

Université de Montréal

Étude du trafic intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1 : rôle
des facteurs de l'hôte

par
Andrés Finzi

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

Mai, 2007

© Andrés Finzi, 2007



w

4

U58

2007

v. 149

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 trafic intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1 : rôle
des facteurs de l'hôte

présentée par :

Andrés Finzi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

M. Paul Jolicoeur Ph.D, président rapporteur

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

M. Roger Lippé Ph.D, membre du jury

M. Michel Tremblay Ph.D, examinateur externe

Représentant du doyen de la FES

Sommaire

L'assemblage de particules rétrovirales est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes en coordination avec différents facteurs de l'hôte. Toutefois, malgré de nombreuses recherches sur ce sujet, le site où l'assemblage du VIH-1 se fait chez les cellules infectées demeure extrêmement controversé. Historiquement, l'assemblage et le bourgeonnement du VIH était sensé de se produire à la membrane plasmique (MP) des cellules infectées. Toutefois, l'accumulation du VIH-1 dans des compartiments intracellulaires, particulièrement chez les macrophages, a donné lieu à une série d'études voulant déterminer le site précis d'assemblage dans plusieurs types cellulaires. De nos jours, deux modèles tentent d'expliquer la présence du virus à la MP ainsi que dans des compartiments intracellulaires. Ainsi, le premier modèle soutient que des compartiments endosomaux représentent des intermédiaires précoces où Gag est ciblé avant d'être relâché à la MP. En revanche, d'autres études ont récemment proposé un modèle où l'assemblage de Gag se produirait principalement à la MP. L'accumulation de Gag et des particules virales dans les compartiments endosomaux serait le résultat de leur internalisation à partir de la surface cellulaire.

Le premier objectif de ce projet de recherche visait à évaluer biochimiquement le trafic intracellulaire de la protéine Gag dans des cellules présentant les deux localisations connues de Gag (MP vs. corps multivésiculaires, CMVs). En fait, nous avons réussi à l'aide d'un fractionnement cellulaire à séparer la MP des endosomes tardifs / CMVs. En couplant ce fractionnement à un court marquage métabolique suivi d'immunoprécipitations anti-Gag nous avons identifié la MP comme étant le principal site d'assemblage du VIH-1 dans les cellules HEK 293T. De plus, nos résultats ont montré que l'accumulation de Gag dans des compartiments endosomaux dépendait de son internalisation à partir de la MP.

Par ailleurs, nos études visant à identifier des facteurs cellulaires capables de moduler le trafic intracellulaire de Gag ont permis d'identifier les molécules classiques du CMH-II, incluant HLA-DR, comme étant suffisantes pour modifier la localisation à l'équilibre de Gag de la MP vers des CMVs. Il faut souligner que nous avons identifié les queues cytoplasmiques de HLA-DR comme étant essentielles à ce processus. Finalement, nous avons montré que la relocalisation de Gag par HLA-DR était modulée par l'enveloppe virale et s'expliquerait par une augmentation de l'internalisation de particules virales matures de la MP vers les CMVs.

Ces études auront donc permis d'identifier le site d'assemblage du VIH-1 dans une lignée cellulaire présentant les deux types de localisation de Gag. Par ailleurs, nos résultats auront amélioré notre compréhension sur les mécanismes cellulaires responsables de l'accumulation de particules virales dans des compartiments endosomaux. Finalement, ces études auront permis de mettre en évidence une nouvelle interaction fonctionnelle entre le VIH-1 et le CMH-II.

Mots clés : VIH-1; Gag; assemblage; trafic intracellulaire; internalisation; membrane plasmique; corps multivésiculaires.

Abstract

Retroviral assembly is a complex mechanism that involves a series of events in close coordination with host cell factors. Despite intensive research, HIV-1 assembly site remains very controversial. It has long been considered that HIV-1 Gag precursors assemble and bud from the plasma membrane (PM). However, recent reports have challenged this notion since in different cells a significant proportion of Gag was also found to localize within intracellular compartments, particularly in macrophages. Two models are emerging from recent studies to explain this dual steady-state Gag localization. The first model postulates that Gag is first inserted into endosomal membranes and then, depending on how the process of endosomal compartments-mediated exocytosis is regulated in specific cell types, either retained or further transported to the PM. In this model, endosomal compartments represent early intermediates where assembly and budding can take place. In contrast, the other model postulates that newly synthesized Gag is first targeted to the PM, where viral assembly and release occur; non-released Gag products are subsequently internalized towards endosomal compartments.

The first goal of this work was to develop a new biochemical tool that would allow the analysis of HIV-1 Gag trafficking in HIV-1-producing cells. In fact, we adapted a sub-cellular fractionation method that efficiently separates PM from late endosomes (LE)/ multivesicular bodies (MVB) compartments in HIV-1 producing cells. By combining this sub-cellular fractionation method to pulse-chase labeling and immunoprecipitation analysis of Gag, we were able to demonstrate that productive HIV-1 assembly takes place at the PM of HEK 293T cells; accumulation of HIV-1 particles within endosomal compartments resulted from PM endocytosis.

In addition, our investigation of cellular host factors influencing HIV-1 Gag trafficking led to the finding that classical MHC-II molecules expression,

including HLA-DR, promoted Gag accumulation into LE/MVB in a process that strictly relied on the cytoplasmic tails of their α and β chains. Importantly, we found that Gag relocation by MHC-II was modulated by the viral envelope and was due to accelerated internalization of mature viral particles from the PM.

Altogether, these studies established that productive HIV-1 assembly takes place at the PM of HEK 293T cells and improved our understanding of HIV-1 accumulation within endosomal compartments. Finally, these results shed light on host cell factors governing the cell type-dependent subcellular location of HIV-1 assembly and budding and revealed a novel functional link between MHC-II molecules and HIV-1.

Key words: HIV-1; Gag; assembly; intracellular trafficking; internalization; plasma membrane; multivesicular bodies.

Table des matières

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
<u>1. Introduction</u>	2
<u>2. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)</u>	3
<u>2.1- Classification</u>	3
<u>2.2- Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)</u>	4
2.2.1- Origine.....	4
2.2.2- Pathologie causée par l'infection au VIH.....	5
2.2.3- Thérapies.....	7
2.3- Structure.....	11
2.4- Organisation génomique.....	11
<u>2.5- Cycle de réplication</u>	16
2.5.1- Entrée virale.....	16
2.5.2- Transcription inverse.....	22
2.5.3- Intégration.....	23
2.5.4- Synthèse des ARNm viraux et de l'ARN génomique...26	

<u>2.5.5- Export et traduction des ARNm viraux</u>	27
<u>2.6- Les protéines de structure : Gag</u>	31
<u>2.6.1- Protéine de la matrice (MA) p17</u>	32
<u>2.6.2- Protéine de la capsid (CA) p24</u>	36
<u>2.6.3- Protéine de la nucléocapsid (NC) p7</u>	37
<u>2.6.4- Protéine p6</u>	38
<u>2.7- Les glycoprotéines d'enveloppe virales</u>	39
<u>2.7.1- Glycoprotéine d'enveloppe gp120</u>	40
<u>2.7.2- Glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire</u> <u>gp41</u>	41
<u>2.7.2.1- L'ectodomaine</u>	41
<u>2.7.2.2- Le domaine transmembranaire</u>	44
<u>2.7.2.3- Le domaine cytoplasmique</u>	44
<u>2.8- Les protéines accessoires</u>	45
<u>2.8.1- Nef</u>	46
<u>2.8.2- Vpr</u>	48
<u>2.8.3- Vif</u>	51
<u>2.8.4- Vpu</u>	53
<u>3- Assemblage et bourgeonnement viral</u>	56
<u>3.1- Ciblage aux membranes : Domaine M</u>	56
<u>3.2- Multimérisation : Domaine I</u>	56
<u>3.3- Bourgeonnement : Domaine L</u>	57
<u>3.3.1- Motif P(T/S)AP</u>	58
<u>3.3.2- Motif YP(X)_nL</u>	59
<u>3.3.3- Motif PPxY</u>	60
<u>4- Site d'assemblage viral : Membrane plasmique (MP) vs corps</u> <u>multivésiculaires (CMVs)</u>	63
<u>4.1- Endosomes tardifs / corps multivésiculaires</u>	66

<u>4.1.1- Complexes endosomaux requis pour le transport (ESCRT)</u>	67
4.1.1.1- <u>ESCRT-I</u>	68
4.1.1.2- <u>ESCRT-II</u>	69
4.1.1.3- <u>ESCRT-III</u>	69
4.1.2- <u>AIP1</u>	73
4.1.3- <u>AMSH</u>	73
4.1.4- <u>Rôle de l'ubiquitination dans la relâche virale</u>	74
4.2- <u>Membrane plasmique</u>	74
4.2.1- <u>Radeaux lipidiques (lipid RAFTS)</u>	76
4.2.2- <u>Microdomaines enrichies en tétraspanines (TEMs)</u>	77
4.3- <u>Facteurs ou mécanismes cellulaires influençant le site d'assemblage viral</u>	78
4.3.1- <u>AP3</u>	79
4.3.2- <u>Phosphatidylinositols</u>	79
4.3.3- <u>Endocytose</u>	80
4.4- <u>Transmission virale : virus libre versus synapse virologique</u>	81
4.4.1- <u>Infection par des virus libres</u>	81
4.4.2- <u>Infection par contact cellule/cellule</u>	82
4.4.3- <u>Stabilité des virus s'accumulant dans les CMVs</u>	83
<u>5- Mécanismes d'internalisation à partir de la membrane plasmique</u>	85
<u>5.1- Endocytose clathrine-dépendante</u>	88
5.1.1- <u>Clathrine</u>	88
5.1.1.1- <u>Protéines adaptatrices</u>	89
5.1.1.2- <u>Assemblage</u>	90
5.1.2- <u>Dynamine</u>	90
5.1.3- <u>Inhibiteurs</u>	91
<u>5.2- Endocytose cavéoline-dépendante</u>	93

<u>5.2.1- Cavéoline</u>	93
<u>5.2.2- Inhibiteurs</u>	95
<u>5.3- Phagocytose</u>	96
<u>5.3.1- Signalisation et extension membranaire</u>	96
<u>5.3.2- Exocytose focale</u>	97
<u>5.3.3- Maturation du phagosome</u>	97
<u>5.3.4- Inhibiteurs</u>	98
<u>6- Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II)</u>	99
<u>6.1- Structure</u>	99
<u>6.2- Diversité, organisation génomique et polymorphisme</u>	103
<u>6.3- Formation du complexe CMH-II/peptide et trafic intracellulaire</u>	103
<u>6.4- Induction des compartiments enrichis en CMH-II (MIIC) dans des cellules épithéliales</u>	106
<u>6.5- Le CMH-II et le VIH-1</u>	107
<u>6.5.1- Incorporation du CMH-II dans la particule virale</u>	107
<u>6.5.2- Diminution de l'expression de surface du CMH-II par la protéine Nef du VIH-1</u>	107
<u>6.5.3- Trafic intracellulaire de Gag et du CMH-II</u>	108
7- Problématique et buts du projet de recherche	109
CHAPITRE 2 (ARTICLE 1): Analysis of HIV-1 Gag trafficking.....	111
CHAPITRE 3 (ARTICLE 2): Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartment.....	161

CHAPITRE 4 (ARTICLE 3): Major histocompatibility complex class II molecules enhance HIV-1 Gag internalization to late endosomal / multivesicular body compartments.....	204
CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....	241
CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET CONTRIBUTIONS MAJEURES	258
CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	262
CHAPITRE 8 : APPENDICE 1 (ARTICLE 4) :.....	328
CHAPITRE 9 : APPENDICE 2 (ARTICLE 5) :.....	346
CHAPITRE 10 : APPENDICE 3 (Figures supplémentaires).....	380

Liste des figures

- Page 9 : Évolution typique de l'infection par le VIH (Figure 1).
- Page 12 : Représentation schématique d'une particule mature du VIH-1 (Figure 2).
- Page 14 : Organisation génétique du VIH-1 (Figure 3).
- Page 18 : Cycle de réplication du VIH-1 (Figure 4).
- Page 20 : Mécanisme hypothétique de la fusion entre la membrane virale et cellulaire (Figure 5).
- Page 24 : Mécanisme de transcription inverse du VIH-1 (Figure 6).
- Page 29 : Schéma simplifié de l'épissage des ARNm du VIH-1 (Figure 7).
- Page 33 : Schéma linéaire de l'organisation du précurseur Gag du VIH-1. (Figure 8)
- Page 42 : Représentation schématique du précurseur d'enveloppe gp160 ainsi que de ses sous-unités de surface (gp120) et transmembranaire (gp41) (Figure 9).
- Page 61 : Représentation schématique des protéines structurales de différents virus enveloppés montrant la localisation de ses domaines L respectifs (Figure 10).
- Page 64 : Modèles du trafic intracellulaire de Gag (Figure 11).
- Page 71: Modèle du réseau d'interactions des protéines de Classe E nécessaire à la biogénèse des vésicules internes dans les CMVs (Figure 12).
- Page 86 : Résumé de deux routes majeures d'endocytose : clathrine- et cavéoline-dépendantes (Figure 13).
- Page 101: Schéma de la structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Figure 14).

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AP :	Protéine adaptatrice
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARN Pol II :	ARN polymérase II
ARNt :	ARN de transfert
CA :	Protéine de la capsid
Cav :	Cavéoline
CAV :	Cavéosome
CD :	Cellules dendritiques
Cdk9 :	kinase-9 cycline-dépendante
ChTx :	Toxine cholérique
CLASP :	« Clathrin-associated sorting proteins »
CLIP:	« class II associated Ii peptide »
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Corps multivésiculaires
CPA :	Cellules présentatrices d'antigènes
CPI :	Complexe de préintégration
CPZ :	Chimpanzé
CRM1 :	« Chromosome Maintenance gene 1 »
CTL :	Lymphocytes T cytotoxiques
CsA :	Cyclosporin A
CTD :	« C-terminal domain »
CTS :	« Central Termination Signal »
CypA :	Cyclophiline A
DC-SIGN:	« DC-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin »
Env :	Enveloppe
ER :	Endosomes de recyclage

Liste des abréviations (suite)

EP :	Endosomes précoces
ESCRT :	« Endosomal Complex Required for Transport »
ET :	Endosomes tardifs
Gag :	« Group-specific antigen »
Gp :	Glycoprotéine
HA :	Protéine hémagglutinine (virus influenza)
HAART:	« Highly Active Antiretroviral Therapy »
HLA :	« Human Leukocyte Antigen »
HTLV :	Virus de la leucémie (lymphotropique) T humaine
Ig :	Immunoglobuline
Ii :	Chaîne invariante
IN :	Intégrase virale
ITAM:	« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif »
IVS:	«Indinavir sulfate»
K44A :	Transdominant négatif de la dynamine
Lamp :	« Lysosomal Associated Membrane Proteins »
LDL :	« Low Density Lipoprotein »
LEDGF/p75:	(« Lens Epithelium-Derived Growth Factor »
LTR :	« Long Terminal Repeat»
LY:	Lysosomes
MA :	Protéine de la matrice
M β CD:	Methyl- β -cyclodextrine
MIIC :	« MHC-II-enriched Compartments »
MHR :	« Major Homology Region »
MLV :	Virus de la leucémie murine
MP :	Membrane Plasmique
Myr-exp :	Exposition de l'acide myristylique
Myr-seq :	Séquestration de l'acide myristylique

Liste des abréviations (suite)

NC :	Protéine de la nucléocapside
Nef :	« Negative factor »
NES :	Signal d'exportation nucléaire
NLS :	Signal de localisation nucléaire
NNRT :	Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse
NRTI :	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
NTD	« N-terminal domain »
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PAK :	p21-activated kinase
PBS :	« Primer-Binding Site »
PI :	« Protease inhibitor »
PI3K :	« phosphatidylinositol 3-kinase »
PI(4,5)P2:	Phosphatidylinositol (PI) 4,5-bisphosphate
Pol :	Polymérase
PR :	Protéase virale
RE :	Réticulum endoplasmique
RILP :	« Rab7-Interacting Lysosomal Protein »
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RRE :	« Rev Response Element »
RSV :	Virus du sarcome de Rous
RT :	Transcriptase inverse
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience humaine acquise
SNARE :	« SNAP-Receptor»
SU :	Domaine de surface de la glycoprotéine de l'enveloppe
TAR :	« <i>trans</i> -activating response element »
TCR :	Récepteur des cellules T
TDN :	Transdominant négatif
TEM :	« Tetraspanin-Enriched Microdomains »

Liste des abréviations (suite)

TGN :	Trans-Golgi Network
TIP47:	« Tail-Interacting Protein of 47 kDa »
TM :	Domaine transmembranaire de la glycoprotéine de l'enveloppe
UEV :	« Ubiquitin E2 Variant »
Vif :	« Viral Infectivity Factor »
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS :	Virus de l'immunodéficience simienne
VLP :	« Virus-like particle »
Vpr :	« Viral Protein R »
Vpu :	« Viral Protein U »
VSV :	Virus de la stomatite vésiculaire

Mamá, papá, les dedico esta tesis por su
pasión, su coraje y su garra

« Petit matin dans le désert, au bord de la mer. Charles Darwin arrive en poussant son laboratoire ambulante. Il ouvre un de ses innombrables tiroirs, prend une feuille de parchemin et jette un coup d'œil sur ses éprouvettes pour en vérifier le contenu....Charles termine sa note, passe en revue ses éprouvettes et les vérifie. D'un tiroir il sort une vieille bouteille crasseuse, la nettoie un peu.....Charles introduit son papier dans la bouteille et la ferme avec un bouchon à épreuve des longues traversées. Puis s'approche du bord de la mer.... regarde l'heure à sa montre de gousset, puis jette la bouteille à la mer. On entend le lent clapotis des vagues ».

Alejandro Finzi, *Fin de siècle sur l'île*

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier mon directeur de recherche, le docteur Éric A. Cohen, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche et son support continu tout au long de mes études. Éric, c'est dans votre laboratoire que j'ai appris à « manipuler », à designer des expériences, à écrire des articles scientifiques, bref, à faire de la recherche! Merci. Je me souviens particulièrement des réunions du groupe « assemblage » lorsqu'on discutait pendant plusieurs heures des résultats obtenus et décisions ensemble des nouvelles expériences à faire, c'était particulièrement formateur. Je tiens aussi à vous remercier pour votre soutien financier, pour votre grande disponibilité ainsi que pour m'avoir donné la possibilité de présenter à plusieurs reprises dans des congrès internationaux, gracias.

Je tiens aussi à remercier Johanne Mercier et Nicole Rougeau pour leur compétence et leur support tant scientifique que moral tout au long de mes études : Johhhhaaaane, j'ai adoré travailler avec toi, merci. Je veux particulièrement remercier le docteur Ghislaine Duisit pour m'avoir enseigné à faire une présentation! pour m'avoir appris à déguster du lapin et pour ses nombreux conseils scientifiques qui deviennent précieux devant une paillasse. Je tiens à remercier Alexandre Orthwein avec qui nous avons travaillé très fort pour la mise au point du gradient. Je veux remercier les docteurs Yong Xiao, Alexandre Brunet et Jacques Thibodeau pour leur soutien et leur contribution au papier « DR ». Un merci chaleureux à tous les membres de l'équipe du docteur Cohen que j'ai eu la chance de côtoyer, particulièrement Patrick Lebrun et les docteurs Mélanie Wellman et Guillermo Cervantes-Acosta. Je veux aussi remercier tout le personnel de l'IRCM qui font un travail exceptionnel à chaque jour pour que nous puissions nous concentrer sur notre recherche; spécialement à Annie pour son aide précieuse en microscopie

électronique. Je tiens aussi à remercier le docteur Martin Clément pour m'avoir grandement aidé au début de mes études graduées.

Je veux surtout remercier ma femme Gaëlle pour son support continu pendant toutes ces années et ma fille Clara avec qui j'ai écrit la plus grande partie de cette thèse (sur les genoux, bien entendu)! Je veux remercier mes parents (« mis viejos ») et mon frère Daniel pour leur présence malgré la distance. Je veux aussi dire un grand merci à mes familles québécoises : Antonio et Marie-Thérèse, Bob et Yolande, Roland et Ginette, gracias!

J'ai pu faire ces études grâce au soutien financier de mon patron, du Département de Microbiologie et Immunologie, aux Instituts de Recherche en Santé du Canada, à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal ainsi qu'à la Faculté des Études Supérieures (pour leur bourse d'exemption des frais supplémentaires pour les étudiants étrangers).

CHAPITRE 1:
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Introduction

Les premiers cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ont été rapportés en 1981. Depuis la découverte de l'agent étiologique de cette maladie, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le nombre total d'infections ne cesse d'augmenter, notamment en Afrique Subsaharienne, en Asie de l'Est et dans les Caraïbes. Les plus récentes données générées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent que vers la fin de l'année 2005, 38,6 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde et ce nombre ne cesse d'augmenter.

La difficulté à contrôler cette pandémie est en partie due au fait que le VIH s'attaque directement au système immunitaire. En fait, ce virus infecte plusieurs cellules du système immunitaire incluant les lymphocytes T CD4, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. La caractéristique principale de l'infection au VIH-1 est l'affaiblissement progressif du système immunitaire à un point tel que l'individu infecté devient susceptible à des infections opportunistes et l'émergence de certains cancers.

Toutes les composantes nécessaires à la formation d'une particule virale doivent se réunir à un site déterminé de la cellule et s'assembler de façon coordonnée afin de former une particule virale infectieuse. Toutefois, malgré d'énormes progrès scientifiques réalisés dans ce domaine de recherche depuis quelques années plusieurs aspects demeurent mal compris. Par exemple, le compartiment cellulaire où l'assemblage du VIH se fait ainsi que l'impact que cet endroit peut avoir sur la pathogénèse virale ne sont toujours pas bien établis. De plus, la route que la protéine structurale Gag emprunte afin de se rendre au site d'assemblage viral demeure un sujet très controversé.

Dans cette revue de la littérature, un portrait global du VIH, suivi d'un résumé des connaissances actuelles sur les mécanismes d'assemblage, bourgeonnement et relâche virales seront présentés. Une attention

particulière sera portée sur les mécanismes viraux et cellulaires responsables de l'assemblage du VIH-1 ainsi que sur les compartiments cellulaires où ce processus pourrait avoir lieu.

2. Le virus de l'immunodéficience humaine

2.1 Classification

En fonction de la similarité de séquence de la reverse transcriptase (RT), la grande famille des Retroviridae a été divisée en sept genres : Alpha-rétrovirus, Beta-rétrovirus, Gamma-rétrovirus, Delta-rétrovirus, Epsilon-rétrovirus, Spuma-rétrovirus et Lentivirus. Ces différents genres se divisent en rétrovirus simples (Alpha-rétrovirus, Beta-rétrovirus et Gamma-rétrovirus) car ils ne possèdent que les gènes *gag*, *pol* et *env* et en rétrovirus complexes (Delta-rétrovirus, Epsilon-rétrovirus, Spuma-rétrovirus et Lentivirus). En effet, ces derniers possèdent en plus de ces trois gènes, d'autres qui codent pour des protéines régulatrices et auxiliaires. Le genre Lentivirus (ce qui signifie virus lent, en latin) comprend cinq groupes incluant les lentivirus équin, bovin, félin, ovin/caprin ainsi que des primates.

Comme leur nom l'indique, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1 ou de type 2 ainsi que le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) font partie des lentivirus des primates. En fonction de leur identité de séquences, le VIH-1 a été divisé en trois groupes : M (« Main »), N (« New ») et O (« Outlier »). Le groupe M qui est prédominant a évolué en au moins neuf sous-types (A,B,C,D,F,G,H,J et K), ainsi que plusieurs formes recombinantes (Korber, Gaschen et al. 2001; Thomson and Najera 2005).

2.2 Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)

2.2.1 Origine

Les premiers cas de SIDA ont été rapportés en 1981 chez un groupe d'hommes présentant une immunodéficience sévère avec des infections opportunistes rares (CDC 1981). Il a fallu attendre deux ans avant que le VIH-1 soit isolé et identifié, par des chercheurs de l'Institut Pasteur à Paris et des chercheurs du « National Institutes of Health's National Cancer Institute » aux États-Unis, comme étant l'agent étiologique du SIDA (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Sarin et al. 1983). Trois ans plus tard, un deuxième rétrovirus humain, le VIH-2, était identifié chez les populations d'Afrique de l'ouest (Clavel, Guetard et al. 1986; Clavel, Guyader et al. 1986). Phylogénétiquement, le VIH-1 et VIH-2 sont relativement éloignés, reflétant une origine différente. Des analyses de séquence ont identifié le macaque à face de suie (*Cercocebus atys*) comme étant le réservoir naturel du VIH-2 (Hirsch, Olmsted et al. 1989). Par contre, le VIH-1 est proche quant à lui du VIScpz (VIS du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*). Des études de comparaison de séquences entre le VIScpz présent chez des chimpanzés captifs originaires du bassin du Congo et le VIH ont démontré que l'homme a acquis le VIH-1 à au moins trois occasions indépendantes, donnant lieu aux groupes M, N et O (Gao, Bailes et al. 1999). Des études récentes ont finalement prouvé la présence du virus non seulement chez les chimpanzés captifs mais également chez les singes sauvages, confirmant ainsi *Pan troglodytes troglodytes* comme le réservoir naturel du VIH-1 (Keele, Van Heuverswyn et al. 2006). Le mode de transmission du virus entre le singe et l'homme a généré un grand nombre d'hypothèses au cours des derniers années; toutefois, des nouvelles études ont montré que le VIH s'est vraisemblablement transmis à l'homme par la chasse et la consommation de viande de brousse infectée (Chitnis, Rawls et al. 2000). En effet, cette hypothèse a récemment été démontrée chez un groupe de chasseurs du Cameroun chez qui on observait, suite à leur activités de chasse, un haut taux d'infection par différents rétrovirus simiens (Wolfe, Switzer et al. 2004).

2.2.2- Pathologie causée par l'infection au VIH

L'infection par le VIH se produit via le transfert de liquides organiques tels que le sang, le sperme, le fluide vaginal ou le lait provenant d'une personne activement infectée. Il se transmet donc principalement par des rapports sexuels, par de aiguilles contaminées, notamment chez les utilisateurs de drogues intraveineuses, ainsi que de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou l'allaitement.

Le VIH-1 infecte plusieurs types cellulaires incluant les lymphocytes T CD4, piliers du système immunitaire, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ainsi que certaines cellules du système nerveux central (Rosenberg and Fauci 1989). La caractéristique principale de l'infection au VIH-1 est une diminution graduelle des lymphocytes T CD4 naïfs et mémoires (Levy 1993). Le SIDA représente le stade le plus évolué de l'infection qui se déroule en trois étapes (Figure 1) : la primo-infection, la phase asymptomatique et la phase SIDA.

La primo-infection a lieu pendant les premières semaines suite à l'infection. Elle se caractérise par des symptômes qui ressemblent à ceux de la grippe ou d'une mononucléose (Levy 1993). Une diminution importante des lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique (Gaines, von Sydow et al. 1990) ainsi qu'une virémie élevée favorisent la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme pendant cette période (Clark, Saag et al. 1991; Daar, Moudgil et al. 1991). Cette phase initiale est suivie, pratiquement chez tous les individus infectés, par une réponse immunitaire spécifique qui contribue à diminuer drastiquement les titres viraux dans le sang périphérique ainsi qu'à stabiliser temporairement le nombre de lymphocytes T CD4+ (Ho, Rota et al. 1985; Cooper, Imrie et al. 1987; Gaines, von Sydow et al. 1987). Cette amélioration est principalement due à l'apparition de lymphocytes T CD8 cytotoxiques, spécifiques à certains antigènes du VIH (Koup, Safrit et al. 1994; Pantaleo, Demarest et al. 1994). La réponse humorale est aussi activée

pendant cette période et résulte dans la production d'anticorps spécifiques au VIH (séroconversion) (Koup, Safrit et al. 1994).

La primo-infection est suivie par une période caractérisée par l'absence de manifestations cliniques (asymptomatique). Toutefois, même si la réplication virale diminue, elle est toujours présente et résulte dans une diminution graduelle de la fonction et du nombre de lymphocytes T CD4 (Wyand, Ringler et al. 1989; Pantaleo, Graziosi et al. 1993; Piatak, Saag et al. 1993). Cette période varie énormément d'un individu à un autre mais de façon générale elle peut s'étendre pendant une dizaine d'années avant d'atteindre la phase symptomatique (Lemp, Payne et al. 1990; Lemp, Payne et al. 1990).

Lorsque le nombre de lymphocytes T CD4 passe en dessous du seuil critique de 200 cellules/ μ l de sang périphérique, le système immunitaire est tellement affaibli que l'individu infecté devient susceptible à des infections opportunistes et l'émergence de certains cancers. Ainsi, des infections dont la plupart sont normalement contrôlées par une immunité à médiation cellulaire axée sur les cellules T CD4 apparaissent : le muguet (*Candida*), la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), le zona, causé par une réactivation du virus herpès zoster, des lymphomes à cellules B et le sarcome de Kaposi. Finalement, à une date plus tardive, des pneumonies à *Pneumocystis carinii* ainsi que des infections par cytomégalovirus ou par *Mycobacterium avium* apparaissent chez les personnes sidatiques (Coffin, Varmus. 1997).

Les plus récentes données générées par l'OMS indiquent que 38,6 millions de personnes sont infectées par le VIH dans le monde. Seulement en 2005, 4,1 millions d'individus l'ont nouvellement contracté et presque 3 millions de personnes ont perdu la vie à cause du SIDA. Toutefois, malgré une certaine stabilisation à la fin des années 1990, l'épidémie continue de

faire des ravages dans plusieurs régions du globe, particulièrement en Afrique subsaharienne, en Asie de l'Est et dans les Caraïbes (ONUSIDA, 2006).

2.2.2- Thérapies

L'espérance de vie des personnes sidatiques ayant accès à des thérapies antirétrovirales a complètement changée depuis la description des premiers cas. De nos jours, la moyenne de survie des patients infectés au VIH (ayant accès aux nouveaux traitements), dépasse les 10 ans; en fait, la moyenne de survie pour ces patients n'est pas encore bien établie car les nouveaux médicaments n'ont été introduits qu'il y a 10 ans seulement (Hogg, O'Shaughnessy et al. 1997). Cette amélioration peut être attribuée à divers facteurs incluant le développement de thérapies antirétrovirales efficaces, une détection précoce des personnes infectées et une meilleure compréhension des mécanismes de résistance virale. Par ailleurs, il a été bien établi que la combinaison de drogues anti-VIH est plus efficace qu'une monothérapie (Richman 2001). En effet, leur combinaison réduit l'émergence de virus résistants aux traitements car le nombre de mutations requises pour échapper aux inhibiteurs diminue le « fitness » viral. Les thérapies antirétrovirales ciblent maintenant trois étapes du cycle de réplication du VIH : la transcription inverse, la maturation protéolytique et finalement la fusion virale. D'ailleurs, la trithérapie, aussi connue sous le nom de HAART (pour « Highly Active Antiretroviral Therapy »), représente maintenant le standard pour traiter les personnes infectées au VIH. Elle comprend des inhibiteurs de la protéase virale (PI) ou des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRT) en combinaison avec deux autres inhibiteurs nucléosidiques de la même enzyme (NRTI). Malheureusement, ce traitement n'est toujours pas bien toléré par les patients, il requiert de la discipline, il est coûteux et finalement il peut mener à l'apparition d'isolats viraux multirésistants. Toutefois, en absence d'un vaccin efficace contre le VIH, ce traitement demeure la seule thérapie viable; ce qui souligne la nécessité de développer des nouvelles molécules qui soient mieux tolérées par les patients

ainsi que d'identifier des nouvelles cibles virales permettant de rendre cette thérapie plus efficace. En ce sens, des inhibiteurs de l'entrée virale ont récemment été développés. Par exemple, l'enfuvirtide (aussi connu sous le nom de T20) qui est un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 127-162 de la glycoprotéine d'enveloppe 41 (gp41), empêche la fusion des membranes virales et cellulaires, diminuant ainsi le taux de virémie chez les patients infectés (Fletcher 2003; Matthews, Salgo et al. 2004). De plus, des antagonistes des corécepteurs viraux, essentiels à l'entrée virale, sont présentement en phase clinique (Este and Telenti 2007). Finalement, une autre cible potentielle à l'étude est la troisième enzyme virale : l'intégrase. Des inhibiteurs contre l'intégrase ont récemment été développés et se sont montrés efficaces pour diminuer la virémie dans des modèles animaux (Hazuda, Young et al. 2004).

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques ne peut à lui seul diminuer l'ampleur de la pandémie causée par le VIH; il faut que ces médicaments soient accessibles aux personnes infectées. Or, tel que mentionné précédemment, la majorité des personnes infectées se trouvent dans des pays en voie de développement et ne possèdent pas les moyens nécessaires pour se les procurer. Bien que dans les dernières années l'extension de l'accès aux traitements ait permis d'éviter entre 250 000 et 350 000 décès (pour la période allant de 2003 à 2005), il ne reste pas moins qu'à l'échelle mondiale les médicaments ne parviennent qu'à seulement 20% des personnes ayant besoin du traitement. Parmi les obstacles à l'élargissement des traitements, on peut noter, en plus des coûts, la concentration des lieux de traitement dans les zones urbaines, et l'insuffisance des efforts déployés pour répondre aux besoins des populations vulnérables incluant les professionnel(le)s du sexe, les hommes qui ont des rapports sexuels avec des hommes, les consommateurs de drogues injectables, les détenus et les réfugiés (ONUSIDA, 2006).

Figure 1 : Évolution typique de l'infection par le VIH. 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 et adaptée pour les besoins de cette revue.

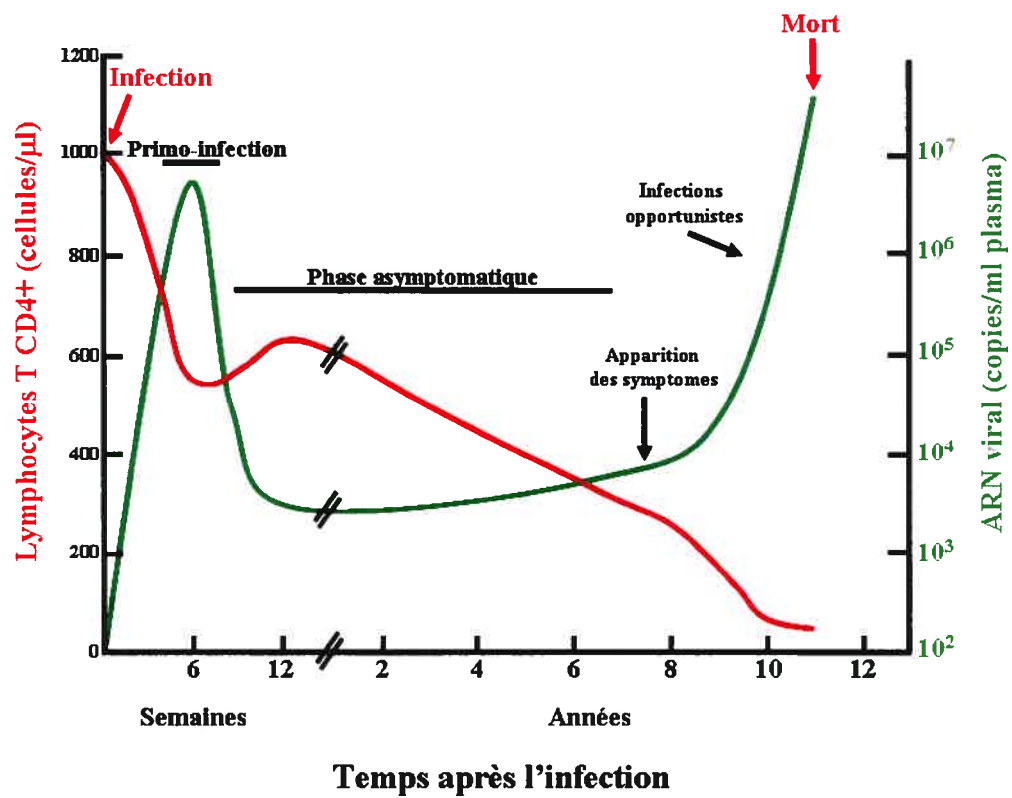


Figure 1

2.3- Structure

Lors de son identification, la présence de la transcriptase inverse (RT) dans les particules virales a permis à l'équipe de l'Institut Pasteur de classer le VIH dans la famille des Rétrovirus (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). Le rôle de cette enzyme est de convertir l'ARN génomique en une molécule d'ADN double brin linéaire qui s'intégrera par la suite dans le génome de la cellule hôte. La transcription de cet ADN proviral par la machinerie cellulaire génère des molécules d'ARN qui servent soit à la production des protéines virales, soit à fournir les deux molécules d'ARN génomique (à polarité positive) encapsidées dans la particule virale. Le matériel génétique ainsi que certaines protéines virales indispensables à la réplication virale (protéase, transcriptase inverse et intégrase) se trouvent à l'intérieur de la capsid (« core ») qui a une forme conique caractéristique. Ces particules virales, avec un diamètre de 80 à 100 nm, sont enveloppées et possèdent à leur surface des trimères des glycoprotéines d'enveloppe qui permettent leur attachement à la surface de la cellule hôte (Figure 2).

2.4- Organisation génomique

À l'instar de tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 (approximativement 9200 paires de base) est flanqué à chaque extrémité par deux longues séquences terminales répétées identiques ou LTR (« Long Terminal Repeat »). Ces séquences sont importantes pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire ainsi que pour l'expression des gènes viraux (Reicin, Kalpana et al. 1995). Toutefois, à la différence des rétrovirus simples qui possèdent seulement les gènes *gag* (« group-specific antigen »), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), le VIH-1 possède neuf cadres de lecture ouverts qui codent pour 15 protéines distinctes (Figure 3) (Frankel and Young 1998). Comme c'est le cas pour tous les rétrovirus, les gènes *gag*, *pol* et *env* sont synthétisés sous forme de précurseurs polyprotéiques qui sont par la suite

Figure 2 : Représentation schématique d'une particule mature du VIH-1. La matrice (MA) lie la membrane virale tandis que la capsid (CA) forme le noyau central du virus qui contient les deux copies d'ARN génomique du virus. Le matériel génétique est encapsidé et protégé par la nucléocapside (NC). Les enzymes virales nécessaires au cycle de réplication incluant la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) se retrouvent aussi à l'intérieur de la particule virale et sont impliquées dans la maturation du virus, la transcription inverse et l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte. Les molécules d'enveloppe se retrouvent à la surface virale sous forme trimérique. Elles sont constituées d'un domaine de surface (SU) qui assure la liaison au récepteur CD4 ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM) qui possède un peptide fusogénique, essentiel à la fusion des membranes virales et cellulaires. Finalement, d'autres protéines virales, dont Vpr (impliqué dans l'import nucléaire du complexe de préintégration), sont aussi incorporées dans les virions.

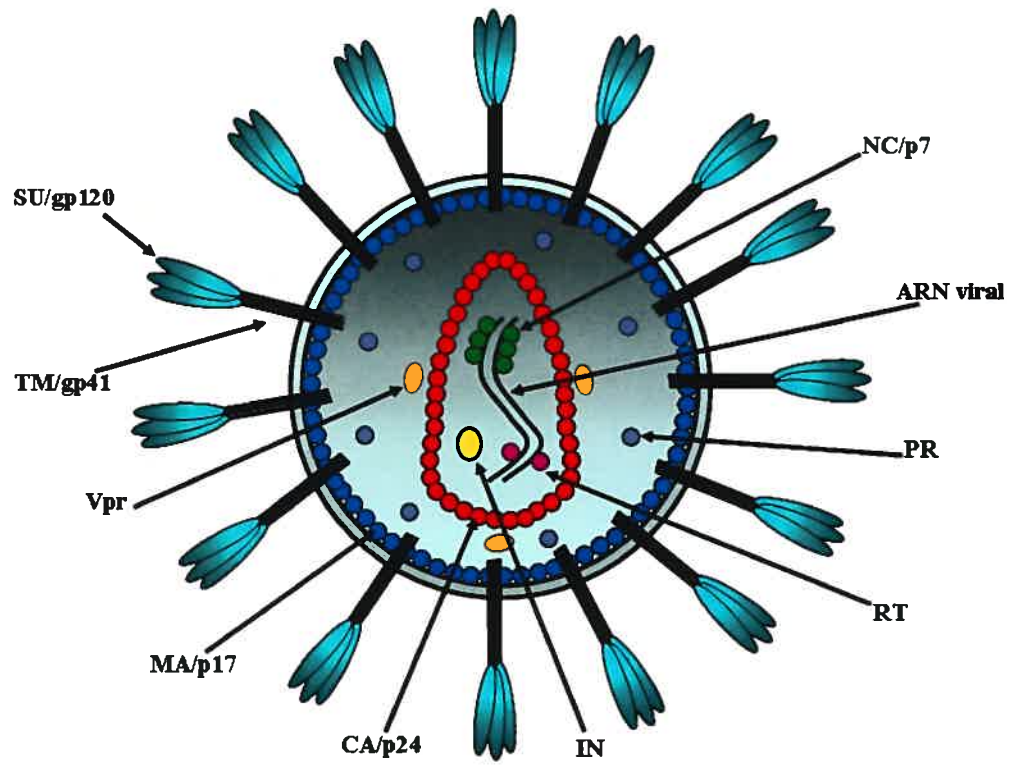


Figure 2

Figure 3 : Organisation génétique du VIH-1. En plus des gènes communs à tous les rétrovirus (*gag*, *pol* et *env*), le VIH-1 possède deux protéines régulatrices, Tat et Rev et quatre protéines accessoires : Vif, Vpr, Vpu et Nef. Les produits des précurseurs polyprotéiques Gag, Gag-Pol et Env sont indiqués ainsi que leur poids moléculaire.

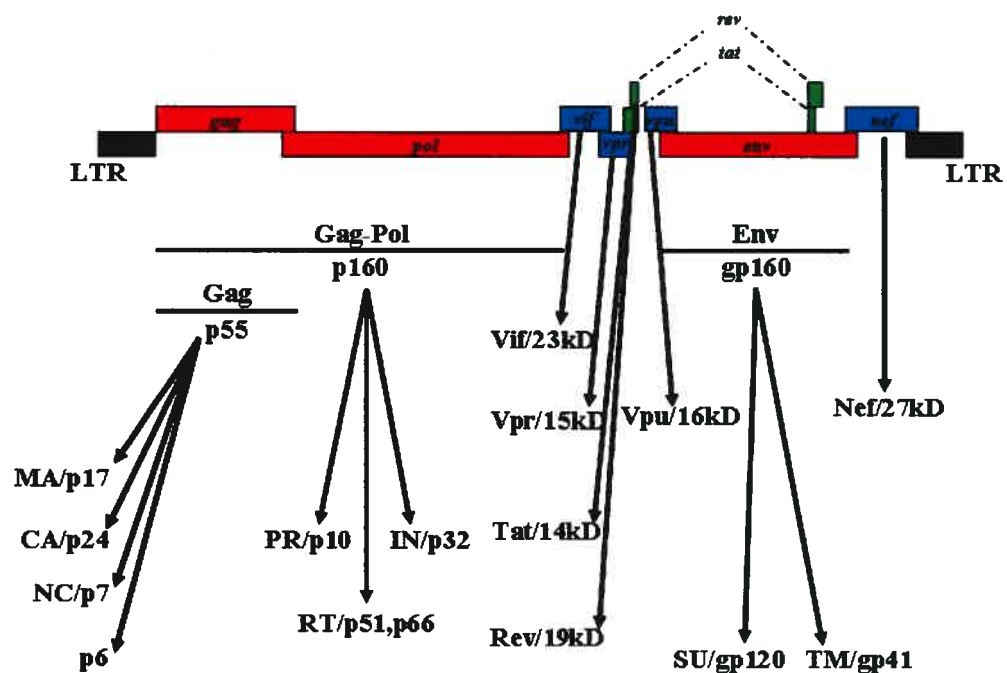


Figure 3

clivés par la protéase virale ou des protéases cellulaires. Ainsi, le précurseur Gag suite à son clivage par la protéase virale (PR) génère la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24), la nucléocapside (NC) et la protéine p6 (Freed 1998). Le précurseur Pol, aussi clivé par la protéase virale, dégage les protéines PR (libérée par un mécanisme d'autocatalyse), la RT et l'intégrase (IN). Le précurseur Env est quant à lui clivé par des proprotéines convertases cellulaires qui se trouvent dans l'appareil de Golgi et génère la glycoprotéine de surface gp120 ainsi que la glycoprotéine transmembranaire gp41 (Decroly, Vandenbranden et al. 1994; Decroly, Benjannet et al. 1997). En outre, le VIH-1 code pour six protéines supplémentaires : deux protéines régulatrices (Tat et Rev) et quatre protéines accessoires : Vpu (« Viral Protein U »), Nef (« NEgatif Factor »), Vpr (« Viral Protein R ») et Vif (« Virus Infectivity Factor »).

2.5- Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH peut se diviser en une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce comprend les événements aboutissant à l'intégration de l'ADN proviral tandis que l'étape tardive comprend les événements qui débutent par la transcription du provirus et se termine par la relâche et la maturation des nouvelles particules virales (Figure 4) (Freed 2001).

2.5.1- Entrée virale

La première étape d'une infection par le VIH nécessite l'attachement du virus à la cellule cible. Ceci se produit via une reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur cellulaire CD4 qui se trouve principalement à la surface des lymphocytes T CD4+ et des macrophages (Dalglish, Beverley et al. 1984; Maddon, Dalglish et al. 1986). La liaison gp120/CD4 n'est toutefois pas suffisante pour assurer l'infection de la cellule. En effet, il y a des cellules chez qui l'expression du récepteur CD4 ne peut les rendre susceptibles à l'infection (Chesebro, Buller et al. 1990;

Clapham, Blanc et al. 1991). Deux autres molécules furent identifiées comme étant nécessaires à l'établissement de l'infection : les corécepteurs CXCR4 (Feng, Broder et al. 1996) et CCR5 (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Deng, Liu et al. 1996; Doranz, Rucker et al. 1996). Ces deux molécules sont des récepteurs de chimiokines et définissent le tropisme des différentes souches du VIH. Ainsi, les isolats M (Macrophage)-tropiques utilisent le co-récepteur CCR5 (R5), tandis que les isolats T (lymphocytes T)-tropiques utilisent le co-récepteur CXCR4 (X4); certaines souches peuvent utiliser les deux co-récepteurs et sont dites à double tropisme (X4/R5).

L'importance des corécepteurs dans la réplication du VIH-1 est illustrée par le fait que certains individus possédant l'allèle CCR5/ Δ 32 sont moins susceptibles de contracter le VIH. En effet, la protéine codée par cet allèle est tronquée, le corécepteur ne peut être exprimé à la surface cellulaire ce qui empêche l'infection par les souches M-tropiques (Dean, Carrington et al. 1996; Huang, Paxton et al. 1996; Liu, Paxton et al. 1996; Samson, Libert et al. 1996).

Le déterminant viral responsable du tropisme a quant à lui été identifié dans une région d'Env : suite à l'interaction de la gp120 avec CD4 un changement conformationnel se produit dans la gp120. Ceci résulte dans l'exposition de la boucle V₃ qui se trouve enfouie à l'intérieur de la gp120. Cette boucle interagit de façon sélective avec le corécepteur de la cellule cible et devient ainsi responsable du tropisme viral (Hwang, Boyle et al. 1991; Shioda, Levy et al. 1991). Suite à la formation du complexe gp120/CD4/corécepteur, un autre changement conformationnel expose le peptide de fusion de la gp41 et entraîne la fusion des membranes virales et cellulaires; permettant l'entrée de la capsid dans la cellule (Figure 5) (Sattentau and Moore 1991).

Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1. L'enveloppe du VIH-1 interagit avec CD4 et les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 (1). Suite à la fusion membranaire, il y a décapsidation (2) et relâche du complexe de transcription inverse dans le cytoplasme. La transcription inverse (3) permet de copier le génome ARN simple brin de polarité positive du virus en ADN double brin. Le complexe de préintégration (CPI) permet ensuite d'introduire le matériel génétique dans le noyau de la cellule (4) où l'intégrase virale (qui fait partie du CPI) intègre le génome viral au chromosome cellulaire (5). La transcription virale (6) permet de produire des ARNm; une partie de ces ARNm nécessitent la protéine Rev pour quitter le noyau (7). Les protéines de l'enveloppe sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) tandis que les précurseurs Gag et Gag-Pol le sont dans le cytoplasme. Finalement, toutes les composantes virales s'assemblent (8) pour former des particules virales qui sont maturées pendant leur bourgeonnement / relâche.

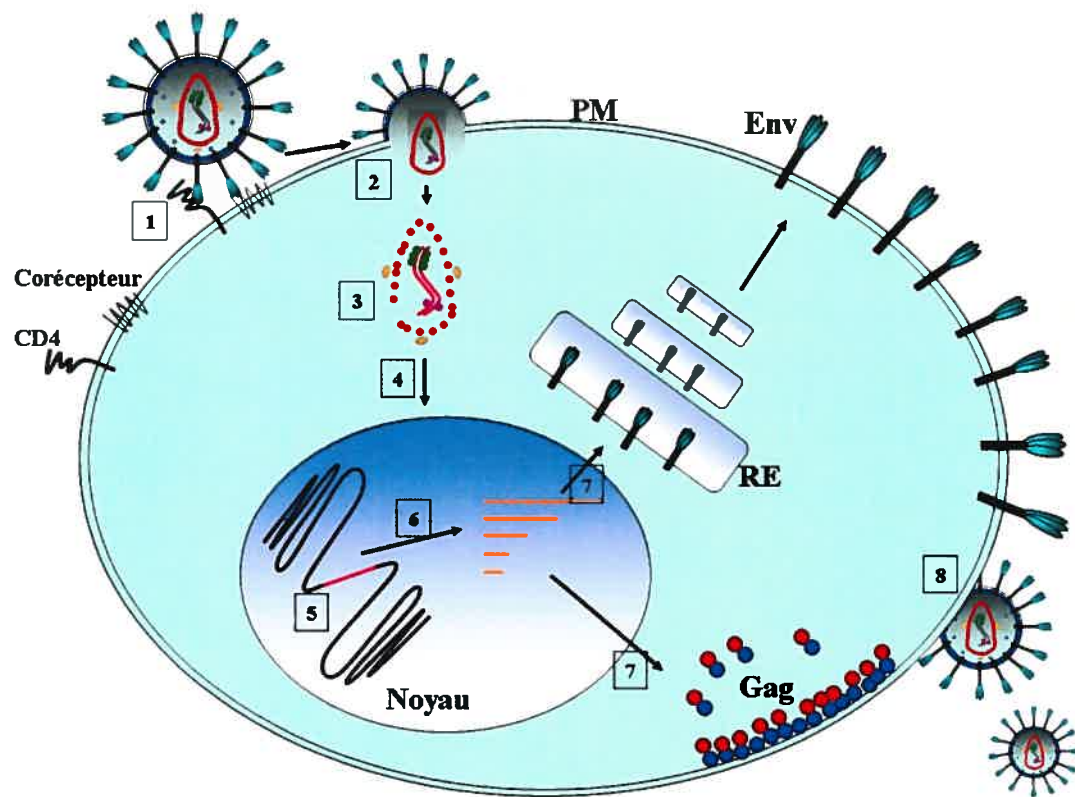


Figure 4

Figure 5 : Mécanisme hypothétique de la fusion entre la membrane virale et cellulaire. L'interaction entre la gp120 et le récepteur CD4 (1) induit un changement conformationnel qui permet à la gp120 de lier son corécepteur (CXCR4 or CCR5) (2). Suite à cette interaction, d'autres changements conformationnels exposent le peptide de fusion (en rouge) de la gp41 (3). Ce peptide s'insère dans la membrane plasmique de la cellule hôte et induit sa fusion avec la membrane virale.

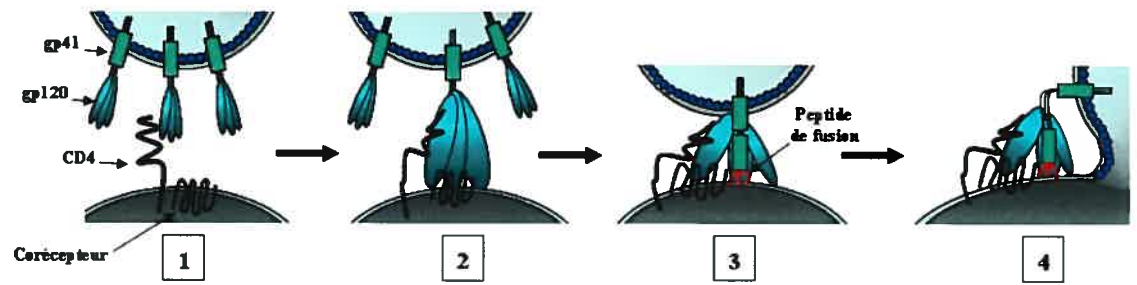


Figure 5

2.5.2- Transcription inverse

Le processus de transcription inverse est initié dans la capsid virale; toutefois, la déstructuration de la capsid (décapsidation), suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, est essentielle au progrès de la transcription inverse (Auewarakul, Wacharapornin et al. 2005). La décapsidation permet la relâche dans le cytoplasme d'un complexe contenant l'ARN génomique viral, un ARN de transfert (l'ARN_t^{lys}) ainsi que des protéines virales et cellulaires essentielles à la conversion de l'ARN génomique viral en ADN bicaténaire. Ce processus complexe se fait en sept étapes distinctes (Figure 6) et nécessite les trois activités enzymatiques de la RT : polymérisation d'ADN à partir d'un brin d'ARN (activité polymérase ARN-dépendante), activité ribonucléase (RNaseH) et polymérisation d'ADN à partir d'un brin d'ADN (activité polymérase ADN-dépendante) :

- 1- La synthèse du brin de polarité négative commence à l'aide de l'extrémité 3' de l'ARN_t^{lys}, encapsidé sélectivement dans la particule virale (Jiang, Mak et al. 1993; Mak, Jiang et al. 1994), qui se trouve apparié au « primer-binding site » (PBS) sur l'ARN génomique. La synthèse d'ADN se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' du génome.
- 2- L'activité RNaseH de la RT digère spécifiquement la portion ARN de l'hybride ARN/ADN nouvellement formé ce qui permet de libérer un court fragment d'ADN simple brin (« minus strand strong-stop DNA »).
- 3- Ce court fragment d'ADN est transféré à l'extrémité 3' du génome où il s'hybride avec la région répétée (R) qui se trouve à chaque extrémité du génome dans les LTR. La NC (Darlix, Vincent et al. 1993) et l'actine (Hooker and Harrich 2003) semblent faciliter ce transfert.

- 4- Il s'ensuit une synthèse d'ADN du brin de polarité négative et l'activité RNaseH dégrade au fur et à mesure le brin d'ARN de l'hybride ARN/ADN nouvellement formé.
- 5- Certains endroits du génome (le PPT; « polypurine tract ») résistent à la dégradation de l'ARN par l'activité RNaseH et servent comme amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive (Charneau, Alizon et al. 1992).
- 6- L'activité RNaseH enlève l'ARNt₃^{lys} qui a servi d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité négative (étape 1). Ceci expose la région PBS à l'extrémité 3' du brin d'ADN de polarité positive nouvellement synthétisé et permet l'hybridation avec sa région PBS homologue chez le brin d'ADN de polarité négative.
- 7- Suite au second transfert de brin, l'élongation se poursuit sur les brins de polarité négative et positive (chaque brin sert de matrice à l'autre brin). L'élongation du brin de polarité positive se termine dans la région CTS (« central termination signal ») après le déplacement d'une centaine de nucléotides qui se superposent à l'ADN bicaténaire (Charneau, Mirambeau et al. 1994). Cette structure, appelée « DNA flap », semble jouer un rôle important dans les étapes ultérieures lors de l'import nucléaire du complexe de préintégration (CPI) (Zennou, Petit et al. 2000; Ao, Yao et al. 2004).

2.5.3- Intégration

Une caractéristique des lentivirus est leur capacité à infecter des cellules qui ne se divisent pas. Pour cela, ils doivent transporter leur matériel génétique à l'intérieur du noyau à travers les pores nucléaires à l'aide du CPI. Le CPI comprend l'ADN proviral nouvellement synthétisé, certaines protéines virales dont l'intégrase, la MA, la RT et Vpr (Bukrinsky and Haffar 1998) ainsi que certaines protéines

Figure 6 : Mécanisme de transcription inverse du VIH-1 (voir le texte de la section 2.5.2 pour les détails). Cette figure a été adaptée pour les besoins de cette revue à partir de la quatrième édition de « Fundamental Virology », Knipe DM., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. et Straus S. 2001. Lippincott Williams and Wilkins, 1395 pages.

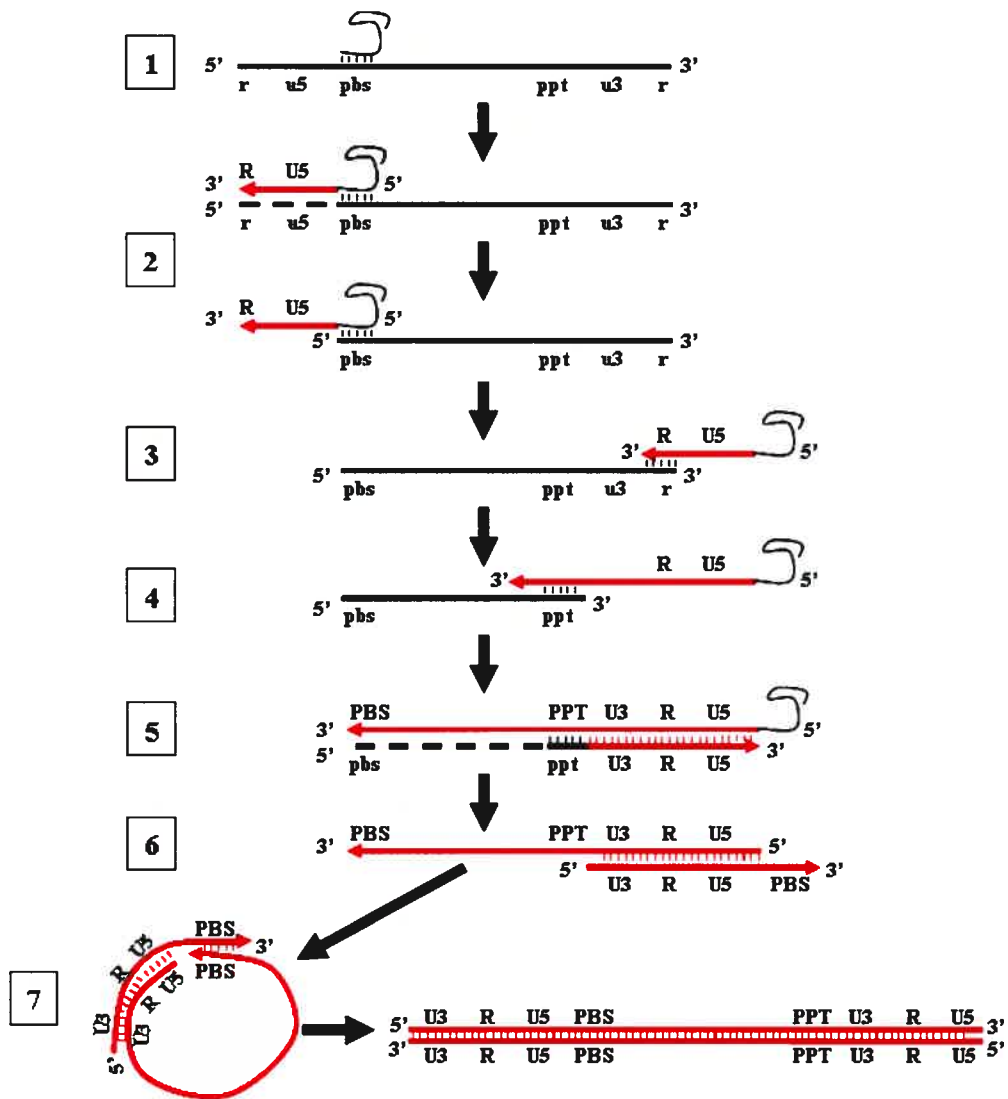


Figure 6

cellulaires (Suzuki and Craigie 2007). La présence des signaux de localisation nucléaire chez IN (Gallay, Hope et al. 1997; Bouyac-Bertoia, Dvorin et al. 2001), MA (Bukrinsky, Haggerty et al. 1993; Haffar, Popov et al. 2000) et Vpr (Subbramanian, Yao et al. 1998) ainsi que le « DNA flap » (Zennou, Petit et al. 2000; Ao, Yao et al. 2004) faciliteraient ce processus.

Une fois que l'ADN proviral est rentré dans le noyau, l'intégrase virale catalyse l'intégration du provirus au génome cellulaire. L'intégrase reconnaît les deux LTR et clive à chaque extrémité 3' deux paires de base, créant ainsi des extrémités 3'-hydroxyle qui servent ensuite à l'intégration du provirus. L'intégrase clive aussi l'ADN génomique et suite à une étape de trans-estérification, les extrémités 3'-hydroxyle de l'ADN proviral sont liguées aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cellulaire. L'intégration se termine par la réparation du site d'intégration par la machinerie cellulaire (Brown, Bowerman et al. 1989). Il a été rapporté que l'ADN proviral du VIH-1 s'intègre préférentiellement dans des gènes actifs (Schroder, Shinn et al. 2002). Toutefois, les mécanismes sous-jacents ainsi que les facteurs cellulaires responsables de ce choix demeuraient jusqu'à récemment complètement inconnus. L'identification de la protéine LEDGF/p75 (« lens epithelium-derived growth factor ») comme partenaire de l'intégrase virale a commencé à éclairer ce sujet (Cherepanov, Maertens et al. 2003). En effet, ce facteur cellulaire, identifié comme étant un partenaire essentiel à l'intégration provirale (Llano, Saenz et al. 2006), semble avoir la capacité de contrôler le site d'intégration proviral (Ciuffi, Llano et al. 2005).

2.5.4- Synthèse des ARNm viraux et de l'ARN génomique

Dans le contexte de l'ADN viral intégré, le rôle principal du LTR situé en 5' du génome est la régulation de la transcription. En ce sens, le LTR possède une séquence promotrice (boîte TATA) et des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription, incluant SP1, qui permettent le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN Pol-II) au niveau du site d'initiation de la

transcription (Li, Flanagan et al. 1994). La phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN Pol-II (domaine CTD) est essentielle à l'initiation de la transcription (Lu, Zawel et al. 1992; Ohkuma and Roeder 1994).

De plus, la transcription est modulée par l'activation de la cellule infectée. Ainsi, l'activation cellulaire induit la relocalisation du facteur nucléaire NF- κ B du cytoplasme vers le noyau (Kerr, Inoue et al. 1991; Palombella, Rando et al. 1994). Le facteur NF- κ B peut alors se fixer sur le domaine activateur (« enhancer ») présent dans la région 5' du LTR (Siekevitz, Josephs et al. 1987; Leonard, Parrott et al. 1989) et augmente le taux d'initiation et d'élongation de la transcription (Barboric, Nissen et al. 2001). Au début de la transcription, la faible capacité intrinsèque d'élongation de l'ARN Pol-II entraîne la synthèse de courts transcrits épissés non-polyadénylés à partir desquels les protéines Tat, Rev et Nef sont synthétisées (Kim, Byrn et al. 1989).

La protéine Tat nouvellement synthétisée joue un rôle clé dans l'activation de la transcription virale car elle augmente drastiquement la processivité de l'ARN Pol-II. Afin d'y arriver Tat lie une tige-boucle d'ARN appelée TAR (« *trans*-activating response element ») (Dingwall, Ernberg et al. 1989; Roy, Delling et al. 1990) et recrute la cycline T1, la protéine kinase-9 cycline-dépendante (Cdk9) ainsi que le facteur d'élongation de la transcription b (TEF b) qui hyperphosphorylent le CTD de l'ARN Pol-II. C'est cette hyperphosphorylation qui entraîne l'augmentation de la processivité de l'ARN Pol-II (Mancebo, Lee et al. 1997; Wei, Garber et al. 1998).

2.5.5- Export et traduction des ARNm viraux

Malgré un génome relativement petit, le VIH-1 est capable de produire 15 protéines différentes. Ceci est en partie dû à la présence de plusieurs sites d'épissage présents dans son génome (Schwartz, Felber et al. 1990; Purcell and Martin 1993). Chez le VIH-1 il existe trois types différents d'ARNm (Figure 7) : non-épissé, mono-épissé et multi-épissé, possédant tous la même

extrémité non codante en 5'; tous les transcrits viraux possèdent une coiffe en 5' et sont polyadénylés en 3'. Les ARNm épissés peuvent quitter le noyau comme les ARNm cellulaires et coder pour les protéines Tat, Rev et Nef. Par contre, les ARNm mono ou non-épissés nécessitent la protéine virale Rev pour leur export nucléaire (Sodroski, Goh et al. 1986; Rosen, Terwilliger et al. 1988; Malim and Cullen 1991).

L'activité de Rev nécessite l'interaction d'une séquence hautement structurée présente chez les ARNm mono ou non-épissés appelée RRE (« Rev Response Element ») (Malim and Cullen 1991). Rev possède un NLS qui lui permet de se rendre au noyau, suite à sa synthèse cytoplasmique, afin de lier les ARNm qui se sont accumulés et qui contiennent la structure RRE. Toutefois, c'est son signal d'export nucléaire (NES) qui lui permet de recruter les facteurs cellulaires nécessaires à son export vers le cytoplasme. Ainsi, l'interaction de son NES avec le facteur cellulaire CRM1 (« Chromosome Maintenance gene 1 ») qui interagit avec des constituants des pores nucléaires (Neville, Stutz et al. 1997) et avec Ran GTP/GDP qui fournit l'énergie nécessaire à l'export nucléaire (Taura, Krebber et al. 1998; Farjot, Sergeant et al. 1999) lui permettent d'exporter les ARNm vers le cytoplasme où ils seront traduits dans le cytoplasme ou dans le réticulum endoplasmique (RE) afin de produire les protéines auxiliaires, structurales et enzymatiques. Alternativement, certains ARNs (l'ARN génomique) seront encapsidés dans les particules virales.

Il faut souligner que pour générer une particule virale infectieuse, des grandes quantités du précurseur Gag sont nécessaires. Toutefois, une plus faible quantité d'enzymes, codées par le gène *pol* (PR, RT et IN), sont requises. Étant donné que toutes ces protéines sont traduites à partir du même

Figure 7 : Schéma simplifié de l'épissage des ARNm du VIH-1. À partir du génome du VIH-1 (A), trois types d'ARNm sont générés (B). Les transcrits non-épissés (en rouge) ou mono-épissés (en vert) possèdent la séquence RRE qui leur permet de lier la protéine Rev afin de quitter le noyau. Les transcrits multi-épissés suivent quant à eux la même voie que les ARNm cellulaires.

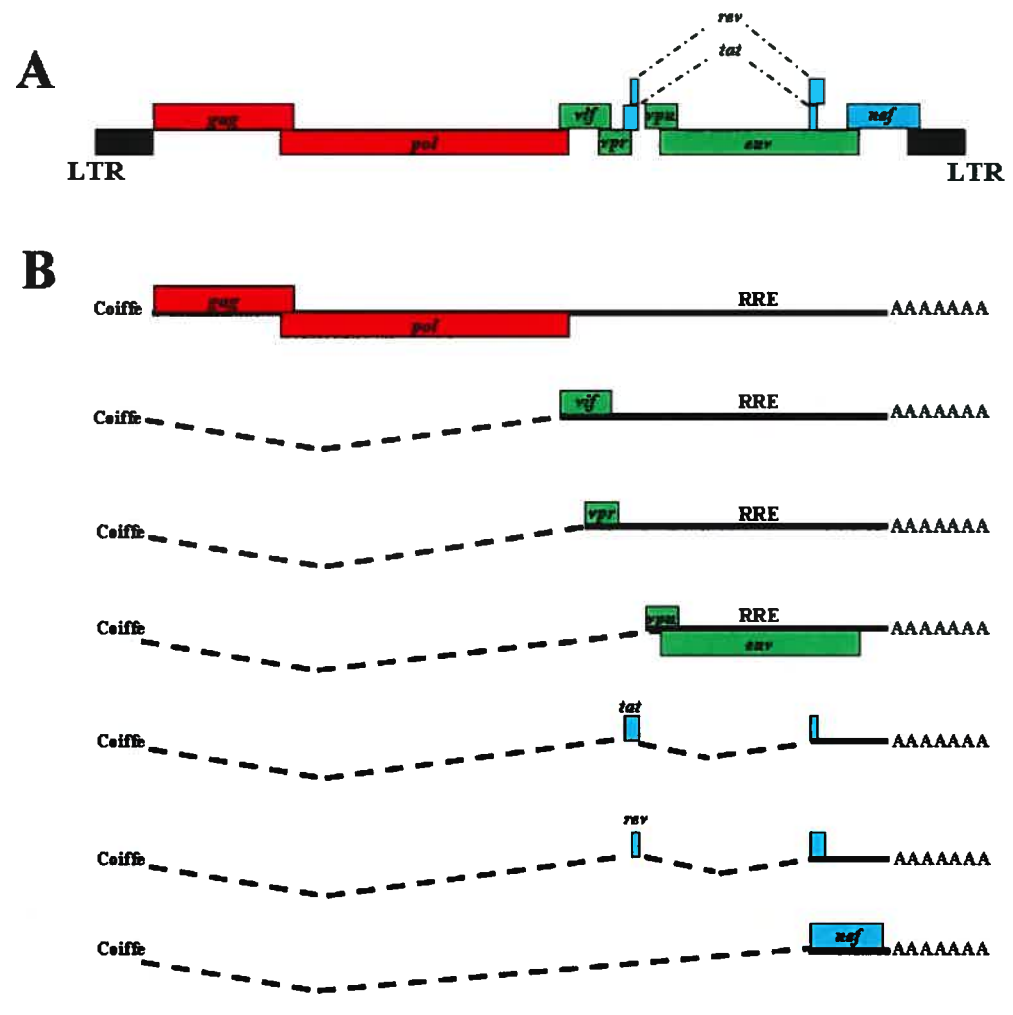


Figure 7

ARNm non-épissé de 9.2 Kb, le virus a dû développer un mécanisme efficace pour synthétiser les quantités adéquates de chaque protéine. Ainsi, le précurseur Gag-Pol est obtenu grâce à un décalage d'un nucléotide du cadre de lecture en fin de traduction du précurseur Gag. Ce décalage nécessite la présence d'une tige-boucle dans l'ARNm qui permet le glissement du ribosome d'un nucléotide (Jacks, Power et al. 1988; Bidou, Stahl et al. 1997). De cette façon, 20 précurseurs Gag sont traduits pour chaque précurseur Gag-Pol. Ce ratio est essentiel à la production de particules virales infectieuses (Karacostas, Wolffe et al. 1993; Liao and Wang 2004).

C'est dans le réticulum endoplasmique rugueux que les protéines de l'enveloppe ainsi que la protéine Vpu sont synthétisées à partir du même ARNm mono-épissé (Schwartz, Felber et al. 1990). Cet ARNm contient les deux cadres de lecture qui se chevauchent; c'est grâce à un mécanisme nommé « leaky scanning » que le ribosome passe outre sur le codon d'initiation de Vpu et permet la synthèse d'Env (Schwartz, Felber et al. 1990; Schwartz, Felber et al. 1992).

2.6- Les protéines de structure : Gag

Le précurseur Gag est nécessaire et suffisant à la production de particules virales non-infectieuses (VLP pour « Virus-Like Particles ») ou pseudovirions en absence d'autres protéines virales (Gottlinger 2001). C'est en fonction de sa masse moléculaire qu'il a été nommé Pr55^{Gag}. Tel que décrit précédemment, il est traduit à partir d'un ARNm non-épissé de 9.2 Kb. Le précurseur Pr55^{Gag} interagit avec l'ARN génomique, l'enveloppe virale, la membrane cellulaire ainsi que le précurseur Gag-Pol. Pendant l'assemblage et le bourgeonnement viral, la protéase virale contenue dans le précurseur Gag-Pol, s'active et clive le précurseur Pr55^{Gag} en quatre protéines : la matrice (MA ou p17), la capside (CA ou p24), la nucléocapside (NC ou p7), la protéine p6 ainsi que deux peptides de séparation p2 et p1 (Krausslich, Facke et al. 1995; Freed 1998; Gottlinger 2001).

2.6.1- Protéine de la matrice (MA) p17

La MA est une protéine multifonctionnelle qui régule des étapes précoces et tardives du cycle de réplication. Elle est constituée de 132 acides aminés et se trouve en position N-terminale du précurseur Pr55^{Gag} (Figure 8) où elle est myristylée par une N-myristoyltransferase (Bryant and Ratner 1990). Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) et cristallographie aux rayons X ont démontré qu'il existe un équilibre entre sa forme monomérique et trimérique (Massiah, Starich et al. 1994; Hill, Worthylake et al. 1996; Conte and Matthews 1998; Verli, Calazans et al. 2006). Il a été proposé que chacune de ses formes aient des fonctions spécifiques dans le cycle de réplication viral. Ainsi, sous sa forme trimérique, la MA serait impliquée dans l'assemblage, l'association du précurseur Pr55^{Gag} aux membranes ainsi que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (Yuan, Yu et al. 1993; Zhou and Resh 1996). Par contre, sous sa forme monomérique la MA pourrait se dissocier des membranes ce qui lui permettrait d'interagir avec le CPI et jouer un rôle dans son import nucléaire (Freed 1998).

Comme décrit précédemment, un groupement myristylique, constitué d'acides gras saturés, est attaché de façon covalente à la place de la première méthionine en position N-terminale de la MA. Cette modification est responsable en partie de l'association du précurseur de Pr55^{Gag} aux membranes cellulaires.

Étant donné que la myristylation n'est pas suffisante pour assurer l'association du précurseur Pr55^{Gag} aux membranes, la MA possède un deuxième signal, constitué des résidus hydrophobes 6 à 8 et d'une région basique (résidus 26 à 32), afin de lui permettre de s'attacher fermement aux membranes cellulaires. En réalité, ces résidus interagissent avec les groupes négativement chargés des phospholipides, présents dans la couche interne de la membrane plasmique (Hermida-Matsumoto and Resh 1999; Ono and Freed 1999; Paillart and Gottlinger 1999; Ono, Demirov et al. 2000).

Figure 8 : Schéma linéaire de l'organisation du précurseur Gag du VIH-1. Pendant l'assemblage et le bourgeonnement viral le précurseur Pr55^{Gag} est clivé par la protéase virale en quatre protéines : la matrice (MA ou p17), la capsid (CA ou p24), la nucléocapsid (NC ou p7), la protéine p6 ainsi que deux peptides de séparation p2 et p1.



Figure 8

La MA myristylée peut adopter deux conformations : exposition (myr-exp) ou séquestration (myr-seq) de l'acide myristylique; ce phénomène a été nommé « myristoyl switch ». Ceci est régulé par les séquences qui se trouvent en aval de la région basique de la MA (Hermida-Matsumoto and Resh 1999; Paillart and Gottlinger 1999; Resh 2004). À l'état myr-seq, la MA aurait l'acide myristylique à l'intérieur d'une cavité hydrophobe de sa tête globulaire; son exposition dépendrait de la multimérisation de la MA. En conséquence, la MA sous forme monomérique serait à l'état myr-seq et resterait associée au CPI lors des étapes précoces du cycle de réplication. Par contre, lors de l'assemblage des particules virales, la multimérisation du précurseur Pr55^{Gag} exposerait l'acide myristylique et permettrait son association aux membranes (Tang, Murakami et al. 2003; Resh 2004). Il faut toutefois souligner que l'exposition de l'acide myristylique ne pourrait se faire que lorsque la MA rencontre un type particulier de lipides. En effet, le phosphatidylinositol (PI) 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P2] serait essentiel à ce changement conformationnel (Saad, Loeliger et al. 2006; Saad, Miller et al. 2006). Le rôle du [PI(4,5)P2] dans l'assemblage viral sera abordé en détail dans la section 4.3.2.

Par ailleurs, la MA semble aussi jouer un rôle dans les étapes précoces du cycle de réplication. En effet, de par son association au CPI et grâce à ses deux NLS (résidus 24-31 et 110-114), plusieurs études ont proposé que la MA pourrait faciliter l'import nucléaire du CPI (Bukrinsky, Sharova et al. 1992; Bukrinsky, Haggerty et al. 1993; von Schwedler, Kornbluth et al. 1994; Haffar, Popov et al. 2000; Bukrinsky 2004).

Finalement, la MA s'associe avec la queue cytoplasmique de la gp41 pendant l'assemblage viral et devient responsable de l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les particules virales (Yu, Yuan et al. 1992; Dorfman, Mammano et al. 1994). L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe sera approfondie dans la section 2.7.2.3.

2.6.2- Protéine de la capsid (CA) p24

La protéine de la capsid est située après la MA dans le contexte du précurseur Pr55^{Gag} (Figure 8) et joue des rôles cruciaux lors de la décapsidation et l'assemblage viral. La CA est constituée de deux domaines à savoir la portion N-terminale (NTD) et la portion C-terminale (CTD) qui sont unis par une région flexible (Gitti, Lee et al. 1996; Momany, Kovari et al. 1996; Gamble, Yoo et al. 1997). Le NTD, qui comprend les deux tiers de la CA, est requis pour la formation de la forme conique caractéristique de la capsid virale mais il est dispensable pour l'assemblage des particules virales immatures (Dorfman, Bukovsky et al. 1994; Borsetti, Ohagen et al. 1998). Par contre, le CTD est essentiel pour l'assemblage de particules virales matures et immatures (Dorfman, Bukovsky et al. 1994; Mammano, Ohagen et al. 1994). En fait, le CTD forme des dimères en solution (Gamble, Yoo et al. 1997) et est suffisant pour la production de VLPs (Accola, Strack et al. 2000). Toutefois, dans le contexte du précurseur Pr55^{Gag}, le domaine de dimérisation pourrait s'étendre jusqu'au peptide qui sépare la CA de la NC (p2) (Accola, Hoglund et al. 1998). Par ailleurs, le CTD possède aussi une série de 20 résidus nommée « major homology region » (MHR) qui est particulièrement conservée parmi toutes les CA rétrovirales (Gottlinger 2001). Cette conservation suggère que le MHR joue un rôle majeur dans le cycle de réplication, probablement au niveau de l'assemblage ainsi que de la décapsidation (Craven, Leure-duPree et al. 1995; Alin and Goff 1996; Cairns and Craven 2001).

Tel qu'énoncé au début de cette section, la CA est importante pour les étapes précoces du cycle de réplication, particulièrement pour la décapsidation. C'est à cette fin que le domaine N-terminal de la CA interagit, via une boucle riche en prolines, avec une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase nommée cyclophiline A (CypA) et induit son incorporation dans la particule virale (Luban, Bossolt et al. 1993; Franke, Yuan et al. 1994; Thali, Bukovsky et al. 1994). L'immunosuppresseur cyclosporin A (CsA) se lie au site actif de

la CypA (Handschumacher, Harding et al. 1984) et empêche son incorporation dans les virions (Thali, Bukovsky et al. 1994; Braaten, Franke et al. 1996; Wiegers, Rutter et al. 1999). Toutefois, c'est la CypA présente dans les cellules cibles et non celle qui est incorporée qui est importante pour les étapes précoces de l'infection (Sokolskaja, Sayah et al. 2004; Hatzioannou, Perez-Caballero et al. 2005). En fait, le mécanisme d'action de la CypA ressemble à celui qui dicte en partie le tropisme de différents rétrovirus. En fait, de tous les rétrovirus, seulement la CA du VIH-1 lie la CypA et conséquemment, seul le VIH a besoin de son interaction pour répliquer (Luban, Bossolt et al. 1993; Franke, Yuan et al. 1994; Thali, Bukovsky et al. 1994). C'est cette observation qui suggéra que les déterminants viraux nécessaires à l'interaction avec la CypA pourraient être importants pour le tropisme du VIH-1. En fait, le bloc au VIH-1 observé chez des cellules de primates (non-humaines) se produit au même niveau que celui observée chez les cellules humaines en présence de CsA (Himathongkham and Luciw 1996; Hofmann, Schubert et al. 1999). Toutefois, chez les cellules de singes, le bloc au VIH-1 est dû à un facteur de restriction qui lie la CA : TRIM5alpha (Sayah, Sokolskaja et al. 2004; Stremlau, Owens et al. 2004). Il est donc probable que chez les cellules humaines le rôle de la CypA soit d'empêcher la reconnaissance de la CA par des facteurs de restriction (Hatzioannou, Perez-Caballero et al. 2005).

2.6.3- Protéine de la nucléocapside (NC) p7

La NC est une protéine basique, caractérisée par deux motifs en doigts de zinc très conservés, CX₂CX₄HX₄C, connectés par une séquence basique. En fait, ces doigts de zinc lient une séquence d'environ 110 nucléotides (séquence Psi) à l'extrémité 5' de l'ARN non épissé qui est essentielle à l'encapsulation de l'ARN génomique (South and Summers 1993; Amarasinghe, Zhou et al. 2001).

La capacité de la NC à lier l'ARN et à multimériser permet l'oligomérisation du précurseur Gag lors de l'assemblage viral (Gottlinger 2001). Par ailleurs, l'importance de l'interaction NC/ARN dans l'assemblage est illustré par le fait qu'en absence d'ARN viral la NC permet l'incorporation d'ARN cellulaire (Muriaux, Mirro et al. 2001).

La NC possède aussi la capacité de rendre plus stable le dimère d'ARN génomique suite à la maturation de la particule virale (Fu, Gorelick et al. 1994). Finalement, la NC protège le génome viral des nucléases et permet l'initiation de la transcription inverse en liant l'ARN_{t3}^{lys} (Barat, Schatz et al. 1993; Darlix, Lapadat-Tapolsky et al. 1995).

2.6.4- Protéine p6

La protéine p6 est située en position C-terminale du précurseur Gag et est seulement présente chez les lentivirus de primates. Elle est séparée de la NC par le peptide p1 qui est responsable du changement de cadre de lecture lors de la traduction du précurseur Gag-Pol (Jacks, Power et al. 1988; Wilson, Braddock et al. 1988; Henderson, Bowers et al. 1992). Dû au changement de cadre de lecture, p6 est le seul domaine absent du précurseur Gag-Pol. La protéine p6 possède plusieurs fonctions incluant l'incorporation spécifique de la protéine Vpr via un motif LXXLF (Kondo and Gottlinger 1996; Bachand, Yao et al. 1999).

En outre, la protéine p6 joue un rôle crucial dans le détachement des particules virales de la surface cellulaire (Gottlinger, Dorfman et al. 1991). Ce rôle est accompli par la présence de deux motifs distincts. Premièrement, le motif riche en prolines P(T/S)AP est conservé parmi les cinq lignées de lentivirus de primates à l'exception de VIScol (Cournaud, Pourrut et al. 2001). Ce motif recrute Tsg101 (Garrus, von Schwedler et al. 2001; Martin-Serrano, Zang et al. 2001; VerPlank, Bouamr et al. 2001; Demirov, Ono et al. 2002) en se liant directement au domaine UEV (« Ubiquitin E2 Variant »)

dans l'extrémité N-terminale de Tsg101 (Pornillos, Alam et al. 2002). Le rôle de cette protéine est d'acheminer des protéines vers les corps multivésiculaires (Katzmann, Odorizzi et al. 2002) et connecterait Gag avec le complexe endosomal requis pour le transport (ESCRT) important dans la biogénèse de ces compartiments.

Le deuxième motif, YPLTSL, est aussi important pour le détachement des particules virales car il permet de recruter la protéine AIP1 (Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003). Cette protéine est aussi impliquée dans la formation des vésicules internes dans les corps multivésiculaires (Nikko, Marini et al. 2003; Odorizzi, Katzmann et al. 2003). Il faut souligner que Tsg101 et AIP1 interagissent directement entre elles via le motif PTAP présent chez AIP1 (Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003). Le rôle que Tsg101, AIP1 et le complexe ESCRT jouent dans l'assemblage et la relâche des particules virales sera approfondi dans les sections 3.3 et 4.1.2.

2.7- Les glycoprotéines d'enveloppe virales

Les glycoprotéines d'enveloppe jouent un rôle primordial dans le cycle de réplication du VIH-1. Elles présentent les déterminants nécessaires à l'interaction avec le récepteur CD4 ainsi qu'aux corécepteurs CXCR4 et CCR5. Finalement, elles sont responsables de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte.

Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont synthétisées à partir d'un ARNm mono-épissé de 4.3 Kb qui code aussi pour la protéine Vpu (voir section 2.5.5). Elles sont traduites sous forme d'un précurseur, gp160, par des ribosomes associés au RE rugueux. La gp160 est glycosylée co-translationnellement et s'associe rapidement avec les chaperonnes cellulaires BiP/GRP78, calréticuline et calnexine, qui lui permettent d'atteindre un repliement adéquat et d'oligomériser (Willey, Bonifacino et al. 1988; Earl,

Moss et al. 1991; Otteken and Moss 1996). Les protéines d'enveloppe forment un trimère qui est transporté jusqu'à l'appareil de Golgi où il est clivé par des proprotéines convertases cellulaires, incluant la furine, qui libèrent les formes matures gp120 et gp41 (Figure 9) (Hallenberger, Bosch et al. 1992; Decroly, Vandenbranden et al. 1994; Decroly, Benjannet et al. 1997). Le précurseur gp160 est clivé sur une séquence hautement conservée RX(K/R)R autour du résidu 510 de la gp120 (McCune, Rabin et al. 1988; Dubay, Dubay et al. 1995). La structure trimérique d'Env est maintenue suite au clivage et la gp120 reste associée par un lien non-covalent avec la gp41 (Center, Leapman et al. 2002). Il faut souligner que le clivage d'Env est essentiel au processus de fusion virale et donc à l'infectivité (McCune, Rabin et al. 1988; Freed, Myers et al. 1989).

2.7.1- Glycoprotéine d'enveloppe gp120

La gp120 ou glycoprotéine de surface (SU) se retrouve à la surface des particules virales et est responsable de lier le récepteur CD4 à la surface des cellules cibles. La gp120 est hautement glycosylée et possède cinq régions hypervariables V₁ à V₅ intercalées par cinq régions plus conservées appelées régions constantes C₁ à C₅ (Starcich, Hahn et al. 1986). Suite à l'interaction avec son récepteur, la gp120 subit un changement conformationnel qui permet d'exposer le site de liaison aux corécepteurs, déterminant ainsi le tropisme viral. Plusieurs régions de la gp120, dont les régions V₁/V₂ (Ross and Cullen 1998) sont impliquées dans l'interaction avec les corécepteurs; toutefois, c'est la boucle hypervariable V₃ qui joue le rôle déterminant (Hwang, Boyle et al. 1991; Shioda, Levy et al. 1991; Sakaida, Hori et al. 1998). Suite à l'interaction avec son corécepteur, des changements conformationnels additionnels chez la gp120 et la gp41 entraînent l'exposition du peptide fusogénique et l'initiation de la fusion des membranes virales et cellulaires (Sattentau and Moore 1991; Thali, Moore et al. 1993).

2.7.2- Glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire gp41

La gp41 ou glycoprotéine transmembranaire (TM) est composée de trois domaines : l'ectodomaine N-terminal, le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique.

2.7.2.1- L'ectodomaine

L'étude de la protéine HA des orthomyxovirus et de la protéine F des paramyxovirus a montré qu'une région très hydrophobe située à leur extrémité N-terminale jouait un rôle crucial dans la fusion membranaire (White 1992). Des études ont par la suite identifié un domaine analogue de 23 acides aminés (le peptide fusogénique) à l'extrémité N-terminale de la gp41 (Freed, Myers et al. 1990; Nieva, Nir et al. 1994). Des études biochimiques et structurales ont indiqué que les changements conformationnels qui précèdent à la fusion membranaire, sont équivalents chez la protéine HA et la gp41 (Bullough, Hughson et al. 1994; Chan, Fass et al. 1997; Weissenhorn, Dessen et al. 1997).

Des études de RMN et rayons X ont démontré que l'ectodomaine de la gp41 est formé par deux hélices α antiparallèles et, sous sa forme trimérique, par un « fagot » de six hélices. Les hélices N-terminales se retrouvent à l'intérieur du « fagot » et les hélices C-terminales s'assemblent dans des cavités hydrophobes à l'extérieur (Chan, Fass et al. 1997; Tan, Liu et al. 1997; Weissenhorn, Dessen et al. 1997; Caffrey, Cai et al. 1998). Ces données structurales ont permis de démontrer que l'exposition du peptide de fusion ne se fait que suite à l'interaction d'Env à CD4. En effet, des peptides correspondant aux hélices C-terminales ne peuvent interagir avec le peptide de fusion que suite à cette interaction (Furuta, Wild et al. 1998). De plus, il faut souligner que ces peptides ont un potentiel thérapeutique. Par exemple, le peptide T20 (qui correspond à une région de l'hélice C-terminale de l'ectodomaine) est capable d'inhiber la fusion et la réplication virales chez des patients infectés (Kilby, Hopkins et al. 1998).

Figure 9 : Représentation schématique du précurseur d'enveloppe gp160 ainsi que de ses sous-unités de surface (gp120) et transmembranaire (gp41), produites suite au clivage du précurseur par des protéines convertases cellulaires.

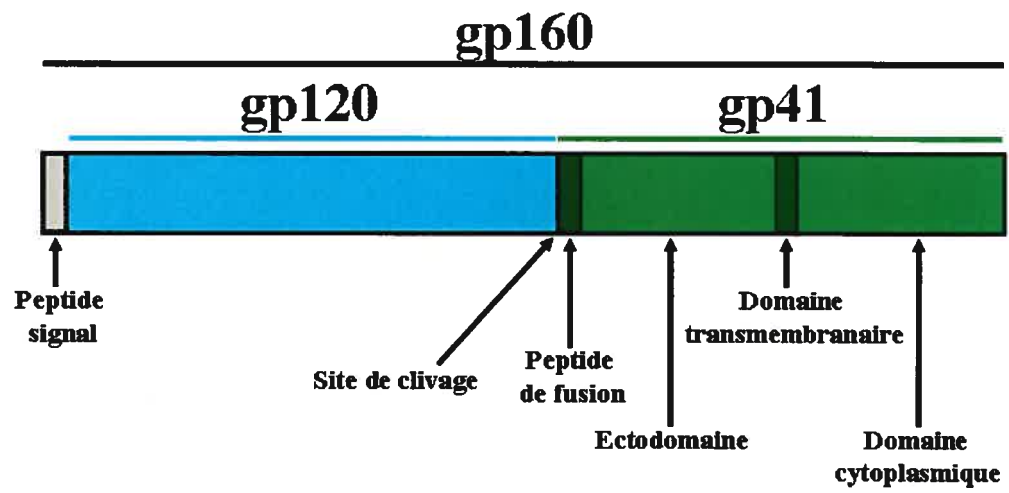


Figure 9

2.7.2.2- Le domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire de la gp41 est composé de seulement 21 résidus et est responsable de son ancrage à la membrane virale (Gabuzda, Olshevsky et al. 1991). Certaines études ont montré qu'en plus de son rôle d'ancrage, le domaine transmembranaire peut influencer le processus de fusion membranaire (Helseth, Olshevsky et al. 1990). Toutefois, son rôle dans la fusion reste controversé car le changement complet du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine cellulaire CD22 n'affecte pas l'infectivité virale (Wilk, Pfeiffer et al. 1996). Par contre, des nouvelles études ont montré que son changement par celui de la glycophorine A, de la protéine G du virus de la somatite vésiculaire ou de la protéine HA d'influenza bloquent son activité fusogénique (Miyachi, Komano et al. 2005; Welman, Lemay et al. 2007).

2.7.2.3- Le domaine cytoplasmique

La gp41 possède un long domaine cytoplasmique. En effet, ses 150 résidus lui confèrent une longueur largement supérieure à celle des autres rétrovirus qui ne possèdent que de 20 à 50 résidus. Le domaine cytoplasmique n'est pas impliqué dans le processus de fusion virale mais plutôt dans celui de l'incorporation d'Env dans les particules virales (Gabuzda, Lever et al. 1992; Freed and Martin 1995; Freed and Martin 1996). Cette incorporation peut être expliquée par au moins deux modèles différents. Le modèle d'incorporation passive, postule qu'Env est incorporé de façon non-spécifique dans les particules virales. Ce modèle est appuyé par le fait que le VIH-1 peut incorporer des protéines d'enveloppe hétérologues telles que celles du virus de la somatite vésiculaire (VSV), du virus de la leucémie humaine T tropique (HTLV) ainsi que celle du virus de la leucémie murine (MLV) (Akkina, Walton et al. 1996; Lodge, Delamarre et al. 1997). De plus, dans certaines conditions le domaine cytoplasmique de la gp41 est dispensable pour le processus d'incorporation (Freed and Martin 1995; Freed and Martin 1996).

En revanche, le modèle d'incorporation active propose que l'enveloppe du VIH-1 soit incorporée par une interaction spécifique avec la protéine de la matrice. Ce modèle se base sur le fait que plusieurs mutations dans la MA et dans le domaine cytoplasmique de la gp41 empêchent l'incorporation d'Env sans affecter la relâche des particules (Murakami and Freed 2000; Murakami and Freed 2000; Piller, Dubay et al. 2000). De plus, une interaction directe entre la MA et des peptides dérivés de la queue cytoplasmique de la gp41 a pu être montrée *in vitro* (Cosson 1996). Récemment, ce modèle a été remis à l'avant-scène par l'identification du facteur cellulaire TIP47 (« tail-interacting protein of 47 kDa ») qui servirait de lien entre la MA et la gp41 (Lopez-Verges, Camus et al. 2006). En effet, la déplétion de TIP47 ou des mutations empêchant sa liaison à la MA bloquent l'incorporation d'Env; tandis que la surexpression de TIP47 l'augmente. Finalement, il a été montré que les mutations connues pour empêcher l'incorporation d'Env empêchent aussi l'interaction entre la MA et TIP47 (Lopez-Verges, Camus et al. 2006). Ces nouvelles données suggèrent fortement que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe se fait de façon active plutôt que passive.

Finalement, il faut mentionner que le domaine cytoplasmique de la gp41 possède un motif à base de tyrosine YXX Φ (ou Φ représente un résidu hydrophobe) qui est nécessaire au ciblage basolateral de Gag, dans des cellules épithéliales polarisées. Ce motif serait aussi impliqué dans le ciblage de Gag vers un pôle distinct des lymphocytes T (Lodge, Lalonde et al. 1997; Deschambeault, Lalonde et al. 1999).

2.8- Les protéines accessoires

Tel que décrit dans la section 2.4, en plus de protéines structurales et régulatrices, le génome du VIH-1 code pour quatre protéines accessoires: Nef, Vpr, Vif et Vpu. Ces protéines sont dites « accessoires » parce qu'elles ne

sont pas essentielles à la réplication virale *in vitro*. Néanmoins, des nouvelles études ont démontré qu'elles sont capables de moduler significativement la réplication virale *in vitro* et *in vivo* ainsi que de favoriser la progression de la maladie chez les individus infectés.

2.8.1- Nef

Nef est une protéine myristylée de 27 kDa qui est fortement exprimée au début du cycle de réplication viral (Klotman, Kim et al. 1991). Contrairement à sa dénomination originale (« NEgatif Factor »), elle agit comme facteur positif car elle augmente la réplication et l'infectivité virales.

Nef altère les voies de signalisation en aval du récepteur des cellules T (TCR) ce qui résulte en une activation des lymphocytes T CD4 et les rend plus susceptibles à l'infection (Skowronski, Parks et al. 1993; Baur, Sawai et al. 1994). En fait, Nef module l'activité de plusieurs protéines nécessaires à la signalisation via le TCR incluant Vav (Fackler, Luo et al. 1999), p21-activated kinase (PAK) (Nunn and Marsh 1996; Fackler, Lu et al. 2000; Vincent, Priceputu et al. 2006), Rac (Vilhardt, Plastre et al. 2002) et CDC42 (Lu, Wu et al. 1996). Par ailleurs, la modulation des voies de signalisation des cellules T augmente aussi l'expression de surface du ligand de FAS (FasL). Ceci protège les cellules infectées en augmentant l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) (Xu, Laffert et al. 1999). Toutefois, cette même augmentation pourrait causer l'apoptose de la cellule infectée. Pour contrer le tout, Nef a évoluée de façon à bloquer les signaux proapoptotiques induits par FasL en inhibant l'activité d'ASK1 (Geleziunas, Xu et al. 2001). De plus, Nef bloquerait aussi l'apoptose p53-dépendante (Greenway, McPhee et al. 2002).

Nef a trouvé un autre moyen de protéger les cellules infectées d'une mort prématurée en empêchant leur reconnaissance par les CTLs. En fait, Nef diminue l'expression de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), requis pour la reconnaissance des cellules infectées par

les CTLs (Schwartz, Marechal et al. 1996; Collins, Chen et al. 1998). De plus, Nef diminue l'expression de surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) ce qui diminue la présentation antigénique des cellules infectées (Stumptner-Cuvelette, Morchoisne et al. 2001) (l'effet de Nef sur le CMH-II sera approfondi dans la section 6.5.2). Par ailleurs, il faut souligner que Nef augmente le nombre de CMVs dans les cellules épithéliales (Stumptner-Cuvelette, Jouve et al. 2003; Costa, Chen et al. 2006), probablement en recrutant AIP1, impliqué dans la biogénèse de ces compartiments (Costa, Chen et al. 2006).

Nef augmente l'infectivité virale par deux mécanismes distincts : premièrement, Nef réduit le nombre de récepteurs CD4 présents à la surface des cellules infectées en les connectant avec la machinerie d'endocytose cellulaire par l'interaction du complexe d'adaptines (Mariani and Skowronski 1993; Craig, Pandori et al. 1998). L'endocytose de CD4 permet d'éviter la surinfection des cellules ainsi que d'augmenter l'infectivité virale en permettant une incorporation optimale d'Env (Lama, Mangasarian et al. 1999; Levesque, Zhao et al. 2003). Elle prévient aussi l'agrégation de particules virales à la surface des cellules infectées. En effet, ces agrégats pourraient se former suite à l'interaction de CD4 avec les glycoprotéines d'Env incorporées dans les particules néoformées (Ross, Oran et al. 1999).

L'autre mécanisme d'augmentation de l'infectivité virale par Nef est moins bien connu mais est complètement indépendant de CD4. Il serait relié à une altération générale des endosomes précoces et de recyclage (Madrid, Janvier et al. 2005).

Nef jouerait aussi un rôle dans la transmission virale. Il est connu que les cellules dendritiques (CDs) peuvent capturer des particules virales infectieuses via un récepteur spécifique (DC-SIGN) et peuvent les transmettre par la suite à d'autres cellules (Pohlmann, Soilleux et al. 2001; Cavrois, Neidleman et al. 2007). Étant donné que Nef augmente l'expression de

surface de DC-SIGN, elle pourrait ainsi promouvoir la transmission virale (Sol-Foulon, Moris et al. 2002). De plus, Nef faciliterait cette transmission par un autre mécanisme : en recrutant des lymphocytes T. En effet, Nef augmente la production de chimiokines chez les macrophages infectés (Swingler, Mann et al. 1999; Swingler, Brichacek et al. 2003).

Finalement, l'importance de Nef dans la pathogénèse virale se reflète par le fait que son expression suffit, dans un modèle animal de souris, à causer des symptômes très semblables à ceux observés chez des personnes sidatiques : perte de poids, diarrhée, atrophie thymique, diminution du nombre des lymphocytes T CD4; suggérant un rôle majeur de Nef dans la pathogénèse virale (Hanna, Kay et al. 1998). En ce sens, il a été rapporté que des personnes infectées avec des isolats défectifs pour cette protéine ne présentent pas, après une longue période d'infection, les symptômes de la maladie (Deacon, Tsykin et al. 1995).

2.8.2- Vpr

Vpr est une petite protéine basique de 96 acides aminés (14 kDa) qui est incorporée dans les particules virales (Cohen, Dehni et al. 1990; Yuan, Matsuda et al. 1990) via une interaction avec la protéine p6 de Gag (voir section 2.6.4) (Kondo and Gottlinger 1996; Bachand, Yao et al. 1999). L'importance de Vpr dans le cycle de réplication viral est bien illustrée par sa haute conservation parmi les lentivirus de primates (Tristem, Marshall et al. 1992). Cinq fonctions majeures sont attribuées à Vpr : 1- augmentation de la fidélité de la RT, 2-stimulation de l'expression virale via le LTR, 3-transport du CPI vers le noyau lors des étapes précoces de l'infection, 4- induction d'un arrêt de cycle en phase G2/M et 5- induction de l'apoptose chez les cellules infectées.

Il a été montré que Vpr module le taux de mutations du VIH-1 en augmentant la précision de la RT lors de la transcription inverse. En effet, l'absence de Vpr augmenterait de quatre fois le taux de mutations par cycle, dans des cellules en division (Mansky 1996; Marassi, Ma et al. 1999) et de dix-huit fois dans des cellules qui ne se divisent pas, telles que les macrophages (Chen, Le Rouzic et al. 2004). Il a été proposé que cette activité soit intimement liée au facteur cellulaire UNG (« uracil DNA glycosylase ») (Mansky, Preveral et al. 2000; Chen, Le Rouzic et al. 2004), qui est impliqué dans les voies de réparation de l'ADN en enlevant l'incorporation d'uraciles de l'ADN. Il a été montré que Vpr lie directement UNG et induit son incorporation dans la particule virale, ce qui pourrait influencer la précision de la transcription inverse (Mansky, Preveral et al. 2000; Chen, Le Rouzic et al. 2004). Toutefois, l'incorporation d'UNG ainsi que son rôle dans la fidélité de la RT restent controversés (Schrofelbauer, Yu et al. 2005).

Vpr stimule l'activité transcriptionnelle du LTR probablement en recrutant les facteurs de transcription Sp1 (Wang, Mukherjee et al. 1995; Sawaya, Khalili et al. 1998), TFIIB (Agostini, Navarro et al. 1996) et TFIID (Kino, Gragerov et al. 1999) nécessaires au processus de transcription (voir section 2.5.4). Toutefois, cette activité de Vpr pourrait aussi être liée à sa fonction d'arrêt de cycle (voir plus bas).

Une des caractéristiques du VIH-1 est sa capacité à infecter des cellules qui ne se divisent pas comme les macrophages et les lymphocytes T CD4 quiescents. Afin de répliquer dans ces cellules, le VIH-1 doit transporter son matériel génomique du cytoplasme au noyau. Tel qu'évoqué dans la section 2.5.3, Vpr fait partie du CPI et contribue à son import (Connor, Chen et al. 1995; Subbramanian, Kessous-Elbaz et al. 1998). En effet, bien que Vpr ne possède pas des signaux de localisation nucléaire canoniques, elle possède des propriétés karyophiliques qui faciliteraient ce processus (Lu, Spearman et al. 1993; Subbramanian, Yao et al. 1998). En fait, il a été montré

que Vpr peut s'associer directement avec l'importine alpha et que cette interaction est essentielle au transport du CPI vers le noyau des macrophages (Nitahara-Kasahara, Kamata et al. 2007). Finalement, il a été proposé que Vpr pourrait aider au transport du CPI vers le noyau en augmentant l'affinité du NLS de la MA pour les importines nucléaires (Bukrinsky and Haffar 1998; Agostini, Popov et al. 2000).

Il a été clairement établi que Vpr cause l'arrêt de cycle en phase G2/M dans plusieurs types de cellules de mammifères (He, Choe et al. 1995; Jowett, Planelles et al. 1995; Re, Braaten et al. 1995). L'arrêt de cycle ne nécessite pas la synthèse *de novo* de la protéine; il est induit par les molécules incorporées dans les particules virales (Poon, Grovit-Ferbas et al. 1998). Toutefois, sa signification biologique n'est pas encore claire. Il pourrait être responsable d'une activation générale de l'expression virale (Goh, Rogel et al. 1998) ou de l'induction de l'apoptose chez les cellules infectées (Andersen, Dehart et al. 2006). Par ailleurs, les mécanismes responsables de l'arrêt de cycle restent très controversés. Néanmoins, de nouvelles évidences indiquent que la voie de réponse de réparation de l'ADN serait impliquée via l'activation de la protéine ATR (Roshal, Kim et al. 2003; Lai, Zimmerman et al. 2005), impliquée dans la transition G2/M (Abraham 2001). En fait, des papiers très récents indiquent que cette fonction de Vpr résulterait du recrutement d'un complexe Cul4/DDB1/VprBP (culin 4/damage-specific DNA-binding protein 1/Vpr binding protein), impliqué dans la dégradation de différents substrats cellulaires incluant UNG (Belzile, Duisit et al. 2007; Le Rouzic, Belaidouni et al. 2007; Schrofelbauer, Hakata et al. 2007).

Finalement, il a été clairement établi que Vpr induit l'apoptose dans plusieurs types cellulaires incluant différentes lignées cellulaires ainsi que chez des lymphocytes T primaires (Poon, Jowett et al. 1997; Stewart, Poon et al. 1997; Yao, Mouland et al. 1998; Muthumani, Hwang et al. 2002); toutefois, son mécanisme d'action reste mal compris. Ainsi, il a été rapporté

que l'expression de Vpr résulte dans la relâche du cytochrome C et dans l'activation de la caspase 9 (Muthumani, Hwang et al. 2002), suggérant un effet direct de Vpr sur les mitochondries. En ce sens, il a été rapporté que Vpr interagit avec la protéine mitochondriale ANT qui participe au maintien de la perméabilité de ces organelles. De plus, il a été montré dans des tests *in vitro* que cette interaction résulte dans la relâche de cytochrome C (Jacotot, Ravagnan et al. 2000; Vieira, Haouzi et al. 2000). Toutefois, le rôle d'ANT dans l'induction de l'apoptose reste très controversé car une autre étude a récemment rapporté que la capacité de Vpr à induire l'apoptose reste intacte lorsqu'on diminue l'expression d'ANT avec des ARN d'interférence (Andersen, Dehart et al. 2006). Par ailleurs, les auteurs de cette étude ont plutôt proposé un modèle où l'induction de l'apoptose par Vpr résulterait de l'activation d'un autre pore mitochondrial : Bax. Cette activation dépendrait de l'activation par Vpr, via la voie de réparation de l'ADN ATR-dépendante (Andersen, Dehart et al. 2006); ceci impliquerait que les mécanismes d'arrêt de cycle en G2/M et l'induction de l'apoptose par Vpr soient liés. En ce sens, il a récemment été rapporté que l'induction de l'apoptose par Vpr dépend de son interaction avec la protéine DDB1 qui est essentielle à l'induction par Vpr de l'arrêt de cycle en phase G2/M (Le Rouzic, Belaidouni et al. 2007; Schrofelbauer, Hakata et al. 2007).

2.8.3- Vif

Des virus n'exprimant pas la protéine Vif sont incapables de se répliquer dans des lymphocytes T CD4 ou macrophages primaires ainsi que dans une série des lignées cellulaires T. Ces cellules sont dites « non-permissives » par opposition à d'autres dites « permissives » chez qui ces virus sont capables de se répliquer au même niveau que des virus sauvages (Cullen 2006). À travers l'utilisation d'hétérokaryons entre des cellules permissives et non-permissives il a été montré que le phénotype non-permissif était dominant, suggérant que les cellules non-permissives expriment un

facteur inhibiteur qui bloquerait sélectivement des virus ne possédant pas le gène *vif* (Madani and Kabat 1998; Simon, Gaddis et al. 1998). C'est en comparant les ARNm des cellules permissives avec celui de non-permissives, à l'aide d'une technique de soustraction d'ADN complémentaire (ADNc), que le facteur cellulaire APOBEC3G fut identifié. L'expression de ce facteur est capable de conférer le phénotype non-permissif à des cellules permissives (Sheehy, Gaddis et al. 2002).

APOBEC 3G est une cytidine désaminase qui catalyse la transformation de cytidines en uraciles (C à U). En absence de Vif, APOBEC 3G est incorporée dans les particules virales. Lors de la transcription inverse elle introduit des mutations de guanidines à adénosines (G à A) (Harris, Bishop et al. 2003; Mangeat, Turelli et al. 2003; Zhang, Yang et al. 2003). Étant donné qu'APOBEC 3G ne peut utiliser que de l'ADN simple brin comme substrat et que celui de polarité positive se trouve majoritairement sous forme d'ADN double brin, les mutations sont introduites dans le brin de polarité négative (Suspene, Sommer et al. 2004; Yu, Konig et al. 2004). En plus d'introduire des mutations, APOBEC 3G diminue la synthèse de l'ADN proviral par un mécanisme qui demeure mal connu (Simon and Malim 1996; Mangeat, Turelli et al. 2003). Finalement, il faut souligner que l'activité inhibitrice d'APOBEC sur le virus ne peut être attribuée seulement à son activité désaminase car des mutants d'APOBEC ayant perdu cette fonction possèdent toujours une activité antivirale (Newman, Holmes et al. 2005; Holmes, Koning et al. 2007).

Le mécanisme utilisé par Vif pour empêcher l'action d'APOBEC 3G a été bien établi. En fait, Vif lie directement APOBEC 3G dans la cellule productrice et induit sa dégradation en le connectant au complexe cullin5 ECS E3 ubiquitine ligase (Yu, Yu et al. 2003). La formation de ce complexe résulte dans la poly-ubiquitination et subséquente dégradation d'APOBEC 3G par le protéasome, ce qui diminue son incorporation dans les particules virales

(Sheehy, Gaddis et al. 2003; Yu, Yu et al. 2003). Il faut souligner que d'autres membres de la famille APOBEC sont capables d'inhiber la réplication des virus Vif-. Par exemple, APOBEC3F semble avoir le même effet inhibiteur qu'APOBEC3G (Wiegand, Doehle et al. 2004; Rose, Marin et al. 2005). Cependant, la dégradation d'APOBEC par Vif ne semble pas être le seul mécanisme permettant l'absence d'incorporation d'APOBEC dans les particules virales (Mariani, Chen et al. 2003; Stopak, de Noronha et al. 2003).

2.8.4- Vpu

Le produit du gène *vpu*, synthétisée à partir du même ARNm bicistronique qui code pour Env, est une protéine membranaire de type I de 81 acides aminés (Cohen, Terwilliger et al. 1988; Strebel, Klimkait et al. 1988). Le gène *vpu* est absent du VIH-2 ainsi que de tous les isolats VIS à l'exception de VISgsn, VISmon et VISmus (Cohen, Terwilliger et al. 1988; Huet, Cheynier et al. 1990; Courgnaud, Pourrut et al. 2001; Courgnaud, Salemi et al. 2002). Vpu possède deux rôles majeurs dans le cycle de réplication du VIH-1 : 1- la dégradation du récepteur CD4 nouvellement synthétisée dans le RE et 2- l'augmentation de la relâche des particules virales (Klimkait, Strebel et al. 1990; Willey, Maldarelli et al. 1992; Bour, Schubert et al. 1995). Ces deux activités biologiques ont été attribuées à deux régions différentes de la protéine (Schubert, Bour et al. 1996).

1- Dans les cellules infectées, la dégradation de CD4 par Vpu nécessite l'expression de l'enveloppe virale. En effet, l'expression simultanée du précurseur d'enveloppe gp160 et du récepteur CD4 dans le RE résulte dans la formation de complexes gp160-CD4 (Buonocore and Rose 1990; Crise, Buonocore et al. 1990; Bour, Boulerice et al. 1991). La rétention de CD4 par Env permet à Vpu d'induire sa dégradation, qui permet à son tour à Env de quitter le RE plus rapidement (Willey, Maldarelli et al. 1992; Vincent and Abdul Jabbar 1995). Le mécanisme de dégradation de CD4 par Vpu se fait en plusieurs étapes dont la première est l'interaction avec CD4. Même si les

deux hélices α du domaine cytoplasmique de Vpu sont essentielles à la dégradation de CD4 (Lenburg and Landau 1993; Vincent, Raja et al. 1993; Yao, Friberg et al. 1995), c'est seulement la première (localisée en position proximale de la membrane) qui lie la queue cytoplasmique de CD4 (Tiganos, Yao et al. 1997). Il faut souligner que l'interaction entre les deux protéines est nécessaire mais pas suffisante à la dégradation de CD4 (Bour, Schubert et al. 1995); Vpu doit être phosphorylée sur deux résidus sérines (Ser 52 et 56) pour induire la dégradation de CD4. Cette phosphorylation est nécessaire au recrutement de β TrCP 1 et 2 (« beta transducin-repeat containing protein ») (Margottin, Bour et al. 1998; Buttica, Michielin et al. 2007) qui permettent de recruter à leur tour Skp1, une composante d'un complexe ubiquitine E3 ligase, impliquée dans la dégradation de protéines par le protéasome (Bai, Sen et al. 1996). L'importance de la diminution de l'expression de CD4 dans les cellules infectées a déjà été abordée dans la section dédiée à Nef (section 2.8.1).

2- En plus de son rôle dans la dégradation de CD4, Vpu stimule la relâche des particules virales de façon CD4 et Env indépendante (Cohen, Terwilliger et al. 1988; Strebel, Klimkait et al. 1988; Terwilliger, Cohen et al. 1989; Klimkait, Strebel et al. 1990) via son domaine N-terminal (Schubert, Bour et al. 1996; Tiganos, Friberg et al. 1998) qui ancre la protéine aux membranes cellulaires et qui pourrait former un canal ionique (Ewart, Sutherland et al. 1996; Schubert, Ferrer-Montiel et al. 1996). Les premières études sur Vpu ont démontré qu'elle augmente la relâche de particules virales de plusieurs rétrovirus (Gottlinger, Dorfman et al. 1993). Des études plus récentes suggèrent fortement que Vpu agit en contrecarrant un facteur de restriction. En effet, il a été rapporté que Vpu est nécessaire à la relâche de particules virales à partir d'hétérokaryons formés entre cellules susceptibles et non-susceptibles à l'effet de Vpu (Varthakavi, Smith et al. 2003). De façon analogue, la protéine Env du VIH-2 qui possède une activité similaire (Bour, Schubert et al. 1996), est aussi capable de stimuler la relâche de particules

virales à partir d'hétérokaryons formés par des cellules susceptibles et non-susceptibles (Abada, Noble et al. 2005).

Le mécanisme d'action du facteur de restriction semble être lié à une rétention à la surface cellulaire des virus néoformés (Neil, Eastman et al. 2006). Les virus qui resteraient attachés seraient par la suite internalisés. Ceci expliquerait l'observation de particules virales matures dans des compartiments intracellulaires en absence de Vpu (Klimkait, Strebel et al. 1990; Gottlinger, Dorfman et al. 1993; Harila, Prior et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). En contrecarrant cette activité cellulaire Vpu empêcherait l'internalisation de Gag ou de particules virales matures (Harila, Prior et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). L'effet de Vpu sur le trafic de Gag sera abordé en détail dans la section 4.

3- Assemblage et bourgeonnement viral

Comme décrit dans la section 2.6, le précurseur Gag possède toutes les informations nécessaires requises pour l'assemblage et le bourgeonnement de VLPs (Gottlinger 2001). Ces informations se trouvent dans trois domaines fonctionnels : le domaine M est impliqué dans l'attachement du précurseur Gag aux membranes, le domaine I est responsable des interactions Gag-Gag et le domaine L (« late ») est nécessaire au bourgeonnement et au détachement des particules virales de la surface cellulaire.

3.1- Ciblage aux membranes : Domaine M

Le domaine M comprend les premiers 32 acides aminés de la protéine MA. Comme décrit dans la section 2.6.1, la MA doit être myristylé pour cibler le précurseur Gag aux membranes cellulaires. L'acide myristylique, qui remplace la première méthionine du précurseur, s'insère dans la bicouche lipidique de la membrane. Toutefois, c'est grâce à un deuxième signal, constitué des résidus hydrophobes 6 à 8 et d'une région basique (résidus 26 à 32) que l'ancrage aux membranes se fait fermement (Hermida-Matsumoto and Resh 1999; Ono and Freed 1999; Paillart and Gottlinger 1999; Ono, Demirov et al. 2000). Il faut souligner que l'association de Gag aux membranes est essentielle pour la production de particules virales (Gottlinger 2001).

3.2- Multimérisation : Domaine I

L'assemblage de Gag est initié par l'interaction de la protéine de la NC avec l'ARN génomique (Sandefur, Smith et al. 2000; Khorchid, Halwani et al. 2002). En effet, il a été montré *in vitro* qu'en absence d'ARN la multimérisation de Gag ne peut se faire (Campbell and Vogt 1995; Gross, Hohenberg et al. 1997; Campbell and Rein 1999; Ganser, Li et al. 1999) (Khorchid, Halwani et al. 2002). De plus, le besoin d'ARN pour la production de particules virales est si important qu'en absence du signal

d'encapsulation de l'ARN génomique, la même quantité d'ARN cellulaire est incorporé à sa place (Muriaux, Mirro et al. 2001).

Les premières étapes de l'assemblage de Gag ne sont pas encore tout à fait bien comprises, toutefois, il a été proposé que le complexe NC-ARN promouvoit la dimérisation et par la suite, la multimérisation du précurseur Gag (Alfadhli, Dhenub et al. 2005). Des évidences en ce sens montrent que la délétion de la NC bloque complètement la production de VLPs (Zhang and Barklis 1997; Bowzard, Bennett et al. 1998; Cimorelli, Sandin et al. 2000; Muriaux, Costes et al. 2004) à moins que la NC soit remplacée par des domaines capables de dimériser (Zhang, Qian et al. 1998; Accola, Strack et al. 2000; Johnson, Scobie et al. 2002).

3.3- Bourgeonnement : Domaine L

L'assemblage rétroviral se termine par la relâche des particules virales à partir des membranes cellulaires. Cette dernière étape est très complexe et ne commence qu'à être mieux cernée. Les premières évidences indiquant que les rétrovirus possèdent des régions nécessaires pour la relâche virale viennent de l'observation que des mutants de délétion de la protéine p6 du VIH-1 empêchent grandement la production virale à des étapes très tardives (Gottlinger, Dorfman et al. 1991). En fait, ces mutants forment des structures virales immatures, incapables de se détacher de la surface cellulaire. Ce phénotype fut par la suite étendu à d'autres rétrovirus et il est devenu évident qu'il est dû à trois séquences différentes : le motif P(T/S)AP, le motif YP(X)_nL et le motif PPxY (Figure 10).

Ces motifs ont aussi été identifiés chez d'autres virus enveloppés incluant les rhabdovirus (Craven, Harty et al. 1999; Harty, Paragas et al. 1999), les filovirus (Harty, Brown et al. 2000), et les arenavirus (Perez, Craven et al. 2003; Strecker, Eichler et al. 2003) (Figure 10). L'identification de ces motifs a permis d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de

bourgeonnement et de relâche virales. Par exemple, l'un des premiers résultats importants concernant ces motifs est le fait qu'ils fonctionnent comme des unités distinctes, capables de promouvoir la relâche dans d'autres contextes que l'original (Parent, Bennett et al. 1995). Même si leur habilité à fonctionner dans des contextes hétérologues n'est pas universelle (Strack, Calistri et al. 2002; Martin-Serrano, Perez-Caballero et al. 2004), elle a permis l'identification de nouveaux motifs : par exemple, l'identification du motif FPIV présent chez les paramyxovirus est basée sur sa capacité à remplacer le motif PTAP du VIH-1 (Schmitt, Leser et al. 2005). Finalement, il est maintenant clair que ces motifs fonctionnent en recrutant différents facteurs cellulaires nécessaires à la relâche de particules virales.

3.3.1- Motif P(T/S)AP

Le motif P(TS)AP fut originalement identifié dans la protéine p6 du VIH-1 (Gottlinger, Dorfman et al. 1991; Huang, Orenstein et al. 1995). Par la suite, ce motif a été retrouvé dans d'autres rétrovirus, incluant HTLV-I (Bouamr, Melillo et al. 2003) et le virus des singes Mason-Pfizer (MPMV) (Gottwein, Bodem et al. 2003). Le motif PTAP recrute la protéine Tsg101, une protéine normalement impliquée dans le ciblage des protéines dans les CMVs (Garrus, von Schwedler et al. 2001; Martin-Serrano, Zang et al. 2001; VerPlank, Bouamr et al. 2001; Demirov, Ono et al. 2002) via une interaction directe avec son domaine N-terminal UEV (« ubiquitin E2 variant ») (Pomillos, Alam et al. 2002). Les domaines UEV possèdent des similarités structurales avec les ubiquitines E2 ligases et peuvent donc lier l'ubiquitine; toutefois, ils ne peuvent la transférer car ils ne possèdent pas leur site actif. Plusieurs évidences indiquent que c'est effectivement via le recrutement de Tsg101 que le motif PTAP facilite la relâche virale. Premièrement, il existe une corrélation très forte entre la capacité des mutants au niveau de p6 à lier Tsg101 et leur capacité à faciliter la relâche virale (Garrus, von Schwedler et al. 2001; Martin-Serrano, Zang et al. 2001). Deuxièmement, la déplétion de Tsg101 par des techniques d'ARN d'interférence résulte dans un phénotype L

qui est corrigé lorsque Tsg101 est réintroduit (Garrus, von Schwedler et al. 2001). En outre, l'expression des fragments liant Tsg101 (contenant le motif PTAP) induit aussi un phénotype L (Demirov, Ono et al. 2002). Finalement, le ciblage de Tsg101 au site d'assemblage de Gag permet la récupération de la relâche causée par la mutation du motif PTAP (Martin-Serrano, Zang et al. 2001).

L'orthologue de Tsg101 chez la levure, Vps23, fait partie d'une famille de molécules qui forme des complexes multiprotéiques requis pour le ciblage de protéines à l'intérieur de la vacuole. Ces complexes se nomment ESCRT -I, -II et -III (pour complexe endosomal requis pour le transport) (Katzmann, Odorizzi et al. 2002). Ces complexes ont été conservés chez les mammifères et sont impliqués dans la formation des vésicules à l'intérieur des CMVs (Pornillos, Garrus et al. 2002). La protéine Tsg101 avec les orthologues de Vps28 et Vps27 fait partie du complexe ESCRT-I. Le rôle des complexes ESCRT dans l'assemblage du VIH-1 sera abordé dans la section 4.1.1.

3.3.2- Motif YP(X)_nL

Le motif YPDL fut identifié dans la protéine p9 d'EIAV (« equine infectious anemia virus ») comme étant essentiel à la relâche virale (Parent, Bennett et al. 1995; Puffer, Parent et al. 1997). Par la suite, un motif plus complexe, YPLTSL, capable de faciliter la relâche virale du VIH-1 (Strack, Calistri et al. 2003) et de VIScol (Courgnaud, Pourrut et al. 2001; Strack, Calistri et al. 2003) furent identifiées. Ce motif interagit avec AIP1, une protéine qui lie des composantes des complexes ESCRT-I et ESCRT-III (voir section 4.1.2) (Martin-Serrano, Zang et al. 2003; Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003).

3.3.3- Motif PPxY

Le motif PPxY fut identifié dans le domaine p2b de RSV (Parent, Bennett et al. 1995) et facilite la relâche virale de plusieurs rétrovirus, incluant MMuLV (« moloney murine leukemia virus ») (Yuan, Li et al. 1999), HTLV-I (Bouamr, Melillo et al. 2003) et MPMV (Yasuda and Hunter 1998). La séquence PPxY représente un motif de liaison pour certaines ubiquitines E3 ligases HECT (« Homologous to E6AP C-terminus ») ayant des domaines WW, incluant Nedd4 (Harty, Paragas et al. 1999; Kikonyogo, Bouamr et al. 2001; Bouamr, Melillo et al. 2003; Heidecker, Lloyd et al. 2004; Sakurai, Yasuda et al. 2004). Il a été montré par la suite que ces protéines modulent la relâche de particules virales par un mécanisme qui reste à déterminer (Strack, Calistri et al. 2000; Strack, Calistri et al. 2002; Sakurai, Yasuda et al. 2004; Martin-Serrano, Eastman et al. 2005).

Plusieurs rétrovirus, incluant MPMV et HTLV-I possèdent deux motifs L, soit P(T/S)AP et PPxY (Bouamr, Melillo et al. 2003; Gottwein, Bodem et al. 2003; Blot, Perugi et al. 2004; Sakurai, Yasuda et al. 2004). Lorsque ces deux séquences sont présentes, c'est le motif PPxY qui semble jouer le rôle principal. En effet, chez HTLV-I la séquence P(T/S)AP peut être remplacée par un autre motif L, ce qui permet de récupérer la relâche virale. Par contre, le motif PPxY ne peut être remplacé par aucun autre motif (Wang, Machesky et al. 2004). En fait, chez MPMV et HTLV-I des mutations du motif PPxY causent un défaut de relâche à une étape plus précoce que les mutants P(T/S)AP (Le Blanc, Prevost et al. 2002; Gottwein, Bodem et al. 2003; Wang, Machesky et al. 2004).

Figure 10 : Représentation schématique des protéines structurales de différents virus enveloppés montrant la localisation de ses domaines L respectifs. Cette figure a été adaptée à partir de la revue annuelle « Retrovirus Budding » chez *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Morita E. Sudnquist WI. 2004. 20 :395-425.

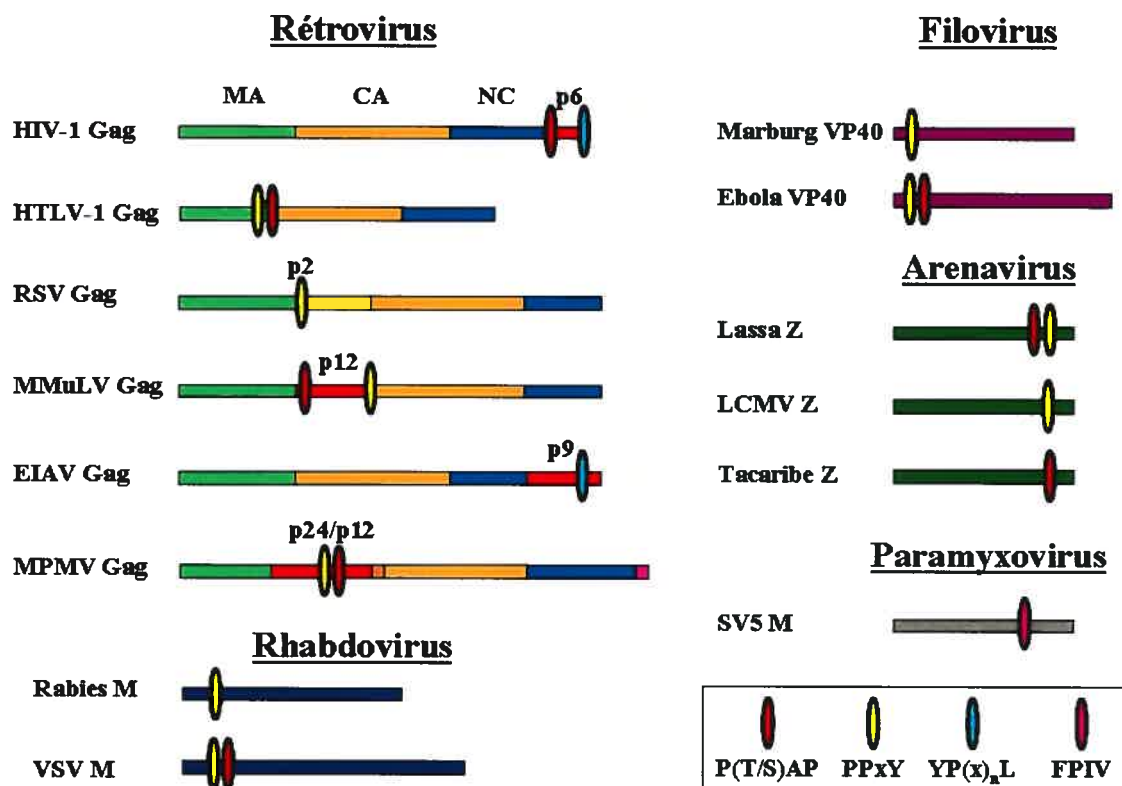


Figure 10

4- Site d'assemblage viral : membrane plasmique (MP) vs corps multivésiculaires (CMVs)

Tel que décrit précédemment, l'assemblage de Gag est un processus complexe qui se fait en plusieurs étapes incluant : 1- la dimérisation et multimérisation du précurseur Gag; 2- l'encapsidation de l'ARN génomique et 3- le transport des complexes Gag/ARN, Gag-Pol et Env au site d'assemblage viral. Toutefois, le site précis dans lequel l'assemblage viral se produit reste très controversé. Ainsi, plusieurs études suggèrent que des compartiments endosomaux tardifs, notamment les CMVs, représentent des intermédiaires précoces où Gag est ciblé avant le bourgeonnement à la MP (Figure 11) (Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Par contre, des études récentes supportent plutôt un modèle où l'assemblage de Gag se produirait principalement à la MP et l'accumulation de Gag et des particules virales dans les CMVs serait le résultat de leur internalisation à partir de la surface cellulaire (Figure 11) (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006).

Figure 11 : Modèles du trafic intracellulaire de Gag. Selon le modèle 1, Gag serait directement ciblé vers des compartiments endosomaux tardifs / CMVs. La relâche virale serait le fruit de leur migration ainsi que de leur fusion avec la membrane plasmique (MP). Par contre, selon le modèle 2 Gag serait premièrement ciblé à la MP à partir de laquelle il serait relâché. Ensuite, les molécules de Gag qui y resteraient associées ou des particules virales retenues à la surface cellulaire seraient par la suite internalisées vers des compartiments endosomaux tardifs / CMVs.

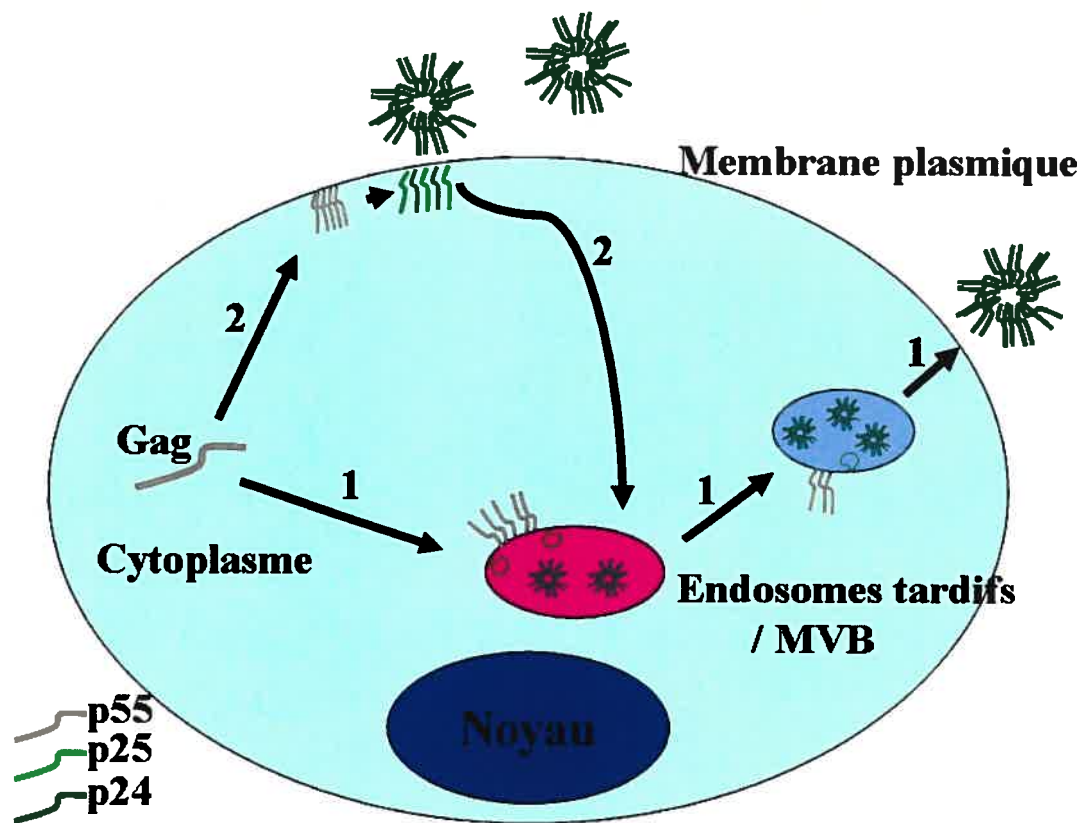


Figure 11

4.1- Endosomes tardifs / corps multivésiculaires

Historiquement, l'assemblage et le bourgeonnement des rétrovirus et du VIH étaient sensés de se produire à la MP (Gottlinger 2001; Demirov and Freed 2004). Toutefois, des données de microscopie électronique donnèrent les premières évidences soulevant la possibilité que le VIH pouvait s'assembler et bourgeonner à l'intérieur de compartiments intracellulaires dans des macrophages (Orenstein, Meltzer et al. 1988). Récemment, ces compartiments ont été identifiés comme étant des endosomes tardifs / CMVs (Raposo, Moore et al. 2002; Gould, Booth et al. 2003; Nguyen, Booth et al. 2003; Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Ono and Freed 2004). Par la suite, d'autres études ont rapporté la présence de Gag ou de particules matures à l'intérieur de ces mêmes compartiments dans plusieurs lignées cellulaires incluant des cellules T (MOLT) (Grigorov, Arcanger et al. 2006), les cellules HeLa (Nydegger, Foti et al. 2003; Ono and Freed 2004), 293 / 293T (Sherer, Lehmann et al. 2003; Dong, Li et al. 2005; Finzi, Brunet et al. 2006; Grigorov, Arcanger et al. 2006), Cos (Lindwasser and Resh 2004; Perlman and Resh 2006) ainsi que K562 et Mel JuSo (Nydegger, Foti et al. 2003). Dans ce contexte, la relâche des particules virales vers le milieu extracellulaire se produirait par la voie de sécrétion exosomale lors de la migration et la fusion des CMVs avec la MP (Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002). Ainsi, il a été montré que des stimuli connus pour augmenter l'exocytose de ces compartiments, tels qu'une augmentation de calcium intracellulaire, étaient capables d'augmenter la relâche virale chez des cellules présentant une accumulation de particules virales dans les CMVs (Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Ces observations ont permis de proposer une hypothèse postulant que Gag agirait tout simplement comme un cargo qui emprunte la voie de sécrétion d'exosomes afin de quitter les cellules (the « Trojan exosome » hypothesis) (Gould, Booth et al. 2003).

Par ailleurs, le bourgeonnement des particules rétrovirales et la formation de vésicules à l'intérieur des CMVs sont des processus analogues sur le plan topologique. En effet, la formation de vésicules dans les CMVs implique que la membrane cellulaire se courbe vers l'extérieur du cytoplasme; le bourgeonnement des particules virales se fait de la même façon, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains rétrovirus utilisent la machinerie nécessaire à la formation des CMVs pour sortir des cellules (Demirov and Freed 2004; Morita and Sundquist 2004).

4.1.1- Complexes endosomaux requis pour le transport (ESCRT)

Il est connu que l'ubiquitine joue un rôle clé dans le trafic de protéines membranaires vers les lysosomes. En effet, la mono-ubiquitination de certains récepteurs de surface sert comme signal de ciblage vers des vésicules endocytaires en formation à la MP (Hicke and Dunn 2003). Par la suite, des protéines possédant des domaines spécifiques de reconnaissance pour la mono-ubiquitination et qui appartiennent à la famille Vps de classe E (« vacuolar protein sorting ») entrent en jeu. Le rôle de ces molécules est de cibler les protéines mono-ubiquitinées vers les vésicules en formation dans les CMVs. La fusion des CMVs avec des membranes lysosomales permet le transfert des vésicules internes des CMVs vers les lysosomes où ces vésicules et leur contenu sont dégradés. Ce mécanisme permet aux cellules de dégrader des protéines transmembranaires ainsi que certains lipides (qui seront par la suite recyclés) présents dans les vésicules internes des CMVs (Katzmann, Odorizzi et al. 2002; Babst 2005).

Des études chez la levure ont identifié 17 protéines Vps comme étant nécessaires au ciblage des protéines membranaires dans la vacuole (chez la levure) ou dans le lumen des CMVs (chez les mammifères) (Gruenberg and Stenmark 2004; Babst 2005). Au moins un orthologue humain pour chaque protéine de classe E a été identifié. De plus, il est remarquable de noter que les complexes multiprotéiques qu'elles forment, ESCRT-I, -II et -III, ont été

préservés (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003). Ces complexes sont essentiels à la biogénèse des vésicules internes des CMVs et sont recrutés séquentiellement (Katzmann, Babst et al. 2001).

4.1.1.1- ESCRT-I

Les protéines mono-ubiquitinées destinés à être dégradées dans les lysosomes sont reconnues dans les endosomes précoces par la protéine Hrs (« heptocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate », Vps27 chez la levure) qui possède des motifs spécifiques pour interagir avec l'ubiquitine (UIM, « ubiquitin interacting motif ») (Hofmann and Falquet 2001; Polo, Sigismund et al. 2002; Shih, Katzmann et al. 2002). Le motif PSAP présent chez Hrs permet de recruter le complexe ESCRT-I en liant le domaine UEV de Tsg101 (vps23 chez la levure) (Bache, Brech et al. 2003; Katzmann, Stefan et al. 2003; Pornillos, Higginson et al. 2003). De plus, la présence d'un motif PTAP chez Tsg101 permettrait de consolider cette interaction en se liant à Hrs (Amara and Littman 2003; Bache, Brech et al. 2003; Katzmann, Stefan et al. 2003; Pornillos, Higginson et al. 2003). Finalement, il a été montré que Hrs peut remplacer le domaine L du VIH-1 lorsque fusionné en position C-terminale de Gag (Pornillos, Higginson et al. 2003) et que la surexpression des mutants au niveau de son domaine N-terminal ou au niveau de son motif PSAP inhibe la relâche du VIH-1 en empêchant l'interaction de Gag avec Tsg101 (Bouamr, Houck-Loomis et al. 2007).

La protéine Tsg101 fait partie du complexe soluble ESCRT-I, de 350 kDa, qui comprend aussi les protéines VPS28 et VPS37 (Vps28 et Vps37 chez la levure) (Stuchell, Garrus et al. 2004; Eastman, Martin-Serrano et al. 2005) (Figure 12). Il faut souligner que toutes ces protéines sont nécessaires à la relâche du VIH-1. Par exemple, le domaine C-terminal de Tsg101 recrute VPS28 à la MP suite à l'expression de Gag du VIH-1 (Martin-Serrano, Zang et al. 2003). Des mutations dans Tsg101 qui empêchent cette interaction

affectent la relâche de particules virales (Martin-Serrano, Zang et al. 2003; Stuchell, Garrus et al. 2004). En ce qui concerne VPS37, quatre différentes versions (Vps37 A-D) ont récemment été identifiées (Bache, Slagsvold et al. 2004; Stuchell, Garrus et al. 2004; Eastman, Martin-Serrano et al. 2005) et les formes B et C ont été rapportées comme étant nécessaires à la relâche PTAP-dépendante (Stuchell, Garrus et al. 2004; Eastman, Martin-Serrano et al. 2005). Finalement, le rôle de Tsg101 dans la relâche PTAP-dépendante a déjà été abordé dans la section 3.3.1.

4.1.1.2- ESCRT-II

Le complexe ESCRT-II est constitué des protéines EAP20 (Vps25 chez la levure), EAP30 (Vps22 chez la levure) et EAP45 (Vps36 chez la levure) et son rôle est de faire le lien entre les complexes ESCRT-I et -III (von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Langelier, von Schwedler et al. 2006). En effet, les protéines EAP30 et EAP45 recrutent directement Tsg101 (ESCRT-I) (von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Langelier, von Schwedler et al. 2006). De plus, ces trois protéines lient la protéine CHMP6 (« charged MVB protein ») du complexe ESCRT-III (von Schwedler, Stuchell et al. 2003) (Figure 12). Malgré un rôle important dans la biogénèse des CMVs et sa capacité à lier l'ubiquitine (Alam, Sun et al. 2004; Langelier, von Schwedler et al. 2006), le VIH-1 ne semble pas utiliser le complexe ESCRT-II pour quitter les cellules. En effet, le bourgeonnement et l'infectivité du VIH-1 ne sont pas affectés lorsque EAP20 est déplété des cellules à l'aide d'ARN d'interférence (Langelier, von Schwedler et al. 2006).

4.1.1.3- ESCRT-III

Le complexe ESCRT-III constitue le noyau de la machinerie impliquée dans la formation de vésicules à l'intérieur des CMVs. Six protéines CHMP forment le complexe ESCRT-III (Figure 12). Tel que décrit dans la section précédente, CHMP6 lie toutes les composantes d'ESCRT-II

ainsi que CHMP4. Les protéines CHMP4 (A, B et C) permettent à leur tour de recruter AIP1 (voir section 4.1.2).

La protéine CHMP5 lie quant à elle LIP5 (Ward, Vaughn et al. 2005). Des techniques de déplétion par ARN d'interférence ou des mutants dominants négatifs (créés par la fusion d'une protéine telle que EGFP en C-terminal) des protéines LIP5, CHMP2, CHMP3 ou CHMP4 diminuent grandement la relâche du VIH-1 (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Ward, Vaughn et al. 2005). De plus, il est possible que toutes les protéines CHMP (incluant CHMP 1, 2 et 3) soient capables de lier l'AAA (pour « ATPase associated with various cellular activities ») ATPase VPS4 (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003). Ce recrutement induit la dislocation de la machinerie ESCRT dans le cytoplasme et permet plusieurs cycles de formation de vésicules (Babst, Sato et al. 1997; Babst, Wendland et al. 1998). En fait, ce phénomène est analogue à celui qui permet la dislocation des complexes SNARE (« soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptor ») par la NSF AAA ATPase (Brunger and DeLaBarre 2003). VPS4 possède un rôle très important dans la relâche de particules virales. En effet, ses transdominants négatifs sont des inhibiteurs très puissants de la relâche, indépendamment du motif L utilisé (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003). En guise de comparaison, l'inactivation de Tsg101 ou AIP1 n'affecte que la relâche des virus qui utilisent respectivement les motifs P(TS)AP ou YP(X)_nL. Ceci suggère que tous les rétrovirus entrent dans la voie de biogénèse des CMVs en amont de VPS4 mais que leur relâche est ultimement gouvernée par celle-ci.

Figure 12 : Modèle du réseau d'interactions des protéines de Classe E nécessaire à la biogénèse des vésicules internes dans les CMVs. Certains virus incluant les rétrovirus utilisent cette même machinerie afin de quitter les cellules. Cette figure a été adaptée à partir de la revue annuelle « Retrovirus Budding » chez *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Morita E. Sudnquist WI. 2004. 20 :395-425.

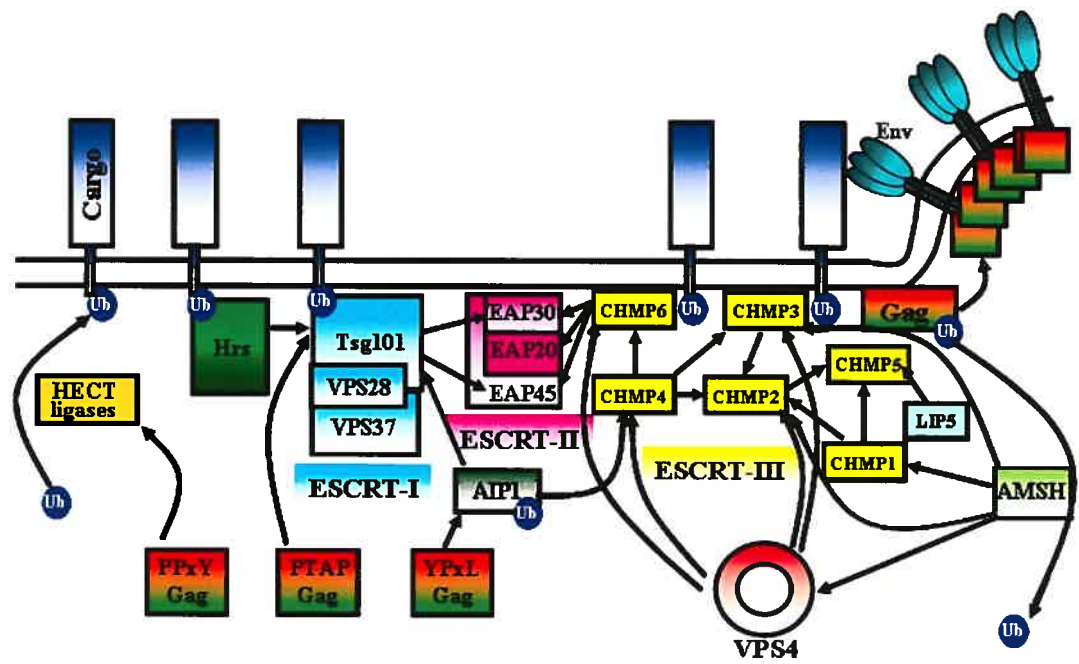


Figure 12

4.1.2- AIP1

AIP1 (« ALG-2-interacting protein 1 »; Bro1 ou Vps31 chez la levure) s'est récemment ajoutée à la liste des protéines impliquées dans la biogénèse des CMVs. Elle fut identifiée chez la levure à cause de son implication dans la diminution de l'expression de surface d'une perméase, Gap1, de façon ubiquitine-dépendante (Springael, Nikko et al. 2002). Même si AIP-1 ne fait partie d'aucun complexe ESCRT, elle fait le lien entre ESCRT-I et -III via son interaction avec Tsg101 et certaines protéines CHMP (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Fisher, Chung et al. 2007). De plus, elle lie aussi des endophilines impliquées dans l'invagination et la fission des vésicules endocytaires (Schmidt, Wolde et al. 1999; Chatellard-Causse, Blot et al. 2002). Finalement, tel que décrit dans la section 3.3.2, son interaction avec le domaine p6 de Gag ainsi que son incorporation dans les particules virales du VIH-1 a permis d'identifier le motif YP(X)_nL comme étant important pour la relâche de certains rétrovirus (Strack, Calistri et al. 2003; Fisher, Chung et al. 2007).

4.1.3- AMSH

Chez la levure, l'isopeptidase Doa4 enlève l'ubiquitine des protéines mono-ubiquitinées avant qu'elles soient incorporées dans les vésicules internes des CMVs. Ceci permet de maintenir de façon constante le niveau d'ubiquitine dans les cellules (Amerik, Nowak et al. 2000). Son orthologue chez les mammifères a récemment été identifié : AMSH (« associated molecule with the SH3 domain of STAM »). Cette protéine interagit avec des composantes du complexe ESCRT-III (CHMP1A, -1B, -2B et -3) et l'ATPase VPS4 de manière mutuellement exclusive (Agromayor and Martin-Serrano 2006; Zamborlini, Usami et al. 2006). En fait, le recrutement de VPS4 ne se ferait que suite à la désubiquitination de la protéine ciblée pour la dégradation. Par ailleurs, bien que l'activité catalytique d'AMSH semble impliquée dans la relâche de particules virales (son mutant inactif empêche la relâche) (Agromayor and Martin-Serrano 2006), son véritable rôle dans le processus

n'est pas encore clair. En effet, sa déplétion par ARN d'interférence plutôt que d'empêcher la relâche, l'augmente modestement (Agromayor and Martin-Serrano 2006).

4.1.4- Rôle de l'ubiquitination dans la relâche virale

Comme il a pu être constaté au cours de cette revue, plusieurs observations suggèrent que l'ubiquitine joue un rôle général dans le bourgeonnement rétroviral. En effet, il a été montré que des inhibiteurs du protéasome ou des mutations dans l'ubiquitine empêchent la relâche virale (Patnaik, Chau et al. 2000; Schubert, Ott et al. 2000; Strack, Calistri et al. 2000; Strack, Calistri et al. 2002; Ott, Coren et al. 2003). De plus, une ubiquitine HECT ligase est nécessaire pour la relâche des virus répondant aux motifs PPxY (Martin-Serrano, Eastman et al. 2005). Finalement, les niveaux de mono-ubiquitination de Gag semblent être influencés par les motifs-L. En effet, la présence des motifs PTAP et LYPxL diminuent la mono-ubiquitination de Gag (Martin-Serrano, Perez-Caballero et al. 2004; Gottwein and Krausslich 2005), probablement en recrutant AMSH (Agromayor and Martin-Serrano 2006). Par contre, les motifs PPxY l'augmentent, vraisemblablement dû à leur association avec des ubiquitines HECT ligases (Strack, Calistri et al. 2000; Martin-Serrano, Perez-Caballero et al. 2004). Bien que les mécanismes par lesquels l'ubiquitine facilite la relâche virale ne soient pas encore totalement élucidés, il a été montré que la mutation de tous les résidus lysine en aval de la CA du VIH-1 induit un défaut de relâche similaire à celui induit par des mutations dans son motif-L (Gottwein, Jager et al. 2006).

4.2- Membrane plasmique

Bien qu'il soit indéniable que Gag puisse s'accumuler dans les CMVs en fonction du type cellulaire et que son domaine p6 recrute directement des composantes essentielles à la biogénèse des CMVs, la route empruntée afin d'y arriver reste très controversée. En effet, même si certaines études ont

proposé que Gag soit ciblé dans les CMVs avant de se rendre à la MP (Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006), d'autres ont plutôt proposé un modèle où Gag serait ciblé et assemblé directement à la membrane plasmique. La localisation endosomale de Gag s'expliquerait par un mécanisme d'internalisation sensible à des inhibiteurs d'endocytose (voir section 5) (Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). Le fait que Gag doive recruter des facteurs essentiels à la formation des CMVs pour être relâché n'empêche en rien ce dernier modèle. En effet, il a été démontré que Gag est capable de les recruter directement à la MP (Martin-Serrano, Zang et al. 2001; Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003).

Par ailleurs, deux de ces études ont identifié la protéine Vpu comme étant un déterminant crucial pour la localisation de Gag à la MP (Harila, Prior et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). En effet, dans les cellules HeLa l'internalisation de Gag vers les CMVs est accentuée en absence de cette protéine (Harila, Prior et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). Ce rôle serait conservée chez les cellules T où l'absence de Vpu résulte dans l'accumulation de particules virales à l'intérieur de compartiments intracellulaires (Klimkait, Strebel et al. 1990). Par contre, chez les macrophages, Gag ainsi que des particules virales matures s'accumulent dans les CMVs même en présence de Vpu (Nguyen, Booth et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003).

Il faut souligner qu'au moins deux domaines de la MP ont été proposés comme étant des plateformes d'assemblage du VIH-1: les radeaux lipidiques et les microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs).

4.2.1- Radeaux lipidiques (lipid RAFTS)

Les molécules Gag de plusieurs rétrovirus, incluant le VIH-1, ne se localisent pas uniformément à la MP mais plutôt dans des régions discrètes de celle-ci (Jones, Blaug et al. 1990; Sandefur, Varthakavi et al. 1998; Hermida-Matsumoto and Resh 2000; Ono, Orenstein et al. 2000). Ces régions ont des marqueurs des radeaux lipidiques (Hermida-Matsumoto and Resh 2000; Nguyen and Hildreth 2000). Ces microdomaines joueraient un rôle critique dans plusieurs processus biologiques incluant la transduction des signaux ainsi que le trafic de protéines, vraisemblablement en concentrant les molécules impliquées dans ces processus (Nguyen and Hildreth 2000; Simons and Toomre 2000). Les radeaux lipidiques sont fortement enrichis en sphingolipides et cholestérol. Cette composition particulière permet de les extraire par lyse cellulaire avec des détergents non-ioniques tels que le Triton X-100, à basse température. En utilisant cette technique il a été démontré que, suite à son association membranaire, Gag est ciblé préférentiellement dans ces microdomaines. Ce processus serait modulée par la MA ainsi que par la multimérisation du précurseur Gag (Lindwasser and Resh 2001; Ono and Freed 2001).

Le modèle d'assemblage de Gag dans les radeaux lipidiques est aussi soutenu par le fait que la composition lipidique du VIH-1 diffère de celle de la MP cellulaire. En effet, elle est grandement enrichie en sphingolipides et cholestérol (Aloia, Tian et al. 1993). Une estimation récente de la composition lipidique du VIH-1 indique qu'il y a autour de 296 000 molécules lipidiques par particule virale (Brugger, Glass et al. 2006). Finalement, il a été montré que la déplétion de cholestérol à la MP ou l'inhibition de sa synthèse, réduit la relâche des particules virales (Ono and Freed 2001) et diminue significativement leur infectivité (Ono and Freed 2001; Graham, Chertova et al. 2003; Liao, Graham et al. 2003). Par ailleurs, l'importance des sphingolipides dans le processus d'assemblage viral a été confirmée en

inhibant leur biosynthèse. Bien que cela n'affecte pas la relâche des particules virales, elle diminue grandement leur infectivité (Brugger, Glass et al. 2006).

4.2.2- Microdomaines enrichies en tétraspanines (TEMs)

Les tétraspanines possèdent quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et trois courtes régions cytoplasmiques. Chez l'humain, 33 tétraspanines ont été identifiées, incluant CD63, CD9, CD81 et CD82 (Berditchevski and Odintsova 2007). Ces protéines s'associent spécifiquement entre elles à la surface cellulaire et constituent des plateformes qui organiseraient la MP afin de réaliser différentes fonctions incluant la présentation antigénique, l'adhésion cellulaire, la fusion cellule-cellule ainsi que l'activation cellulaire (Hemler 2005; Levy and Shoham 2005; Berditchevski and Odintsova 2007). Il faut souligner que les TEMs ne sont pas composés que des tétraspanines car d'autres protéines, incluant le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II), sont recrutés spécifiquement par des tétraspanines (Kropshofer, Spindeldreher et al. 2002; Unternaehrer, Chow et al. 2007).

La protéine CD63 est un marqueur classique des endosomes tardifs/CMVs et ne serait que faiblement présente à la MP (Nydegger, Khurana et al. 2006). Toutefois, cette molécule est enrichie dans les particules virales relâchées par des cellules qui supportent l'assemblage viral à la MP (Orentas and Hildreth 1993). La possibilité que cette tétraspanine soit incorporée lors de l'assemblage viral dans des plateformes qui la concentrent (TEMs) a été récemment étudiée (Nydegger, Khurana et al. 2006). Ces recherches ont permis d'établir que le marquage ponctué de Gag ou d'Env à la MP des cellules HeLa ou Jurkat colocalise avec des tétraspanines (Booth, Fang et al. 2006; Nydegger, Khurana et al. 2006). De plus, ces microdomaines sont capables de recruter différentes composantes des complexes ESCRT suite à l'expression de Gag (Booth, Fang et al. 2006; Nydegger, Khurana et al. 2006).

Bien que Gag possède toutes les informations nécessaires pour se rendre aux TEMs, les auteurs ont observé que l'expression d'Env augmente ce ciblage. Ce résultat suggère qu'Env pourrait influencer le site d'assemblage viral (nous reviendrons sur cette question au chapitre 4). Finalement, les auteurs ont montré que l'intégrité des TEMs est importante pour la relâche du VIH-1. En effet, l'ajout d'un anticorps anti-TEMs (anti-CD9) qui modifie leur structure spatiale, diminue la relâche virale (Nydegger, Khurana et al. 2006).

Tel que décrit dans la section précédente et celle-ci, les TEMs et les radeaux lipidiques partagent plusieurs caractéristiques. En effet, les deux plateformes permettent d'organiser la MP, recrutent spécifiquement Gag, Env et des composantes ESCRT et leur désorganisation à l'aide de drogues ou d'anticorps diminue la relâche virale. Toutefois, bien qu'il ait été montré que le cholestérol soit important pour la structure des TEMs, suggérant un lien entre les deux plateformes (Delaguillaumie, Harriague et al. 2004; Silvie, Charrin et al. 2006), il faut souligner que les TEMs ne colocalisent pas avec des marqueurs des radeaux lipidiques (Nydegger, Khurana et al. 2006). Par conséquent, il est possible que le VIH-1 utilise deux plateformes différentes pour quitter les cellules infectées.

4.3- Facteurs ou mécanismes cellulaires influençant le site d'assemblage viral

Comme nous l'avons décrit dans les sections 4.1 et 4.2, le site d'assemblage du VIH-1 varie dépendamment du type cellulaire étudié. Il est donc possible qu'en plus des déterminants viraux, des facteurs cellulaires de l'hôte jouent un rôle dans la détermination du site d'assemblage du VIH-1.

4.3.1- AP3

En essayant d'identifier de nouveaux partenaires de Gag du VIH-1 à l'aide d'une banque d'ADNc des cellules HeLa, Dong et ses collaborateurs ont identifié l'interaction de la sous-unité δ de l'adaptine AP3 avec la MA (Dong, Li et al. 2005). Cette adaptine est impliquée dans le trafic de certaines protéines, incluant CD63 vers les CMVs (Dell'Angelica, Ohno et al. 1997; Rous, Reaves et al. 2002). Remarquablement, l'expression des inhibiteurs dominant négatifs d'AP3 ou sa déplétion à l'aide d'ARN d'interférence, inhibent la localisation de Gag dans les CMVs ainsi que la production de particules virales (Dong, Li et al. 2005). Ces données ont suggéré que le ciblage de Gag dans les CMVs était essentiel à la production de particules virales. Toutefois, malgré l'intensité de la recherche dans le trafic intracellulaire de Gag il n'y a pas eu d'autres études scientifiques qui ont corroboré ou donné suite à ces données.

4.3.2- Phosphatidylinositols

Il a récemment été démontré que la localisation de Gag à la MP dépend d'une classe particulière de phosphatidylinositols: les phosphatidylinositols 4,5 bi-phosphate (PI(4,5)P₂). Ces phosphatidylinositols se trouvent dans la membrane interne de la MP (Behnia and Munro 2005) et leur déplétion ou leur relocalisation vers les endosomes résulte dans la redistribution de Gag dans ces compartiments ainsi que dans une forte diminution de la relâche virale (Ono, Ablan et al. 2004). Le fait que la substitution de la MA par le domaine N-terminal de la kinase Fyn diminue la sensibilité du virus à la manipulation des PI(4,5)P₂ a suggéré que la MA soit directement impliquée dans l'interaction avec ces phosphatidylinositols (Ono, Ablan et al. 2004). En fait, une étude récente a réussi à montrer cette interaction entre la MA (résidus Lys/Arg 22, Ser 77 et Asn 80) et les PI(4,5)P₂ (Saad, Loeliger et al. 2006; Saad, Miller et al. 2006). Il faut souligner que le site d'interaction est fortement conservé dans les 454 isolats publiés du VIH-1, suggérant un rôle clé de cette interaction pour le cycle de

réplication du virus (Saad, Miller et al. 2006). En fait, tel que discuté dans la section 2.6.1, cette interaction induit un changement conformationnel chez la MA qui permet d'exposer son acide myristylique afin de lier les membranes (Saad, Loeliger et al. 2006; Saad, Miller et al. 2006).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les PI(4,5)P2 s'associent sous certaines conditions (ex : lors de l'activation cellulaire) avec les radeaux lipidiques (voir section 4.2.1) (Golub and Caroni 2005; McLaughlin and Murray 2005). Ceci pourrait expliquer pourquoi Gag ne se localise pas uniformément à la MP mais plutôt dans des microdomaines spécifiques où les PI(4,5)P2 seraient concentrés.

Finalement, une étude récente a démontré que des anticorps dirigés contre des phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP), un intermédiaire lors de la synthèse des PI(4,5)P2 (Downes, Gray et al. 2005), étaient capables d'inhiber la réplication virale dans des PBMC au même titre qu'un anticorps neutralisant anti-VIH (Brown, Karasavvas et al. 2007), démontrant encore une fois l'importance de ces lipides dans le cycle de réplication du VIH-1.

4.3.3- Endocytose

Tel que décrit précédemment, quatre études ont observé un ciblage direct de Gag à la MP (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). Le fait que l'accumulation du virus dans les CMVs puisse être bloquée par des inhibiteurs d'endocytose incluant des mutants transdominants négatifs de la dynamine, Rab5 et Eps15 (Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006) soulève la possibilité que l'accumulation de Gag dans les CMVs soit gouvernée par la cinétique d'endocytose de chaque type cellulaire. En ce sens, il a été montré chez les macrophages que si l'on bloque leur mécanisme principal d'endocytose (la phagocytose), on réduit drastiquement l'accumulation du

VIH-1 dans le CMVs (Jouvenet, Neil et al. 2006). Les mécanismes d'endocytose seront abordés en détail dans la section 5.

4.4- Transmission virale : virus libre versus synapse virologique

Deux mécanismes de propagation virale ont été décrits pour les rétrovirus. Premièrement, il existe la route dite « classique » où des virus libres se lient à la surface des cellules cibles via les récepteurs et co-récepteurs viraux. Le deuxième mécanisme implique la transmission directe du virus entre les cellules infectées et les cellules cibles. Bien que ce phénomène soit connu depuis plusieurs années déjà (Gupta, Balachandran et al. 1989; Sato, Orenstein et al. 1992; Dimitrov, Willey et al. 1993; Phillips 1994; Carr, Hocking et al. 1999; Johnson and Huber 2002) ce n'est que récemment qu'il a été décrit en détail pour le HTLV-1 (Igakura, Stinchcombe et al. 2003) et par la suite pour le VIH-1 (McDonald, Wu et al. 2003). En fait, les contacts entre deux cellules induisent chez celle qui est infectée une polarisation du centre organisateur des microtubules vers la jonction cellule-cellule. Par la suite, les protéines virales de structure, le génome ainsi que des molécules d'adhésion s'accumulent dans cette jonction, appelée synapse virologique (SV), permettant ainsi une transmission virale efficace (Igakura, Stinchcombe et al. 2003; McDonald, Wu et al. 2003; Barnard, Igakura et al. 2005).

4.4.1- Infection par des virus libres

La transmission du VIH-1 est mille fois plus efficace par contact cellule-cellule que par voie « classique » (Sato, Orenstein et al. 1992; Dimitrov, Willey et al. 1993; Phillips 1994). De plus, une étude récente a démontré que la propagation virale *in vitro* est largement due à la transmission cellule-cellule (Sourisseau, Sol-Foulon et al. 2007). Les auteurs de cette étude ont mesuré la transmission virale dans des co-cultures des lymphocytes T CD4 dans des conditions statiques ou d'agitation. Bien que le

simple fait d'agiter les cellules n'affecte pas la viabilité cellulaire, la production virale ni l'expression de CD4, il diminue la propagation virale de façon drastique. Ceci serait dû à une diminution du temps de contact entre les cellules, ce qui empêcherait la formation des synapses virologiques (Sourisseau, Sol-Foulon et al. 2007). Ces résultats pourraient expliquer, du moins en partie, pourquoi chez les individus infectés la transmission virale se fait de façon prédominante dans les organes lymphoïdes où la concentration des lymphocytes est très élevée et leur circulation grandement diminuée, ce qui augmenterait le temps de contact entre les cellules (Bouso and Robey 2004; Celli, Garcia et al. 2005).

4.4.2- Infection par contact cellule/cellule

Tel que décrit ci-dessus, une synapse virologique représente le site de contact entre une cellule infectée (effecteur) et une cellule exprimant les récepteurs viraux (cible). Pour le VIH-1, ceci implique le recrutement du récepteur CD4, des co-récepteurs CXCR4 ou CCR5 ainsi que des molécules d'adhésion (ex : LFA-1) dans la cellule cible; tandis que chez la cellule infectée Env, Gag et les molécules d'adhésion correspondantes (ex : ICAM) doivent être présentes au site de contact (Jolly, Kashefi et al. 2004; Jolly and Sattentau 2004). L'assemblage de ce complexe dépend aussi du cytosquelette d'actine chez la cellule cible (Jolly, Kashefi et al. 2004) mais aussi de celui d'actine et des microtubules chez la cellule infectée (effectrice) (Jolly, Mitar et al. 2007). De plus, la stabilité des radeaux lipidiques semble jouer un rôle dans ce processus car leur dislocation avec des drogues liant le cholestérol inhibe la formation des SV (Jolly and Sattentau 2005).

Les synapses virologiques impliquant le VIH-1 ont été décrites entre des lymphocytes T (Jolly, Kashefi et al. 2004; Jolly and Sattentau 2005) mais aussi entre des cellules dendritiques et des lymphocytes T (McDonald, Wu et al. 2003; Ganesh, Leung et al. 2004). Le rôle des CD est de patrouiller les muqueuses afin de capturer et transformer des pathogènes en peptides

antigéniques pour les présenter dans le contexte du CMH-II aux lymphocytes T CD4 (Banchereau and Steinman 1998). Le VIH-1 capturé par les CDs dans les muqueuses est présenté aux lymphocytes T CD4 dans les organes lymphoïdes (Spira, Marx et al. 1996; Hu, Frank et al. 2004). La transmission du VIH-1 peut alors se faire indépendamment de l'infection active des CDs. En effet, les CDs peuvent lier des particules virales infectieuses, sans être infectées elles mêmes (Blauvelt, Asada et al. 1997; Turville, Santos et al. 2004). Ceci se fait à l'aide de certaines molécules incluant la lectine de type C DC-SIGN (« DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin ») (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000) ou certaines tétraspanines (Garcia, Pion et al. 2005; Wiley and Gummuluru 2006). Un modèle de transmission propose que suite à leur attachement, ces particules virales soient internalisées dans des compartiments ressemblant aux CMVs (Garcia, Pion et al. 2005; Wiley and Gummuluru 2006). Suite à l'interaction entre les CDs et les cellules T, ces particules seraient relocalisées vers la SV afin de les transmettre *en trans* aux cellules T (McDonald, Wu et al. 2003; Turville, Santos et al. 2004; Garcia, Pion et al. 2005). Toutefois, ce modèle commence à être contesté. En effet, il a été signalé que les particules internalisées par les CDs perdent rapidement (en quelques heures) leur potentiel infectieux (Moris, Nobile et al. 2004). De plus, une étude récente a montré que les virions transmis *en trans* par les CDs aux cellules T proviennent majoritairement de la surface cellulaire et non pas de compartiments intracellulaires. En effet, c'est seulement sous des conditions particulières de stimulation avec des superantigènes (qui imitent la présentation antigénique) qu'une quantité restreinte de particules virales provenant de compartiments intracellulaires est transmise *en trans* (Cavrois, Neidleman et al. 2007). Des résultats similaires ont été rapportés entre des cellules Raji DC-SIGN⁺ et de cellules HEK 293T CD4⁺ CCR5⁺ (Burleigh, Lozach et al. 2006).

4.4.3- Stabilité des virus s'accumulant dans les CMVs

Tel que décrit dans la section 4.1, il est connu depuis longtemps que chez les macrophages le VIH-1 s'accumule dans des compartiments intracellulaires possédant des marqueurs des CMVs (Raposo, Moore et al. 2002; Gould, Booth et al. 2003; Nguyen, Booth et al. 2003; Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Ono and Freed 2004). En revanche, ce n'est que récemment que leur potentiel infectieux a été analysé par deux études. Ces études ont démontré que ces virus restent infectieux (Kramer, Pelchen-Matthews et al. 2005; Sharova, Swingler et al. 2005) et ce, pendant de longues périodes de temps (jusqu'à six semaines) (Sharova, Swingler et al. 2005).

Étant donné que les macrophages sont capables de transmettre le VIH-1 en *trans* (Carr, Hocking et al. 1999; Swingler, Brichacek et al. 2003; Sharova, Swingler et al. 2005), que ce mode de transmission est très efficace (Carr, Hocking et al. 1999) et finalement, qu'à la différence des CD4 les virus accumulés dans les CMVs des macrophages restent infectieux pendant de longues périodes de temps (Sharova, Swingler et al. 2005), il se peut que l'accumulation virale dans ces compartiments soit avantageuse *in vivo*. Toutefois, il n'y a pas encore de données probantes à ce sujet dans la littérature.

5- Mécanismes d'internalisation à partir de la MP

Tel que décrit dans la section 4.3.3, il a été rapporté que certaines voies d'endocytose contrôlent, du moins en partie, le trafic intracellulaire de Gag. Cette nouvelle section se veut un résumé des connaissances actuelles sur les principaux mécanismes d'endocytose.

L'endocytose représente un processus hautement coordonné, essentiel pour l'homéostasie et la signalisation cellulaire. L'endocytose permet aux cellules de contrôler la composition de la MP en internalisant des récepteurs de signalisation, des protéines transmembranaires et des lipides (Maldonado-Baez and Wendland 2006). De plus, l'endocytose est exploitée par plusieurs virus incluant influenza, le virus de la stomatite vésiculaire ou SV40 pour entrer dans les cellules (Sieczkarski and Whittaker 2002). Il existe plusieurs formes d'endocytose qui se divisent principalement en deux catégories, dépendamment de leur dépendance aux molécules de clathrine (Figure 13). La forme la plus étudiée est sans nul doute l'internalisation clathrine-dépendante qui permet soit de recycler les protéines internalisées soit de les dégrader dans les lysosomes (Mousavi, Malerod et al. 2004). En ce qui concerne les autres formes, l'endocytose dépendante des cavéolines a été largement étudié principalement dû à leur association aux radeaux lipidiques (Nabi and Le 2003).

Figure 13 : Résumé de deux routes majeures d'endocytose : clathrine- et cavéoline- dépendantes. (A) La formation des puits recouverts de clathrine nécessite l'action coordonnée de l'Epsine, Eps15, AP2 et la dynamine. Leur migration vers les endosomes précoces (EP) se fait via un mécanisme contrôlé par la petite GTPase Rab5. Les EPs peuvent être recyclés soit à la membrane plasmique (MP) via les endosomes de recyclage (ER) (contrôlés par Rab4/11) ou être ciblés vers les endosomes tardifs (ET) via Rab7 afin de dégrader leur contenu dans les lysosomes (LY). Par contre, les cavéolines (B) se forment dans des plateformes de la MP enrichies en cholestérol et nécessitent la présence de la cavéoline1 et de la dynamine. Les cavéolines peuvent ensuite être internalisées vers le réticulum endoplasmique (RE) via le cavésome (CAV), vers le complexe de Golgi ou directement vers les EPs. Les drogues régulièrement utilisées afin de bloquer ces voies sont indiquées en rouge.

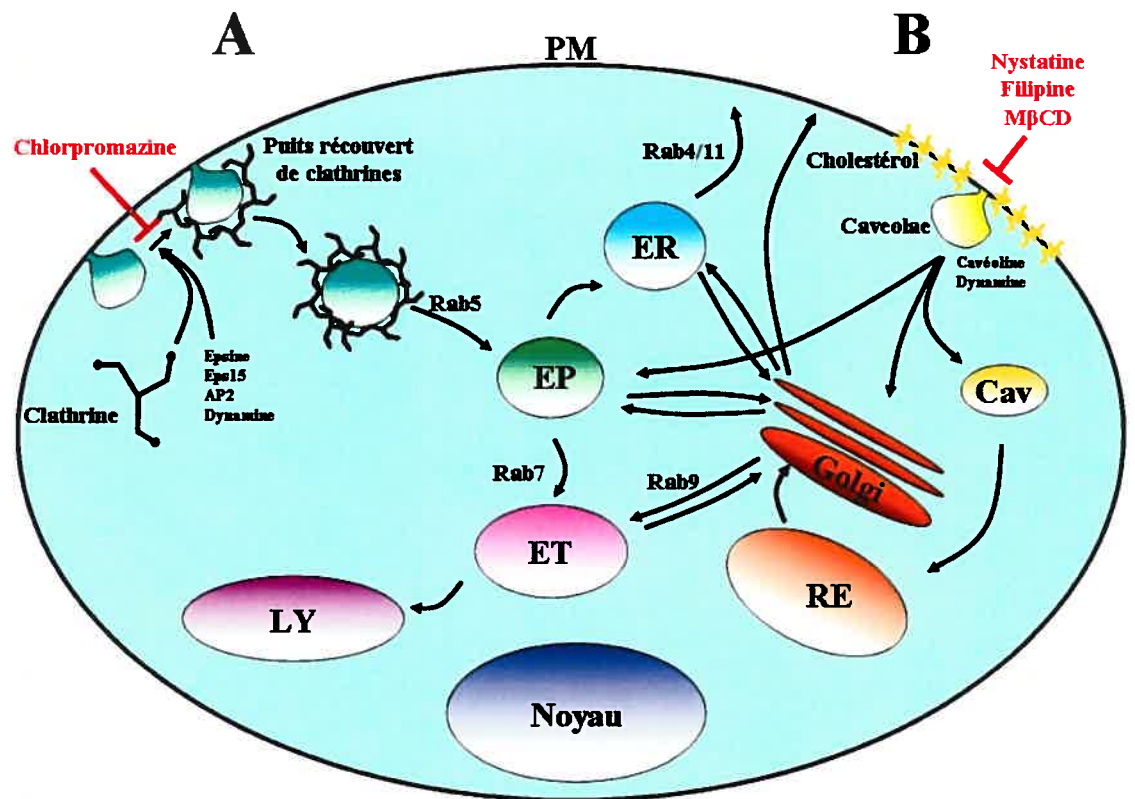


Figure 13

5.1- Endocytose clathrine-dépendante

L'internalisation de ligands liés à leurs récepteurs ou de fluide extracellulaire se fait principalement par la formation de puits recouverts de clathrine. Ceux-ci se concentrent à des sites spécialisés de la MP qui recouvrent entre 0.5 à 2% de celle-ci (Brown and Petersen 1999). Les facteurs membranaires qui définissent ces sites ne sont pas complètement élucidés mais il est largement accepté que les phosphatidylinositols PI(4,5)P₂ jouent un rôle crucial dans ce processus en recrutant différentes protéines impliquées dans la formation des puits recouverts de clathrine (Maldonado-Baez and Wendland 2006). Il faut souligner que, même si l'assemblage des puits de clathrine se fait à la MP, les molécules de clathrine n'ont pas d'affinité pour elle. En fait, celles-ci sont recrutées à la MP via des protéines adaptatrices (Kaksonen, Sun et al. 2003; Maldonado-Baez and Wendland 2006), voir plus bas.

5.1.1- Clathrine

Les molécules de clathrine sont des protéines cytoplasmiques présentes sous la forme d'une étoile à trois branches appelée triskélium. Chaque branche est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. La chaîne lourde, de 180 kDa, est responsable de la charpente du manteau de clathrines (les branches s'associent par leur domaine C-terminal) et des interactions avec les adaptines via leur domaine N-terminal. Par contre, le rôle des chaînes légères, 30-35 kDa, n'est pas encore clairement établi chez les cellules de mammifères (Maldonado-Baez and Wendland 2006). La formation du manteau de clathrines est un processus coordonné et complexe, rendu possible grâce au recrutement de différentes protéines adaptatrices et chaperonnes. Celles-ci sont ciblées à la MP grâce à leurs domaines de liaison spécifiques aux PI(4,5)P₂.

5.1.1.1- Les protéines adaptatrices

L'adaptine AP2 (« adaptor protein 2 ») a été une des premières protéines identifiées ayant la capacité de lier la clathrine (Collins, McCoy et al. 2002). Traditionnellement, cette protéine était considérée comme la molécule la plus importante dans l'assemblage des puits recouverts de clathrine. Toutefois, la découverte des motifs d'interaction à la clathrine chez d'autres protéines incluant l'Epsine, AP180 et Dab2 (nommées CLASP pour « clathrin-associated sorting proteins ») a permis de reconsidérer cette notion. En effet, toutes ces protéines lient le domaine N-terminal de la chaîne lourde des clathrines et sont capables d'induire la formation de puits recouverts de clathrine *in vitro* (Traub 2003; Meyerholz, Hinrichsen et al. 2005). De plus toutes ces protéines possèdent aussi des motifs d'interaction avec la MP (Maldonado-Baez and Wendland 2006).

AP2 reste malgré tout l'adaptine la mieux étudiée. En plus de son rôle dans l'assemblage des puits de clathrine, elle interagit avec des « signaux d'endocytose » présents chez les protéines destinées à être internalisées. Les motifs à base de tyrosine incluent le motif NPxY présent chez les membres de la famille du récepteur des LDL et le motif YxxΦ (Φ : résidu hydrophobe) présents dans un grand nombre de récepteurs comme celui de la transferrine. De plus, il existe également des motifs dileucine présents chez d'autres protéines incluant le récepteur viral CD4. Bien que l'interaction entre les protéines destinées à être internalisées et AP-2 soit faible, elle est suffisante pour les concentrer dans les puits recouverts de clathrine (Mousavi, Malerod et al. 2004). Par ailleurs, un motif dileucine a été mis en évidence chez la protéine Gag du VIH-1. Il a été montré que ce motif était responsable de l'internalisation de Gag vers des CMVs probablement en recrutant le complexe AP-2 (Lindwasser and Resh 2004). Toutefois, ce sujet reste très controversé car la mutation de ce motif semble empêcher l'assemblage viral en affectant la multimérisation de Gag, son association aux membranes ainsi que la maturation virale (Joshi, Nagashima et al. 2006).

5.1.1.2- Assemblage

Le modèle actuel de la formation des puits recouverts de clathrine propose que le processus commence suite au ciblage de quelques molécules d'Epsine à des sites de la MP enrichis en PI(4,5)P2 (Ford, Mills et al. 2002). Par la suite, d'autres protéines CLASP, incluant AP180 sont recrutées au puits en formation et permettent d'amener les triskélions de clathrine. Les molécules d'Epsine s'associent ensuite avec AP2 de façon directe ou via Eps15. Elles sont déplacées lorsque les molécules d'AP2 induisent la polymérisation des clathrines. Finalement, les molécules d'Epsine, en conjonction avec la polymérisation des molécules de clathrines, seraient responsables de la déformation de la MP (Ford, Mills et al. 2002).

5.1.2- Dynamine

Suite à leur formation, les puits recouverts de clathrine doivent se renfermer sur eux mêmes afin de se détacher de la MP. La dynamine est essentielle à ce processus. Cette protéine est aussi connue pour son rôle dans le transport à partir du TGN ainsi que pour l'internalisation à partir des cavéolines (voir section 5.2) (Damke, Baba et al. 1994; Nabi and Le 2003; Abazeed, Blanchette et al. 2005; Cao, Weller et al. 2005). Cette protéine de 100 kDa possède trois domaines: un domaine d'interaction aux lipides PH (« pleckstrin-homology ») qui cible la protéine à la MP, un domaine GED (« GTPase effector domain ») et un domaine riche en prolines et arginines qui permet de recruter des protéines ayant des domaines SH3. Trois isoformes existent chez les mammifères, mais la dynamine 1 et 2 demeurent les mieux caractérisées.

La dynamine est recrutée dans les vésicules en formation sous forme libre ou liée au GDP par le domaine SH3 de l'amphiphysin. Par la suite, son domaine PH lui permet d'interagir avec les PI(4,5)P2 à la MP (Mousavi, Malerod et al. 2004). L'échange GDP/GTP induit sa dissociation du manteau

de clathrines et lui permet de s'assembler à la constriction de la vésicule en formation. À cet endroit, la dynamine s'assemble en une structure spiralée. L'hydrolyse du GTP induit un changement conformationnel qui lui permet de resserrer la surface membranaire et probablement permettre le détachement de la vésicule en formation. C'est grâce à cette capacité d'utiliser l'énergie libérée par l'hydrolyse du GTP en force mécanique que la dynamine est considérée comme une enzyme « mécano-chimique » (Hinshaw and Schmid 1995; McNiven 1998). Toutefois, il a aussi été proposé que le rôle de la dynamine se limite à recruter des partenaires qui seraient capables d'induire la fission de la vésicule. En effet, certains mutants de la dynamine ayant perdu la capacité de s'assembler ou d'hydrolyser le GTP permettent toujours l'internalisation de la transferrine (Sever, Damke et al. 2000).

5.1.3- Inhibiteurs

Le mutant K44A de la dynamine a été le premier transdominant négatif décrit ayant la capacité d'inhiber l'internalisation clathrine-dépendante. Toutefois, il a été montré par la suite que la dynamine est aussi impliquée dans d'autres voies d'endocytose car elle est impliquée dans la formation des vésicules en général (McNiven, Cao et al. 2000). Conséquemment, ses transdominants négatifs ne peuvent être considérés comme spécifiques. De même, les mutants d'un groupe de protéines qui lient la dynamine, via leurs domaines SH3, incluant l'amphiphysine et l'intersectine ne peuvent être considérés comme spécifiques malgré leur capacité à inhiber l'endocytose de la transferrine (Brodsky, Chen et al. 2001). C'est en partie grâce à l'introduction de la technique d'ARN d'interférence que l'internalisation clathrine-dépendante a pu être étudiée spécifiquement. En effet, la déplétion à l'aide des siRNA des chaînes lourdes des clathrines, du complexe AP2, d'Eps15 ou de l'Epsine inhibe spécifiquement ce processus. En outre, l'expression des mutants transdominants négatifs des protéines dites adaptatrices telles qu'Eps15 et Epsine représente un autre moyen de bloquer spécifiquement l'endocytose clathrine-dépendante en empêchant le

recrutement du complexe AP2 (Mousavi, Malerod et al. 2004). Par exemple, le transdominant négatif d'Eps15 a récemment été utilisé pour démontrer le rôle de l'internalisation clathrine-dépendante dans l'internalisation de Gag (Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006).

Certains traitements ou drogues ont aussi été utilisés afin d'empêcher l'internalisation clathrine-dépendante. Par exemple, la déplétion potassique et des chocs hypotoniques ont permis d'étudier le rôle des clathrines dans l'internalisation des rhinovirus (Madshus, Sandvig et al. 1987; Bayer, Schober et al. 2001). Par ailleurs, l'utilisation de la chlorpromazine, une drogue qui induit l'assemblage des manteaux des clathrines dans des membranes endosomales plutôt qu'à la MP (Wang, Rothberg et al. 1993), a permis de mettre en évidence le rôle de l'internalisation clathrine-dépendante dans l'internalisation de plusieurs virus incluant influenza, polyomavirus JV, picornavirus parechovirus type 1 et le virus de l'hépatite B (Krizanova, Ciampor et al. 1982; Pho, Ashok et al. 2000; Joki-Korpela, Marjomaki et al. 2001; Cooper and Shaul 2006). Finalement, il a été rapporté que l'utilisation de drogues qui enlèvent ou séquestrent le cholestérol à la surface des cellules, incluant la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) ou la filipine, peuvent perturber la formation des puits recouverts de clathrine. Toutefois, ce mécanisme reste mal compris (Rodal, Skretting et al. 1999; Subtil, Gaidarov et al. 1999).

5.2- Endocytose cavéoline-dépendante

Les cavéolines ont été décrites pour la première fois dans les années 1950 comme étant des invaginations de la MP ayant un diamètre de 50 à 100 nm (Yamada 1955). À l'instar des radeaux lipidiques, ces structures sont enrichies en cholestérol, sphingomyéline et peut-être en glycosphingolipides et phosphatidylinositols. Plusieurs molécules incluant la toxine cholérique (ChTx), l'albumine, des glycosphingolipides et même certains virus (SV40) sont spécifiquement internalisés à partir de ces domaines par un mécanisme dynamine-dépendant (Cheng, Singh et al. 2006).

5.2.1- Cavéoline

La Cavéoline-1 (Cav1) fut identifiée dans les années 1990 suite à l'isolation de membranes résistantes aux détergents (Kurzchalia, Dupree et al. 1992; Rothberg, Heuser et al. 1992). Par ailleurs, cette protéine lie directement le cholestérol (Murata, Peranen et al. 1995). Bien que Cav1 soit nécessaire pour la formation des cavéolines, elle n'est pas essentielle à la formation de domaines lipidiques insolubles aux détergents de façon générale (Fra, Williamson et al. 1994; Gorodinsky and Harris 1995). En fait, il est maintenant accepté que différents types de domaines enrichies en cholestérol existent à la MP. Tous ces domaines seraient associées à l'internalisation clathrine-indépendante (Anderson and Jacobson 2002; Sharma, Varma et al. 2004).

Il existe trois types de cavéolines (Cav1, -2 et -3); toutefois c'est surtout Cav1 qui est impliquée dans la biogénèse des cavéolines dans la plupart des cellules (Rothberg, Heuser et al. 1992; Engelman, Zhang et al. 1998). Cette protéine n'est pas exprimée de façon ubiquitaire; chez les cellules qui ne l'expriment pas il n'y a pas de structures similaires aux cavéolines (Fra, Williamson et al. 1994; Gorodinsky and Harris 1995; Engelman, Wykoff et al. 1997; Drab, Verkade et al. 2001). Toutefois, il faut souligner que du moins chez les lymphocytes T, l'absence de détection de

Cav1 serait probablement expliquée par la grande affinité que cette protéine a pour le cholestérol. Ceci empêcherait sa solubilisation dans des conditions de lyse standard (Hovanessian, Briand et al. 2004). Malgré cela, la surexpression de Cav1 chez ces cellules résulte dans la formation d'invaginations ayant les caractéristiques des cavéolines, démontrant le rôle clé de Cav1 dans leur biogénèse (Fra, Williamson et al. 1994; Engelman, Wykoff et al. 1997). En revanche, le rôle de Cav1 dans l'internalisation cavéoline-dépendante demeure controversée. Certaines études ont montré que la déplétion de Cav1 diminue l'endocytose via les cavéolines (Pelkmans, Kartenbeck et al. 2001; Sharma, Brown et al. 2005) et que sa surexpression résulte dans une augmentation du processus (Lobie, Sadir et al. 1999; Sottile and Chandler 2005) tandis que d'autres ont montré que la surexpression de Cav1 empêche l'internalisation de l'albumine et la ChTx (Minshall, Tirupathi et al. 2000; Le, Guay et al. 2002).

Par ailleurs, certaines études ont montré que Cav1 est relativement immobile à la MP et que seulement une minorité des vésicules Cav1+ sont internalisées. Ces données ont suggéré que les cavéolines représentent des structures stables à la MP et que l'endocytose via ces domaines est plutôt rare (Thomsen, Roepstorff et al. 2002; Tagawa, Mezzacasa et al. 2005). Toutefois, d'autres études ont montré que l'endocytose dépendant des cavéolines est un processus inductible (Parton, Joggerst et al. 1994; Tirupathi, Song et al. 1997; Sharma, Brown et al. 2004). En effet, l'internalisation cavéoline-dépendante est augmentée par certains inhibiteurs de phosphatases et inhibée par certains inhibiteurs de kinases incluant la staurosporine et la genistein (Parton, Joggerst et al. 1994; Tirupathi, Song et al. 1997; Tagawa, Mezzacasa et al. 2005). De plus, les cargos destinés à être internalisés par les cavéolines sont capables de stimuler leur propre internalisation. Ainsi, le virus SV40 induit sa propre internalisation suite à son attachement à la surface cellulaire en induisant une phosphorylation locale et en recrutant la dynamine (Pelkmans, Puntener et al. 2002); les cavéolines des mêmes cellules non-

infectées demeurent stables (Pelkmans, Kartenbeck et al. 2001). De plus, l'interaction de l'albumine avec son récepteur (gp60) ou celle de certains glycosphingolipides ont aussi la capacité d'augmenter l'internalisation cavéoline-dépendante (Sharma, Brown et al. 2004).

Finalement, bien que la destination finale des protéines internalisées par les cavéolines soit le Golgi ou le RE (Nabi and Le 2003), il a récemment été montré que suite à leur internalisation, certaines d'entre elles peuvent converger avec la voie clathrine-dépendante. En effet, des glycosphingolipides, l'albumine, la ChTx ou le virus SV40 peuvent se retrouver après seulement quelques minutes dans des endosomes précoces (Pol, Calvo et al. 1999; Sharma, Choudhury et al. 2003; Pelkmans, Burli et al. 2004). Ces observations pourraient expliquer, du moins en partie, pourquoi l'accumulation de Gag dans les CMVs, qui représentent la destination des protéines internalisées de façon clathrine-dépendante, peut-être grandement diminuée par des inhibiteurs des cavéolines (voir chapitres 2 et 4).

5.2.2- Inhibiteurs

Tel que décrit plus haut, le mutant transdominant de la dynamine (K44A) ainsi que la surexpression de Cav1 diminuent l'internalisation cavéoline-dépendante (Nabi and Le 2003). Par ailleurs, étant donné que le cholestérol représente un élément essentiel des cavéolines, sa déplétion ou séquestration résulte dans leur dislocation. Les drogues les plus utilisées à cette fin sont la nystatine, la filipine et la M β CD (Kirkham and Parton 2005). Leur utilisation a permis de démontrer l'entrée cavéoline-dépendante du virus SV40, du polyomavirus murin et de l'échovirus de type 1 (Anderson, Chen et al. 1996; Gilbert and Benjamin 2000; Richterova, Liebl et al. 2001; Marjomaki, Pietiainen et al. 2002).

5.3- Phagocytose

Chez les cellules de mammifères, la phagocytose est une caractéristique des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) incluant les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les neutrophiles (Greenberg and Grinstein 2002; Aderem 2003). Ce processus est déclenché suite à l'interaction des récepteurs avec leur ligand à la surface cellulaire. Parmi les différents récepteurs, les mieux caractérisés sont les immunoglobulines (Ig) et le complément qui servent à opsoniser les particules étrangères. La liaison de la particule avec son ligand provoque une transduction de signal qui déclenche la polymérisation d'actine et permet l'extension membranaire autour des particules qui seront phagocytées (Greenberg, el Khoury et al. 1991; May and Machesky 2001). Afin que le pseudopode puisse se former, des membranes issues des compartiments internes doivent être recrutées à la MP. La phagocytose permet ultimement la dégradation des particules internalisées lors de la maturation du phagosome.

5.3.1- Signalisation et extension membranaire

Des kinases de la famille des Src sont activées suite à la liaison du récepteur avec les molécules destinées à être phagocytées. Ces kinases phosphorylent les motifs ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») présents dans les queues cytoplasmiques des récepteurs. Les ITAMs phosphorylés deviennent ainsi des sites de liaison pour plusieurs enzymes cytosolique incluant les kinases Syk et PI3Ks (« phosphatidylinositol 3-kinases »). Celles-ci permettent l'accumulation de phosphatidylinositols au site de la phagocytose (May and Machesky 2001; Stephens, Ellson et al. 2002). Ensuite, l'activation de deux protéines appartenant à la famille des Rho GTPases : Cdc42 et Rac induit la polymérisation d'actine, responsable du processus phagocytaire (Patel, Hall et al. 2002; Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003).

Il a été montré que les phosphatidylinositols qui s'accumulent au site de formation du phagosome sont les PI(4,5)P₂. L'inhibition des enzymes qui les produisent diminue grandement la phagocytose (Coppolino, Dierckman et al. 2002; Leverrier, Okkenhaug et al. 2003). En fait, ils permettent le remodelage d'actine en recrutant des protéines du cytosquelette (Coppolino, Dierckman et al. 2002). Par ailleurs, les moteurs de myosine sont quant à eux recrutés afin de refermer le phagosome (Olazabal, Caron et al. 2002; Araki, Hatae et al. 2003).

5.3.2- Exocytose focale

Jusqu'à récemment il était généralement accepté que les phagosomes se formaient suite à la fermeture de la membrane plasmique autour des particules destinées à être phagocytosées. Toutefois, il a été remarqué que pendant la phagocytose la quantité de membranes présentes à la MP augmentait au lieu de diminuer (Holevinsky and Nelson 1998). Il est maintenant connu que des membranes provenant de compartiments internes, incluant les endosomes tardifs et de recyclage, fusionnent avec la MP lors de la phagocytose. Ce processus est appelé « exocytose focale » et dépend des SNARE (Bajno, Peng et al. 2000; Booth, Trimble et al. 2001). L'apport des membranes dépend des microtubules, des microfilaments d'actine (Damiani and Colombo 2003) ainsi que des protéines ARF6 et Rab11 qui contrôlent le recrutement de membranes à partir des endosomes de recyclage (Cox, Lee et al. 2000; Niedergang, Colucci-Guyon et al. 2003).

5.3.3- Maturation du phagosome

Suite à sa fermeture, le phagosome mature en fusionnant avec différents compartiments endosomaux. Ceci se termine par l'insertion des protéines Lamp (« lysosomal associated membrane proteins ») au niveau de la membrane tandis que des enzymes lysosomales sont insérées dans le lumen du phagosome (Garin, Diez et al. 2001; Gotthardt, Warnatz et al. 2002). La maturation du phagosome est contrôlée par des protéines responsables du

trafic intracellulaire des compartiments endosomaux tels que la syntaxine 13 (endosomes de recyclage), la syntaxine 7 et Rab 7 (endosomes tardifs) (Rupper, Grove et al. 2001; Collins, Schreiber et al. 2002). Pendant tout le processus de maturation, le phagosome migre sur des microtubules à partir de la périphérie vers une région périnucléaire. La protéine RILP (« Rab7-interacting lysosomal protein ») qui lie les complexes dynéine-dynactine, fait le lien entre les phagosomes et les microtubules (Harrison, Bucci et al. 2003).

5.3.4- Inhibiteurs

Tel que décrit précédemment, la phagocytose repose sur la polymérisation de l'actine. Ainsi, toute drogue qui affecte ce processus diminue la phagocytose. Par exemple, la Cytochalasin-D (un inhibiteur de la polymérisation d'actine) a permis d'évaluer le rôle de la phagocytose dans l'accumulation du VIH-1 dans les CMVs des macrophages (Jouvenet, Neil et al. 2006). Par ailleurs, la diminution de la concentration intracellulaire des PI(4,5)P₂, en exprimant des mutants transdominants négatifs qui bloquent leur production, inhibent la phagocytose (Coppolino, Dierckman et al. 2002). Finalement, tous les inhibiteurs qui affectent l'exocytose focale ont le potentiel d'empêcher la phagocytose; le phagosome ne peut se former sans un apport supplémentaire de membranes à partir de compartiments intracellulaires. Par exemple, il a été démontré que des transdominants négatifs de l'amphiphysine, une protéine nécessaire à la fission des compartiments internes pendant l'exocytose focale, diminuent la phagocytose (Gold, Morrissette et al. 2000; Di, Nelson et al. 2003).

6- Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II)

Tout au long de cette revue de littérature il a pu être constaté qu'en plus de déterminants viraux, des facteurs cellulaires sont capables de moduler le trafic intracellulaire ainsi que l'assemblage et la relâche du VIH-1. Nos travaux ont permis d'identifier un de ces facteurs: le CMH-II (voir chapitre 3). La prochaine section résume les connaissances actuelles sur ces molécules ainsi que le lien qui les unit au VIH-1.

Les molécules du CMH-II sont exprimées dans un nombre limité des cellules incluant les cellules B, les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T activés. De façon générale elles présentent des peptides issus de la dégradation de protéines internalisées par les CPA aux lymphocytes T CD4. Lorsque le peptide présenté est antigénique, les lymphocytes T CD4 s'activent, prolifèrent et induisent une réponse immunitaire spécifique contre l'antigène en question. Par ailleurs, le CMH-II est aussi impliqué dans la sélection et la maturation des lymphocytes T CD4 dans le thymus. En effet, lors de la sélection positive elles présentent à la surface des cellules épithéliales thymiques des peptides du soi qui produisent chez les lymphocytes T CD4⁺ un signal de survie (Jameson, Hogquist et al. 1995). Par la suite, le CMH-II exprimé à la surface des cellules dendritiques du thymus participe à la sélection négative; ce qui permet d'éliminer les cellules T autoréactives (Laufer, DeKoning et al. 1996; Brocker, Riedinger et al. 1997).

6.1- Structure

Les molécules du CMH-II font partie de la superfamille des immunoglobulines et forment un hétérodimère (Figure 14). Les glycoprotéines transmembranaires qui forment le CMH-II, la chaîne α de 34 kDa et la chaîne β de 29 kDa, sont liées de façon non-covalente. Leur

différence de taille est principalement attribuée à des différences dans leur glycosylation. Les deux chaînes possèdent une partie extracellulaire formée par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ou $\beta 1$ et $\beta 2$. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment une niche peptidique constituée de deux hélices α antiparallèles qui reposent sur une plateforme de huit feuillets β (Stern, Brown et al. 1994). La niche peptidique est ouverte aux extrémités (à différence de celle du CMH-I) et peut accommoder des peptides ayant une longueur allant de 12 à 20 acides aminés; les extrémités des peptides peuvent se retrouver à l'extérieur de la niche. Les peptides situés dans la niche peptidique interagissent avec les régions variables $V\alpha$ et $V\beta$ du TCR pendant que le domaine $\beta 2$ du CMH-II stabilise cette interaction en liant CD4. Finalement, les chaînes α et β du CMH-II possèdent aussi un domaine transmembranaire et cytoplasmique importants pour leur trafic intracellulaire, leur transport à la surface cellulaire, leur efficacité de présentation antigénique et leur diffusion latérale (St-Pierre, Nabavi et al. 1989; Nabavi, Freeman et al. 1992).

Figure 14 : Schéma de la structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Les chaînes α et β sont liées de façon non-covalente. Elles peuvent se diviser en trois parties: les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$, $\beta 2$ font partie de la portion extracellulaire (où $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment la niche peptidique). De plus, chaque chaîne possède un domaine transmembranaire (TM) ainsi qu'une courte queue cytoplasmique.

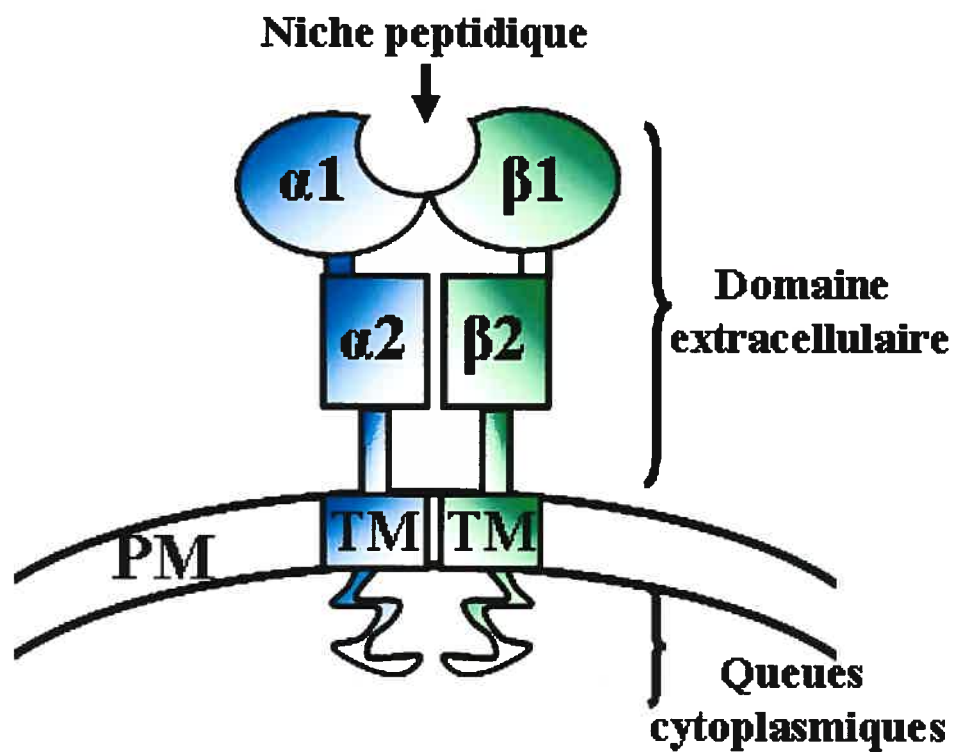


Figure 14

6.2- Diversité, organisation génomique et polymorphisme

Chez l'homme il existe trois CMH-II classiques : HLA (pour « human leukocyte antigen ») –DP (Gorski, Rollini et al. 1984), HLA-DQ (Okada, Boss et al. 1985) et HLA-DR (Lee, Trowsdale et al. 1982; Spies, Sorrentino et al. 1985) et deux dits non-classiques : HLA-DM (Kelly, Monaco et al. 1991) et HLA-DO (Inoko, Ando et al. 1985; Tonnelle, DeMars et al. 1985). Les chaînes α et β sont codées par des gènes séparés dans le chromosome 6. De plus, cette région code aussi pour de protéines impliquées dans la présentation antigénique dans le contexte du CMH-I : Tap1, Tap2, LMP2 et LMP7 (Consortium 1999).

Les molécules du CMH-II classiques sont hautement polymorphiques, pour certains locus il existe plus de 200 allèles. Les régions polymorphiques se situent principalement dans les régions qui interagissent avec le TCR et déterminent la forme de la niche peptidique. Le haut polymorphisme du CMH-II fait en sorte que ces molécules soient utilisées comme marqueurs pour des études génétiques de population ou lors de la transplantation de greffes. Par contre, la chaîne α de HLA-DR et les CMH-II non-classiques sont monomorphiques.

6.3- Formation du complexe CMH-II/peptide et trafic intracellulaire

Les molécules du CMH-II sont synthétisées dans le RE où elles s'associent avec une protéine transmembranaire de type II : la chaîne invariante (Ii) (Monaco and McDevitt 1984). En fait, le complexe CMH-II/Ii est nonamérique car 3 dimères des chaînes α/β du CMH-II s'associent avec un trimère d'Ii (Cresswell 1996). La chaîne invariante joue plusieurs rôles dans la présentation antigénique. Premièrement, elle est importante pour le bon repliement et l'assemblage des molécules du CMH-II. De plus, elle empêche une association prématurée du CMH-II avec des peptides, en liant

elle-même la niche peptidique. Finalement, elle est nécessaire au trafic intracellulaire du CMH-II car en son absence, celles-ci ne quittent par le RE (Bikoff, Huang et al. 1993; Bonnerot, Marks et al. 1994). Ainsi, des signaux dileucine présents dans le domaine cytosolique d'Ii permettent le transport du complexe CMH-II/Ii vers des endosomes tardifs, spécialisés dans la présentation antigénique (MIIC pour « MHC-II-enriched compartments ») (Pieters, Bakke et al. 1993; Odorizzi, Trowbridge et al. 1994). Toutefois, la voie utilisée par le complexe CMH-II/Ii pour se rendre aux MIIC reste controversé. En effet, certaines études ont proposé un ciblage direct du Golgi vers les MIIC (Benaroch, Yilla et al. 1995; Davidson 1999) tandis que d'autres soutiennent que le complexe se rend à la MP avant d'être internalisé, par un mécanisme clathrine-dépendant, vers les MIIC (Dugast, Toussaint et al. 2005; McCormick, Martina et al. 2005).

Les MIIC possèdent un environnement acide qui permet la dégradation d'Ii par des protéases (Villadangos, Riese et al. 1997; Riese and Chapman 2000). Ceci génère le peptide CLIP (« class II associated Ii peptide ») qui reste logée dans la niche peptidique. Toutefois, afin que les peptides dérivés de la dégradation de protéines exogènes soient capables d'entrer dans la niche peptidique, il faut que le peptide CLIP soit enlevé. Ce processus est catalysé par la molécule HLA-DM qui lie de façon transitoire le complexe MHC-II/CLIP et stabilise l'intermédiaire à partir duquel le peptide CLIP peut être relâché (Vogt, Kropshofer et al. 1996; Kropshofer, Arndt et al. 1997). Il faut souligner que l'échange du peptide CLIP par les peptides antigéniques ne se produit que dans les MIICs. Ceci est régulé par la molécule HLA-DO qui bloque HLA-DM de façon pH-dépendante. Ainsi, le pH des endosomes précoces permet l'inhibition de HLA-DM par HLA-DO. Par contre, lorsque le complexe se trouve dans le pH acide typique des MIICs, HLA-DO n'est plus capable d'empêcher HLA-DM (Kropshofer, Vogt et al. 1998; van Ham, van Lith et al. 2000). Par la suite, les complexes CMH-II/peptide sont

transportés à la surface cellulaire où ils sont présentés aux lymphocytes T CD4.

Les complexes CMH-II/peptide doivent rester à la MP afin d'induire une réponse immunitaire efficace. Par exemple, il est connu que la redistribution du CMH-II vers la MP est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T CD4 par les cellules dendritiques (Turley, Inaba et al. 2000; Chow, Toomre et al. 2002). Malgré son importance, la modulation de l'expression de surface des molécules du CMH-II ne commence qu'à être comprise. En effet, des papiers très récents ont identifié l'ubiquitination de la chaîne β des molécules du CMH-II (sur son résidu lysine en position 225) comme nécessaire à l'internalisation du CMH-II chez les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Ohmura-Hoshino, Matsuki et al. 2006; Shin, Ebersold et al. 2006). De plus, l'ubiquitine ligase impliquée vient d'être identifiée. Elle appartient à une nouvelle famille d'E3 ligases, nommée c-MIR (Ohmura-Hoshino, Matsuki et al. 2006; Matsuki, Ohmura-Hoshino et al. 2007). Les membres de cette famille sont capables d'induire l'endocytose et la dégradation de nombreuses protéines cellulaires (Goto, Ishido et al. 2003; Bartee, Mansouri et al. 2004; Ohmura-Hoshino, Goto et al. 2006). De plus, il a été montré que l'expression de c-MIR dans plusieurs lignées de cellules B ou dans un système reconstitué dans les cellules HEK 293T est suffisante pour diminuer l'expression de surface du CMH-II (Ohmura-Hoshino, Matsuki et al. 2006). Récemment, il a été montré *in vivo* que MARCH-I, une E3 ligase ayant 80% d'identité avec c-MIR, est aussi importante pour l'ubiquitination du CMH-II dans les lymphocytes B où elle est fortement exprimée. En effet, la demi-vie du CMH-II à la surface est grandement augmentée chez des lymphocytes B extraits des souris MARCH-I « knock-out » et conséquemment, leur capacité à présenter des antigènes dans le contexte du CMH-II est accrue (Matsuki, Ohmura-Hoshino et al. 2007).

6.4- Induction des compartiments enrichis en CMH-II (MIIC) dans des cellules épithéliales

Tel que décrit précédemment, suite à leur synthèse dans le RE, le CMH-II doit se rendre dans des compartiments endosomaux afin de lier les peptides qui seront présentés à la surface cellulaire. Toutefois, il a été rapporté que le compartiment précis où ceci se produit possède certaines caractéristiques qui le différencient des endosomes tardifs ou des lysosomes classiques (Peters, Neefjes et al. 1991). Toutefois, leur mécanisme de formation reste mal compris. Chez les cellules B les MIIC ne sont pas stables et ils ont besoin de la synthèse protéique continue pour être présents (Calafat, Nijenhuis et al. 1994). Bien que les protéines impliquées n'aient pas été identifiées chez les lymphocytes B, chez des cellules épithéliales (HEK 293) l'expression des chaînes α et β du CMH-II est nécessaire et suffisante pour l'induction de ces compartiments. Ces compartiments possèdent une morphologie analogue ainsi que les mêmes marqueurs que les MIIC des lymphocytes B (Calafat, Nijenhuis et al. 1994) (Peters, Neefjes et al. 1991; Calafat, Nijenhuis et al. 1994). Ces compartiments ont une morphologie multivésiculaire ou multilamellaire (Calafat, Nijenhuis et al. 1994), probablement reflétant différents étapes de leur maturation (Kleijmeer, Morkowski et al. 1997). Finalement, les auteurs de cette étude ont identifié les régions transmembranaires et cytoplasmiques des chaînes α et β comme étant responsables de la formation des structures multilamellaires (Calafat, Nijenhuis et al. 1994).

6.5- Le CMH-II et le VIH-1

En plus de son rôle central dans la réponse immunitaire, le CMH-II est lié de près au cycle de réplication du VIH-1. Ainsi, il a été rapporté que le CMH-II est incorporé dans les particules virales, que la protéine Nef module son expression de surface et finalement, que Gag affecte son trafic intracellulaire.

6.5.1- Incorporation du CMH-II dans la particule virale

Le VIH-1 est relâché des cellules infectées en bourgeonnant à travers des membranes cellulaires. Pendant ce processus, plusieurs protéines cellulaires, incluant le CMH-II sont incorporées dans les particules virales (Cantin, Fortin et al. 1997; Poon, Coren et al. 2000; Esser, Graham et al. 2001; Chertova, Chertov et al. 2006). L'isoforme HLA-DR semble être incorporé de façon préférentielle aux isoformes –DP et –DQ (Arthur, Bess et al. 1992; Schols, Pauwels et al. 1992). En revanche, le mécanisme d'incorporation du CMH-II dans les particules virales reste controversé. En effet, une étude a identifiée la queue cytoplasmique de la gp41 comme essentielle à l'incorporation (Poon, Coren et al. 2000) alors qu'une étude plus récente indique que cette incorporation peut se faire en absence d'Env (Martin, Beausejour et al. 2005). Malgré cette controverse, l'incorporation du CMH-II augmente l'infectivité en accélérant l'entrée du virus (Cantin, Fortin et al. 1997). Finalement, une étude récente a montré que les particules virales incorporent du CMH-II complexé avec des peptides antigéniques. La présentation de ces peptides à la surface des virus active directement et de façon spécifique les lymphocytes T CD4 (Roy, Martin et al. 2005).

6.5.2- Diminution de l'expression de surface du CMH-II par la protéine Nef du VIH-1

Un autre lien entre le VIH et le CMH-II se fait via la protéine Nef. En effet, il a été rapporté que Nef est capable de diminuer l'expression de surface du CMH-II tout en augmentant celle de la chaîne invariante, par deux

mécanismes distincts (Stumptner-Cuvelette, Morchoisne et al. 2001; Schindler, Wurfl et al. 2003; Stumptner-Cuvelette, Jouve et al. 2003). De plus, ces deux activités diminuent la présentation antigénique (Stumptner-Cuvelette, Morchoisne et al. 2001), sont conservées parmi différents isolats primaires du VIH-1, VIH-2 et VIS (virus de l'immunodéficience simienne) et restent constantes tout au cours de l'infection (Schindler, Wurfl et al. 2003).

Il a été montré qu'en présence de Nef, le CMH-II s'accumule dans les CMVs alors que la dégradation d'Ii dans les lysosomes est grandement diminuée (Stumptner-Cuvelette, Jouve et al. 2003). Toutefois, bien que l'augmentation de l'expression de surface d'Ii par Nef ait été confirmée chez des lymphocytes T CD4 primaires, son effet sur le CMH-II n'a pu être reproduit (Keppler, Tibroni et al. 2006).

6.5.3- Trafic intracellulaire de Gag et du CMH-II

Finalement, Gag réunit encore une fois le VIH-1 et le CMH-II. En effet, l'expression de Gag est suffisante pour rétablir le trafic du CMH-II à la MP chez un sous-clone des cellules HUT-78 chez qui le CMH-II ne s'accumule que dans des compartiments intracellulaires (Gluschankof and Suzan 2002). Ces données suggèrent que Gag et le CMH-II partagent quelque part la même voie de trafic intracellulaire, ce qui soulève la possibilité que ces deux molécules puissent moduler mutuellement leur trafic intracellulaire.

7- Problématique et buts du projet de recherche

Cette revue de la littérature a permis de constater jusqu'à quel point l'assemblage de particules virales est un processus complexe qui se déroule de façon coordonnée avec différents facteurs de l'hôte. Toutefois, malgré de nombreuses études sur ce sujet, le site où l'assemblage du VIH-1 se fait chez les cellules infectées demeure extrêmement controversé.

Un modèle soutient que les CMVs représentent des intermédiaires précoces où Gag est ciblé avant d'être relâché à la MP (Raposo, Moore et al. 2002; Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). En revanche, d'autres études ont récemment proposé un modèle alternatif où l'assemblage de Gag se produirait principalement à la MP. L'accumulation de Gag et des particules virales dans les CMVs se ferait suite à leur internalisation à partir de la surface cellulaire (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006).

Le premier objectif de ce projet de recherche consistait à évaluer biochimiquement le trafic intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1. À l'aide d'un fractionnement cellulaire nous avons réussi à séparer la MP des endosomes tardifs / CMVs, ce qui nous a permis d'identifier lequel des deux modèles présentés ci-dessus s'applique dans des cellules ayant une localisation de Gag à la MP ainsi que dans les CMVs. Ce travail, sous forme d'article a été publié en juillet 2007 et est présenté au chapitre 2.

Le fait que le VIH-1 s'accumule dans différents compartiments en fonction du type cellulaire soulève la possibilité qu'en plus des déterminants viraux, des facteurs cellulaires de l'hôte puissent aussi jouer un rôle dans la

détermination du site d'assemblage. Le deuxième objectif de ce projet était de déterminer si l'expression d'HLA-DR, capable d'induire la formation de compartiments endosomaux tardifs dans des cellules épithéliales (Calafat, Nijenhuis et al. 1994), était suffisante pour modifier la localisation à l'équilibre de Gag et des virus matures de la MP vers des compartiments intracellulaires. Ce travail, sous forme d'article a été publié en octobre 2006 et est présenté au chapitre 3.

Finalement, le troisième objectif de ce projet de recherche visait à identifier l'itinéraire cellulaire ainsi que les mécanismes impliqués dans la relocalisation de la protéine Gag du VIH-1 par HLA-DR. Ce travail, sous forme d'un article à être soumis sous peu, est présenté au chapitre 4.

CHAPITRE 2:

ARTICLE 1

Historiquement, l'assemblage du VIH-1 était sensé d'avoir lieu à la membrane plasmique des cellules infectées. Toutefois, l'accumulation du VIH-1 dans des compartiments intracellulaires, particulièrement chez les macrophages, a donné lieu à une série d'études voulant identifier le site précis d'assemblage. De nos jours, deux modèles expliquent le phénomène. Le premier modèle soutient que des compartiments endosomaux représentent des intermédiaires précoces où Gag est ciblé avant d'être relâché à la membrane plasmique. En revanche, le deuxième modèle indique que l'assemblage se produirait principalement à la membrane plasmique et que l'accumulation de Gag dans des compartiments intracellulaires serait le résultat de son internalisation à partir de la surface cellulaire. Le but de ce travail visait donc à séparer biochimiquement, à l'aide d'une technique de fractionnement cellulaire, la MP des CMVs et d'évaluer le trafic intracellulaire de la protéine Gag afin d'identifier le compartiment cellulaire où l'assemblage du VIH-1 se réalise.

Ce travail, sous forme d'article a été publié en juillet 2007 dans The Journal of Virology. 81(14): 7476-90.

PRODUCTIVE HIV-1 ASSEMBLY TAKES PLACE AT THE PLASMA MEMBRANE

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

¹Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, ²Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

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

Running Title: Analysis of HIV-1 Gag trafficking

Manuscript information: 49 pages, 7 Figures.

Word and character counts: abstract = 180 words; word count for the text = 6830.

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

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

Production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particles involves a series of coordinated events that includes targeting of viral structural proteins at a membrane assembly site, incorporation of the RNA genome, clustering of Gag/Gag-Pol molecules, and subsequent release of immature virions, which undergo a protease-mediated maturation process to become fully infectious. While the envelope glycoproteins (Env) and the *pol*-encoded enzymes (protease, reverse transcriptase, and integrase) are required for the production of infectious particles, expression of Gag polyprotein (Pr55^{Gag}) alone is necessary and sufficient for the assembly and release of noninfectious virus-like particles (18). Pr55^{Gag} is constituted of four structural components that are cleaved by the viral protease concomitant to the budding process, to generate the mature virion-associated Gag products matrix (MA or p17), capsid (CA or p24), nucleocapsid (NC or p7), and p6, as well as two spacer peptides, SP1 and SP2 (for a review, see references 16 and 18). Three functional domains (M, I, and L) within Gag capable of mediating the formation and release of virus-like particles have been identified (for a review, see references 16 and 18). M, the membrane-binding domain, which consists of an N-terminal myristylyc acid group and a highly basic domain in MA, allows the precursor to associate with a membrane assembly and budding site following its synthesis on cytosolic polysomes. I, the interaction domain, promotes Gag-Gag multimerization and consists of the region spanning the C-terminus domain of CA and the N-terminus domain of NC. L, the late domain, is responsible for the pinching-off of nascent particles from cellular membranes during the release step. The L domain through its highly conserved PTAP and YPLTSL late motifs located in p6 recruits Tsg101, AIP1, and other components of the endosomal sorting complex required for transport, which are normally responsible for directing the formation of intraluminal vesicles within multivesicular bodies (MVB) (for a review, see references 4 and 33).

HIV-1 Gag precursors have long been considered to assemble and bud from the plasma membrane (PM) in T lymphocytes as well as in most transformed cell lines, such as HEK 293T, HeLa, and T-cell lines (9, 33). However, recent reports have challenged this notion mainly because in these cells, a significant proportion of Gag was also found to localize to intracellular compartments that express late endosome (LE) or MVB markers (12, 21, 46, 54). Furthermore, this internal localization of Gag was particularly pronounced in macrophages, where very large numbers of viral particles are found to accumulate within LE/MVB compartments (36, 42, 45, 48). However, the molecular mechanisms that control cell surface versus LE/MVB accumulation of Pr55^{gag} and, consequently, the choice of the viral assembly and budding site are still poorly understood. One key specific aspect that remains to be clarified is the route that Pr55^{gag} follows to reach its PM or LE/MVB steady-state location. Interestingly, two models are emerging from recent studies to explain this dual-steady-state Gag localization in different cell types. One model proposes that Pr55^{gag} is first inserted into endosomal membranes and then, depending on how the process of LE/MVB-mediated exocytosis is regulated in specific cell types, either retained (macrophages) or further transported to the PM (e.g., T lymphocytes, HeLa, and HEK 293T cells) (12, 21, 30, 39, 45, 46, 48, 49, 54). In this model, LE/MVB compartments represent early intermediates where assembly and budding can take place. In contrast, the other model postulates that newly synthesized Pr55^{gag} is first targeted to the PM, where viral assembly and release occur; nonreleased Gag products are subsequently internalized towards LE/MVB (22, 24, 34, 51) in a process that is sensitive to endocytosis inhibitors (24, 34). To distinguish between these two models, we adapted a subcellular fractionation method that efficiently separates the PM from LE/MVB. This method coupled to pulse-chase labeling and immunoprecipitation analysis allowed a dynamic and quantitative monitoring of newly synthesized Gag trafficking in HIV-1 provirus-transfected HEK 293T cells. Our results reveal that the majority of newly synthesized Pr55^{gag} is targeted to the PM.

Importantly, however, a significant fraction of PM-associated Gag products was found to be internalized over time to LE/MVB by means of endocytosis. This process was not affected by chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, but it was efficiently blocked by filipin and methyl- β -cyclodextrin (M β CD), two endocytosis inhibitors known to affect PM-associated cholesterol. Taken together, our data identify the PM as being the primary site of productive HIV-1 assembly and release in cells that also support Gag accumulation into intracellular compartments.

MATERIALS AND METHODS

Cells and plasmids. HEK 293T cells were maintained as described previously (28). The HIV-1 molecular clone HxBc2 (27), the bicistronic pBud-DR construct (14), and the SVCMV CD4 expression plasmid (28) were previously described. The HxBc2 PR- Env- provirus was constructed by replacing the Sall/BamHI fragment of HxBc2 PR- (19) with the Sall/BamHI fragment of HxBc2 Env- (7).

Abs. The following antibodies (Abs) were used. L243 (immunoglobulin G2a [IgG2a]), a mouse monoclonal Ab that binds a specific HLA-DR α conformational determinant dependent on the correct conformation of the alpha/beta heterodimer (44), mouse monoclonal anti-HLA-DR beta-chain XD5 Ab (47), anti-CD4 (OKT4) (catalog no. CRL-8002), and anti-p24 (catalog no. HB-9725) monoclonal Abs were isolated from supernatants of cultured hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Rabbit anti-p24 polyclonal Ab (catalog no. 4250) was from the NIH AIDS Reference and Reagent Program. Mouse anti-Lamp1 (H5G11, IgG1) was from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Mouse anti-CD63 (H5C6, IgG1) was from the Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa. Anti- Na⁺-K⁺ ATPase (M7-PBE9) and anti- α -tubulin (T5168) were from Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada. Alexa-594-conjugated anti-mouse IgG was from Molecular Probes, Burlington, Ontario, Canada.

Transfections and metabolic labeling. Transfections were performed as described previously (61); experiments were done 48 h posttransfection. For pulse-chase experiments, transfectants were metabolically labeled with 1 mCi/ml [³⁵S]methionine-cysteine (35S protein-labeling mix; Perkin-Elmer, Wellesley, MA) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed fetal bovine serum for 10 min and chased for different time intervals in DMEM containing

excess unlabeled methionine and cysteine. When indicated, chlorpromazine (10 $\mu\text{g/ml}$), filipin (4 $\mu\text{g/ml}$), M β CD (8 mM), or nocodazole (10 $\mu\text{g/ml}$) was added during the starvation period (30 min) and maintained throughout the chase. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich.

Subcellular fractionation, immunoprecipitation, enzymatic assay, and Western blotting. Subcellular fractionation was performed as described previously (53). Briefly, 5 million HEK 293T cells were harvested in 250 μl of homogenization buffer (0.25 M sucrose, 78 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 8.4 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, and 50 mM HEPES-NaOH [pH 7.0], containing a cocktail of protease inhibitors [Roche, Mississauga, Ontario, Canada]) and lysed for 60 s using a pellet pestle with a cordless motor (Kontes, Vineland, NJ). Homogenates were centrifuged at 1,000 $\times g$ for 5 min to pellet nuclei and any cell debris. Postnuclear supernatant (PNS) was loaded onto a 5 to 20% linear Optiprep gradient according to the manufacturer's instructions (application sheet S23; Axis-Shield, Norton, MA) and spun at 150,000 $\times g$ at 4°C for 20 h using an SW41 ultracentrifuge rotor (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). Fourteen fractions (800 μl) were collected from the top of the gradient and lysed with 200 μl of 5X deoxycholate-containing radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA.DOC: 700 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 5% NP-40, 2.5% sodium deoxycholate, 0.25% sodium dodecyl sulfate [SDS]) containing a cocktail of protease inhibitors. Immunoprecipitations were performed on each fraction as follows. Fractions were precleared with the corresponding normal serum for 2 h at 4°C before being immunoprecipitated for 3 h at 4°C with a monoclonal anti-p24 Ab or a polyclonal anti-p24 serum as described previously (61). For denaturing conditions, each fraction was denatured as described previously (41) before immunoprecipitation with a polyclonal anti-p24 serum. Analysis of released viral particles was performed on tissue culture supernatants that were cleared by low-speed centrifugation (10 min at 400 $\times g$) and passed through a 0.45- μm pore-size filter (Costar, Cambridge, MA). Viral particles were pelleted

from the filtrate by ultracentrifugation through a 20% (wt/vol) sucrose cushion in phosphate-buffered saline (PBS) for 120 min at 130,000 x g at 4°C, lysed in 1XRIPA.DOC buffer containing a cocktail of protease inhibitors, and immunoprecipitated as described above. Immunocomplexes were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by autoradiography. Quantitation of radioactive Gag-related bands in each fraction was performed using a PhosphorImager equipped with the ImageQuant software 5.0. Enzymatic assays performed to identify alkaline phosphatase-containing fractions were performed as follows. Twenty-five microliters of each fraction was mixed with 15 µl of 4 mM 4-methylumbelliferyl phosphate (Sigma-Aldrich) dissolved in a citrate buffer (50 mM citric acid, 70 mM Na₂HPO₄ [pH 4.5]). After 2 h of incubation at 37°C, the reaction was stopped by using 50 µl of Glycine buffer (100 mM glycine [pH 10.4], 10 mM EDTA, 2% Triton X-100). Samples were excited at 355 nm and read at 460 nm on a multiple reader (Wallac Victor, Wallac Oy, Turku, Finland). Finally, the presence of Na⁺-K⁺ ATPase, CD63, and Lamp1 in each fraction was determined by Western blotting as previously described (28). For HLA-DR detection, each fraction was immunoprecipitated with the L243 conformational Ab before being detected by Western blotting using the anti-HLA-DR β-chain XD5 Ab.

Cell surface biotinylation, biotinylated Tfr, and cell surface CD4. Forty-eight hours posttransfection, cells were washed three times with ice-cold PBS and then labeled in PBS containing 480 µg/ml of sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Rockford, IL) for 30 min at 0°C. Cells were then washed with cold PBS-Tris (50 mM) to quench the remaining biotinylation reagent. For biotinylated transferrin (Tfr), cells were incubated for 15 min at 0°C with human biotin-Tfr (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were then washed twice with cold PBS. For both experiments, cells were then mechanically lysed as described above and the PNS was subjected to subcellular fractionation. Of note, due to the high density of fractions 10 to 14, we could not perform dot

blot analysis for cell surface biotinylation. Therefore, biotinylated cell surface proteins were loaded on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel (12.5%) and allowed to enter the gel by a short migration. Fractions were subsequently analyzed by Western blotting using a streptavidin horseradish peroxidase conjugate (Amersham, Baie d'Urfe, Quebec, Canada). For the analysis of cell surface biotinylation in drug-treated cells, drugs were added for 30 min at 37°C in DMEM before subjecting cells to the procedure described above (drugs were present throughout the experiment). For cell surface CD4 analysis, HEK 293T cells were cotransfected with the HxBc2 proviral construct and SVCMV CD4, a plasmid encoding CD4. Forty-eight hours later, cells were washed with ice-cold PBS and then labeled with anti-CD4 (OKT4) Ab resuspended in PBS for 30 min at 0°C to mark cell surface CD4. Cells were washed twice with cold PBS prior to mechanical lysis and fractionation as previously described. Cell surface-bound OKT4 was revealed by Western blotting using a goat anti-mouse Ab coupled to peroxidase (Amersham), as described previously (28).

EM. For electron microscopy (EM), after subcellular fractionation, fractions 2 and 3, 6 and 7, and 13 and 14 were fixed for 1 h at 4°C with 2.5% glutaraldehyde–0.1 M cacodylate (pH 7.3). Fixed fractions were subsequently precipitated for 15 min at 40,000 \times *g* in an F-20/microrotor (Sorvall, Burlington, Ontario, Canada). Fraction pellets were washed three times with 0.1 M cacodylate (pH 7.3) before incubation in 1% OsO₄ in cacodylate buffer for 45 min at 21°C. Pellets were dehydrated in alcohol series before embedding and polymerization in Durcupan resin (Sigma-Aldrich). Thin sectioning was done with an ultramicrotome system (Reichert-Jung Ultracut E; Reichert-Jung, Rochester, NY), and the sections were placed on nickel 200mESH grids (Canemco, Lakefield, Quebec, Canada). Cells were stained with 1% uranyl acetate in 70% ethanol and lead citrate. For immunogold staining, samples were processed as described previously (32). Polyclonal anti-p24 Ab staining was followed by incubation with a goat anti-rabbit serum

coupled to 12- or 18-nm gold beads (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). The grids were examined on a JEOL JEM-1200 EX transmission electron microscope.

Cholera toxin and Tfr uptake. Cells were treated for 30 min with chlorpromazine (10 $\mu\text{g/ml}$), filipin (4 $\mu\text{g/ml}$), or M β CD (8 mM) at 37°C (drugs maintained throughout the experiment), subsequently washed with PBS, and incubated for 30 min at 0°C with either Tfr- or cholera toxin β subunit (ChTx β)-Alexa-488 conjugates (Molecular Probes, Burlington, Ontario, Canada) in PBS. Cells were then washed with cold PBS and then incubated at 37°C for 10 min to allow Tfr or ChTx β internalization. Cytospin, paraformaldehyde fixation, staining of nuclei, and mounting were performed as previously described (14). Cells were examined by conventional epifluorescence micrographs on a Zeiss Cell Observer system (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) equipped with an Axiovert 200 M microscope and a Zeiss AxioCam ultra-high-resolution monochrome digital camera, using the 100X oil lens. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 4.4 software using the nearest-neighbor deconvolution method.

RESULTS

Characterization of a subcellular fractionation method that separates PM from LE/MVB.

It is now well established that HIV-1 Gag localizes at steady state both at the PM and in LE/MVB in several established human cell lines, including HEK 293T cells, which have been used as model systems to study Gag trafficking as well as HIV-1 particle assembly and release (12, 14, 21, 38, 54). To gain insights into this dual Gag localization (PM versus LE/MVB), we have adapted a previously described method that was based on a 5 to 20% continuous iodixanol (Optiprep) gradient (53). Of note, all of the characterization steps described below were performed on HxBc2 provirus-transfected HEK 293T cells that were lysed mechanically in an osmotic buffer 48 h posttransfection. PNS was fractionated by iodixanol gradient after high-speed and prolonged centrifugation periods (see Materials and Methods). Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and analyzed for the presence of different endogenous and exogenous cellular markers. In an effort to localize where PM migrated into the gradient, we biotinylated exposed cell surface-associated proteins; the majority of the biotin-labeled proteins were found in light-density fractions, identifying them as PM associated (mostly fractions 3 to 6). Similarly, biotin-conjugated Tfr was also incubated with HEK 293T cells at 0°C to label the PM and gave similar results; biotin-conjugated Tfr was exclusively found in light-density fractions (mostly fractions 3 to 6) (Fig. 1A). Furthermore, when cells were cotransfected with a CD4 expressor and incubated at 0°C to block endocytosis of the receptor bound to an anti-CD4 antibody, cell surface CD4 was also exclusively found in light-density fractions (fractions 3 to 6) (Fig. 1A). Similarly, Na⁺-K⁺ ATPase, a known PM marker (31), was also primarily found in light-density fractions (fractions 2 to 6 [data not shown]). Finally, an enzymatic assay was performed on each fraction to detect the presence of alkaline phosphatase, an enzyme previously shown to be PM associated (15).

As expected, alkaline phosphatase activity was mainly found in light-density fractions (Fig. 1A [80% of the total enzymatic signal was associated with light-density fractions 1 to 6]). We next examined LE/MVB migration into the Optiprep gradient by Western blotting using antibodies directed against late endosomal markers. CD63 was found in high-density fractions (fractions 13 and 14) but also in PM-enriched fractions (fractions 3 to 7 [Fig. 1B]). Interestingly, as recently described by Janvier and Bonifacino (23), significant fractions of CD63 localize at the PM and traffic through the cell surface before reaching late endosomes, thus explaining the CD63 presence in light-density fractions. We then evaluated the migration of HLA-DR, another marker that was previously shown to accumulate in LE/MVB via the PM (13). When cells were cotransfected with an HLA-DR expressor, it fractionated in high-density fractions (fractions 13 and 14) but also in light-density fractions (fractions 2 to 6) (Fig. 1B), most likely reflecting its previously described cell surface localization (13). Finally, the endosomal/lysosomal marker Lamp1 was predominantly found (48%) in high-density fractions (fractions 13 and 14) and to a lesser extent between fractions 4 and 6 (25%) (Fig. 1B), likely representing its previously reported PM localization (23). Altogether, these data suggested that the majority of LE/MVB migrated to high-density fractions, whereas light-density fractions were enriched in PM. To further obtain direct evidence that these fractions were indeed PM or LE/MVB enriched, we performed transmission EM analysis of light- and high-density fractions. Briefly, provirus-transfected HEK 293T cells were mechanically lysed 48 h posttransfection and the PNS was fractionated as described above. Fractions 2 and 3, 6 and 7, and 13 and 14 were ultracentrifuged, and the resulting pellets were processed for conventional EM. As expected, light-density fractions were highly enriched in filamentous structures reminiscent of the PM (Fig.1Ca). Interestingly, these filaments presented small (50 to 100 nm) invaginations as well as separate small vesicles that were not stained by the anti-CA antibody; these structures were similar in shape and diameter to previously described caveolae and indeed were specifically labeled with an

antibody directed against caveolin-1, a key component of caveolae (1, 50, 58; data not shown). Interestingly, when fractions 6 and 7 were analyzed by EM we observed again a clear enrichment of filamentous structures reminiscent of the PM (Fig.1Cb); however, in contrast to fractions 2 and 3, these structures were devoid of caveolae-like structures, thus suggesting that two distinct PM subpopulations appear to be separated by the fractionation procedure. Importantly, the fact that no LE/MVB structures were observed in these fractions after extensive analysis suggested that detection of markers such as CD63, Lamp1, and HLA-DR in these fractions (Fig. 1B) probably reflected the reported association of these proteins with the PM during their trafficking. Finally, when we performed EM analysis on high-density fractions (fractions 13 and 14), we observed a clear enrichment (approximately 10-fold) of multivesicular (Fig.1Cc) and multilamellar (Fig.1Cd) structures.

Taken together, these biochemical and electron microscopy data provide strong evidence indicating that this modified subcellular fractionation method efficiently separates PM from LE/MVB: light-density fractions were found to be enriched in PM, whereas high-density fractions were devoid of PM markers but enriched in multivesicular and multilamellar structures.

Steady-state HIV-1 Gag distribution following subcellular fractionation.

Since we were able to separate PM from LE/MVB, we next addressed how HIV-1 Gag fractionated into the gradient. HEK 293T cells were transfected with an infectious molecular clone of HIV-1 (HxBc2) and fractionated 48 h later as described above. Interestingly, at steady state, two Gag populations were observed (Fig. 2A): Pr55^{gag} and its cleavage products p41, p25, and p24 were primarily detected in PM-enriched fractions at the top of the gradient (mainly fractions 2 to 6), while a smaller proportion of Gag products were found in fractions enriched in LE/MVB markers at the bottom of the gradient (fractions 13 and 14). To ensure that the high-density fraction-associated Gag signal was membrane associated and indeed did not result

from sedimentation of cytosolic Gag complexes, we subjected PNS from provirus-transfected HEK 293T cells to membrane permeabilization with a nonionic detergent (NP-40) known to permeabilize membrane vesicles and to solubilize membrane-associated proteins. Similar treatments were recently used to demonstrate the association of HIV-1 Gag with different cellular membranes (21, 59). As expected, after this treatment, Gag signal was absent from high-density fractions and was entirely detected in light-density fractions, which in addition to PM markers were associated with the cytosolic marker actin (fractions 2 to 6 [data not shown]), thus indicating that Gag located at the bottom of the gradient was detergent sensitive and as such likely to be membrane associated (data not shown).

To obtain additional evidence that LE/MVB-containing virus migrates at the bottom of the gradient, we analyzed the distribution of Gag products at steady state in the presence or absence of HLA-DR (Fig. 2) since we recently reported that HLA-DR expression in human cell lines such as HEK 293T or HeLa cells induced accumulation of Gag and HIV-1 particles in LE/MVB (14). As expected, the data of Fig. 2A and B clearly revealed a 2.5-fold increase of mature Gag product accumulation in high-density fractions in HLA-DR⁺ as compared to HLA-DR⁻ samples upon shorter exposure of Western blots (Fig. 2A and B, bottom panels, and C). Altogether, these results suggest that LE/MVB compartments associated with mature Gag products, normally found in virions, migrate to high-density fractions (fractions 13 and 14). Finally, to ensure that PM or LE/MVB-associated Gag signals were not the result of cofractionation between Gag products and the different enriched structures, we performed immunogold staining of CA on pelleted material from fractions 2 and 3, 6 and 7, and 13 and 14 using a polyclonal anti-p24 antibody and analyzed CA staining on subcellular structures by EM. Interestingly, the filamentous structures depicted in Fig. 1C stained positive for CA (Fig. 3A). In fact, CA staining was observed on discrete patches of the PM, probably reflecting assembling structures (Fig. 3A). Similar CA staining was previously observed in pellets of purified detergent-resistant membranes

isolated from Gag-expressing BSC-40 cells (11). Furthermore, analogous CA-enriched patches were also observed in fractions 6 and 7 (Fig. 3B). Finally, when high-density fractions (fractions 13 and 14) were processed for conventional EM analysis, we observed LE/MVB compartments containing structures reminiscent of fully mature viruses (Fig. 3C), in agreement with the strong accumulation of fully mature Gag (p24) detected in fractions 13 and 14 by Western blotting (Fig. 2A). Importantly, immunogold analysis of the same fractions using a polyclonal anti-p24 Ab confirmed that these structures were associated with viral particles (Fig. 3D). Of note, fractions 2 and 3, 6 and 7, and 13 and 14 isolated from mock-transfected cells remained completely unlabeled by this technique, thus indicating that CA labeling in fractions obtained from provirus-transfected cells was specific (data not shown and Figure 10, Appendice 3).

Subcellular trafficking of HIV-1 Gag.

To analyze the movement of newly synthesized Pr55^{gag} and its cleavage products between the PM and LE/MVB, we combined our subcellular fractionation method with pulse-chase labeling and immunoprecipitation analysis. Briefly, HEK 293T cells were transfected with the HIV-1 HxBc2 provirus; 48 h later, cells were metabolically labeled with [35S] methionine-cysteine for 10 min and chased for various time intervals prior to cell lysis and subcellular fractionation by Optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in Optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 antibody. Figure 4A and D clearly show that after 10 min of labeling (time zero h), Gag and its cleavage products were primarily detected in fractions associated with PM markers and to a lesser extent with fractions enriched with LE/MVB markers (fractions 1 to 6 and 13 and 14, respectively), suggesting that some Gag was concomitantly targeted to the PM and LE/MVB. Even though more Gag cleavage products were detected in PM-associated fractions at zero h (Fig. 4A), the kinetics of Pr55^{gag} processing, calculated as the decrease of Pr55^{gag}

signal over time, were identical between PM- and LE/MVB-enriched fractions (Fig. 4C), suggesting that the subcellular compartment where Gag accumulates does not appear to influence its processing. Interestingly, we observed that different processed forms of Gag were present in fractions associated with different subcellular compartments (PM versus LE/MVB). Indeed, CA-p2 (p25) was primarily detected in PM-enriched fractions, probably reflecting the fact that p24 is constantly being lost from PM-enriched fractions as virions (which contain predominantly fully processed p24 [Fig. 4B]), whereas a marked accumulation of the fully processed CA (p24) form of Gag was principally found in fractions associated to LE/MVB markers at the bottom of the gradient (Fig. 4A). Throughout the 5 h of chase, a progressive decrease of PM-associated Gag and Gag cleavage products was observed and correlated with the progressive increase of progeny virus released extracellularly, as shown by the levels of mature p24 detected in the supernatant (Fig. 4B and D). In contrast, Gag cleavage products accumulated in high-density fractions over the 5 h of chase (Fig. 4A and D), thus suggesting that virus-containing LE/MVB were not efficiently transported towards the PM, at least under our experimental conditions in HEK 293T cells. In support of this observation, we found that treatment of HIV-1-producing HEK 293T cells with nocodazole, a drug that induces microtubule depolymerization (Fig. 5A) and interferes with late endosome motility (2, 5), did not affect Gag trafficking to PM-enriched fractions (Fig. 5B), in agreement with a recent report that showed that nocodazole-induced microtubule depolymerization did not modify PM-associated Gag localization or particle release (24). Importantly, by 2 h of chase we started detecting an important accumulation of mature Gag (p24) products in high-density fractions (Fig. 4A) that was unlikely to result from Pr55^{gag} processing in these fractions (compare Pr55^{gag} and Pr41^{gag} processing over time in fractions 13 and 14). Rather, it appeared to reflect internalization of mature and/or assembling viral particles from the PM towards LE/MVB. In fact, after 2 h of chase, the subcellular location of Gag and its cleavage products was very

similar to that observed at steady state (compare Fig. 2A and Fig. 4A at time 2 h), with more CA-p2 (p25) in PM-enriched fractions compared to a clear accumulation of CA (p24) in LE/MVB-enriched fractions. Importantly, similar results were obtained with polyclonal anti-p24 antibodies as well as under conditions in which proteins were denatured by boiling before immunoprecipitation as described previously (41), thus indicating that the detection method was not biased towards some Gag species or Gag-assembling structures because of lack of access to antigenic epitopes (data not shown). Finally, membrane flotation analysis indicated that 10 min of pulse-labeling was sufficient to obtain the majority (more than 60%) of Gag products associated with membranes; this association increased to almost 80% after 2 h of chase (data not shown).

Overall, these results suggest that newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM, where assembly and release occur; a significant fraction of the remaining PM-associated Gag products appears to be subsequently internalized towards LE/MVB, where it accumulates, thus accounting for the majority of LE/MVB-associated Gag products detected at steady state.

Effect of endocytosis inhibitors on HIV-1 Gag trafficking.

To confirm that the accumulation of mature Gag products in high-density fractions detected at 2 h reflected an endocytosis process from the PM towards LE/MVB, we thought to block two main routes of endocytosis. First, we used chlorpromazine, a drug known to prevent clathrin-coated pit formation at the PM (60). Even though chlorpromazine efficiently blocked clathrin-dependent endocytosis but not caveolae-dependent internalization, as measured by Tfr and ChTx β uptake (Fig. 6A and B, respectively), the accumulation of mature Gag products in high-density fractions at 2 h of chase was not affected (Fig. 6C). Indeed, quantification of the relative amounts of Pr55^{Gag} at zero h or quantification of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- and LE/MVB-associated fractions at 2 h remained identical to those

obtained in untreated cells (Fig. 6D and E), thus suggesting that Gag internalization from PM might be clathrin independent in HEK 293T cells.

Since clathrin lattices seemed not to be required for Gag internalization, we blocked another major route of endocytosis by using sterol-binding drugs such as filipin and M β CD. These drugs interfere with caveolae- or raft-dependent endocytosis by sequestering (filipin) or depleting (M β CD) cholesterol, an essential component of caveolae and lipid rafts (35, 43, 50). Filipin and M β CD efficiently blocked the uptake of ChTx β , which was previously shown to be internalized by a cholesterol-dependent process (25) (Fig. 7B). Surprisingly, in addition to blocking ChTx β internalization, filipin efficiently blocked Tfr uptake under our experimental conditions (Fig. 7A). Although it is very commonly reported that cholesterol is required only for cholesterol-dependent uptake mechanisms such as caveolae and lipid raft-mediated endocytosis, there is evidence for cholesterol requirement also in clathrin-mediated endocytosis (56). Interestingly, under these conditions in which clathrin and caveolae/raft-dependent endocytosis were affected, we detected a significant decrease of Gag product internalization to LE/MVB-enriched fractions (Fig. 7C). Indeed, accumulation of p25/p24 Gag products in these fractions was reduced from 40% to 14%, as calculated by quantifying the relative amounts of mature Gag products detected in PM- and LE/MVB-associated fractions after 2 h of chase in control- and filipin-treated cells (Fig. 7F). Furthermore, M β CD treatment also significantly decreased mature Gag product accumulation in LE/MVB-enriched fractions at 2 h of chase (Fig. 7D); the decrease was similar to that obtained after filipin treatment, going from 40% to 19% (Fig. 7F). Importantly, removal of M β CD during the 2-h chase period partially restored mature Gag product accumulation in the LE/MVB-enriched fraction, thus indicating that the effect of cholesterol depletion was specific and reversible (data not shown). Finally, in contrast to filipin, M β CD did not affect Tfr uptake (Fig. 7A), thus suggesting that clathrin-dependent endocytosis appeared not to be involved in Gag-related product internalization from PM to LE/MVB. Of note, filipin and M β CD

treatment did not affect normal cellular mechanisms such as the processing and exocytosis of PCSK9, a proprotein convertase that is extracellularly released by the constitutive secretory pathway (data not shown), thus indicating that the effect of sterol-binding drugs on mature Gag product accumulation within LE/MVB-enriched fractions was not due to cellular toxicity. Moreover, filipin and M β CD treatment reduced significantly the Pr55^{gag} signal detected in high-density fractions at zero h (Fig. 7C and D, upper panels). Indeed, total Pr55^{gag} signal decreased from 44% to 15% in LE/MVB-associated fractions (Fig. 7E), thus arguing also for a rapid internalization of Pr55^{gag} from the PM to LE/MVB. Nonetheless, the residual Pr55^{gag} detected in high-density fractions of filipin- or M β CD-treated cells and the fact that targeting of Pr55^{gag} was detected in LE/MVB-associated fractions under conditions in which the labeling period was decreased to only 5 min (data not shown) suggest a possible but minor direct targeting of Gag precursor to LE/MVB.

Finally, we found that chlorpromazine or sterol-binding drug treatment did not reduce Gag's ability to associate with membranes at zero h or after 2 h of chase, when the internalization process was at its peak (data not shown), suggesting that the potent reduction of Gag internalization induced by sterol-binding drugs might result from their inhibition of cholesterol-dependent uptake mechanisms. Taken together, these results suggest that the majority of newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM; some newly synthesized Gag might be directly targeted to LE/MVB but represent a minor fraction of total Gag. Furthermore, the majority of mature Gag products present in LE/MVB after 2 h of chase result from an internalization process that is cholesterol dependent.

DISCUSSION

The precise subcellular membrane site where HIV-1 assembly is initiated has recently been the subject of intense debates. While some studies indicate that internal endosomal compartments, notably LE/MVB, represent early intermediates where Gag is first targeted prior to budding at the PM (12, 21, 30, 39, 45, 46, 48, 49, 54), more recent studies support a model in which Gag-mediated assembly mainly occurs at the PM with accumulation of Gag and viral particles in LE/MVB resulting from an internalization process from the cell surface (22, 24, 34, 51). One aspect that has complicated interpretation of the data is that, initially, most studies evaluated Gag localization at steady state by electron or fluorescence microscopy (12, 30, 38, 39, 45, 48, 54); the observation that Gag or viral particles accumulated in LE/MVB did not absolutely mean that the precursor was first targeted or assembled at this location nor did it provide any information about the route that Gag follows before reaching its steady-state subcellular destination. Furthermore, several studies analyzed Gag localization or trafficking using codon-optimized Rev-independent Gag constructs (12, 30, 38, 46, 51, 54) and/or Gag constructs encoding Gag proteins that were C-terminally fused to different tags (enhanced green fluorescent protein, enhanced cyan fluorescent protein, and tetracysteine) (12, 24, 30, 34, 38, 46, 51, 54). However, several lines of evidence suggest that the trafficking and subcellular localization of C-terminally tagged Gag molecules or Gag expressed from mRNA that do not engage the physiological Rev-dependent viral RNA nuclear export pathway may differ from those of native Gag expressed from a provirus. In that regard, it was recently reported that the mere fact of changing the length of a linker sequence between Gag and a carboxy-terminal tetracysteine tag drastically modified the localization of Gag from the PM to intracellular compartments (51). Furthermore, the presence of a carboxy-terminal hemagglutinin tag was sufficient to inhibit the endocytosis of PM-associated Pr55^{Gag} (22). Moreover, it was reported that introduction of mutations that did not alter Gag amino

acid sequence but modified its mRNA export pathway (passing from Rev-dependent to Constitutive Transport Element [CTE] dependent) affected its steady-state localization (3, 57). In order to analyze the trafficking of native Gag molecules in the context of HIV-1-producing cells, we adapted a subcellular fractionation procedure that efficiently separates PM from LE/MVB and analyzed quantitatively the movement of Gag over time using pulse-chase labeling analysis. Importantly, these studies were performed in HEK 293T cells, an immortalized cell line that displays Gag steady-state localization at the PM and LE/MVB and that was indeed used in some studies from which arose the concept that HIV-1 assembly may be initiated in late endosomes (12, 20, 54).

One critical component of our analysis was efficient separation of PM from LE/MVB. Several lines of evidence suggest that the subcellular fractionation method that we have adapted does indeed do that. First, biochemical analysis of PM- and LE/MVB-associated markers revealed that they segregated in different fractions (Fig. 1A and B). Second, EM analysis of gradient fractions revealed an enrichment of structures that are reminiscent of PM or LE/MVB in distinct fractions (Fig. 1C); importantly, these subcellular structures were found to be associated with HIV-1 Gag products since they were specifically immunostained with anti-p24 antibodies (Fig. 3). Third, expression of HLA-DR, which is reported to induce a two- to three fold Gag relocation from PM to LE/MVB as evaluated by fluorescence microscopy (14), led to a similar increase of mature Gag product accumulation in LE/MVB-enriched fractions (Fig. 2). Furthermore, our separation method was also able to detect Vpu-mediated modulation of Gag accumulation in LE/MVB-associated fractions in HEK 293T cells cultured under confluent growth conditions (10; data not shown), in agreement with previous studies that reported increased Gag accumulation into intracellular compartments in the absence of Vpu (22, 34). Altogether, these results indicated that this subcellular fractionation method was sensitive enough to detect changes in the steady-state cellular location of Gag at the level of a whole population of

HIV-1-producing cells. By combining this subcellular fractionation procedure with short pulse-chase labeling analysis, we provide here strong evidence indicating that the majority of newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM, where most of the productive viral particle assembly occurred. Only a minor fraction of newly synthesized Pr55^{gag} was apparently directly targeted to LE/MVB (Fig. 4 and 7). In agreement with recent reports (22, 24, 34), we found that over time a significant proportion of cell surface-associated Gag products were subsequently internalized from the PM to late endosomal compartments, thus accounting for the majority of LE/MVB-associated Gag and viral particles that were previously observed at steady state using fluorescence microscopy and EM analysis. The internalization of Gag products from the PM towards LE/MVB appeared to occur very quickly after the 10 min of metabolic labeling and peaked after 2 h of chase (Fig. 4 and 7), thus underlining the need to use a very short labeling approach to follow dynamically newly synthesized Gag trafficking.

Our data indicate that endocytosis of PM-associated Gag products in HEK 293T cells is sensitive to sterol-binding drugs. Sequestration or depletion of cell surface cholesterol by treatment with filipin or M β CD, respectively, was found to drastically reduce endocytosis of Gag products (Fig. 7). These sterol-binding drugs have been previously used to inhibit endocytosis via caveolae selectively (55), thus raising the possibility that PM-associated Gag products are internalized to LE/MVB, at least in HEK 293 T cells, by a cholesterol-dependent uptake mechanism that involves caveolae or more generally lipid rafts. Cholesterol is a critical component of lipid rafts involved in caveolae formation (8). When cholesterol is sequestered or extracted from the PM, lipid rafts are disrupted. A large number of studies have implicated cholesterol and sphingolipid-enriched membrane rafts in HIV-1 particle formation, production, and infectivity (29, 31, 37, 40). Furthermore, cholesterol depletion was recently reported to decrease the mobility of Gag in living cells, a process that is likely to play a major role in promoting intramolecular interactions necessary for viral assembly and release

(17). Indeed, as previously reported by other studies (40), we observed that depletion of PM-associated cholesterol decreased viral release efficiency by 50 to 60% (data not shown). Given the important role of cholesterol-enriched membrane microdomains in viral particle assembly and release, we cannot entirely rule out that the effect of sterol-binding drugs on Gag internalization may be indirect rather than direct, especially if the endosomal accumulation of Gag results from internalization of fully assembled virions tethered at the cell surface, as recently suggested by Neil and coworkers (34). In contrast to sterol-binding drugs, chlorpromazine, a drug that affects clathrin-mediated endocytosis, did not have any effect on PM-associated Gag product internalization to LE/MVB (Fig. 6). These results differ from those reported by Jouvenet and colleagues (24), which indicated that Gag internalization from the PM involved clathrin-mediated endocytosis. Indeed, under their experimental conditions, expression of transdominant-negative forms of EPS 15, which inhibits clathrin-mediated endocytosis, reduced endosomal accumulation of Gag-green fluorescent protein fusion proteins. This discrepancy is perhaps related to the form of Gag (tagged Gag versus native Gag) being analyzed and/or the expression context that is used (codon-optimized Gag expressor versus proviral construct). Interestingly, recent data from Suomalainen and colleagues that are based on a fractionation procedure reveal that internalization of unprocessed Pr55^{gag} expressed from a proviral construct is cholesterol dependent (inhibited by filipin) but not affected by small interfering RNA-mediated silencing of the clathrin heavy chain (M. Suomalainen, personal communication). Nevertheless, in a physiological context the mechanism and rate of internalization of Gag and viral particles from the PM are likely to be dictated in a large part by the predominant mechanism of PM internalization, which essentially occurs in all cell types via endocytic or phagocytic mechanisms. These mechanisms of internalization will vary with cell types, as indeed was recently shown with primary macrophages; in this cell type, Gag was also found to first accumulate and

assemble at the PM, but a proportion appeared to be subsequently internalized by a phagocytic process (24).

Finally, under our experimental conditions we were unable to detect movement of Gag-containing LE/MVB to the PM (Fig. 4 and 5). These findings are in agreement with a recent report that found that pharmacological inhibitors (nocodazole and U18666A) that arrest late endosomal motility have no effect on accumulation of Gag at the PM or on extracellular particle release. Furthermore, the same study did not detect any viral release when viral assembly was rationally targeted to late endosomes (24). While these findings suggest that HIV particles accumulating in LE/MVB do not significantly contribute to the overall virus released extracellularly from HEK 293T cells, they do not preclude that in other cell types such as macrophages or dendritic cells and under some physiological stimulus (e.g., antigen presentation or calcium influx, which induce endosome fusion with the cell surface), virus internalized in LE/MVB is eventually released in the extracellular milieu or transmitted upon contact between cells during formation of an immunological synapse. Indeed, it was previously reported that virus accumulating intracellularly in macrophages remains infectious (26, 52) and can efficiently be transmitted to T cells for extended periods of time (52). More recently, under conditions mimicking antigen recognition by interacting T cells, dendritic cells were shown to transmit captured virions from internal compartments. However, this so called process of *trans*-infection was limited to few captured virions and did not appear to be the predominant mode of transmission (6). Clearly, more studies are needed to better understand the role of virus accumulation in internal endosomal compartments, especially in physiological relevant cells and conditions.

Overall, the results presented herein are difficult to reconcile with data supporting a model in which HIV-1 Gag targets LE/MVB prior to budding at PM. Rather, our findings suggest that the majority of Gag is first targeted to

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nabil Seidah for helpful discussion and A. Vallée for expert technical assistance in EM analysis. The polyclonal anti-p24 Ab was obtained through the NIH AIDS Research Reference and Reagent Program. A.F. and A.O. are recipients of studentships from a Canadian Institute of Health Research (CIHR) Strategic Training Program in Cancer Research and the IRCM Foundation, respectively. E.A.C. is a recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from CIHR and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec to E.A.C.

REFERENCES

1. **Abedinpour, P., and B. Jergil.** 2003. Isolation of a caveolae-enriched fraction from rat lung by affinity partitioning and sucrose gradient centrifugation. *Anal. Biochem.* **313**:1–8.
2. **Aniento, F., N. Emans, G. Griffiths, and J. Gruenberg.** 1993. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**:1373–1387.
3. **Berriault, V., J. F. Clement, K. Levesque, C. Lebel, X. Yong, B. Chabot, E. A. Cohen, A. W. Cochrane, W. F. Rigby, and A. J. Mouland.** 2004. A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization. *J. Biol. Chem.* **279**: 44141–44153.
4. **Bieniasz, P. D.** 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**:55–63.
5. **Bomsel, M., R. Parton, S. A. Kuznetsov, T. A. Schroer, and J. Gruenberg.** 1990. Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell* **62**:719–731.
6. **Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene.** 2007. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog.* **3**:e4.
7. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**:11–18.

8. **Crane, J. M., and L. K. Tamm.** 2004. Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys. J.* **86**:2965–2979.
9. **Demirov, D. G., and E. O. Freed.** 2004. Retrovirus budding. *Virus Res.* **106**:87–102.
10. **Deora, A., and L. Ratner.** 2001. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J. Virol.* **75**:6714–6718.
11. **Ding, L., A. Derdowski, J.-J. Wang, and P. Spearman.** 2003. Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J. Virol.* **77**:1916–1926.
12. **Dong, X., H. Li, A. Derdowski, L. Ding, A. Burnett, X. Chen, T. R. Peters, T. S. Dermody, E. Woodruff, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2005. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**:663–674.
13. **Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch.** 2005. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J. Biol. Chem.* **280**:19656–19664.
14. **Finzi, A., A. Brunet, Y. Xiao, J. Thibodeau, and E. A. Cohen.** 2006. Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *J. Virol.* **80**:9789–9797.
15. **Ford, A. W., and P. J. Dawson.** 1994. Effect of type of container, storage

temperature and humidity on the biological activity of freeze-dried alkaline phosphatase. *Biologicals* **22**:191–197.

16. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1–15.

17. **Gomez, C. Y., and T. J. Hope.** 2006. Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J. Virol.* **80**:8796–8806.

18. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *AIDS* **15**(Suppl. 5):S13–S20.

19. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5781–5785.

20. **Gould, S. J., A. M. Booth, and J. E. Hildreth.** 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:10592–10597.

21. **Grigorov, B., F. Arcanger, P. Roingeard, J. L. Darlix, and D. Muriaux.** 2006. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J. Mol. Biol.* **359**:848–862.

22. **Harila, K., I. Prior, M. Sjöberg, A. Salminen, J. Hinkula, and M. Suomalainen.** 2006. Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. *J. Virol.* **80**:3765–3772.

23. **Janvier, K., and J. S. Bonifacino.** 2005. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* **16**: 4231–4242.
24. **Jouvenet, N., S. J. Neil, C. Bess, M. C. Johnson, C. A. Virgen, S. M. Simon, and P. D. Bieniasz.** 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* **4**:e435.
25. **Kirkham, M., and R. G. Parton.** 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **1745**:273–286.
26. **Kramer, B., A. Pelchen-Matthews, M. Deneka, E. Garcia, V. Piguet, and M. Marsh.** 2005. HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**:136–142.
27. **Lavallee, C., and E. A. Cohen.** 1993. HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**:529–530.
28. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J. Biol. Chem.* **278**:28346–28353.
29. **Liao, Z., D. R. Graham, and J. E. Hildreth.** 2003. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **19**:675–687.
30. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with

multivesicular bodies. *J. Virol.* **78**:6013–6023.

31. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J. Virol.* **75**:7913–7924.

32. **Micheva, K. D., A. Vallee, C. Beaulieu, I. M. Herman, and N. Leclerc.** 1998. beta-Actin is confined to structures having high capacity of remodelling in developing and adult rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **10**:3785–3798.

33. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:395–425.

34. **Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* **2**:e39.

35. **Neufeld, E. B., A. M. Cooney, J. Pitha, E. A. Dawidowicz, N. K. Dwyer, P. G. Pentchev, and E. J. Blanchette-Mackie.** 1996. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* **271**:21604–21613.

36. **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**:52347–52354.

37. **Nguyen, D. H., and J. E. K. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74**:3264–3272.

38. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902–910.
39. **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**:1552–1563.
40. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13925–13930.
41. **Ono, A., A. A. Waheed, A. Joshi, and E. O. Freed.** 2005. Association of human immunodeficiency virus type 1 Gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay. *J. Virol.* **79**:14131–14140.
42. **Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J. Virol.* **62**:2578–2586.
43. **Orlandi, P. A., and P. H. Fishman.** 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* **141**:905–915.
44. **Panina-Bordignon, P., X. T. Fu, A. Lanzavecchia, and R. W. Karr.** 1992. Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J. Exp. Med.* **176**:1779–1784.

45. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* **162**:443–455.
46. **Perlman, M., and M. D. Resh.** 2006. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* **7**:731–745.
47. **Radka, S. F., C. E. Machamer, and P. Cresswell.** 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and Western blotting. *Hum. Immunol.* **10**:177–186.
48. **Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze.** 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**:718–729.
49. **Resh, M. D.** 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev.* **7**:84–91.
50. **Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson.** 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**:673–682.
51. **Rudner, L., S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott.** 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 Gag in live cells by biarsenical labeling. *J. Virol.* **79**:4055–4065.
52. **Sharova, N., C. Swingler, M. Sharkey, and M. Stevenson.** 2005. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* **24**:2481–2489. [Epub ahead of print.]

53. **Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull, and I. Mellman.** 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* **145**:123–139.
54. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785–801.
55. **Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker.** 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* **83**:1535–1545.
56. **Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw.** 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6775–6780.
57. **Swanson, C. M., B. A. Puffer, K. M. Ahmad, R. W. Doms, and M. H. Malim.** 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J.* **23**:2632–2640.
58. **Thorn, H., K. G. Stenkula, M. Karlsson, U. Ortegren, F. H. Nystrom, J. Gustavsson, and P. Stralfors.** 2003. Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **14**:3967–3976.
59. **Tritel, M., and M. D. Resh.** 2000. Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J. Virol.* **74**:5845–5855.

60. **Wang, L. H., K. G. Rothberg, and R. G. Anderson.** 1993. Misassembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**:1107–1117.

61. **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.

FIG. 1. PM separation from LE/MVB after iodixanol gradient-based subcellular fractionation. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus and mechanically homogenized 48 h later. PNS production and subcellular fractionation were performed as described in Materials and Methods. (A) Plasma membrane location in the gradient. Cells were cell surface biotinylated or incubated with biotinylated Tfr at 0°C. Alternatively cells were cotransfected with a CD4 expressor and cell surface CD4 was labeled with an anti-CD4 Ab at 0°C; detection of the CD4-bound Ab was performed by Western blotting as indicated in Materials and Methods. Biotinylated cell surface protein and biotinylated Tfr were analyzed in each fraction by Western blotting as described in Materials and Methods. Finally, the presence of alkaline phosphatase was evaluated by incubating each fraction with its specific substrate as described in Materials and Methods. Data shown for alkaline phosphatase represent the average +/- standard deviation of more than 10 independent experiments. (B) LE/MVB marker migration was analyzed by Western blotting using specific anti-CD63 and Lamp1 Abs or by immunoprecipitation/Western blotting using HLA-DR Abs. Data shown in panels A and B are representative of at least two independent experiments. (C) Fractions 2 and 3, 6 and 7, and 13 and 14 were pooled, fixed, ultracentrifuged, and processed for conventional EM. PM structures were highly enriched in fractions 2 and 3 (a) and 6 and 7 (b). Fractions 13 and 14 were highly enriched in multivesicular bodies (c) and multilamellar structures (d). Scale bars represent 200 nm in panel a and 100 nm in panels b to d. Data shown are representative of at least two independent experiments.

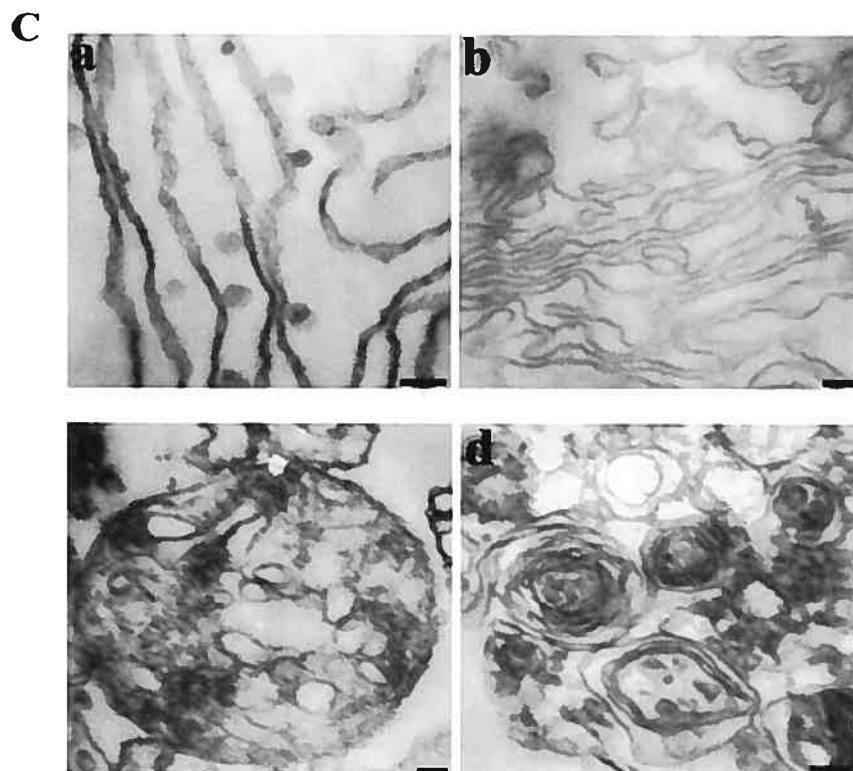
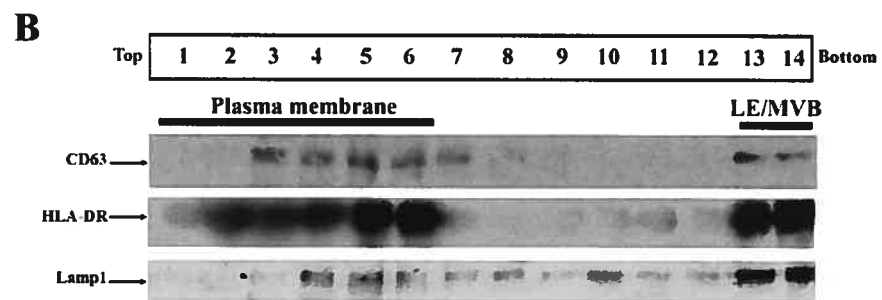
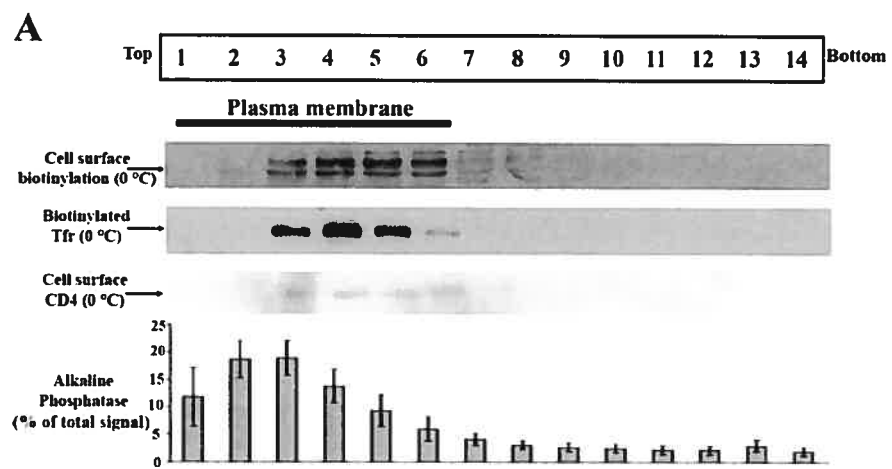


FIG. 2. HIV-1 Gag steady-state distribution after subcellular fractionation. HEK 293T cells were cotransfected with the HxBc2 provirus together with either HLA-DR or empty vector and mechanically homogenized 48 h later. PNS was processed as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient, and Gag and its cleavage products were analyzed by Western blotting using a monoclonal anti-p24 Ab. (A) Steady-state Gag distribution after subcellular fractionation. (B) Steady-state distribution of Gag upon HLA-DR expression. The lower panels represent lower exposure of the mature (p25/p24) Gag products. Data shown are representative of at least two independent experiments. (C) Quantification of the relative amounts of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- or LE/MVB-enriched fractions in the presence or absence of HLA-DR. Signals obtained for HLA-DR-negative samples were arbitrarily set to 100. Data shown are means \pm standard deviations of two independent experiments.

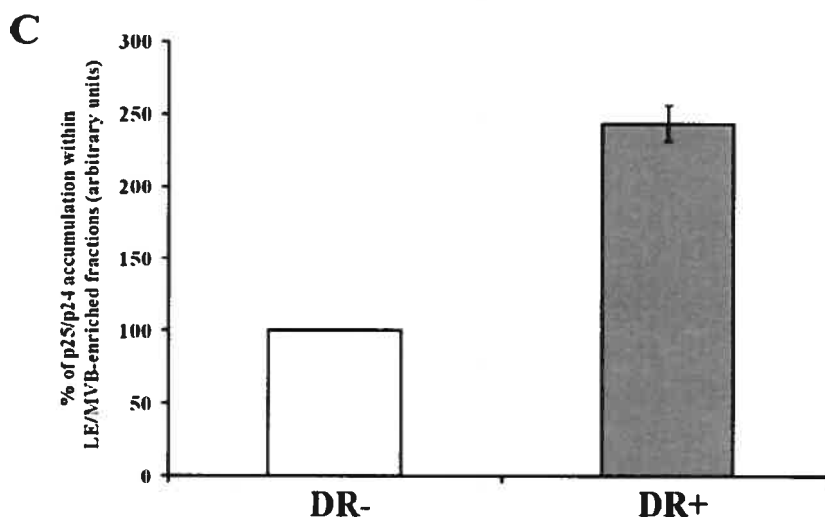
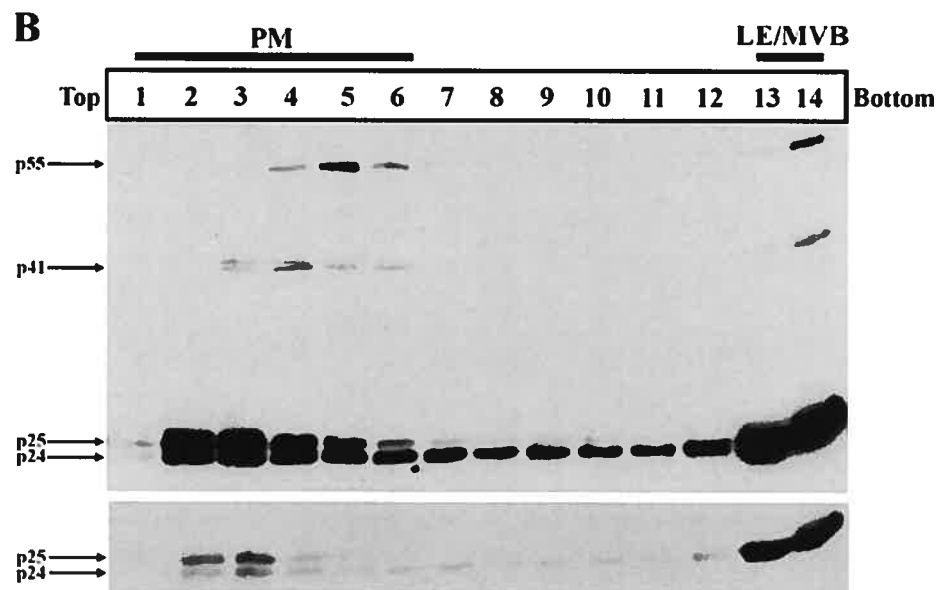
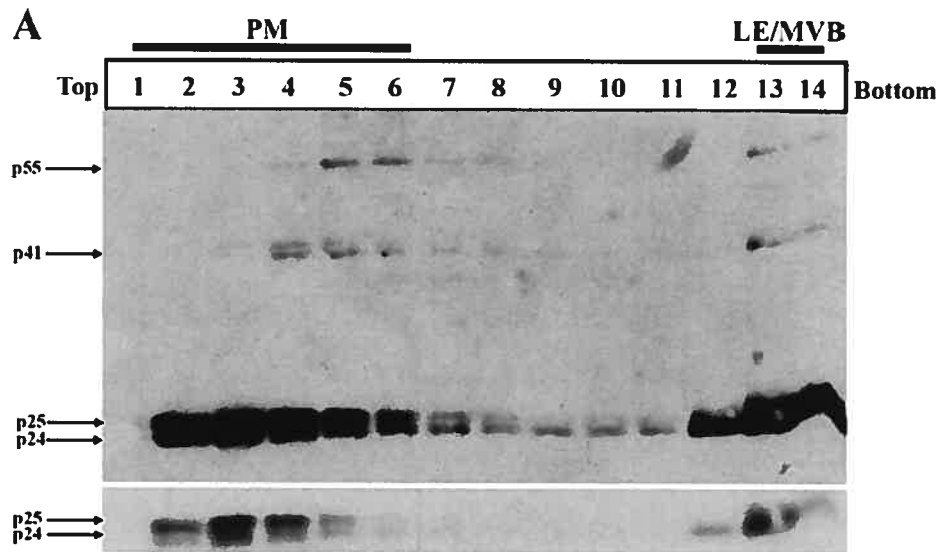


FIG. 3. Ultrastructural analysis of HIV-1 Gag association with different subcellular compartments. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with an HLA-DR expressor and mechanically homogenized 48 h later. PNS production and subcellular fractionation were performed as described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

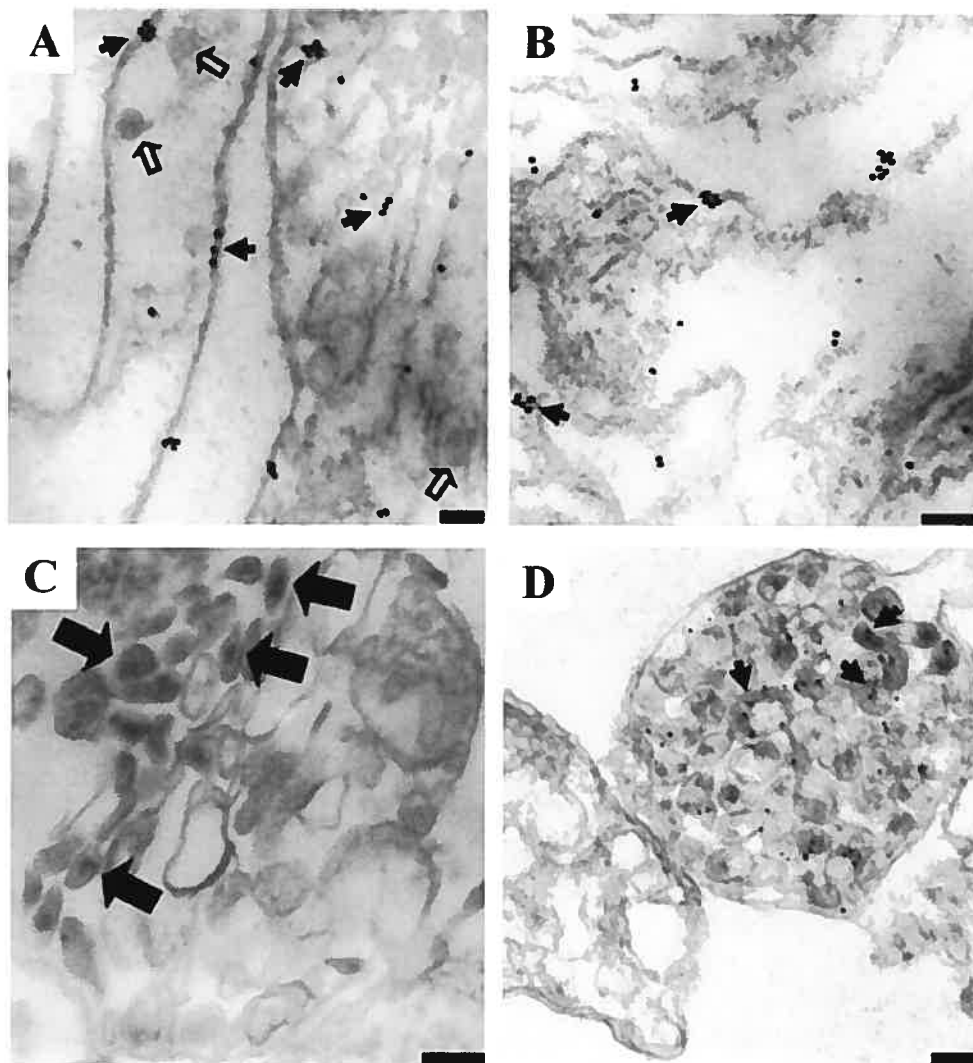


FIG. 4. Subcellular trafficking of HIV-1 Gag. (A) HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for various times prior to cell lysis and subcellular fractionation by Optiprep gradient centrifugation as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient, and Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. (B) Viral release during the pulse-chase analysis. Virion lysates were immunoprecipitated as for panel A. Data shown are representative of five independent experiments. (C) Quantification of the relative amounts of Pr55^{gag} in PM- and LE/MVB-enriched fractions (fractions 1 to 6 and 13 and 14, respectively) over time. Pr55^{gag} signal obtained at time zero h in PM- or LE/MVB-enriched fractions was arbitrarily set to 100. (D) Quantification of the relative amounts of Gag-related products in PM- or LE/MVB-enriched fractions over time. Quantifications were performed using ImageQuant software 5.0.

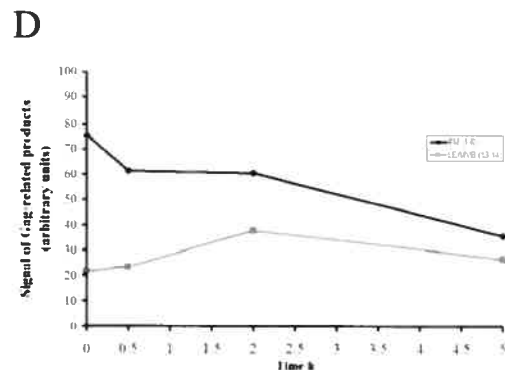
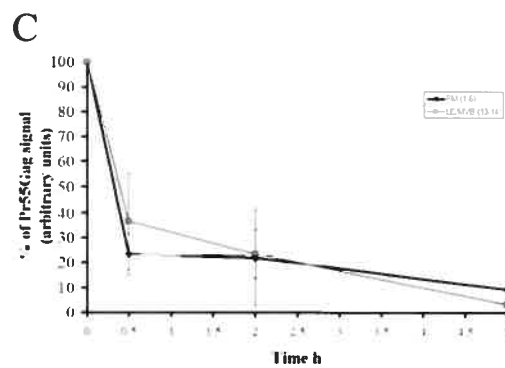
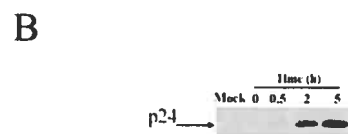
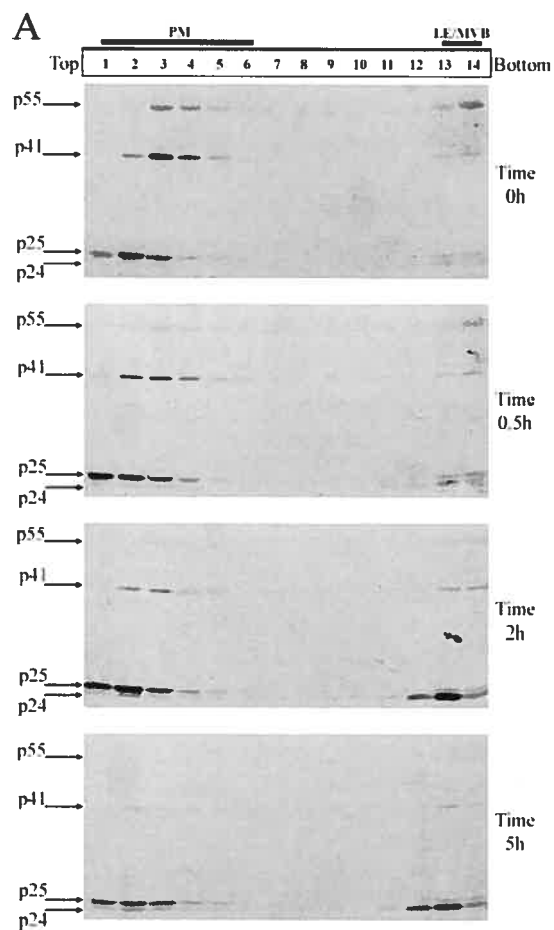


FIG. 5. Microtubule depolymerization does not affect HIV-1 Gag targeting to PM-enriched fractions. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were incubated with nocodazole (10 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min before being processed for immunofluorescence with an anti- α -tubulin (A). In parallel, cells were pretreated with nocodazole (10 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min before being metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in presence of the drug. Cell lysis and subcellular fractionation were performed as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient, and Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab (B). DMSO, dimethyl sulfoxide; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole. The data shown are representative of two independent experiments.

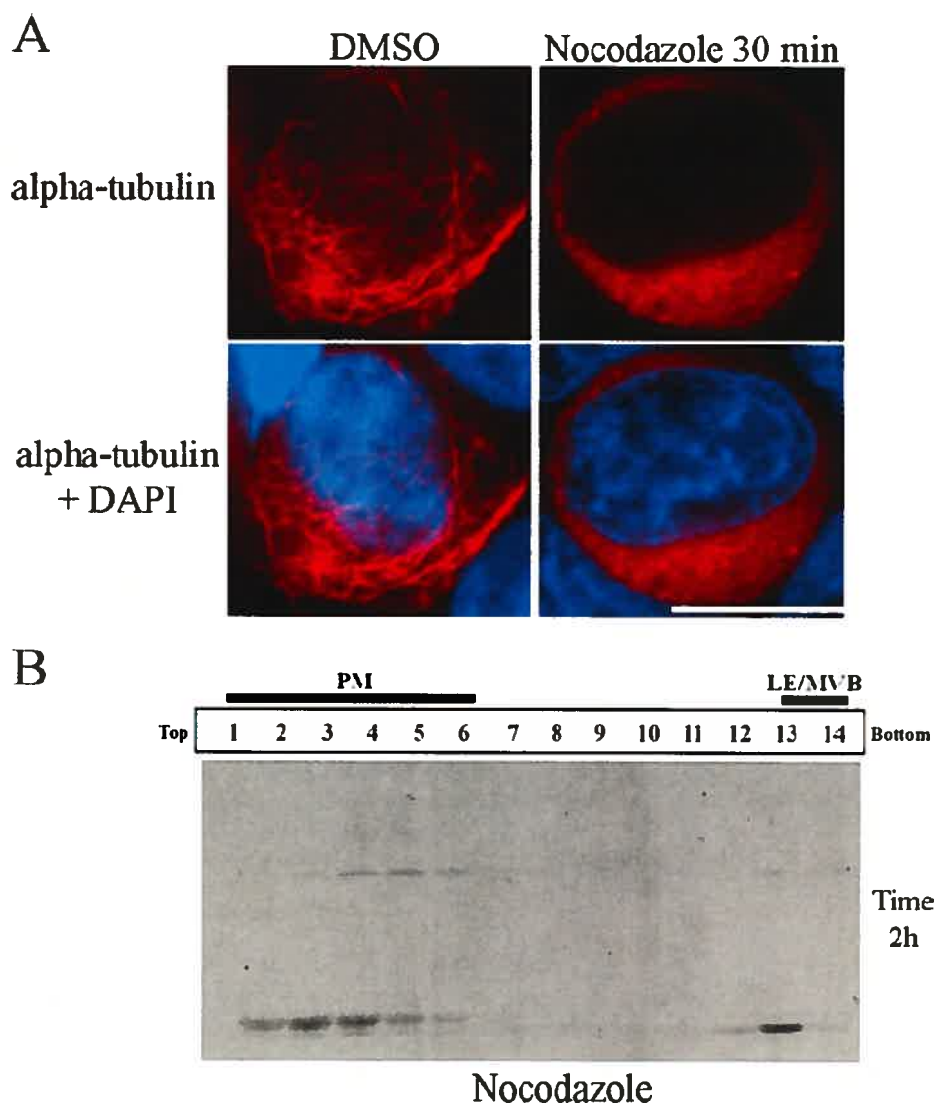


FIG. 6. Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, does not affect HIV-1 Gag trafficking in HEK 293T cells. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were pretreated with chlorpromazine (10 μ g/ml) for 30 min before incubation for another 30 min at 0°C with (A) Tfr- or (B) ChTx β –Alexa-488 conjugates. Tfr or ChTx β internalization was allowed for 10 min at 37°C. Chlorpromazine was maintained throughout the experiment before samples were analyzed by immunofluorescence microscopy (bar, 10 μ m) as described in Materials and Methods. Data shown are representative of two independent experiments. (C) In parallel, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in the presence of chlorpromazine prior to cell lysis and subcellular fractionation by Optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in Optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab for each collected fraction. (D) Quantification of the relative amount of Pr55^{Gag} detected in PM- and LE/MVB-associated fractions (1 to 6 and 13 and 14, respectively) at time zero h of chase. (E) Quantification of the relative amounts of mature Gag products (p25/p24) detected in PM or LE/MVB-associated fractions at time 2 h of chase. Gag-related signals were quantified using a PhosphorImager equipped with ImageQuant software 5.0. The data shown are means \pm standard deviations of: five control and two chlorpromazine independent experiments.

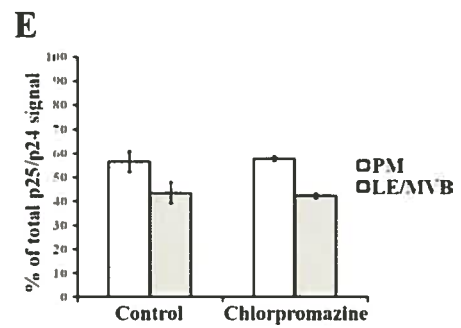
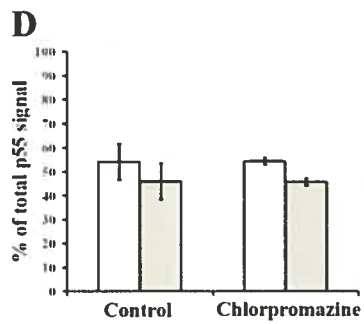
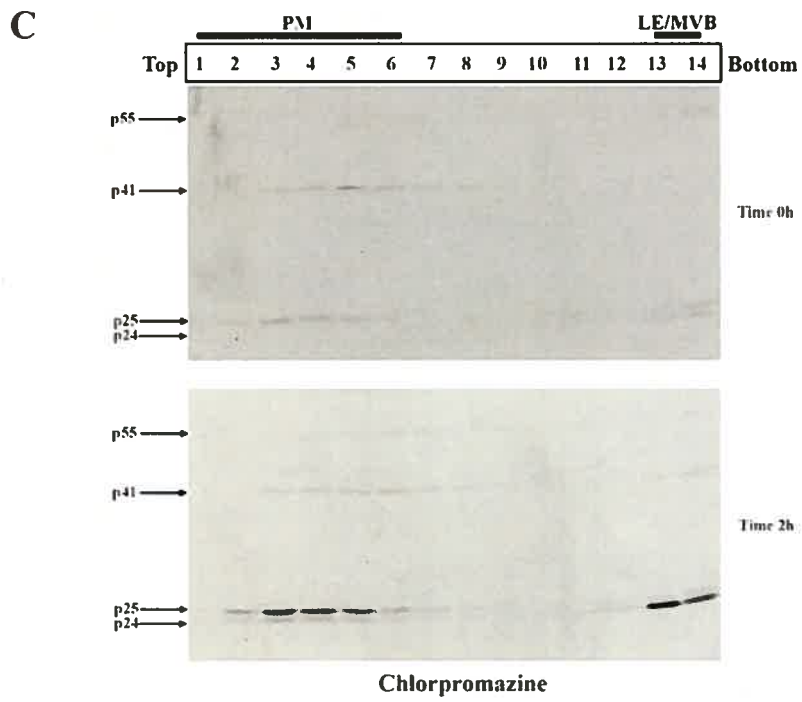
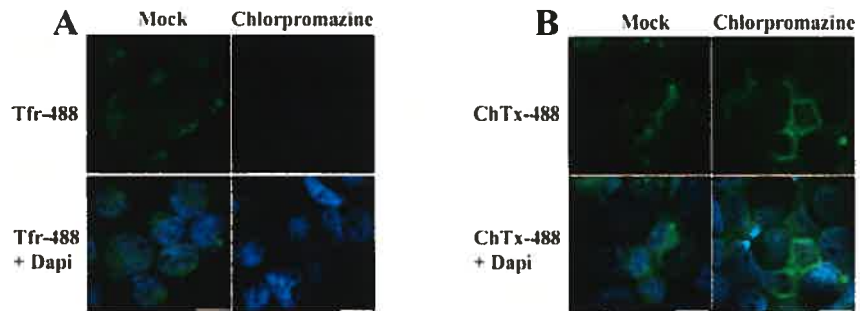
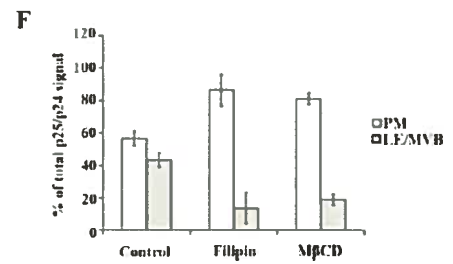
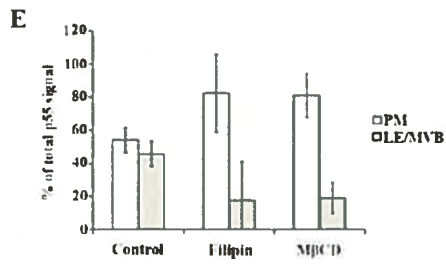
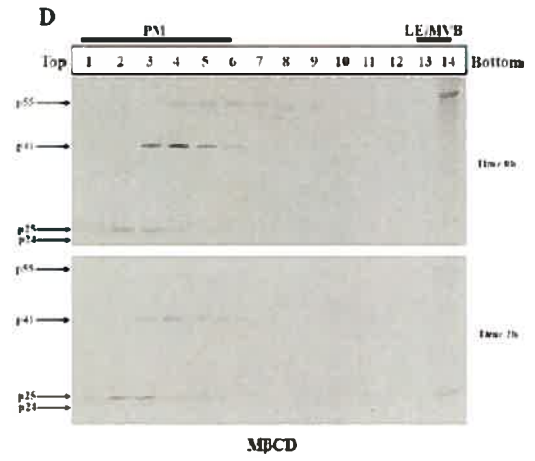
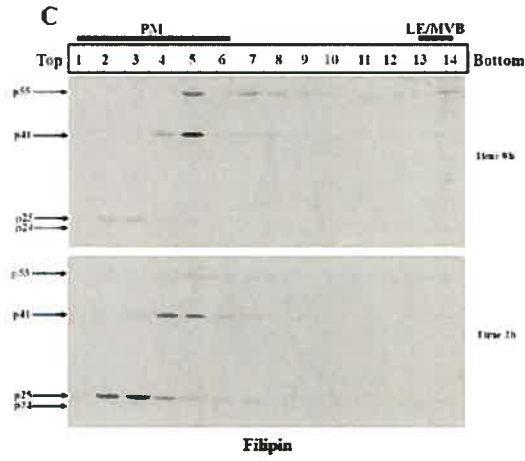
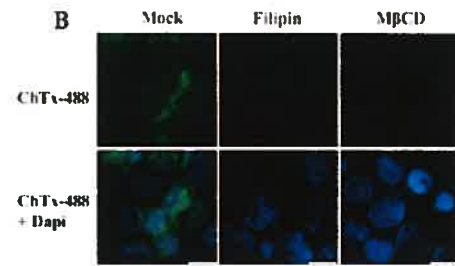
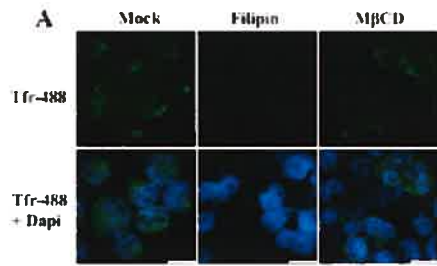


FIG. 7. Effect of cholesterol-binding drugs on HIV-1 Gag trafficking in HEK 293T cells. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were pretreated with filipin (4 $\mu\text{g/ml}$) or M β CD (8 mM) for 30 min before incubation for another 30 min at 0°C with (A) Tfr- or (B) ChTx β -Alexa-488 conjugates. Tfr or ChTx β internalization was allowed for 10 min at 37°C. Endocytosis inhibitors were maintained throughout the experiment. Samples were subsequently analyzed by immunofluorescence microscopy (bar, 10 μm) as described in Materials and Methods. Data shown are representative of two independent experiments. In parallel, cells were metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in the presence of (C) filipin or (D) M β CD prior to cell lysis and subcellular fractionation by Optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in Optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab for each collected fraction. (E) Quantification of the relative amounts of Pr55^{gag} detected in PM- and LE/MVB-associated fractions (1 to 6 and 13 and 14, respectively) at zero h of chase. (F) Quantification of the relative amounts of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- or LE/MVB-associated fractions at 2 h of chase. Gag-related signals were quantified as described in the legend to Fig. 6. Data shown are means \pm standard deviations of 5 control, 3 filipin, and 2 M β CD independent experiments.



CHAPITRE 3:

ARTICLE 2

Le fait que le VIH-1 s'accumule dans différents compartiments en fonction du type cellulaire soulève la possibilité qu'en plus des déterminants viraux, des facteurs cellulaires de l'hôte puissent aussi jouer un rôle dans la détermination du site d'assemblage rétroviral. Dans ce travail, nous avons voulu déterminer si l'expression des molécules du CMH-II, capables d'induire la formation de compartiments endosomaux tardifs dans des cellules épithéliales (Calafat, Nijenhuis et al. 1994), était suffisante pour modifier la localisation à l'équilibre de Gag et des virus matures de la MP vers des compartiments intracellulaires.

Ce travail, sous forme d'article a été publié en octobre 2006 dans The Journal of Virology. 80(19): 9789-97.

JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 2006, p. 9789–9797 Vol. 80, No. 19

**Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Promote
Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly and
Budding to Late Endosomal/Multivesicular Body
Compartments**

Andrés Finzi,^{1,3} Alexandre Brunet,^{2,3†} Yong Xiao,^{1,3†} Jacques Thibodeau,^{2,3}
and Éric A. Cohen^{1,3*}

Unité de Rétrovirologie Humaine, Institut de Recherches Cliniques de
Montréal, Montréal, Canada¹, and Laboratoire d'Immunologie Moléculaire²
and Département de Microbiologie et Immunologie,³ Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Human
Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des
Pins Ouest, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7. Phone: (514) 987-5804.
Fax: (514) 987-5691. E-mail: [REDACTED] † A.B. and Y.X.
contributed equally to the work.

Received 22 May 2006/Accepted 11 July 2006

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assembly, budding, and release occur mostly at the plasma membrane in T lymphocytes as well as in established nonlymphoid cell lines, while in macrophages these processes occur primarily in intracellular compartments that harbor late endosomal/multivesicular body (LE/MVB) markers, including human leukocyte antigen DR (HLA-DR). Major histocompatibility complex class II molecules (MHC-II), which are expressed in macrophages and activated T cells, have been previously reported to induce the formation of multilaminar and multivesicular endocytic MHC-II-like structures analogous to MVB upon their expression in HEK 293 cells. Here, we have examined the role of MHC-II in HIV-1 Gag targeting as well as in virus assembly and release. Expression of HLA-DR in nonlymphoid cell lines induced a relocation of Gag to intracellular compartments that harbored LE/MVB markers and increased the accumulation of viral particles assembling intracellularly. Consequently, viral production and release from the cell surface was found to be substantially decreased in HLA-DR-expressing cells. This process was specific, since it was not observed with HLA-DR molecules lacking their cytoplasmic tails, nor with structurally related but functionally distinct MHC-II molecules such as HLA-DM or HLA-DO. Importantly, virus released intracellularly in HLA-DR-expressing cells retained infectivity. Overall, these results suggest a role of MHC-II molecules in promoting HIV-1 assembly and budding to LE/MVB and raise the possibility that this activity might be part of a normal pathway of virus production in cell types physiologically expressing MHC-II molecules, such as macrophages.

INTRODUCTION

Production of retrovirus particles is a multistep process that requires the coordinated assembly of viral structural components at a membrane budding site. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag polyprotein, Pr55^{Gag}, plays a central role in viral assembly and release, since Gag expression alone is sufficient for the production of noninfectious virus-like particles (16). Pr55^{Gag} is composed of four domains that are cleaved by the viral protease (PR) during the budding process to generate matrix (MA or p17), capsid (CA or p24), nucleocapsid (NC or p7), and p6, as well as two spacer peptides, SP1 and SP2 (12, 16). Functional domains that promote Gag binding to membrane and multimerization have been mapped in Pr55^{Gag} to the myristoylated N-terminal portion of MA and the region spanning from the C terminus of CA to the N terminus of NC, respectively (12, 16). p6, through its tetrapeptide (PTAP) late motif, plays a central role in the release of viral particles by recruiting Tsg101 and other components of the endosomal sorting complex required for transport involved in the biogenesis of multivesicular bodies (MVB) (14, 30, 49, 51).

HIV-1 has been recently reported to assemble and bud either at the plasma membrane or in late endosomes (LE)/MVB. In cells such as T lymphocytes and transformed human cell lines such as HeLa and HEK 293T, the majority of virus assembly takes place at the plasma membrane (12, 34, 36, 46). In contrast, in primary macrophages, assembly occurs primarily in intracellular compartments that express late endosomal or MVB markers, including major histocompatibility complex class II molecules (MHC-II), such as human leukocyte antigen DR (HLA-DR), CD63, and Lamp1 (33, 38, 40, 42). However, the mechanism governing whether virus release occurs via internal or plasma membranes remains poorly understood. Interestingly, several reports have established that in addition to directing Gag membrane binding, the HIV MA domain regulates the targeting of Gag to the site of

virus assembly (7, 9, 13, 18, 37). On the other hand, the cell-type-dependent nature of HIV-1 assembly subcellular location strongly suggests that in addition to viral determinants, host cell factors must also play an active role in determining whether HIV-1 particle assembly and release occurs at the plasma membrane or in LE/MVB. However, the identity of cellular factors promoting HIV-1 targeting to LE/MVB remains to be defined.

Interestingly, MHC-II molecules, which are expressed in macrophages and activated T cells, have been previously reported to induce the formation of CD63/Lamp1-positive multilaminar and multivesicular endocytic structures, reminiscent of MHC-II-enriched compartments (MIIC), upon their ectopic expression in HEK 293 cells (4). Interestingly, the transmembrane and cytoplasmic tails of the class II α and β chains were found necessary for the induction of these prototypical MHC-II endocytic compartments in HEK 293 cells, indicating that MHC-II molecules contain information critical for the formation or maturation of MHC-II-like compartments. Since HIV-1 particles preferentially assemble at the plasma membrane in HEK 293T cells (18, 46), we investigated the impact of MHC-II expression on Gag localization as well as on assembly and release of HIV-1 particles. Our results suggest that expression of classical MHC-II molecules promotes assembly and budding of infectious HIV-1 to LE/MVB in a process that implicates the cytoplasmic domain of the α and β chains of MHC-II. These findings shed light on host cell factors governing the cell-type-dependent subcellular location of HIV-1 assembly and budding and reveal a novel effect of MHC-II molecules on HIV-1 replication and persistence.

MATERIALS AND METHODS

Cells and plasmids. HEK 293T, HeLa-CD4-LTR- β -Gal (25), HeLa DR1 (DR α + DR β 0101) (43), and HeLa DR α TM/DR β TM (19) cells were maintained as described elsewhere (25). The HIV-1 molecular clone HxBc2 (24) and the MHC-II expression plasmids, including pBud-DO, pBud-DM (10), and pLNCX-DQ (19), were previously described. For the bicistronic pBud-DR construct, cDNAs encoding the DR α and DR β chains were cloned into the pBudCE4-amp vector. A BamHI DR β fragment originating from pBSDR β was cloned into pBudCE4 (pBudCE4-amp DR β), and a BamHI fragment encoding the DR α chain was cloned into the Bgl II site of pBudCE4-amp DR β . For experiments where the TM/TM mutant was included, the following plasmids were used: RSV.5 DR α , RSV.3 DR β , RSV.5 DR α TM, and RSV.3 DR β TM (19).

Transfections, immunoprecipitation, and viral release. Transfections were performed as described previously (52). Immunoprecipitations were done using a mix of human anti-HIV serum together with a monoclonal anti-p24 antibody (Ab), as described elsewhere (52). For pulse-labeling experiments, transfectants were metabolically labeled with 1 mCi/ml [³⁵S]methionine-cysteine ([³⁵S] protein labeling mix; Perkin-Elmer) in Dulbecco's modified Eagle's medium lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed fetal bovine serum for 2 h. Viral release was calculated as described elsewhere (35). For pulse-chase experiments, cells were metabolically labeled for 30 min as described above and chased for different time intervals in Dulbecco's modified Eagle's medium containing an excess of unlabeled methionine and cysteine. Viral release was calculated as the amount of virion-associated Gag as a fraction of total (cell plus virion) Gag synthesized during 30 min of the metabolic labeling period (0-h chase).

Antibodies and immunostaining. The following antibodies were used: L243 (immunoglobulin G2a [IgG2a]), a murine monoclonal antibody that binds a specific HLA-DR α conformational determinant dependent on the correct conformation of the α/β heterodimer (39); mouse monoclonal antibody (IgG1), which recognizes p17 but not p55^{gag} (catalog no. HB-8975) and mouse monoclonal anti-p24 (catalog no. HB-9725), isolated from supernatants of cultured hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA); rabbit anti-p24 polyclonal antibody (catalog no. 4250; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program); the anti-HIV-1 serum (no. 162), obtained from an HIV-1-infected individual whose serum tested positive for the presence of HIV-1 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (25); mouse anti-Lamp-1 (H5G11; IgG1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-CD63 (H5C6; IgG1; Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa); mouse anti-lysobisphosphatidic acid (LBPA) monoclonal antibody (22), a kind gift from J. Gruenberg (University of Geneva, Geneva, Switzerland); and rabbit polyclonal anti-human class II alpha chain serum (31), a kind gift from J. Neefjes (Netherlands Cancer Institute). Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG, Alexa 594-conjugated anti-mouse IgG, Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG1, and Alexa 594-conjugated anti-mouse IgG2 were obtained from Molecular Probes (Burlington, ON, Canada). Immunostaining was performed on 5×10^4 HEK 293T or 3×10^4 HeLa cells as follows: transfected cells were rinsed once with phosphate buffered saline (PBS), cyospun for 4 min at 1,100 rpm in a Cytospin 2 (Shandon), and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. HeLa cells were directly fixed in chambered coverglasses, where they were plated 24 h before. All procedures were carried out at room temperature unless otherwise indicated. Following a wash with PBS, fixed cells were permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 for 10 min, followed by an additional washing with PBS. Subsequently, cells were incubated in PBS containing 50 mM ammonium chloride for 10 min and exposed to primary antibodies diluted appropriately in 2% bovine serum albumin in PBS

for 2 h at 37°C. Following three washes with PBS, cells were next incubated for 40 min with an appropriate secondary antibody diluted in PBS. Nuclei were then stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole for 5 min. After extensive washing, cells were mounted with Permount (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and examined by conventional epifluorescence micrographs on a Zeiss Cell Observer system (Zeiss, Toronto, ON, Canada) equipped with an Axiovert 200M microscope using the 100x oil lens. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 3.1 software using the nearest-neighbor deconvolution method. Flow cytometry analysis was performed as described previously (3).

Cell-associated infectivity and Pr55gag processing. HEK 293T cells (3×10^5) were cotransfected with 1.6 μg of HxBc2 provirus together with 0.8 μg of empty or HLA-DR vectors and washed 16 h later. Twenty-four hours posttransfection, indinavir sulfate (IVS; 10 μM ; catalog no. 8145; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) was added to the culture medium to inhibit infectivity of newly produced virus. Forty-eight hours posttransfection, cells were extensively washed in PBS and either lysed in RIPA buffer (5% of cells) or homogenized (95% of cells) in homogenization buffer (0.25 M sucrose, 78 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 8.4 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 50 mM HEPES-NaOH pH 7.0) during 60 s using a pellet pestle with a cordless motor (Kontes, Vineland, NJ). Homogenates were centrifuged at 1,000 $\times g$ for 5 min to pellet nuclei and any cell debris. Evaluation of cell lysis efficiency was accomplished by measuring β -hexosaminidase activity in pellets and supernatants using 4-methyl-umbelliferyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) as described elsewhere (50). Infectivity of virus present in postnuclear supernatants (PNS) was assessed by MAGI assay (20). Each sample was analyzed in duplicate. Of note, IVS treatment involved not only a 24-h exposure of transfected cells to the drug but also maintenance of IVS during PBS washes, the homogenization step, and infection of MAGI (HeLa-CD4-LTR- β -Gal) cells. Lysed cells were

analyzed for Gag polyprotein precursor processing by Western blotting using the mouse monoclonal anti-p24 antibody as described previously (25).

Electron microscopy. Cell pellets were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Postfixation of cell pellets was performed using 2% OsO₄ in *s*-collidine buffer for 2 h at 21°C. Pellets were dehydrated in an acetone series before embedding and polymerization in SPURR resin. Thin sectioning was done with an ultramicrotome system (Ultratome 2128, LKB, Sweden), and the sections were placed on copper-Formvar-carbon-coated grids. Cells were stained with 5% uranyl acetate in 50% ethanol and lead citrate (pH 12.0). For immunogold staining, cell pellets were fixed in 0.1% glutaraldehyde–4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Pellet dehydration, polymerization, and thin sectioning were performed as described above, and the sections were placed on nickel-Formvar-carbon-coated grids. Cells were labeled with a rabbit polyclonal anti-human class II serum (31) followed by incubation with a goat anti-rabbit antibody coupled to 12-nm gold beads before staining using 5% uranyl acetate in 50% ethanol and lead citrate (pH 12.0). The grids were examined on a transmission electron microscope (Hitachi 7100; Japan).

RESULTS

HLA-DR expression induces a relocation of HIV-1 Gag to LE/MVB.

Expression of the α and β chains of MHC-II molecules in HEK 293 cells was found to be sufficient to induce the formation of multilamellar and multivesicular MIIC (4). To examine whether MHC-II molecules could affect Gag localization, HEK 293T cells were cotransfected with the HIV-1 molecular clone HxBc2 together with expression plasmids encoding the α and β chains of HLA-DR or an empty vector. In the absence of HLA-DR, the majority of Gag, as visualized with an anti-p24 antibody, was detected as diffuse cytoplasmic and cell membrane staining (Fig. 1A). In contrast, Gag-positive cells expressing HLA-DR often displayed a marked modification of Gag localization, with Gag staining accumulating in large intracellular vesicles (Fig. 1B). Interestingly, these intracellular Gag-containing vesicles were also HLA-DR positive (Fig. 1B, merge).

Since we were able to differentiate between diffuse and large punctuate Gag staining (Fig. 1A and B, respectively), we quantified the extent of Gag relocation induced by HLA-DR in cell transfectants (Fig. 1C). In the absence of HLA-DR, 80 to 90% of cells showed a diffuse Gag staining, while less than 20% displayed a punctuate Gag staining. Conversely, upon HLA-DR expression, a punctuate Gag staining was detected in approximately 50% of the cells, most probably those expressing higher levels of HLA-DR. Indeed, the effect of HLA-DR expression on Gag localization in intracellular vesicles was dose dependent (Fig. 1D). Importantly, however, levels of HLA-DR expression required to induce Gag relocation to intracellular vesicles (Fig. 1) were comparable to those detected in activated primary monocyte-derived macrophages (data not shown). Finally, to examine whether the effect of HLA-DR on HIV-1 Gag localization was restricted to the classical MHC-II molecules, such as HLA-DR and -DQ, or was also shared with other structurally related MHC-II proteins, such as HLA-DM and -DO (nonclassical MHC-II molecules), we tested the impact of their expression on Gag

localization. HLA-DM is expressed in late endosomal/lysosomal compartments, including MVB and multilamellar compartments (28, 44), while HLA-DO resides in the endoplasmic reticulum when expressed by itself in transfected cells (26); neither HLA-DM nor -DO displayed any effect on Gag localization, while HLA-DQ partially recapitulated the effect of HLA-DR (Fig. 2).

To further characterize the nature of the intracellular compartments where Gag accumulates in the presence of HLADR, we performed costaining experiments with antibodies directed against late endocytic markers. These experiments revealed that Gag-containing intracellular vesicles were positive for LE or MVB markers HLA-DR, Lamp1, CD63, and LBPA, a lipid found in the internal membranes of MVB (22) (Fig. 1B and 3A to C, respectively). Because results so far were obtained in a transient expression system where proteins are overexpressed, we also examined the effect of HLA-DR expression on Gag relocalization in HeLa cells stably expressing HLA-DR (Fig. 4A). Given that previous evidence suggested that the cytosolic domain of MHC-II molecules might be implicated in the induction of MHC-II-like compartments (4), we also analyzed Gag localization in HeLa cells stably expressing a truncated form of HLA-DR that lacks the cytoplasmic tails of the α and β chains (TM/TM). HLA-DR-expressing cell lines were transfected with the HxBc2 provirus and analyzed 48 h later by immunofluorescence microscopy, using an antibody that recognizes mature p17 (but not the MA domain in the context of Pr55^{gag}) and an anti-HLA-DR antibody. Given that most processed MA is found associated with mature viral particles (16), the MA signal obtained with the anti-p17 antibody, in all likelihood, represents sites at which viral assembly occurs. In parental HeLa cells as well as in TM/TM cells, the majority of the MA signal was observed at the cell periphery on the plasma membrane (Fig. 4A), even though TM/TM molecules have been detected in intracellular vesicles that stained positive for MVB markers (A. Finzi and E. A. Cohen, unpublished data). In contrast, in HLA-

DR-expressing cells, we observed a clear redistribution of MA staining to intracellular vesicles, where it colocalized with HLA-DR (Fig. 4A). Importantly, both HeLa-DR and HeLa-TM/TM expressed similar amounts of class II molecules as measured by flow cytometry (Fig. 4B).

Together, these results suggest that ectopic MHC-II expression in human nonlymphoid cell lines induces a redirection of HIV-1 Gag localization and assembly from the plasma membrane to MHC-II-containing LE/MVB. This effect is restricted to classical MHC-II molecules, such as HLA-DR and -DQ and, importantly, appears to involve the cytoplasmic domains of the α and β chains.

HIV-1 particles accumulate into intracellular compartments in MHC-II-expressing HEK 293T cells.

To obtain additional evidence that HLA-DR expression promotes HIV-1 particle assembly and budding in intracellular compartments, we performed electron microscopy analysis on HEK 293T cells transfected with HxBc2 alone or cotransfected with vectors encoding HLA-DR or the TM/TM mutant (Fig. 5). In HEK 293T cells transfected with HxBc2 alone or cotransfected with TM/TM, viral particle budding was observed predominantly at the plasma membrane (Fig. 5A and D and 5C and F, respectively). In HLA-DR-expressing cells, mature virions with typical condensed cores were observed in the lumen of large intracellular vesicles (Fig. 5B and E and 5G and H). Viral particles in the process of budding were also seen on the limiting membrane of these enlarged intracellular vesicles (Fig. 5G and H). Furthermore, immunogold staining experiments using an anti-HLA-DR antibody clearly revealed that the internal vesicles containing mature virions and budding viral particles stained positive for HLA-DR (Fig. 5H).

Effect of HLA-DR expression on HIV-1 production.

Having obtained evidence suggesting that HLA-DR expression promotes assembly and budding of HIV-1 particles to LE/MVB in HEK 293T cells, we next examined the impact of this relocation on HIV-1 particle production. HEK 293T cells were singly transfected with HxBc2 or cotransfected with expression vectors encoding HLA-DR or related molecules. Cells were pulselabeled for 2 h, 48 h posttransfection, and cell and virus Gag-associated proteins were analyzed by immunoprecipitation (Fig. 6A). In transfected cell cultures expressing HLA-DR, virus release was reduced by two- to threefold compared to the mock-transfected control (Fig. 6A and B). In contrast, in TM/TM-, HLA-DM-, or HLA-DO-expressing cells, viral release efficiency was unaffected (Fig. 6A and B) (Finzi and Cohen, unpublished). Importantly, the observed impact of HLA-DR on HIV-1 release was not due to any marked defect at the level of Gag precursor processing, since measurements of Gag precursor cleavage in pulse-chase labeling/immunoprecipitation experiments revealed that the Pr55gag processing kinetics was identical in cells expressing HLA-DR and in the negative control (Fig. 6C and D). These results suggest that expression of MHC-II molecules, such as HLA-DR, can modulate viral release efficiency.

Interestingly, when we analyzed both quantitatively and qualitatively cell- and virus-associated Gag-related products by pulse-chase labeling and immunoprecipitation experiments, we started detecting a reduction of viral release in HLA-DR-expressing cells as early as 1 h postchase. This reduction in viral release efficiency was observed throughout the 24-h chase period, with a peak between 5 and 12 h; during that time interval, HLA-DR-expressing cells were found to release approximately twofold less virus than control cells (Fig. 6C and E). Interestingly, this reduction in viral release efficiency was accompanied by a change in the p24/p25 ratio accumulating in HLA-DR-expressing cells; quantitative analysis over several experiments revealed that there was 1.5 to 2.0 times more p24 relative to p25 in HLA-DR-

expressing cells than control cells (Fig. 6C; compare p24 and p25 levels between HLA-DR⁺ and -DR⁻ cells). These results indicate that even though CA is accumulating intracellularly in HLA-DR-expressing cells, it is being processed in a mature form usually found associated with mature viral particles. Overall, these results are consistent with our findings suggesting that expression of MHC-II molecules in HIV-producing cells leads to increased assembly and budding of mature viral particles in LE/MVB.

Infectivity of viral particles assembling intracellularly in the presence of HLA-DR.

We next evaluated whether virions assembling intracellularly upon HLA-DR expression retained their infectivity. This is particularly important given that specific endosomal compartments are known to undergo acidification, a process that inactivates HIV infectivity (11), and participate in the degradation pathway that leads to lysosomes (17). To address this question, we adapted a recently described strategy that was used to evaluate the infectious stability of virions that assemble intracellularly in primary macrophages (45). This approach utilizes suprainhibitory concentrations (10 μ M) of the protease inhibitor IVS to block de novo production of infectious particles. In the presence of 10 μ M IVS, processing of Pr55^{gag} is completely inhibited and virus particles that are produced are immature and hence noninfectious (45; Finzi and Cohen, unpublished). Consequently, infectious virus recovered from HIV-1-producing cells following IVS treatment should be formed prior to addition of the inhibitor. HEK 293T cells cotransfected with HxBc2 provirus and HLA-DR or empty vectors were allowed to produce infectious virus for 24 h prior to addition of IVS. Cells were homogenized and fractionated 24 h later to analyze cell-associated infectivity as described in Materials and Methods. Since cell disruption could affect recovery of the intracellular pool of virus, PNS and pellet fractions were analyzed for β -hexosaminidase activity as a marker for cell lysis and endocytic organelle disruption (23) (Fig. 7A). Consistent with the accumulation of intracellular

viral particles (Fig. 5 and 6), untreated HLA-DR-expressing cells displayed more infectious activity (1.6-fold increase) in their PNS compared to control cells (Fig. 7B). IVS treatment drastically reduced intracellular infectious activity in control cells, thus suggesting that the bulk of cell-associated infectious activity produced during the first 24 h posttransfection (before adding IVS) was efficiently released in the extracellular medium in absence of HLA-DR. Nevertheless, some infectious activity (14%) was still detectable in PNS and most probably represents the background HIV-1 intracellular assembly detected in HEK 293T cells (Fig. 1 and 7C). Remarkably, IVS treated HLA-DR-expressing cells retained four times more infectious activity in their PNS than control cells (57% versus 14%) (Fig. 7B). Interestingly, analysis of β -hexosaminidase activity released in PNS was found to be comparable between HLA-DR transfectants and control cells (Fig. 7A), thus indicating that differences observed in intracellular infectious activity cannot be attributed to variations in cell disruption efficiency. Furthermore, analysis of Gag processing in untreated or IVS-treated cells supported our observation that MHC-II molecules enhanced accumulation of mature virus particles into intracellular compartments (Fig. 7C). In the presence of IVS, as expected, there was a clear inhibition of Gag processing, as visualized by the decreased levels of p25/24 cleavage products and increased accumulation of p55^{gag} (Fig. 7C; compare lanes 1 and 2 and lanes 3 and 4). Strikingly, the inhibitory effect of IVS on Gag processing was less efficient in HLA-DR transfectants than in control cells, as evidenced by the marked accumulation of p25/p24 (two- to threefold increase) in HLADR+ cells relative to the control (Fig. 7C, compare lanes 4 and 2). These completely processed intracellular Gag products, by definition, had to be produced during the 24-h time interval before addition of the drug.

Altogether, these results provide additional evidence indicating that mature virus particles accumulate more efficiently into intracellular compartments in the presence of HLA-DR and demonstrate that virions

released intracellularly within HLA-DR-expressing cells retain their infectivity potential.

DISCUSSION

In this study, we examined the role of MHC-II molecules in HIV-1 Gag targeting as well as in virus assembly and release. Ectopic expression of classical MHC-II molecules, such as HLA-DR and -DQ, in nonlymphoid cell lines was found to promote Gag relocation to intracellular compartments that contained late endosomal and MVB markers (Fig. 1 to 3), in a process that strictly relied on the presence of the cytoplasmic tails of the α and β chains of MHC-II molecules (Fig. 4 and 5). This MHC-II-mediated relocalization of Gag correlated with an increased accumulation of mature viral particles in intracellular compartments (Fig. 5) and, as a consequence, resulted in decreased virus production and release from the cell surface (Fig. 6). Importantly, viral particles assembling intracellularly in HLA-DR-expressing cells retained their infectivity (Fig. 7). Together, these results provide evidence suggesting that MHC-II molecules promote assembly and budding of infectious HIV-1 virions to LE/MVB and raise the possibility that this process might be part of a normal pathway of virus production in cell types physiologically expressing MHC-II molecules, such as macrophages.

HIV-1 Gag contains motifs that are critical for its transport to the plasma membrane (36) and for interaction with LE/ MVB (7, 27). Furthermore, recent evidence indicates that the cell-type-dependent targeting of HIV-1 assembly to the plasma membrane or LE/MVB can also be regulated by host cell factors. For instance, the human ubiquitin ligase POSH, a *trans*-Golgi network-associated protein (1), and more recently phosphatidylinositol (4,5)biphosphate [PI(4,5)P₂], a member of the phosphoinositide family of lipids concentrated primarily on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane (35, 48), were found to regulate HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane, such that depleting hPOSH or cellular PI(4,5)P₂ redirected virus assembly from the plasma membrane to LE and inhibited virus release. Interestingly, in the case of MHC-II molecules, it is the expression of a host cell factor physiologically expressed in macrophages that relocalizes Gag and

viral assembly to LE/MVB in HeLa or HEK 293T cells. Nevertheless, MHC-II-mediated relocation of viral assembly to LE/MVB in HEK 293T cells resulted in a reduction of virus release, as has been reported for hPOSH or cellular ([PI(4,5)P₂] depletion).

How does expression of class II molecules result in a marked accumulation of HIV-1 into LE/MVB? One possibility is that MHC-II molecules interact with a structural component of HIV and retarget a fraction of viral assembly to intracellular compartments following their transit into the endocytic pathway. MHC-II molecules, such as HLA-DR, have been reported to be present at the surface of the HIV-1 virion (5, 6) and, based on a previous study, Env gp41 appears to be required for efficient insertion of HLA-DR molecules within HIV-1 (41). The mechanism underlying MHC-II-mediated relocation of HIV-1 assembly and budding does not appear to involve an interaction between the viral envelope and HLA-DR, since the effect of HLA-DR on Gag relocation and viral particle production was observed with proviral constructs lacking Env (Finzi and Cohen, unpublished). Although this redirection could also result from an interaction of Gag with HLA-DR, we were unable to detect any specific interaction between these molecules in coimmunoprecipitation experiments (Finzi and Cohen, unpublished). However, the lack of physical interaction between HLA-DR and Gag does not preclude the possibility that the two molecules can interact functionally. In fact, it was reported that Gag can affect HLA-DR trafficking (15). In this study, Gag expression was shown to be sufficient to specifically restore defective transport of HLA-DR from intracellular compartments to the cell surface in a subclone of the HUT78 human T-cell line, suggesting that at some point Gag and HLA-DR share the same trafficking pathway. Interestingly, it was reported that a significant pool of MHC-II molecules traffic to endosomal-lysosomal compartments by means of the cell surface (8, 29). Consequently, it is therefore possible that MHC-II-induced relocation of Gag into LE/MVB and subsequent accumulation of mature viral particles in

these intracellular compartments could result from an increased internalization of virions from the plasma membrane mediated by HLA-DR rather than an enhanced targeting of Gag to LE/MVB. Interestingly, a recent report indicates that expression of a dominant negative form of dynamin (K44A), known to inhibit clathrin-mediated endocytosis (47), prevented the accumulation of Gag at intracellular sites in the absence of Vpu in HeLa cells (32). Although our preliminary data indicate that the effect of HLA-DR on viral release was not affected by K44A expression, we did observe a partial reduction of Gag relocation to intracellular compartments under these conditions (Finzi and Cohen, unpublished), thus suggesting that a pool of Gag retargeted by HLA-DR could be plasma membrane associated. Importantly, however, since Gag relocation to intracellular compartments could not be completely abolished upon K44A expression, this suggests that HLA-DR may also affect the cellular localization of Gag by enhancing its direct targeting to MVB.

Indeed, an alternative but not exclusive model to explain the effect of MHC-II molecules on HIV-1 assembly and budding to intracellular compartments postulates that expression of MHC-II may contribute to the formation or maturation of compartments to which Gag molecules would be targeted. Importantly, expression of MHC-II molecules, such as HLADR, in HEK 293 cells was found to be sufficient to induce a MIIC-like structure having a multilamellar and multivesicular morphology and expressing CD63 and Lamp1 (4). Both types of structures were proposed to reflect different maturation states of MIIC (21). One might envision that formation and/or maturation of MIIC-like compartments by MHC-II in HEK 293T cells may provide additional internal membrane platforms toward which Gag can be targeted for assembly and budding. Interestingly, treatment of U1 promonocytic cells with gamma interferon, a strong upregulator of MHC-II expression, was found to significantly increase the redirection of virus assembly from the plasma membrane to intracytoplasmic vesicles (2). More

studies are required to fully understand the precise mechanism underlying the effect of MHC-II molecules on HIV-1 assembly and release. Furthermore, experiments aimed at depleting MHC-II molecules are currently in progress to elucidate whether MHC-II influences Gag targeting and assembly to MVB in primary macrophages and as such constitutes a cellular determinant governing HIV-1 production and egress in this cell type.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Duisit for helpful discussions, as well as A. Robert and A. Vallée for expertise in electron microscopy analysis. We thank J. Gruenberg and J. Neefjes for providing Abs. The polyclonal anti-p24 Ab, IVS, and HeLa-CD4-LTR- β -Gal cells were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program.

A.F. is recipient of a studentship from a Canadian Institute of Health Research (CIHR) training program in cancer research. E.A.C. and J.T. are recipients of the Canada Research Chair in Human Retrovirology and a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) scholarship award, respectively. This work was supported by grants from CIHR and FRSQ to E.A.C. and J.T. and from the FRSQ-AIDS network to E.A.C.

REFERENCES

1. **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. USA* **102**:1478–1483.
2. **Biswas, P., G. Poli, A. L. Kinter, J. S. Justement, S. K. Stanley, W. J. Maury, P. Bressler, J. M. Orenstein, and A. S. Fauci.** 1992. Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J. Exp. Med.* **176**:739–750.
3. **Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau.** 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J. Biol. Chem.* **275**:37062–37071.
4. **Calafat, J., M. Nijenhuis, H. Janssen, A. Tulp, S. Dusseljee, R. Wubbolts, and J. Neefjes.** 1994. Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J. Cell Biol.* **126**:967–977.
5. **Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay.** 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J. Virol.* **71**:1922–1930.

6. **Cantin, R., J. F. Fortin, and M. Tremblay.** 1996. The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific. *Virology* **218**:372–381.
7. **Dong, X., H. Li, A. Derdowski, L. Ding, A. Burnett, X. Chen, T. R. Peters, T. S. Dermody, E. Woodruff, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2005. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**:663–674.
8. **Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch.** 2005. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J. Biol. Chem.* **280**:19656–19664.
9. **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**:4972–4980.
10. **Faubert, A., A. Samaan, and J. Thibodeau.** 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* **277**:2750–2755.
11. **Fredericksen, B. L., B. L. Wei, J. Yao, T. Luo, and J. V. Garcia.** 2002. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**:11440–11446.
12. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1–15.

13. **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**:5311–5320.
14. **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.
15. **Gluschankof, P., and M. Suzan.** 2002. HIV-1 gag polyprotein rescues HLA-DR intracellular transport in a human CD4₊ cell line. *Virology* **300**:160–169.
16. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15**(Suppl. 5):S13–S20.
17. **Gruenberg, J., and H. Stenmark.** 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:317–323.
18. **Hermida-Matsumoto, L., and M. D. Resh.** 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J. Virol.* **74**:8670–8679.
19. **Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau.** 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* **15**:1249–1263.
20. **Kimpton, J., and M. Emerman.** 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**:2232–2239.

21. **Kleijmeer, M. J., S. Morkowski, J. M. Griffith, A. Y. Rudensky, and H. J. Geuze.** 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **139**:639–649.
22. **Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton, and J. Gruenberg.** 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**:193–197.
23. **Kramer, B., A. Pelchen-Matthews, M. Deneka, E. Garcia, V. Piguet, and M. Marsh.** 2005. HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**:136–142.
24. **Lavallee, C., and E. A. Cohen.** 1993. HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**:529–530.
25. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J. Biol. Chem.* **278**:28346–28353.
26. **Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson.** 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* **15**:4817–4824.
27. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J. Virol.* **78**:6013–6023.

28. **Marks, M. S., P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters, and J. S. Bonifacino.** 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* **131**:351–369.
29. **McCormick, P. J., J. A. Martina, and J. S. Bonifacino.** 2005. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:7910–7915.
30. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:395–425.
31. **Neefjes, J. J., V. Stollorz, P. J. Peters, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh.** 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**:171–183.
32. **Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* **2**:e39.
33. **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**:52347–52354.
34. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902–910.

35. **Ono, A., S. D. Ablan, S. J. Lockett, K. Nagashima, and E. O. Freed.** 2004. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:14889–14894.
36. **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**:1552–1563.
37. **Ono, A., J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* **74**:2855–2866.
38. **Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J. Virol.* **62**:2578–2586.
39. **Panina-Bordignon, P., X. T. Fu, A. Lanzavecchia, and R. W. Karr.** 1992. Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J. Exp. Med.* **176**:1779–1784.
40. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* **162**:443–455.
41. **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**:3918–3923.
42. **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**:718–729.

43. **Robadey, C., W. Ammerlaan, C. Muller, I. Cloutier, R. P. Sekaly, J. A. Haefliger, and S. Demotz**. 1997. The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J. Immunol.* **159**:3238–3246.

44. **Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neefjes, H. J. Geuze, and J. Trowsdale**. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**:1566–1569.

45. **Sharova, N., C. Swingler, M. Sharkey, and M. Stevenson**. 2005. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* **24**:2481–2489.

46. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes**. 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785–801.

47. **Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker**. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* **83**:1535–1545.

48. **Simonsen, A., A. E. Wurmser, S. D. Emr, and H. Stenmark**. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:485–492.

49. **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**:689–699.
50. **Stumptner-Cuvelette, P., M. Jouve, J. Helft, M. Dugast, A. S. Glouzman, K. Jooss, G. Raposo, and P. Benaroch.** 2003. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Biol. Cell* **14**:4857–4870.
51. **von Schwedler, U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H. E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimbora, A. Scott, H. G. Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* **114**:701–713.
52. **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.

FIG. 1. HLA-DR induces Gag accumulation in intracellular compartments in HEK 293T cells. HEK 293T cells were cotransfected with the HxBc2 provirus together with empty or HLA-DR vectors and analyzed 48 h later by immunofluorescence microscopy using a polyclonal anti-p24 and the monoclonal L243 HLA-DR Abs. (A) In the absence of HLA-DR, Gag displays a diffuse staining. (B) HLA-DR redirects Gag to large intracytoplasmic vesicles (punctuate staining), where it colocalizes with HLA-DR. (C) Quantification of Gag-associated staining. The number of cells displaying a diffuse versus punctuate Gag staining was evaluated in 200 cells per sample. Data shown represent the average of at least 25 independent experiments +/- the standard deviation. (D) HLA-DR redirects Gag from a diffuse to a punctuate staining in a dose-dependent fashion. Data are representative of four independent experiments.

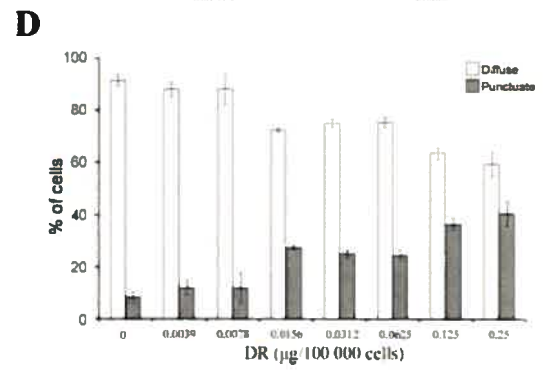
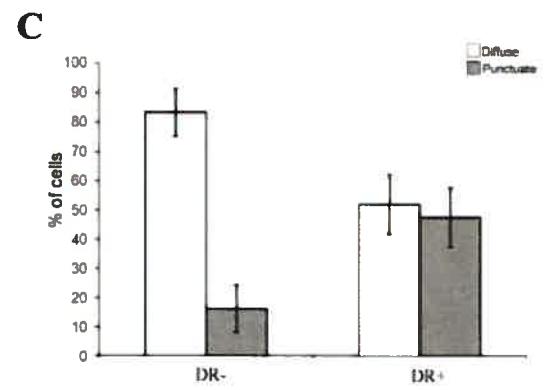
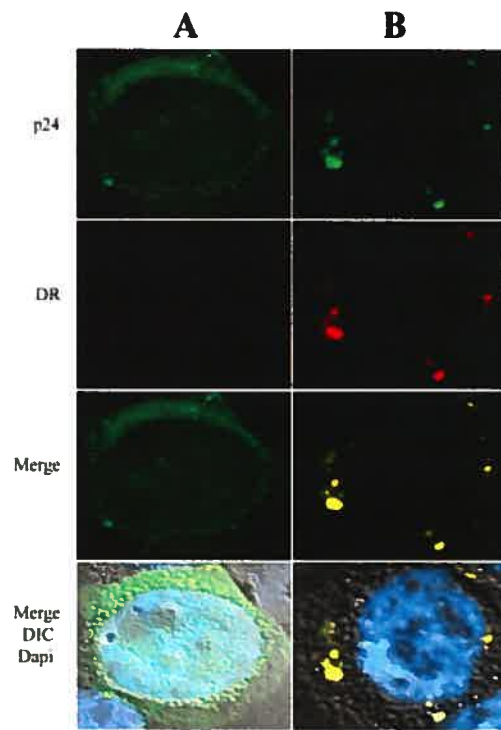


FIG. 2. Classical MHC-II molecules redirect Gag to intracellular compartments. HEK 293T cells were transfected with the proviral construct HxBc2 and plasmids encoding MHC-II-related molecules, including HLA-DR, -DQ, -DM, or -DO, and analyzed for Gag localization by immunostaining and fluorescence microscopy using a rabbit polyclonal anti-p24 antibody. Diffuse or punctuate Gag-associated staining patterns were quantified in 200 cells per sample. Data shown are means \pm standard deviations of two independent experiments.

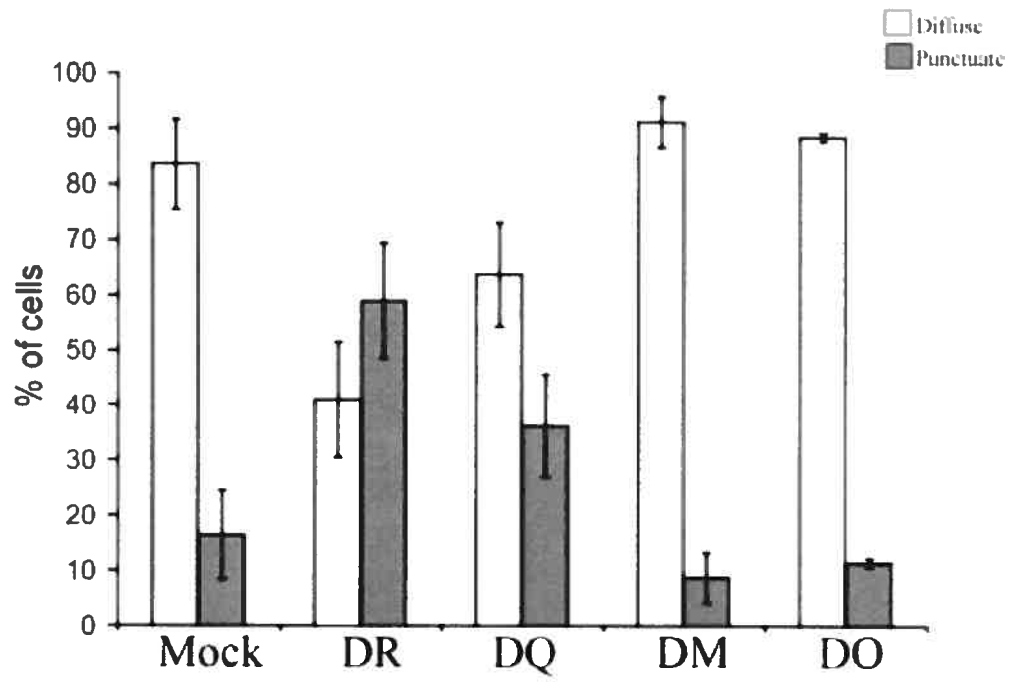


FIG. 3. HLA-DR redirects Gag to LE/MVB in HEK 293T cells. HEK 293T cells were transfected with the proviral construct HxBc2, together with HLA-DR or empty vector. Gag and MVB markers were detected by immunofluorescence microscopy 48 h later using a rabbit polyclonal anti-p24 antibody together with monoclonal antibodies against MVB markers. In the absence of HLA-DR, Gag shows primarily a diffuse staining (left panels of A, B, and C). Upon HLA-DR expression, Gag accumulates into Lamp1-positive (A), CD63-positive (B), and LBPA-positive (C) compartments (right panels).

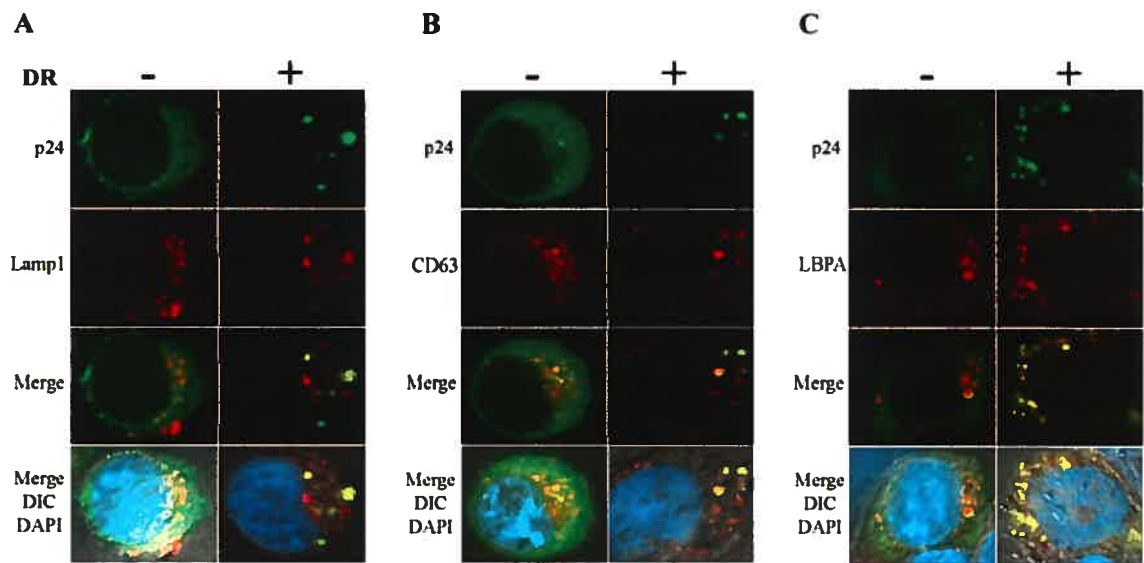


FIG. 4. Stable HLA-DR expression in HeLa cells induces Gag accumulation into HLA-DR-positive intracellular vesicles. Parental, HLA-DR-, or TM/TM-expressing HeLa cells were transfected with the infectious molecular clone HxBc2. Gag and HLA-DR were detected by immunostaining and fluorescence microscopy using mouse monoclonal anti-p17 (MA) and anti-HLA-DR (L243) Abs. (A) In parental HeLa cells, Gag is localized at the plasma membrane, whereas in HLA-DR-expressing cells, Gag is predominantly detected in vesicles at the perinuclear region. Importantly, stable TM/TM expression did not modify Gag localization. (B) Flow cytometry analysis of total HLA-DR expression in cells depicted in panel A using the L243 anti-HLA-DR monoclonal Ab. Black line, HeLa cells; red line, HeLa-DR cells; blue line, HeLa-TM/TM cells.

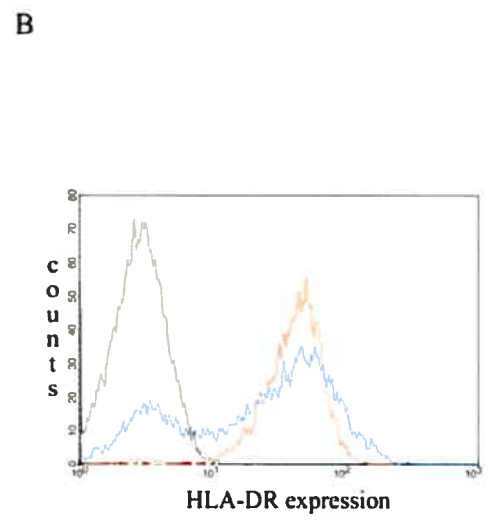
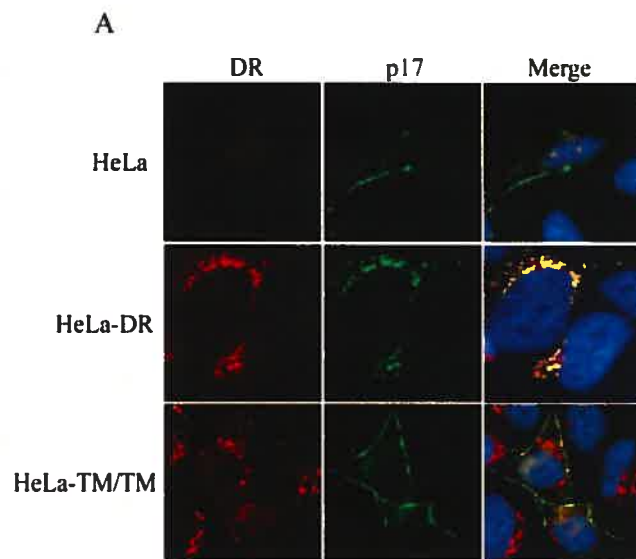


FIG. 5. Mature and budding HIV-1 particles accumulate in intracellular compartments upon HLA-DR expression. HEK 293T cells were cotransfected with HxBc2 and empty, HLA-DR, or TM/TM vectors and observed by transmission electron microscopy (A to G) or processed for immunogold staining with a rabbit polyclonal anti-HLADR α Ab (H). In mock- or TM/TM-transfected cells, HIV-1 assembles at the plasma membrane (A and C, respectively). (B) HLA-DR expression induces accumulation of mature and budding HIV-1 particles into large intracellular compartments. (D to F) Magnified views from regions indicated in panels A to C, respectively. (G) Magnified view of intracellular HIV-1-containing compartments in HLA-DR-expressing cells. (H) HIV-1 particles accumulate into HLA-DR-positive compartments. Empty arrows indicate budding virus, whereas solid arrows indicate mature virus. Bar, 300 nm (A), 500 nm (B), 400 nm (C), or 100 nm (D to H).

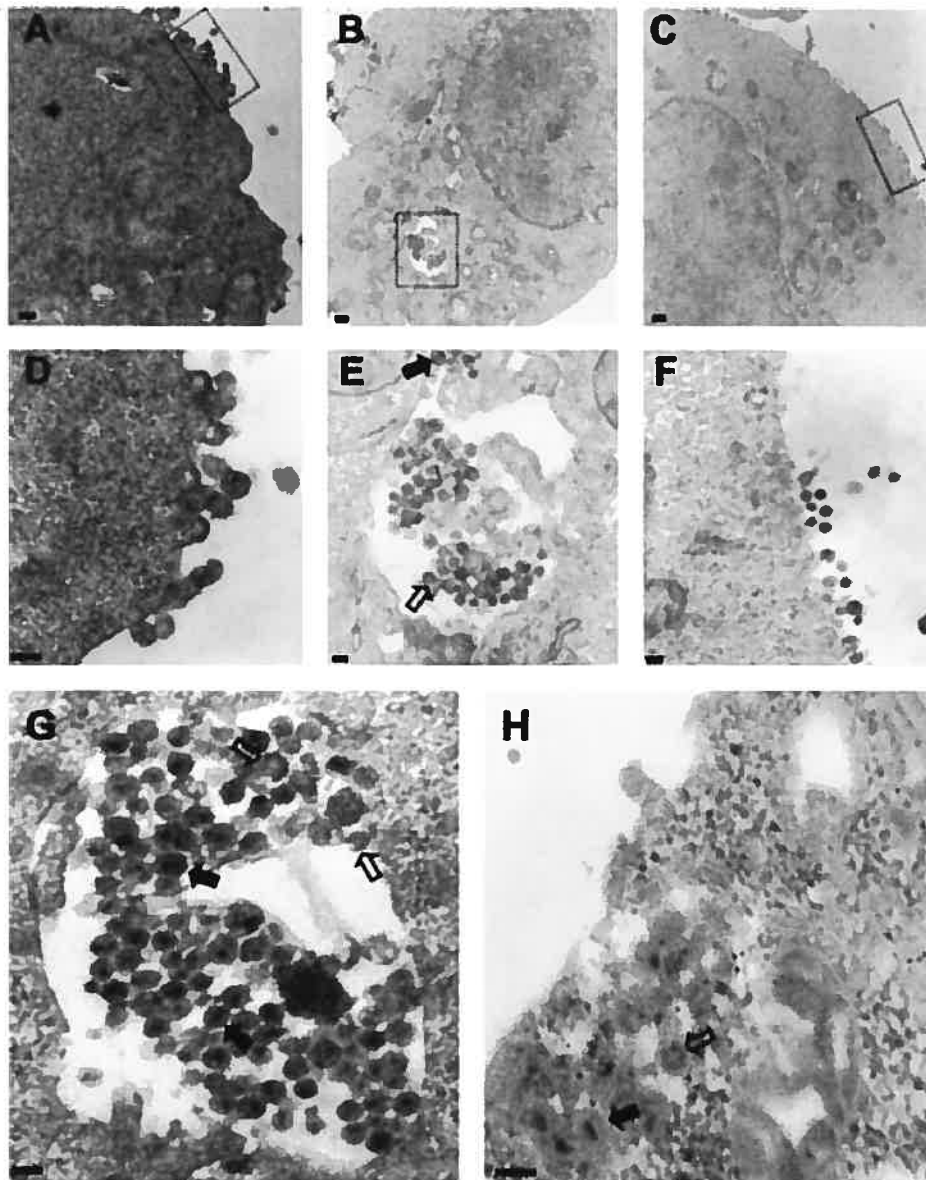


FIG. 6. HLA-DR expression decreases HIV-1 release. (A) HEK 293T cells were mock transfected (M) or cotransfected with plasmids encoding HLA-DR (DR₋), TM/TM (TM), or empty vector (DR-) together with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 2 h, and Gag-associated products in cell and virion lysates were immunoprecipitated using a mix of human anti-HIV serum together with a monoclonal anti-p24 Ab. (B) Quantitation of virus release efficiency. Data shown represent the average of at least four independent experiments +/- the standard deviation. (C) Analysis of viral release kinetics by pulse-chase labeling analysis. Cell and virion lysates from HLA-DR⁺ and HLA-DR⁻ cells were immunoprecipitated as for panel A after a 30-min metabolic labeling with [³⁵S]Met-Cys or at different chase time intervals. (D) Gag precursor processing is represented as the percentage of p55^{gag}-associated signal recovered from cell lysates after pulse-chase analysis as described for panel C. p55^{gag}-associated signal after 30 min of labeling (0-h chase) was arbitrarily set to 100%. Data shown represent the average of five independent experiments +/- the standard deviation. (E) Quantitation of viral release kinetics. Data from two independent experiments were quantified using a PhosphorImager equipped with ImageQuant software 5.0 and are shown as means +/- standard deviations. Viral release efficiency was calculated as described in Materials and Methods. Gray lines, HLA-DR-expressing cells; black lines, HLA-DR-negative cells.

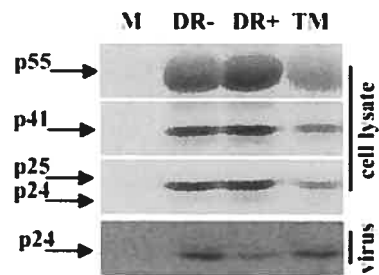
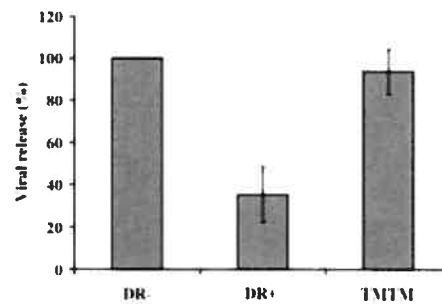
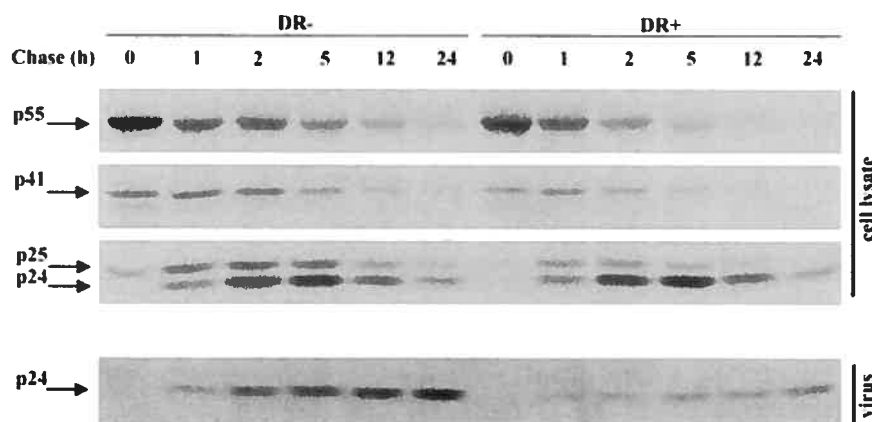
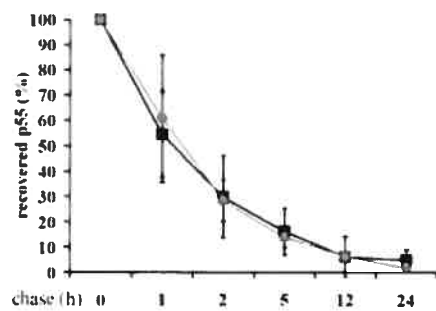
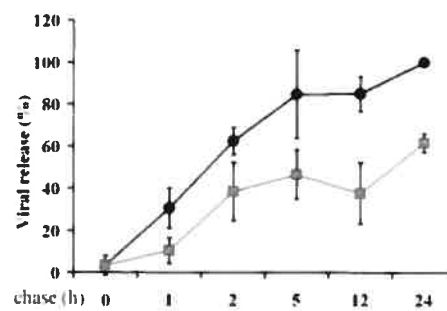
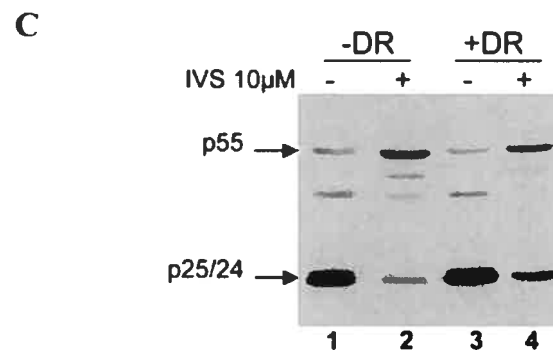
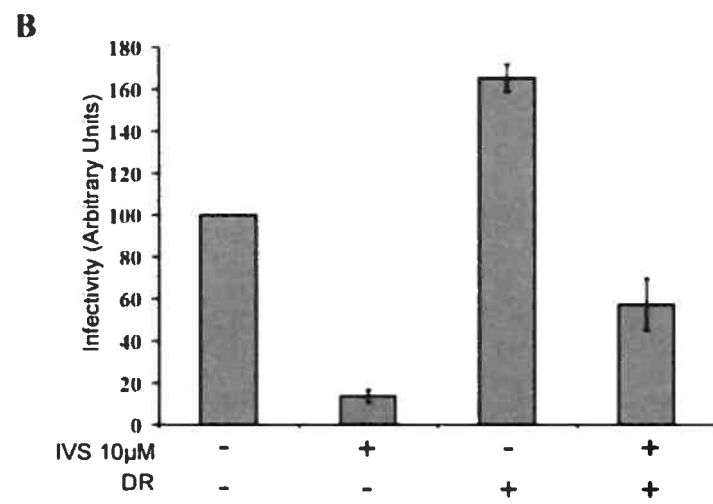
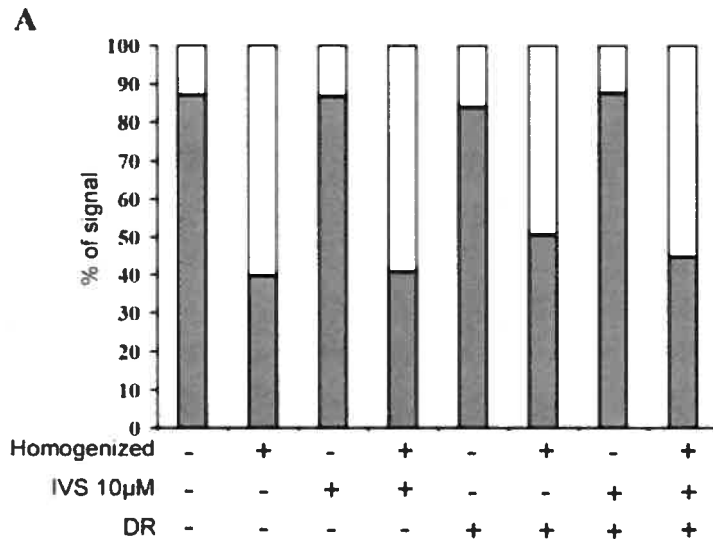
A**B****C****D****E**

FIG. 7. Virions assembling intracellularly in the presence of HLA-DR remain infectious. HEK 293T cells were cotransfected with HxBc2 provirus and empty or HLA-DR vectors. IVS (10 μ M) was added to the culture medium 24 h posttransfection to block production of new infectious virus. Cells were homogenized 24 h later, and cell disruption efficiency was determined by measuring β -hexosaminidase activity in pellets (filled bars) and PNS (empty bars) as described in Materials and Methods (A). Infectious activity was assessed in the PNS by MAGI assay (B). Data shown represent the average of two independent experiments \pm the standard deviation. In parallel, Gag processing in each transfectant was analyzed by Western blotting using a monoclonal anti-p24 Ab (C). Data shown are representative of six independent experiments.



CHAPITRE 4:

ARTICLE 3

Nous avons mis en évidence que l'expression des molécules du CMH-II étaient capables d'induire l'accumulation de Gag et des particules virales matures (et infectieuses) dans des CMVs (Chapitre 3). Toutefois, deux mécanismes d'action pourraient expliquer le phénomène : une augmentation de l'internalisation de Gag à partir de la MP ou au contraire, un ciblage direct de Gag vers les CMVs. Nous avons utilisé le fractionnement cellulaire présenté au chapitre 2 afin d'établir lequel des deux mécanismes était responsable de l'effet de HLA-DR sur Gag. De plus, nous avons essayé de déterminer quels étaient les déterminants viraux influençant l'effet de HLA-DR sur Gag.

Ce travail, sous forme d'un article à être soumis sous peu, est en phase finale de préparation.

MHC-II MOLECULES ENHANCE INTERNALIZATION OF HIV-1 GAG TO LATE ENDOSOMAL COMPARTMENTS

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

¹Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, ²Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

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

Running Title: MHC-II promotes Gag internalization to LE/MVB

Manuscript information: 29 pages, 5 figures + 1 supplemental figure.

Word and character counts: abstract = 239 words; word count for the text = 4024.

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assembly and budding was reported to take place at the plasma membrane (PM) and/or late endosomal / multivesicular compartments (LE/MVB) depending on the cell-type. Our investigation of cellular host factors influencing HIV-1 Gag trafficking led to the finding that human leukocyte antigen (HLA)-DR (HLA-DR) expression promoted Gag and mature particle accumulation into LE/MVB in HeLa and HEK 293T cells (A. Finzi, A. Brunet, Y. Xiao, J. Thibodeau, and E. A. Cohen, *Journal of Virology* 80:9789-9797, 2006). However, HLA-DR could induce this relocation either by increasing Gag internalization from PM or via a direct targeting of Gag to LE/MVB. To distinguish between these two possibilities, we used a recently developed subcellular fractionation method that separates PM from LE/MVB (A. Finzi, A. Orthwein, J. Mercier and E.A. Cohen, *in press*). By combining this method to pulse-chase and immunoprecipitation analysis we were able to follow Gag trafficking in provirus-transfected HEK 293T cells in presence and absence of HLA-DR. Our results indicate that HLA-DR promotes internalization of PM-targeted Gag in a cholesterol-dependent manner. Furthermore, fluorescence microscopy analysis revealed that expression of a transdominant mutant form of dynamin, known to block clathrin and caveolae-dependent endocytosis, decreased Gag accumulation into LE/MVB upon HLA-DR expression. Finally, this process was modulated by the viral envelope and required a functional Gag late-budding domain. Altogether, these results indicate that HLA-DR molecules induce HIV-1 accumulation into LE/MVB by enhancing Gag internalization from the PM.

INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus (HIV-1) Pr55^{gag} polyprotein is the major virion structural protein and its expression alone is sufficient to generate virus-like particles (Gottlinger 2001). Pr55^{gag} is constituted of four functional domains: the N-terminal myristoylated matrix (MA or p17) that promotes membrane binding, capsid (CA or p24) and nucleocapsid (NC or p7) which drive multimerization and packaging of the viral genome and p6. The p6 domain recruits several components of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), involved in the biogenesis of multivesicular bodies (MVB), which are essential for efficient scission of viral particles from cellular membranes (Strack, Calistri et al. 2003; von Schwedler, Stuchell et al. 2003; Morita and Sundquist 2004).

HIV-1 has been recently reported to assemble and bud either at the plasma membrane (PM) or in late endosomal (LE)/MVB compartments in a cell-type dependent manner. However, the itinerary that newly synthesized Gag follows before reaching its cell surface or LE/MVB location remains controversial. Indeed, Gag was proposed to be first inserted into late endosomal membranes and either retained or transported further to the PM, depending on the trafficking properties of these compartments (Raposo, Moore et al. 2002; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Alternatively, we (Finzi et al., 2007) and others (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006) have recently proposed a model where newly synthesized Gag is first targeted to the PM where viral assembly and release occur. Subsequently, non-released Gag products are internalized towards LE-MVB. In this model, mechanisms of PM internalization would control the site of viral accumulation in a cell-type dependent manner as recently shown with primary macrophages, where Gag accumulation within intracellular compartments depended on

phagocytosis (Jouvenet, Neil et al. 2006). However, the cell-type dependent targeting of HIV-1 could also be regulated by host cell factors. For example, phosphatidylinositol(4,5) biphosphate ($PI(4,5)P_2$), a member of the phosphoinositide family of lipids concentrated primarily on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane (Simonsen, Wurmser et al. 2001; Ono, Ablan et al. 2004) was found to regulate HIV-1 Gag targeting to the PM; whereas AP-3, a complex involved in the trafficking of lysosomal membrane proteins, including CD63 (Dell'Angelica, Shotelersuk et al. 1999; Rous, Reaves et al. 2002), was reported to be important for Gag accumulation within LE/MVB (Dong, Li et al. 2005).

Our investigation of cellular host factors influencing HIV-1 Gag trafficking and assembly led to the finding that human leukocyte antigen (HLA)-DR (HLA-DR) expression induced Gag and mature particle accumulation into LE/MVB in HeLa and HEK 293T cells and resulted in decreased viral release, in a process that strictly relied on their cytoplasmic tails (Finzi, Brunet et al. 2006). In this report we investigated the role of endocytosis in HLA-DR induced Gag relocalization. Our results suggest that HLA-DR molecules induce HIV-1 accumulation into LE/MVB by enhancing Gag internalization from the PM.

MATERIALS AND METHODS

Cells, transfections and plasmids.

HEK 293T cells were maintained as described (Levesque, Zhao et al. 2003). The HIV-1 molecular clone HxBc2 (Lavalley and Cohen 1993) and its Env-counterpart, containing a stop codon at the initiation site of the *env* gene and a frameshift at the *KpnI* site in *env* (Yao, Gottlinger et al. 1992), have been previously described. Proviruses with a deletion in MA (Δ 16-18) (Dorfman, Mammano et al. 1994), with mutations in the PTAP late motif of Gag (Huang, Orenstein et al. 1995), encoding substitutions in the NC (pNLHX15A, kindly provided by Dr E.O. Freed, NCI, Maryland, USA) (Cimarelli, Sandin et al. 2000; Ono, Waheed et al. 2005) or envelope (pSVIIIenv) (Gabuzda, Lever et al. 1992) and HLA-DR (pBud-DR) expressors (Finzi, Brunet et al. 2006) were previously described. The transdominant negative form of dynamin (K44A) was kindly provided by Dr JP. Gratton (IRCM, Montreal, Canada). Calcium phosphate transfections were performed on 2×10^6 HEK 293T cells as described (Finzi, Brunet et al. 2006).

Pulse-labeling and viral release.

Experiments were done 48 h post-transfection. Pulse-chase experiments were performed as follow: transfectants were metabolically labeled with 1mCi/mL [³⁵S] methionine-cysteine ([³⁵S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) in DMEM lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed FBS for 10 min (or 30 min when assessing viral release in presence or absence of dynamine) and chased for different time intervals in DMEM containing excess of unlabelled methionine and cysteine. When indicated, chlorpromazine (10 μ g/ml), filipin (4 μ g/ml) or M β CD, (8 mM) were added during the starving period (30 min) and maintained throughout the chase. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Subcellular fractionation, immunoprecipitation and viral release.

The subcellular fractionation method was previously described (Finzi et al., 2007). Briefly, 5 millions HEK 293T cells were harvested in 250 μ l of homogenization buffer (0.25 M sucrose, 78 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 8.4 mM $CaCl_2$, 10 mM EGTA, 50 mM Hepes-NaOH pH 7.0, containing a cocktail of protease inhibitors, Roche, Mississauga, ON, Canada) and lysed during 60 sec using a pellet pestle with a cordless motor (Kontes, Vineland, NJ, USA). Homogenates were centrifuged at 1000 g for 5 min to pellet nuclei and any cell debris. The post-nuclear supernatant was placed on a 5-20% linear Optiprep gradient following manufacturer instructions (Application sheet S23, Axis-Shield, Norton, MA, USA) and spun at 150 000 g at 4 °C for 20 h using a SW41 ultracentrifuge rotor (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Fourteen fractions (800 μ l) were collected from the top of the gradient and lysed with 200 μ l of 5X RIPA.DOC (700 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 5% NP40, 2.5% sodium deoxycholate, 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)) containing a cocktail of protease inhibitors.

Analysis of released viral particles was performed as described (Finzi et al., 2007). Immunoprecipitations for fractions, cell and viral lysates were performed as follows: samples were pre-cleared with mouse serum for 2 h at 4°C before being immunoprecipitated for 3 h at 4°C with a monoclonal anti-p24 Ab. Immunocomplexes were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by autoradiography. Quantitation of radioactive Gag-related bands was performed using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0.

Antibodies and immunostaining.

The following antibodies were used: L243 (IgG_{2a}), a mouse monoclonal antibody that binds a specific HLA-DR α conformational determinant dependent on the correct conformation of the alpha/beta heterodimer (Panina-Bordignon, Fu et al. 1992); the anti-p24 (catalog no. HB-9725) monoclonal

Ab was isolated from supernatants of cultured hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA); the rabbit anti-p24 polyclonal antibody was obtained through the NIH AIDS Reference and Reagent Program (catalog no. 4250). Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG and Alexa594-conjugated anti-mouse IgG were obtained from Molecular Probes (Burlington, ON, Canada). Immunostaining was performed as described (Finzi, Brunet et al. 2006) and samples were examined by conventional epifluorescence micrographs on a Zeiss Cell Observer system (Zeiss, Toronto, ON, Canada) equipped with an Axiovert 200 M microscope using the 100X oil lens. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 4.1 software using the Nearest Neighbor deconvolution method.

Statistics.

Comparison between groups was performed by using Students's *t* test using Sigmaplot 6.0. The data were expressed as means +/- SD. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.

RESULTS

HLA-DR induced Gag relocalization is decreased by inhibiting endocytosis.

We recently reported that HLA-DR expression induced Gag and mature particle accumulation into LE/MVB in HeLa and HEK 293T cells and resulted in decreased viral release (Finzi, Brunet et al. 2006). However, HLA-DR could induce this Gag relocation either by increasing Gag internalization from the PM or via a direct targeting of Gag to LE/MVB. To distinguish between these two possibilities we thought to block PM internalization with a negative form of dynamin (K44A) that efficiently inhibits clathrin and caveolae-mediated endocytosis as evaluated by transferrin (Tfr) and cholera toxin β subunit (ChTx β) uptake (A.Finzi and E.A.Cohen, unpublished data). Importantly, the same transdominant mutant was recently reported to reduce Gag accumulation into intracellular compartments in HeLa cells (Neil, Eastman et al. 2006). Therefore, we evaluated the extent of Gag relocalization induced by HLA-DR in presence of K44A. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with an HLA-DR or empty vector in presence or absence of K44A and processed two days later for immunostaining and fluorescence microscopy with a polyclonal anti-p24 and a monoclonal anti-HLA-DR Abs. As recently reported (Finzi, Brunet et al. 2006), in the absence of HLA-DR, the majority of Gag was detected as a diffuse staining (Fig. 1 A a). In contrast, HLA-DR expression significantly increased Gag accumulation within large intracellular vesicles (Fig. 1 A b and B). Interestingly, these compartments were positive for HLA-DR (Fig. 1 A b, merge) and as recently reported, positive for LE/MVB markers (Finzi, Brunet et al. 2006). Interestingly, upon co-expression of HLA-DR together with the transdominant K44A mutant, cells often displayed Gag and HLA-DR accumulation at the PM (Fig. 1 A d), suggesting that endocytosis was required for intracellular accumulation of Gag in presence of HLA-DR.

We then quantified the extent of HLA-DR-induced Gag relocalization in presence and absence of K44A by counting cells presenting a diffuse versus

a punctuate Gag staining. We observed that in absence of HLA-DR 80 to 90% of cells presented a diffuse and PM Gag staining, independently of dynamin expression. In contrast, upon HLA-DR expression approximately 60% of cells presented Gag within intracellular compartments. Interestingly, K44A expression significantly reduced this number to 40% (Fig. 1 B).

To assess whether this partial relocation of Gag to the PM was sufficient to recover the defect of viral release imposed by HLA-DR, we transfected HEK 293T cells as described above and analyzed viral release by pulse-chase labeling and immunoprecipitation experiments. In transfected cell culture expressing HLA-DR, virus release was reduced as early as 1 h post-chase and maintained throughout the 24 hour-chase period, finishing by a two-to-three fold decrease (Fig. 1 C, E and (Finzi, Brunet et al. 2006)). However, in contrast to immunofluorescence analysis, K44A expression did not restore viral release in presence of HLA-DR (Fig. 1 D and F). Altogether, these results suggested that internalization through the PM was involved in HLA-DR induced Gag relocalization.

HLA-DR increases the internalization of mature Gag-products to LE/MVB compartments.

Having obtained evidence that HLA-DR promoted Gag internalization from the PM, we thought to evaluate directly the contribution of endocytosis on HLA-DR induced Gag relocalization. To this end, we used our recently described subcellular fractionation method that efficiently separates PM from LE/MVB. Importantly, this method is sensitive enough to detect, at steady-state, the accumulation of Gag within LE/MVB induced by HLA-DR (Finzi et al., 2007). However, steady-state analysis does not give any information about the route that Gag follows before reaching these intracellular compartments. Therefore, we coupled this fractionation method to pulse-chase and immunoprecipitation analysis in an effort to evaluate the trafficking of newly synthesized Gag in presence of HLA-DR. Briefly, HEK 293T cells were transfected with the HIV-1 HxBc2 provirus together with empty or HLA-DR

expressing vectors; 48 h later, cells were metabolically labeled with [³⁵S] methionine-cysteine for 10 min and chased for various times prior to cell lysis and subcellular fractionation by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 antibody. As recently described (Finzi et al., 2007), after 10 min of labeling (time 0 h), Gag and its cleavage products were primarily detected in PM-enriched fractions and to a lower extent in fractions enriched in LE/MVB markers (fractions 1-6 and 13-14, respectively) (Fig. 2 A).

Interestingly however, by 2 h of chase an important accumulation of mature Gag (p24) products into high density fractions was detected (Fig. 2 A). This was unlikely due to Pr55^{gag} processing in these fractions (compare Pr55^{gag} and p41^{gag} processing over time in fractions 13 and 14), but probably reflected internalization of mature and/or assembling viral particles from the PM towards LE/MVB. Interestingly, in HLA-DR expressing cells, which presented decreased viral release (Fig. 2 B), accumulation of mature Gag products in LE/MVB-enriched fractions was detected after only 30 min of chase. Indeed, quantification of the relative amount of mature Gag products in PM- and LE/MVB-associated fractions at this time point indicated that nearly 50% of this signal was LE/MVB-associated in presence of HLA-DR compared to only 25% in its absence (Fig. 2 C); thus suggesting that HLA-DR increases the rate of internalization of mature Gag products. To confirm that the accumulation of mature Gag products induced by HLA-DR was indeed due to an internalization process, we blocked cholesterol- and clathrin-dependent endocytosis and evaluated mature Gag distribution at PM- or LE/MVB-enriched fractions. Of note, experiments were performed after 30 min of chase since it was the earliest time point where the effect of HLA-DR was already detectable (Fig. 2 A).

To block clathrin-dependent endocytosis, we used chlorpromazine, a drug that prevents clathrin-coated pit formation at the PM (Wang, Rothberg et al. 1993). Even though chlorpromazine efficiently blocked Tfr uptake in our working conditions (Finzi et al., 2007), it did not affect the accumulation of

mature Gag products within LE/MVB-associated fractions induced by HLA-DR (Fig. 3 A compare a and b). Indeed, quantification of their relative amount detected within PM- and LE/MVB-enriched fractions remained identical to untreated cells (Fig. 3 B), suggesting that HLA-DR might promote mature Gag-products internalization through a clathrin-independent mechanism. We then blocked cholesterol-dependent endocytosis by using sterol-binding drugs such as filipin and methyl- β -cyclodextrin (M β CD). These drugs interfere with caveolae or raft-dependent endocytosis by sequestering (filipin) or depleting (M β CD) cholesterol, an essential component of caveolae and lipid rafts (Rothberg, Heuser et al. 1992; Neufeld, Cooney et al. 1996; Orlandi and Fishman 1998).

Importantly, we recently reported that in HEK 293T cells these drugs efficiently blocked ChTx β uptake, a known marker of caveolae-dependent endocytosis (Finzi et al., 2007). Interestingly, both drugs decreased mature Gag products internalization to LE/MVB-enriched fractions (Fig. 3 A, compare c and d to a). Indeed, mature Gag products accumulation in these fractions was significantly reduced from 50% to 10% in filipin-treated cells, as calculated by quantifying their relative amount within PM- and LE/MVB-associated fractions (Fig. 3 B). Although the effect of M β CD was less pronounced, passing from 50% to 35% (Fig. 3 B), it inhibited Gag internalization to the same extent than filipin after 2 h of chase (Supplemental Figure 1). Altogether, these results indicate that HLA-DR promotes mature Gag-products internalization towards LE/MVB by a cholesterol-dependent mechanism.

HLA-DR induced Gag relocation requires a functional Gag late-budding domain.

Retroviral Gag proteins encode L-domains which are small sequence motifs that facilitate viral egress by recruiting the class E vacuolar protein sorting (VPS) machinery required for the fission of virion and cellular membranes (Morita and Sundquist 2004). Mutation of these motifs results in

accumulation of immature viruses tethered to membranes and contrasts with the accumulation of fully mature virions induced by HLA-DR (Finzi, Brunet et al. 2006). Thus, given that endocytosis appeared to be necessary for HLA-DR-induced Gag relocalization (Fig. 1-3), the block induced by HLA-DR on viral release (Fig. 1 C and D) seems to occur subsequently to that imposed by an L-domain defect. This possibility was evaluated by co-transfecting HEK 293T cells with HxBc2 or its L-domain defective (PTAP-) counterpart, together with empty or HLA-DR vectors. Two days later, cells were lysed and analyzed for cellular Gag products by western blotting or alternatively processed for immunofluorescence using a polyclonal anti-p24 antibody. As recently described (Finzi, Brunet et al. 2006), HLA-DR expression modified the pattern of Gag-related products within cells, resulting in a clear accumulation of mature Gag products (p24) (Fig. 4 A, compare a and b). However, when fission of cellular and virion membranes was abolished by mutating the PTAP late motif, HLA-DR expression was unable to induce any accumulation of mature Gag products (p25 or p24) (Fig. 4 A, compare c and d). Accordingly, immunofluorescence analysis did not reveal any significant change in Gag localization upon HLA-DR expression for the PTAP defective provirus (Fig. 4 B). These results suggest that HLA-DR may selectively enhance endocytosis of fully mature viral particles from the PM, perhaps explaining the intracellular accumulation of mature and infectious virions induced by HLA-DR (Finzi, Brunet et al. 2006).

Env increases the effect of HLA-DR on HIV-1 Gag intracellular accumulation.

The viral envelope was reported to modulate the trafficking of HIV-1 Gag: the intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of virions when able to interact with the MA domain of Gag (Lodge, Gottlinger et al. 1994); in addition, Gag targeting to tetraspanin-enriched microdomains (TEMs), that were proposed to support viral egress at the PM, is enhanced by Env expression (Nydegger, Khurana et al. 2006). We therefore asked whether

Env expression was able to modulate the relocalization of Gag induced by HLA-DR. HEK 293T cells were co-transfected with HxBc2 or its Env-counterpart in presence and absence of HLA-DR. Cells were subsequently processed for immunofluorescence with a polyclonal anti-p24 Ab to quantify the extent of Gag relocalization. As already described, in the absence of HLA-DR only 10% of cells presented a punctuate Gag staining; HLA-DR expression significantly increased this number to 40% (Fig. 5 A). Interestingly, when Gag was expressed in absence of the viral envelope, the effect of HLA-DR was less pronounced but still significant with only 25% of cells presenting intracellular Gag (Fig. 5 A). To ensure that this decrease was due to the absence of Env, we co-expressed the viral envelope in *trans*. Remarkably, this was sufficient to recover the maximal relocalization of Gag to intracellular compartments (Fig. 5 A). To determine whether a specific interaction between Env and Gag proteins was required, we co-transfected HLA-DR together with a provirus that express Env but presents a deletion in a region of MA essential for Env incorporation (Dorfman, Mammano et al. 1994). Interestingly, the extent of Gag relocalization obtained with this mutant was comparable to the one obtained in absence of Env and scored not significant (Fig. 5 B), thus suggesting that the binding between MA and Env is essential for maximal retargeting induced by HLA-DR.

DISCUSSION

We recently reported that major histocompatibility class-II complex (MHC-II) expression in HEK 293T cells induced Gag and mature particle accumulation into LE/MVB and resulted in decreased viral release (Finzi, Brunet et al. 2006). However, the underlying mechanism was unknown: HLA-DR could induce this Gag relocation either by increasing Gag internalization from the PM or by promoting a direct targeting of Gag to LE/MVB. If the first possibility could hypothetically be supported by the fact that a significant pool of MHC-II traffic to LE/MVB by means of the cell surface (Dugast, Toussaint et al. 2005; McCormick, Martina et al. 2005), the second option is supported by the ability of HLA-DR to induce intracellular compartments, reminiscent of LE/MVB (Calafat, Nijenhuis et al. 1994), that might provide additional internal membranes for Gag assembly. Indeed, Gag was proposed to be first inserted into late endosomal membranes and either retained or transported further to the PM, depending on the trafficking properties of these compartments (Raposo, Moore et al. 2002; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Alternatively, we (Finzi et al., 2007) and others (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006) proposed that newly synthesized Gag is first targeted to the PM where viral assembly and release occur. Subsequently, non released-Gag products are internalized towards LE/MVB.

In this report we provide strong evidence indicating that HLA-DR enhances mature Gag-products internalization from the PM. First, the transdominant K44A dynamin mutant, an inhibitor of caveolae/raft- and clathrin-dependent endocytosis, significantly reduced the accumulation of Gag within LE/MVB upon HLA-DR expression (Fig. 1 A and B). In addition, our results suggest that HLA-DR may promote Gag and/or viral particles “trapping” at the PM since restoration of their localization at the PM did not

result in a concomitant increase of viral release (Fig. 1 C and D). These results are in agreement with a recent report that showed an impairment of intracellular accumulation of Gag in presence of K44A but not a restoration of viral release (Neil, Eastman et al. 2006).

To confirm that PM internalization was involved in HLA-DR induced Gag relocation, we used a recently described subcellular fractionation gradient that separates PM from LE/MVB (Finzi et al., 2007). By combining this method to pulse-chase and immunoprecipitation analysis, we observed that HLA-DR induced mature Gag products accumulation within LE/MVB-enriched fractions as early as 30 min post-chase (Fig. 2). Importantly, and in agreement with previous findings indicating that Gag accumulation within LE/MVB in HIV-1 producing HEK 293T cells was cholesterol-dependent (Finzi et al., 2007), we observed that this process was decreased by sequestering or depleting cell surface cholesterol (Fig. 3). The used drugs, filipin and M β CD, are known to specifically inhibit endocytosis through caveolae/lipids rafts (Sieczkarski and Whittaker 2002), thus raising the possibility that HLA-DR enhanced Gag internalization through these microdomains, to which it was shown to be associated (Bouillon, El Fakhry et al. 2003; Setterblad, Roucard et al. 2003). However, these microdomains are also known to be important for Gag mobility, HIV-1 particle assembly, release and infectivity (Nguyen and Hildreth 2000; Lindwasser and Resh 2001; Ono and Freed 2001; Liao, Graham et al. 2003; Gomez and Hope 2006). Therefore, we cannot entirely rule-out that the effect of sterol-binding drugs on Gag internalization may be indirect rather than direct, especially if the endosomal accumulation of Gag results from internalization of fully assembled virions tethered at the cell surface, as recently suggested by Neil and coworkers (32).

In contrast to sterol-binding drugs, chlorpromazine, a drug known to affect clathrin-mediated endocytosis, did not have any effect on Gag-products

internalization in presence of HLA-DR (Fig. 3). Altogether, these results suggest that HLA-DR accelerates the usual, sterol-dependent and chlorpromazine independent, mechanism used by Gag to reach LE/MVB in HEK 293T cells.

In addition, we show that intracellular Gag accumulation in presence of HLA-DR requires a functional Gag L-domain (Fig. 4). This is in agreement with recent reports that identified this motif as essential for Gag accumulation within mammalian class E compartments (von Schwedler, Stuchell et al. 2003), biochemically-enriched endosomes (Goff, Ehrlich et al. 2003) and late endosomal compartments in absence of Vpu (Neil, Eastman et al. 2006). This result raises the possibility that either fission between viral and cellular membranes or recruitment of class E VPS factors is necessary for Gag relocation by HLA-DR. However, we favor the first hypothesis since HLA-DR could not affect the localization of a Gag mutant that preserves a functional L-domain but cannot multimerize, due to mutations of all its NC basic amino acids critical for Gag-Gag interactions (Cimarelli, Sandin et al. 2000) (A. Finzi and EA Cohen, unpublished data).

Finally, we show here that Env expression is necessary to obtain the maximal effect of HLA-DR on Gag relocation (Fig. 5 A), probably due to a direct binding between these viral molecules (Fig. 5 B). However, the mechanism by which HLA-DR molecules target viral particles for internalization remains uncertain. The simplest explanation is that HLA-DR may interact with structural components of the viral particles. However, this seems unlikely; the mechanism does not appear to involve an interaction between Env and HLA-DR since the effect is still observed, albeit to a lesser extent, with proviral constructs lacking Env (Fig. 5 A). In addition, we were unable to detect any specific interaction between Gag and HLA-DR in co-immunoprecipitation experiments (A. Finzi and E.A. Cohen, unpublished data). Alternatively, and as described above, HLA-DR may need to reach specific microdomains at the PM that support viral assembly, such as lipids rafts, to

induce Gag internalization. Finally, it is also possible that HLA-DR molecules modulate the expression and/or activity of cellular proteins with adhesive properties that would attach virions at the cells surface and induce their internalization. Studies aimed at defining HLA-DR determinants that govern MHC-II –mediated Gag internalization are currently in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

The polyclonal anti-p24 Ab and IVS was obtained through the NIH AIDS Research Reference and Reagent Program. Transdominant dynamin K44A expressor and provirus coding for defective multimerization Gag molecules were kindly provided by Dr JP. Gratton (IRCM, Montreal, Canada) and Dr E.O. Freed (NCI, Maryland, USA), respectively. AF is recipient of a studentship from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) training program in cancer research. EAC is recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from CIHR to EAC.

REFERENCES

- Bouillon, M., Y. El Fakhry, et al. (2003). "Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules." J Biol Chem **278**(9): 7099-107.
- Calafat, J., M. Nijenhuis, et al. (1994). "Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures." J Cell Biol **126**(4): 967-77.
- Cimarelli, A., S. Sandin, et al. (2000). "Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA." J Virol **74**(7): 3046-57.
- Dell'Angelica, E. C., V. Shotelersuk, et al. (1999). "Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor." Mol Cell **3**(1): 11-21.
- Dong, X., H. Li, et al. (2005). "AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly." Cell **120**(5): 663-74.
- Dorfman, T., F. Mammano, et al. (1994). "Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein." J Virol **68**(3): 1689-96.
- Dugast, M., H. Toussaint, et al. (2005). "AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes." J Biol Chem **280**(20): 19656-64.
- Finzi, A., A. Brunet, et al. (2006). "Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments." J Virol **80**(19): 9789-97.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, et al. (1992). "Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins." J Virol **66**(6): 3306-15.

- Goff, A., L. S. Ehrlich, et al. (2003). "Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release." J Virol **77**(17): 9173-82.
- Gomez, C. Y. and T. J. Hope (2006). "Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells." J Virol **80**(17): 8796-806.
- Gottlinger, H. G. (2001). "The HIV-1 assembly machine." Aids **15 Suppl 5**: S13-20.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (1991). "Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3195-9.
- Grigorov, B., F. Arcanger, et al. (2006). "Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines." J Mol Biol **359**(4): 848-62.
- Harila, K., I. Prior, et al. (2006). "Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag." J Virol **80**(8): 3765-72.
- Huang, M., J.M. Orenstein, et al (1995). "p6 Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease." J Virol **69**:6810-18.
- Jouvenet, N., S. J. Neil, et al. (2006). "Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly." PLoS Biol **4**(12): e435.
- Lavallee, C. and E. A. Cohen (1993). "HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids." J Acquir Immune Defic Syndr **6**(5): 529-30.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (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**(30): 28346-53.
- Liao, Z., D. R. Graham, et al. (2003). "Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells." AIDS Res Hum Retroviruses **19**(8): 675-87.

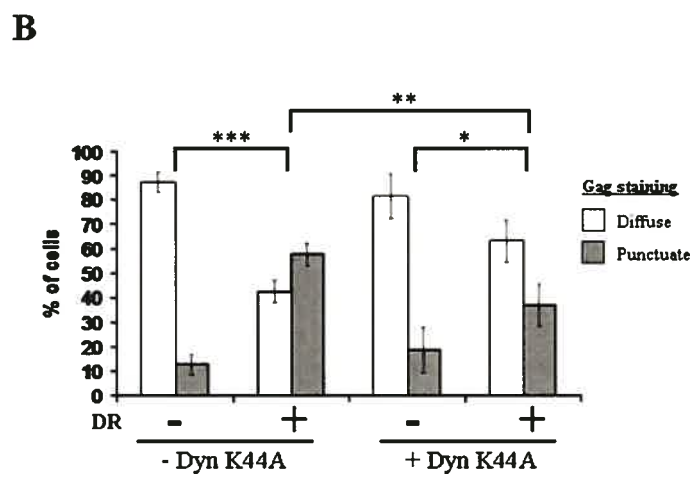
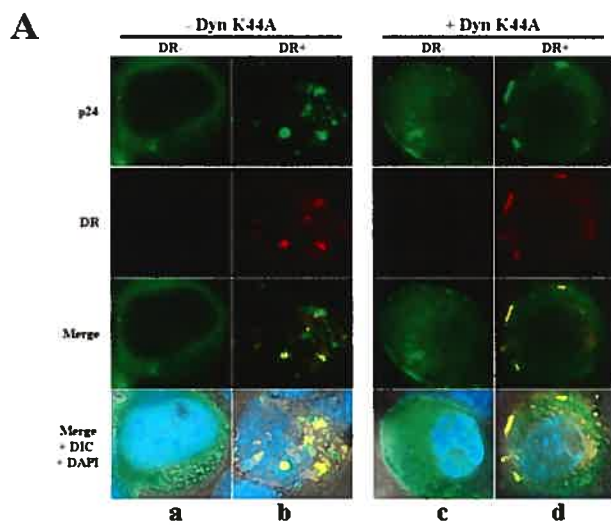
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2001). "Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains." J Virol **75**(17): 7913-24.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies." J Virol **78**(11): 6013-23.
- Lodge, R., H. Gottlinger, et al. (1994). "The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells." J Virol **68**(8): 4857-61.
- McCormick, P. J., J. A. Martina, et al. (2005). "Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7910-5.
- Morita, E. and W. I. Sundquist (2004). "Retrovirus budding." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 395-425.
- Neil, S. J., S. W. Eastman, et al. (2006). "HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane." PLoS Pathog **2**(5): e39.
- Neufeld, E. B., A. M. Cooney, et al. (1996). "Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin." J Biol Chem **271**(35): 21604-13.
- 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**(7): 3264-72.
- Nydegger, S., S. Khurana, et al. (2006). "Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1." J Cell Biol **173**(5): 795-807.
- Ono, A., S. D. Ablan, et al. (2004). "Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14889-94.

- 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**(24): 13925-30.
- 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**(3): 1552-63.
- Ono, A., A. A. Waheed, et al. (2005). "Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay." J Virol **79**(22): 14131-40.
- Orlandi, P. A. and P. H. Fishman (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." J Cell Biol **141**(4): 905-15.
- Panina-Bordignon, P., X. T. Fu, et al. (1992). "Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen." J Exp Med **176**(6): 1779-84.
- Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, et al. (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." J Cell Biol **162**(3): 443-55.
- Perlman, M. and M. D. Resh (2006). "Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag." Traffic **7**(6): 731-45.
- Raposo, G., M. Moore, et al. (2002). "Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments." Traffic **3**(10): 718-29.
- Resh, M. D. (2005). "Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles." AIDS Rev **7**(2): 84-91.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-82.

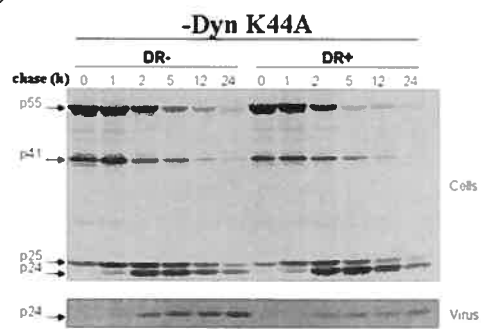
- Rous, B. A., B. J. Reaves, et al. (2002). "Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes." Mol Biol Cell **13**(3): 1071-82.
- Rudner, L., S. Nydegger, et al. (2005). "Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling." J Virol **79**(7): 4055-65.
- Setterblad, N., C. Roucard, et al. (2003). "Composition of MHC class II-enriched lipid microdomains is modified during maturation of primary dendritic cells." J Leukoc Biol **74**(1): 40-8.
- Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." Traffic **4**(11): 785-801.
- Sieczkarski, S. B. and G. R. Whittaker (2002). "Dissecting virus entry via endocytosis." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1535-45.
- Simonsen, A., A. E. Wurmser, et al. (2001). "The role of phosphoinositides in membrane transport." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 485-92.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2003). "AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding." Cell **114**(6): 689-99.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, et al. (2003). "The protein network of HIV budding." Cell **114**(6): 701-13.
- Wang, L. H., K. G. Rothberg, et al. (1993). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." J Cell Biol **123**(5): 1107-17.
- Yao, X. J., H. Gottlinger, et al. (1992). "Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export." J Virol **66**(8): 5119-26.

FIGURE LEGENDS

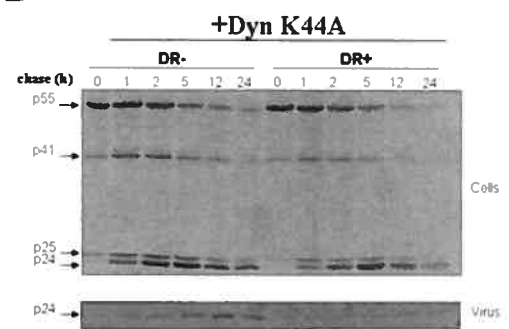
Fig. 1. Effect of endocytosis inhibition on HLA-DR mediated Gag relocation and viral release. HEK 293T cells were mock- or co-transfected with plasmids encoding HLA-DR together with the HxBc2 provirus in absence or presence of K44A. Two days later, cells were analyzed by immunofluorescence microscopy using a polyclonal anti-p24 and the monoclonal L243 anti-HLA-DR Abs (A). In the absence of HLA-DR (a), Gag displays a diffuse staining whereas HLA-DR expression redirects Gag to large intracytoplasmic vesicles (punctuate staining) where it co-localizes with HLA-DR (b). K44A expression induces accumulation of Gag at the PM (c) even in the presence of HLA-DR (d). (B) Quantification of Gag-associated patterns. The number of cells displaying a diffuse versus a punctuate Gag staining was evaluated in 200 cells per sample. Data shown represents the average of 5 independent experiments \pm SD. Alternatively, cells were metabolically labeled with 35 S]Met/Cys for 30 min, and Gag-associated products in cell and virion lysates were immunoprecipitated with a monoclonal anti-p24 Ab at different chase intervals in absence (C) or presence of K44A (D). (E and F) Quantification of data presented in panels C and D respectively. Data represent the average \pm SD of three independent experiments. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ by using Student's *t* test. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.



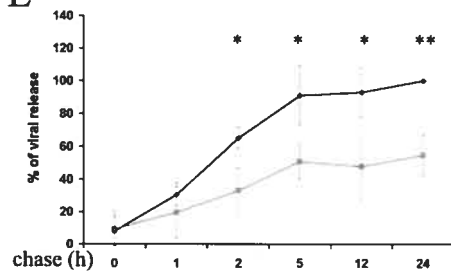
C



D



E



F

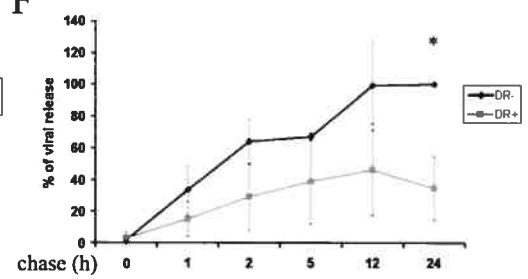


Fig. 2. HLA-DR increases the internalization of mature Gag products from the PM towards LE/MVB. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with empty (DR-) or HLA-DR (DR+) vectors. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for various times prior to cell lysis and subcellular fractionation by optiprep gradient centrifugation as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab (A). Released viruses during the pulse-chase analysis were pelleted, lysed and immunoprecipitated as for panel A (B). (C) Quantification of the relative amount of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- and LE/MVB-associated fractions (1-6 and 13-14, respectively) after 30 min of chase. Data from seven independent experiments were quantified using a PhosphorImager equipped with an ImageQuant software 5.0 and are shown as means ± SD. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ by using Student's *t* test. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.

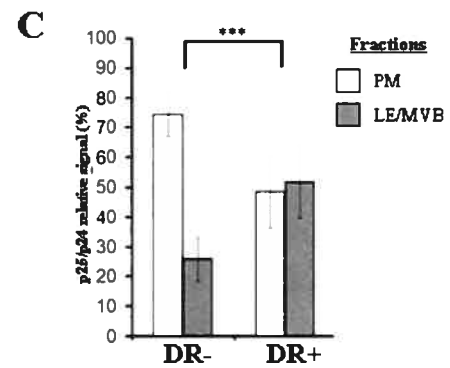
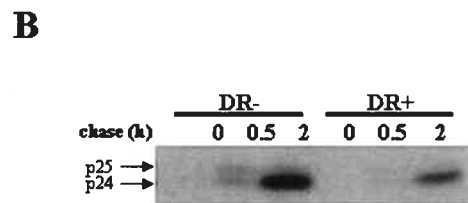
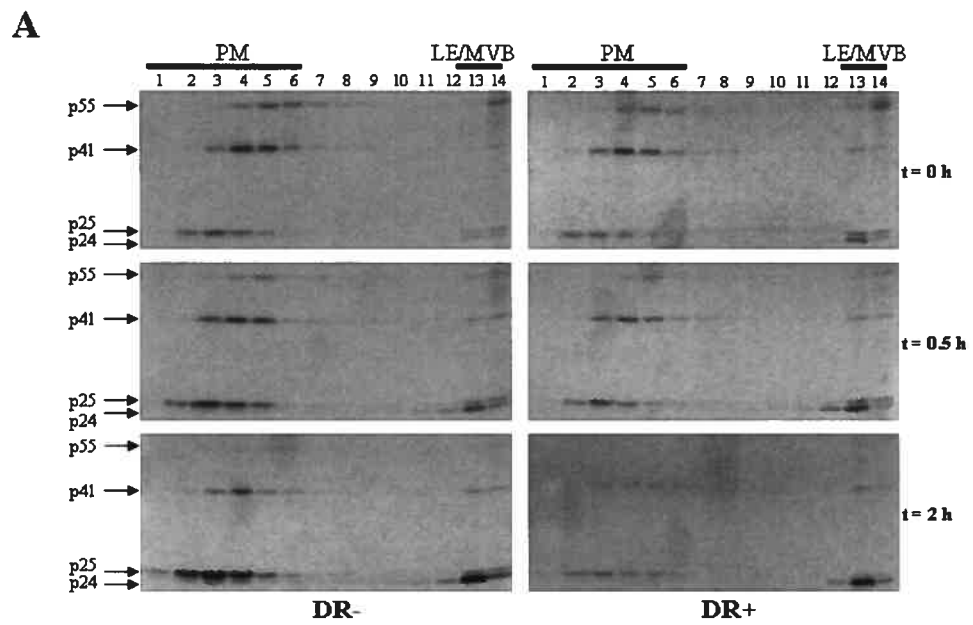


Fig. 3. Effect of cholesterol-binding drugs and chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, on HLA-DR enhanced Gag internalization. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with HLA-DR. (A) Two days later, cells were mock- (a) or pre-treated with (b) chlorpromazine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (c) filipin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and (d) M β CD (8 mM) for 30 min before metabolically labeling with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 30 min in presence of the drugs. Subsequently, cells were mechanically lysed and fractionated by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. (B) Quantification of the relative amount of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- and LE/MVB-associated fractions (1-6 and 13-14, respectively). Data shown are means \pm SD of 7 (mock), 2 (chlorpromazine), 2 (filipin) and 3 (M β CD) independent experiments. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ by using Student's *t* test. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.

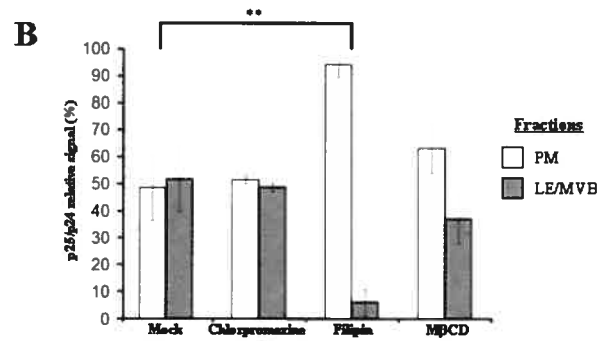
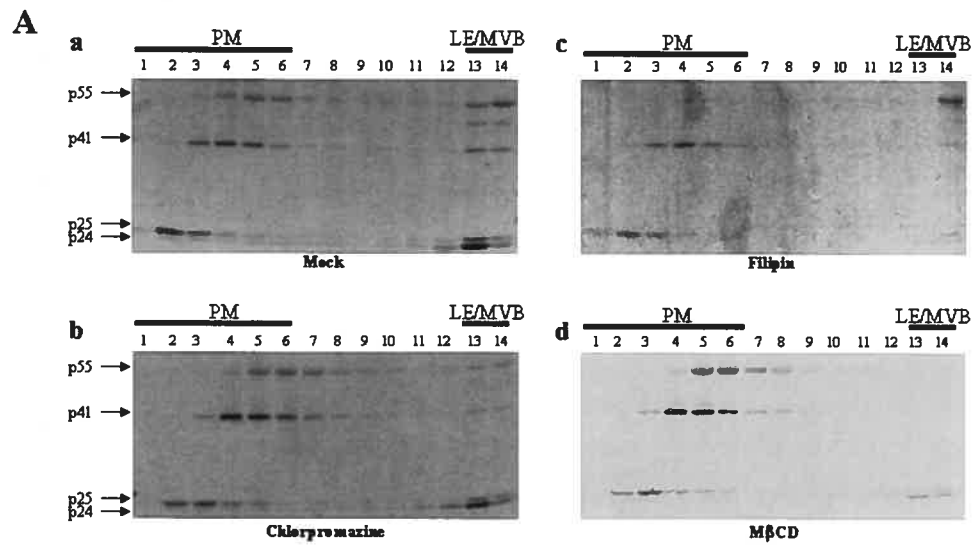
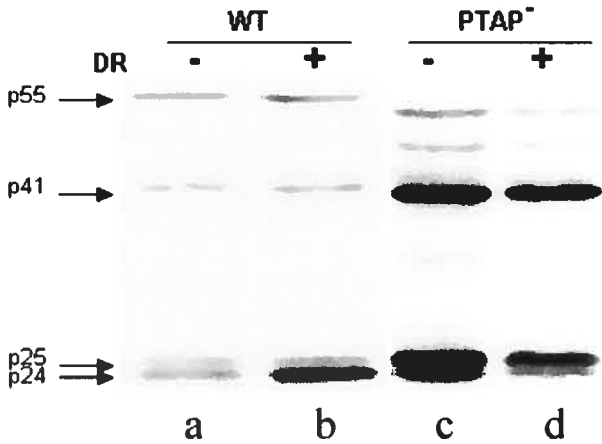


Fig. 4. Gag relocation induced by HLA-DR requires a functional Gag L-domain. HEK 293T cells were transfected with HxBc2 (WT) or a variant lacking a functional PTAP motif, together with HLA-DR (DR+) or empty vector (DR-). (A) Gag-related products were analyzed by western blotting 48 h post-transfection using a monoclonal anti-p24 Ab. Data is representative of three independent experiments. Alternatively, cells were processed for immunostaining and fluorescence microscopy using a rabbit polyclonal anti-p24 antibody (B). Diffuse or punctuate Gag-associated-staining patterns were quantified in two hundred cells per sample. Data are shown as means \pm SD of three independent experiments. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, ns = $P \geq 0.05$ by using Student's *t* test. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.

A



B

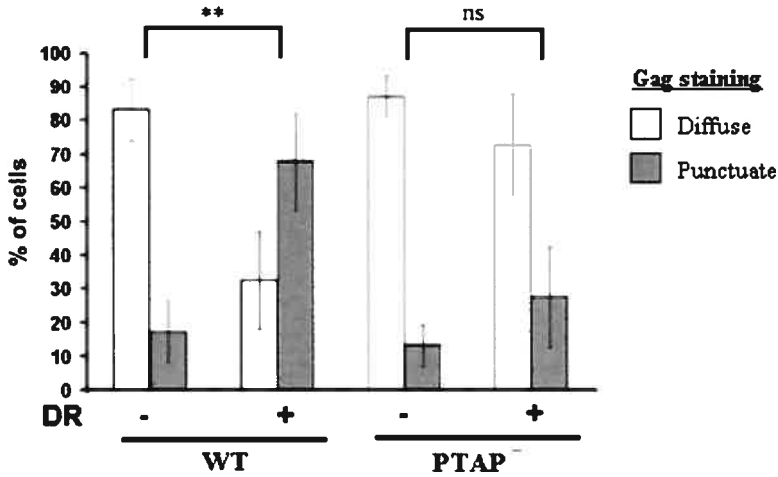


Fig. 5. The viral envelope modulates the effect of HLA-DR on Gag relocation. HEK 293T cells were co-transfected with the proviral construct HxBc2 Env⁺ or Env⁻, together with HLA-DR (DR⁺) or empty vector (DR⁻) in absence or presence of an Env expressor. Cells were processed for immunostaining and fluorescence microscopy using a rabbit polyclonal anti-p24 antibody (A). Alternatively, cells were co-transfected with a provirus that presents a deletion in a region of MA essential for Env incorporation (MA Δ 16-18). Cells were processed as described above (B). Data shown is presented as means \pm SD of at least two independent experiments. Diffuse or punctuate Gag-associated-staining patterns was quantified in two hundred cells per sample. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, ns = $P \geq 0.05$ by using Student's *t* test. *P* values ≥ 0.05 were considered to be not significant.

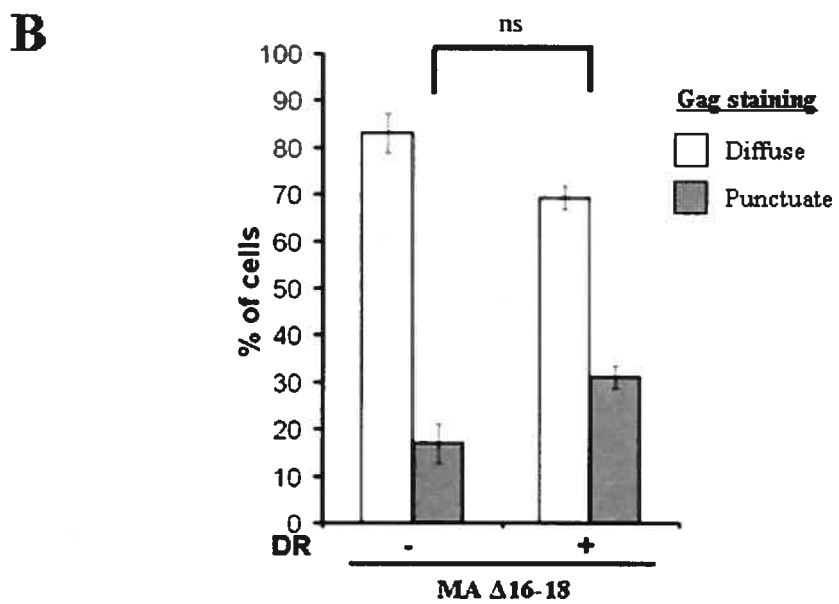
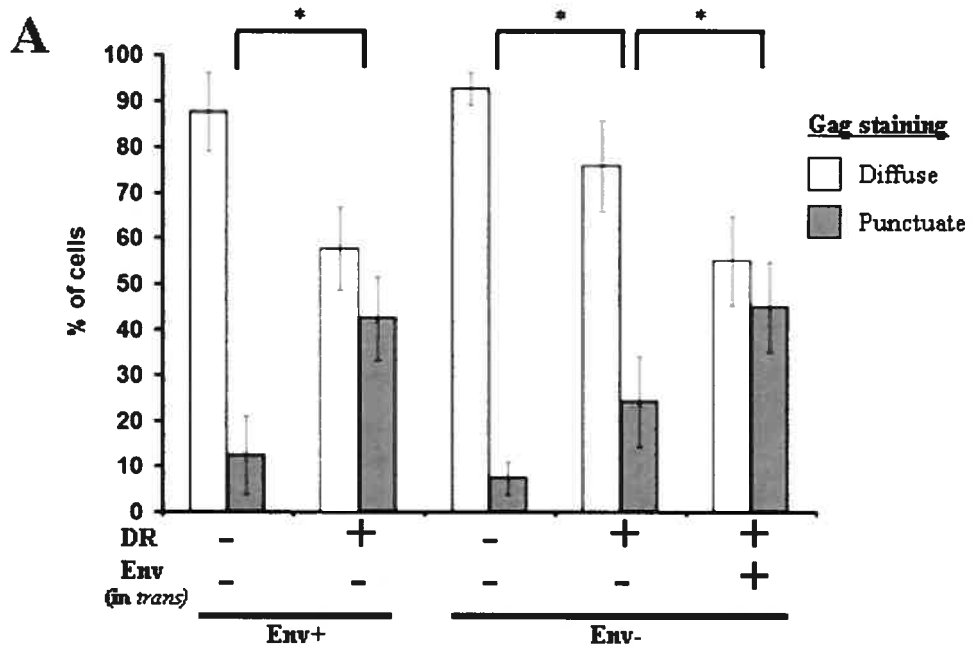
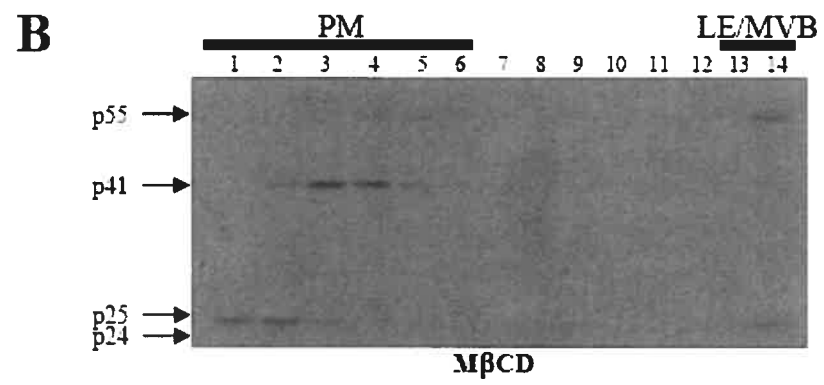
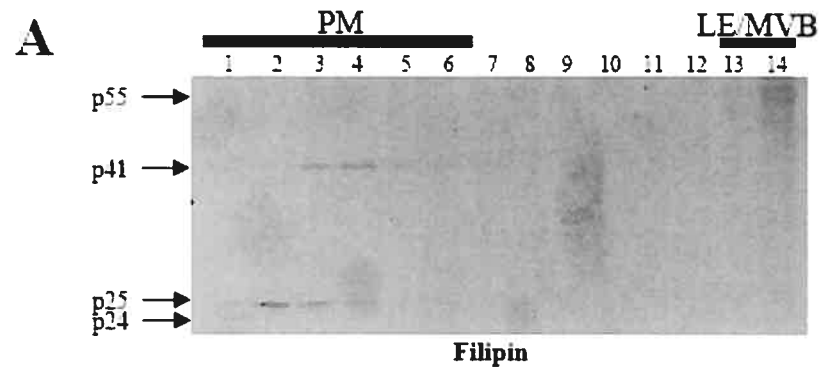


Fig. S1. Effect of cholesterol-binding drugs on HLA-DR enhanced Gag internalization. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with HLA-DR. Two days after transfection cells were pre-treated with (A) filipin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or (B) M β CD (8 mM) for 30 min before metabolically labeling with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in presence of the drugs. Subsequently, cells were mechanically lysed and fractionated by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. (C) Quantification of the relative amount of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- and LE/MVB-associated fractions (1-6 and 13-14, respectively).



CHAPITRE 5:
DISCUSSION

Objectifs de départ

Les travaux qui ont permis d'élaborer cette thèse avaient comme objectifs de départ l'étude du trafic intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1 ainsi que l'identification de protéines cellulaires capables de le moduler. Cette section vise à mettre en perspective les résultats présentés dans les chapitres 2, 3 et 4 ainsi que certaines données non publiées (présentées dans le chapitre 10), tout en tenant compte des plus récentes données décrites dans la littérature.

Trafic intracellulaire de Gag

Les voies intracellulaires empruntées par la protéine Gag du VIH-1 afin de se rendre à la MP ou dans les CMVs demeurent un sujet très controversé. Ainsi, plusieurs études ont suggéré que les CMVs représentent des intermédiaires précoces où Gag est ciblé avant d'être relâché à la MP (Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005; Resh 2005; Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Par contre, d'autres études supportent un modèle où l'assemblage de Gag se produirait principalement à la MP; l'accumulation de Gag et des particules virales dans les CMVs serait le résultat de leur internalisation à partir de la surface cellulaire (Rudner, Nydegger et al. 2005; Harila, Prior et al. 2006; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006). La différence entre ces deux modèles pourrait être expliquée, du moins en partie, par le fait que la plupart d'entre eux ont évalué la localisation de Gag, par microscopie à fluorescence ou électronique, à l'équilibre (Raposo, Moore et al. 2002; Nydegger, Foti et al. 2003; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong, Li et al. 2005). Toutefois, l'observation de Gag à la MP ou dans les CMVs ne

signifie pas nécessairement que le précurseur ait été ciblé directement dans ces endroits. En fait, ces études n'apportent aucune donnée sur le trajet que Gag doit entreprendre afin d'y arriver. Par ailleurs, plusieurs de ces études ont analysé la localisation, ou le trafic de Gag, à l'aide de constructions qui ne nécessitent pas la protéine Rev pour exporter leur ARNm (Nydegger, Foti et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Dong, Li et al. 2005; Rudner, Nydegger et al. 2005; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Toutefois, il faut être très prudent lorsqu'on travaille avec ces constructions car il a été clairement montré que la voie d'export des ARNm viraux peut modifier le trafic de Gag. Ainsi, l'introduction de mutations au niveau de l'ARNm de Gag, qui ne modifient pas sa séquence en acides aminés, mais qui modifient la voie d'export de son ARNm passant de Rev- à CTE-dépendante, affectent sa localisation intracellulaire (Beriault, Clement et al. 2004; Swanson, Puffer et al. 2004). D'autres études ont fusionné Gag à des protéines (EGFP, ECFP) ou des séquences (« tetracysteine tag ») qui permettent de la rendre fluorescente afin de faciliter sa détection par microscopie à fluorescence (Nydegger, Foti et al. 2003; Sherer, Lehmann et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Dong, Li et al. 2005; Rudner, Nydegger et al. 2005; Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Toutefois, il faut encore une fois être vigilant avec des telles constructions car il a été montré que la localisation et le trafic de Gag peuvent être grandement modifiés par l'ajout de fusions en position C-terminale. Par exemple, il a été rapporté que le simple fait de changer la longueur d'un peptide de fusion faisant le lien entre Gag et une séquence tetracystéine fusionnée en C-terminal entraîne un changement de localisation de la MP vers des compartiments intracellulaires (Rudner, Nydegger et al. 2005). En outre, il a été montré que la fusion de la protéine HA d'influenza en C-terminal de Gag empêche l'internalisation de la protéine fusionnée (Harila, Prior et al. 2006).

Afin d'éviter les inconvénients décrits ci-dessus, nous avons développé un fractionnement cellulaire afin d'évaluer le trafic intracellulaire de la protéine Gag (de type sauvage) dans un contexte qui se rapproche davantage de l'infection, c'est-à-dire exprimée à partir d'un provirus. Ainsi, non seulement la voie d'export des ARNm viraux est préservée mais en plus la maturation du précurseur Pr55^{Gag} peut être observée de manière simultanée; ceci donne l'avantage d'évaluer le trafic des différents produits de clivage de Gag (p41, p25, p24) en plus du précurseur Pr55^{Gag}. De plus, le fait que cette technique nécessite une population complète de cellules exprimant le VIH-1 confère le potentiel d'apercevoir des changements mineurs dans le trafic intracellulaire de Gag; ce type de changements risque de passer inaperçu lors d'une étude par microscopie à fluorescence où les cellules sont analysées individuellement.

Nous avons montré au chapitre 2 que le fractionnement cellulaire que nous avons développé sépare efficacement la MP des CMVs (Figure 1, chapitre 2). Nous avons combiné ce gradient à un court marquage métabolique et des immunoprécipitations afin d'étudier le trafic de la protéine Gag nouvellement synthétisée (Figure 4, chapitre 2). Nous avons choisi les cellules HEK 293T pour réaliser nos expériences parce qu'elles supportent l'accumulation de Gag à la MP ainsi que dans les CMVs; mais aussi pour des raisons techniques. En effet, ces cellules sont faciles à manipuler et représentent un système de surexpression qui permet la détection de Gag lors des très courts marquages métaboliques (10 min). Par ailleurs, ces cellules ont servi de modèle cellulaire à plusieurs études ayant proposé que les CMVs représentaient un intermédiaire d'assemblage.

Les résultats obtenus dans ce système appuient le deuxième modèle de trafic de Gag présenté ci-dessus. En effet, dans les temps précoces Gag est observé majoritairement à la MP; le peu de Gag retrouvé dans les CMVs après 10 minutes de marquage (temps 0 h) résulterait d'une internalisation très rapide

(voir plus bas). La présence de Gag à la MP diminue graduellement avec le temps et concorde avec la relâche de virus matures dans le milieu extracellulaire (Figure 4, chapitre 2). Par contre, dans les fractions enrichies en CMVs l'accumulation de Gag ne devient évidente qu'après 2 h de chase, ce qui écarte la possibilité d'un ciblage rapide et direct de Gag vers les CMVs. En ce sens, nous avons observé que Gag s'accumule toujours de façon prédominante à la MP dans des conditions où le réseau de microtubules, important pour la mobilité des CMVs, est dépolymérisé (Figure 5, Chapitre 2). Par ailleurs, pendant toute la durée de l'étude (5 h) les produits de Gag internalisés ne font que s'accumuler dans les CMVs; nous n'avons pas été capables de visualiser un mouvement de ces compartiments vers la MP. Ces données suggèrent que les CMVs ne contribuent pas à la relâche de particules virales dans le milieu extracellulaire et sont en accord avec celles d'une nouvelle étude qui a montré que des inhibiteurs qui bloquent la mobilité des endosomes tardifs n'affectent aucunement la relâche virale ni la localisation de Gag à la MP (Jouvenet, Neil et al. 2006). Toutefois, nos données n'excluent pas que ces compartiments soient capables de se rendre à la MP dans des conditions particulières. Par exemple, il a été montré que l'augmentation du flux de calcium intracellulaire, connu pour augmenter la fusion des compartiments endosomaux, augmente la relâche virale (Grigorov, Arcanger et al. 2006; Perlman and Resh 2006). Des études supplémentaires seront requises pour déterminer si les particules virales s'accumulant dans les CMVs peuvent contribuer, dans certaines conditions, à la relâche virale dans le milieu extracellulaire, ou si elles sont ultimement destinées à être dégradées dans des compartiments lysosomaux.

Afin de confirmer le rôle de l'internalisation dans l'accumulation de Gag dans les CMVs, nous avons voulu utiliser des inhibiteurs spécifiques de l'endocytose clathrine- et cavéoline-dépendante. Le transdominant négatif (TDN) de la dynamine (K44A) et le Dynasore, une drogue qui bloque

spécifiquement la dynamine (Macia, Ehrlich et al. 2006), ont été utilisés afin de bloquer ces deux voies d'endocytose. Le TDN d'Eps15 ($\Delta 95-295$) ainsi que son ARN d'interférence ont été utilisés afin de bloquer spécifiquement l'internalisation clathrine-dépendante. Finalement, nous avons surexprimé la cavéoline-1 pour bloquer l'internalisation dépendante des cavéolines (Le, Guay et al. 2002). Toutefois, malgré ses nombreux avantages, la technique de séparation que nous avons développée possède aussi ses faiblesses. En effet, étant donné que cette approche sépare la MP des CMVs en fonction de leur densité respective, tout changement de celle-ci a le potentiel de nuire à leur séparation. Malheureusement, les inhibiteurs décrits ci-dessus (Dyn K44A, Dynasore, Eps15 siRNA, surexpression de Cavéoline-1) ont modifié la densité de la MP et conséquemment induit sa migration au fond du gradient, rendant par le fait même impossible toute analyse du trafic intracellulaire de Gag en leur présence (Figure 1 A, Appendice 3).

Heureusement, tel que présenté dans la figure 1 B (Appendice 3), nous avons réussi à identifier des drogues capables de bloquer l'internalisation clathrine- (chlorpromazine) et cavéoline/cholestérol-dépendantes (filipine, M β CD) sans pour autant modifier la densité de la MP. Les résultats obtenus en présence de ces drogues indiquent que l'accumulation de produits matures de Gag dans les CMVs est sensible à la déplétion (M β CD) ou à la séquestration (filipin) du cholestérol de surface. En effet, en présence de ces drogues l'accumulation des produits matures de Gag dans les CMVs après 2 h de chase fut diminuée grandement (Figure 7, Chapitre 2). Il faut souligner que l'effet de la déplétion du cholestérol sur l'accumulation de Gag dans les CMVs est spécifique et réversible : il suffit d'enlever ces drogues pour retrouver, du moins partiellement, l'accumulation de Gag dans les CMVs (Figure 2, Appendice 3). Ces données suggèrent ainsi que l'internalisation de Gag vers les CMVs se ferait directement via les cavéolines/radeaux lipidiques. En ce sens, rappelons que les radeaux lipidiques sont connus pour jouer un rôle clé

dans l'assemblage, la production et la relâche du VIH-1 (section 4.2, Chapitre 1) et que le cholestérol présent à la surface cellulaire est essentiel à l'endocytose dépendante des cavéolines/radeaux lipidiques (Parton and Simons 2007). Toutefois, l'effet de la déplétion du cholestérol sur l'accumulation de Gag dans les CMVs pourrait aussi être interprété différemment (voir plus bas).

Il n'est pas encore clair si l'internalisation de Gag dépend des signaux d'internalisation (Lindwasser and Resh 2004; Joshi, Nagashima et al. 2006) ou si elle se fait sous forme de particules virales matures ayant complété le processus de bourgeonnement, tel que récemment suggéré par le groupe de Bieniasz (Neil, Eastman et al. 2006). Cette dernière suggestion a été basée sur le fait que les particules virales qui se trouvent dans des compartiments intracellulaires ont une morphologie complètement mature et que certains inhibiteurs d'endocytose diminuent la quantité de Gag associé aux endosomes tout en induisant l'accumulation de virus matures à la surface cellulaire. Nos résultats présentés dans le chapitre 2 vont dans ce sens. En effet, nous avons observé un enrichissement majeur des produits complètement matures de Gag (p24, normalement associée aux virus matures) dans les fractions enrichies en CMVs, tandis que sa forme partiellement clivée (p25) se retrouve principalement dans les fractions enrichies en MP (Figures 2 et 4, Chapitre 2). Par ailleurs, bien que ces résultats indiquent que Gag se retrouve sous forme mature dans les CMVs, ils ne peuvent déterminer si Gag est clivé lors de son trajet vers ces compartiments ou s'il est internalisé directement sous forme mature. Toutefois, si tel était le cas, alors tout effet ayant le potentiel d'interférer avec l'assemblage viral pourrait directement affecter l'étendu du processus d'internalisation de Gag. Ainsi, étant donné que les domaines enrichis en cholestérol sont importants pour l'assemblage et la relâche virale, nous ne pouvons pas exclure que l'effet de la filipin et de la M β CD au niveau de l'accumulation de Gag dans les CMVs soit indirect plutôt que direct. Bien que l'association de Gag aux membranes ne soit pas diminuée par ces drogues

(Figure 3, Appendice 3), elles affectent la relâche virale de 50-60% (Figure 4, Appendice 3), suggérant que l'effet de ces drogues sur l'accumulation de Gag dans les CMVs serait plutôt dû à un défaut d'assemblage viral. Bien qu'on ne puisse pas écarter cette possibilité, il est toujours possible que l'internalisation à partir des cavéolines/radeaux lipidiques ou la combinaison de ces deux phénomènes soit importante pour l'internalisation de Gag vers les CMVs. Toutefois, même si l'absence d'accumulation de Gag dans les CMVs était due à un défaut d'assemblage de particules virales à la surface cellulaire, ces données indiquent toujours que le site d'assemblage de Gag est bel et bien la MP car si l'accumulation de Gag dans les CMVs était le fruit d'un ciblage direct vers les CMVs, le signal de Gag devrait toujours être détecté dans ces compartiments, malgré un défaut d'assemblage.

Par ailleurs, il faut souligner que la filipine et la M β CD diminuent aussi la quantité relative du signal Pr55^{Gag} détecté dans les fractions enrichies en CMVs au temps 0 h (Figure 7, Chapitre 2). Ce résultat suggère qu'un mécanisme d'internalisation très rapide, différent de celui observé 2 h plus tard, soit responsable de la présence du précurseur Pr55^{Gag} dans les CMVs. En effet, 2 h après le marquage c'est seulement des produits matures de Gag qui sont internalisés (la quantité relative du précurseur Pr55^{Gag} n'étant pas modifiée), tandis qu'au temps 0 h nous détectons majoritairement le précurseur Pr55^{Gag} dans les CMVs. Il est donc possible que l'internalisation de Gag vers les CMVs se réalise en deux étapes. Premièrement, un mécanisme d'endocytose très rapide, sensible à la déplétion du cholestérol, permettrait d'internaliser le précurseur Pr55^{Gag} vers les CMVs tandis qu'un mécanisme plus lent, mais toujours sensible à la déplétion du cholestérol, serait responsable de l'internalisation des produits matures de Gag 2 h plus tard. Étant donné que l'internalisation des produits matures de Gag est plus importante que celle du précurseur Pr55^{Gag} (Figure 4, Chapitre 2), ce serait le

deuxième mécanisme qui serait le principal responsable de l'accumulation de Gag dans les CMVs.

À la différence des drogues liant les stéroïdes, la chlorpromazine, une drogue qui bloque efficacement l'internalisation de la Tfr (Figure 6, Chapitre 2) n'a pas eu d'effet sur l'accumulation de Gag dans les CMVs (Pr55^{Gag} au temps 0 h ou produits matures 2 heures après). Ces résultats diffèrent de ceux récemment présentés par le groupe de Bieniasz (Jouvenet, Neil et al. 2006; Neil, Eastman et al. 2006) qui montrent que l'accumulation de Gag dans des compartiments intracellulaires se fait par un mécanisme dépendant des clathrines. En effet, ils ont montré dans deux systèmes (HeLa et HEK 293T) que l'expression d'un TDN d'Eps 15 réduit l'accumulation des fusions Gag-GFP dans des compartiments endosomaux. Les différences entre ces données et les nôtres pourraient être liées à la forme de Gag utilisée (native vs fusionné), au contexte d'expression de ces protéines (proviral vs Rev-indépendant) ainsi qu'à l'état de clivage de Gag (clivé vs non-clivé).

Tous nos résultats présentés jusqu'à maintenant suggèrent fortement que Gag est premièrement ciblé à la MP et par la suite internalisé vers des CMVs. Ainsi, dans un contexte physiologique, les principaux mécanismes d'endocytose (qui varient en fonction du type cellulaire) contrôleraient l'accumulation de Gag dans ces compartiments. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en adaptant le gradient que nous avons développé, à l'étude du trafic de Gag dans les macrophages. Nous pourrions ainsi vérifier le rôle que la phagocytose (principal mécanisme d'endocytose dans ces cellules) joue dans l'accumulation intracellulaire de Gag. De plus, cette étude serait particulièrement importante afin de clairement identifier le compartiment où s'accumulent les particules virales matures chez les macrophages. En effet, même si plusieurs études ont montré que dans ces cellules les virus s'accumulent dans les CMVs (Raposo, Moore et al. 2002; Pelchen-Matthews, Kramer et al. 2003; Ono and Freed 2004; Jouvenet, Neil et al. 2006) et que

cette accumulation serait le fruit de l'internalisation à partir de la MP (Jouvenet, Neil et al. 2006), deux études très récentes ayant eu recours à des nouvelles techniques de microscopie électronique ont identifié ces compartiments comme étant des invaginations de la membrane plasmique (Deneka, Pelchen-Matthews et al. 2007; Welsch, Keppler et al. 2007). À la lumière de ces nouvelles observations, je pense que l'analyse du trafic intracellulaire de la protéine Gag nouvellement synthétisée dans des macrophages primaires, à l'aide du gradient que nous avons développé, permettrait d'apporter un éclairage important sur ce sujet. (voir plus bas la section « Limite des voies expérimentales utilisées / expériences futures »).

Effet de HLA-DR sur le trafic intracellulaire de Gag

Le CMH-II a attiré notre attention lors de nos recherches visant à identifier des facteurs de l'hôte capables de modifier le trafic intracellulaire de Gag. Premièrement, le CMH-II est exprimé dans des cellules qui sont normalement infectées par le VIH-1, incluant les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que les lymphocytes T activés. De plus, il possède la capacité d'induire de compartiments endosomaux analogues aux CMVs dans des cellules épithéliales (Calafat, Nijenhuis et al. 1994). Finalement, il faut souligner qu'un lien fonctionnel entre le CMH-II et Gag au niveau de leur trafic intracellulaire a déjà été établi. En effet, il a déjà été montré que l'expression de Gag était suffisante pour rétablir le trafic du CMH-II à la MP chez un sous-clone des cellules HUT-78 chez qui le CMH-II ne s'accumulait que dans des compartiments intracellulaires (Gluschankof and Suzan 2002), suggérant par le fait même que Gag et le CMH-II partagent quelque part la même voie de trafic intracellulaire. Étant donné la controverse entourant le trafic intracellulaire de Gag, nous nous sommes demandé si l'expression du CMH-II était suffisante pour modifier la localisation de Gag. Nos résultats présentés au chapitre 3 montrent que c'est effectivement le cas. En effet, nous

avons montré que l'expression de HLA-DR dans les cellules HeLa et HEK 293T induit une accumulation de Gag dans des compartiments intracellulaires possédant plusieurs marqueurs spécifiques des CMVs (Figures 1, 3 et 4, Chapitre 3). Ceci résulte en une diminution de la relâche virale (Figure 5, Chapitre 3). De plus, nos recherches ont identifié les queues cytoplasmiques des chaînes α et β comme étant essentielles à ce processus. En revanche, la relocalisation de Gag par HLA-DR n'est pas un mécanisme conservé parmi toutes les molécules du CMH-II car les molécules dites non-classiques, incluant HLA-DM et -DO, n'en sont pas capables (Figure 2, Chapitre 3).

Par ailleurs, il faut souligner que les virus relocalisés par HLA-DR dans des compartiments intracellulaires restent infectieux, du moins pendant 24 h (la durée de l'étude) (Figure 7, Chapitre 3). Toutefois, à la différence des macrophages qui sont capables de transmettre les virus accumulés intracellulairement aux lymphocytes T pendant de longues périodes de temps (Sharova, Swingler et al. 2005), le virus accumulé en présence de HLA-DR n'est pas transmis efficacement. Afin d'arriver à cette conclusion nous avons mis au point un système de transmission cellule/cellule qui nous permettait de suivre la transmission de particules virales infectieuses (accumulés pendant 24 h dans des compartiments intracellulaires) à partir des cellules HEK 293T vers des lymphocytes T (CEM-GFP) qui deviennent fluorescents suite à l'infection (Gervaix, West et al. 1997). Ainsi, nous avons observé que les cellules (HEK 293T) exprimant HLA-DR transmettent le VIH-1 à des lymphocytes T de façon cinq fois moins efficace (Figure 5, Appendice 3). Il faut souligner que la diminution observée ne peut être attribuée à une diminution de l'infectivité des virions car leur potentiel infectieux demeure inchangé suite à l'expression de HLA-DR (Figure 6, Appendice 3).

Ensemble, ces données suggèrent que les compartiments intracellulaires où Gag s'accumule en présence de HLA-DR ne migrent pas vers la MP, du moins dans nos conditions expérimentales. De plus, la

corrélation « accumulation intracellulaire de Gag / transmission virale moins efficace » suggère aussi que les virus transmis aux lymphocytes T proviennent de la MP. En fait, ce résultat va dans le même sens que ceux d'une étude ayant récemment montré que la majorité des virus transmis *en trans* par des CD4 aux lymphocytes T provient principalement de la MP (Cavrois, Neidleman et al. 2007).

Indépendamment du mécanisme de transmission, nos résultats n'excluent pas que HLA-DR joue un rôle dans la propagation virale *in vivo*, surtout lorsqu'il a été montré qu'une population de lymphocytes T exprimant fortement HLA-DR est responsable de 90% de la dissémination virale dans des tissus cervicaux humains (Hu, Frank et al. 2004). Toutes ces données indiquent qu'il serait important d'étudier le rôle du CMH-II dans le trafic intracellulaire de Gag dans les cellules normalement infectées par le VIH-1 telles que les macrophages, les CD4 et les lymphocytes T activés (voir plus bas la section « Limite des voies expérimentales utilisées / expériences futures »).

Mécanisme d'action de HLA-DR

Le fait que Gag et des virus matures s'accumulent dans des compartiments intracellulaires suite à l'expression de HLA-DR n'indique aucunement les voies qu'ils utilisent pour s'y rendre. En fait, deux mécanismes d'action sont envisageables, soit une augmentation de l'internalisation de Gag à partir de la MP ou au contraire, un ciblage direct de Gag vers les CMVs. La première possibilité est soutenue par le fait que HLA-DR se rend aux CMVs via la MP (Dugast, Toussaint et al. 2005; McCormick, Martina et al. 2005) et pourrait donc amener Gag et/ou les virus matures lors de son parcours vers les CMVs. Ceci impliquerait une interaction de HLA-DR avec une composante structurale du virus (voir plus bas). Par contre, il est aussi possible que l'induction/maturation des endosomes tardifs par HLA-DR

(Calafat, Nijenhuis et al. 1994) augmente la surface de membranes internes où Gag serait directement ciblé.

Les expériences présentées dans le chapitre 4 indiquent que HLA-DR augmente l'internalisation des virus matures à partir de la MP. Premièrement, nous avons montré que l'expression d'un TDN de la dynamine (K44A), connu pour inhiber l'internalisation clathrine- et cavéoline-dépendante, réduit l'accumulation de Gag dans des compartiments intracellulaires en présence de HLA-DR (Figure 1, Chapitre 4). Toutefois, cette récupération partielle de Gag à la MP ne permet pas de récupérer une relâche virale efficace, ce qui suggère que l'expression de HLA-DR résulte dans l'adhésion de particules virales à la surface cellulaire. Ainsi, même si le virus est redistribué à la MP, il reste « attaché » à celle-ci et ne peut être relâché. Des résultats similaires ont été générés par le groupe de Bieniasz. Ils ont montré que l'inhibition de l'endocytose avec le TDN K44A récupère le ciblage de Gag à la MP mais ne rétablit pas un défaut de relâche imposé par l'absence du gène *vpu* dans les cellules HeLa (Neil, Eastman et al. 2006).

Afin de s'assurer que l'internalisation à partir de la MP est véritablement le mécanisme impliqué dans la relocalisation de Gag par HLA-DR, nous avons utilisé le fractionnement cellulaire présenté au chapitre 2. Nos données montrent que HLA-DR induit une accumulation précoce des produits matures de Gag dans les CMVs lorsque comparé à des cellules n'exprimant pas le CMH-II. En effet, en absence de HLA-DR l'accumulation des produits matures de Gag dans les CMVs ne devient évidente qu'après 2 h de chase (Figure 4, Chapitre 2). Par contre, suite à l'expression de HLA-DR, cette accumulation est observée après seulement 30 minutes de chase (Figure 2, Chapitre 4). En fait, ce résultat suggère que HLA-DR, en plus de retenir les virus à la MP, accélère leur processus d'internalisation car si tel n'était pas le cas, l'effet de HLA-DR sur l'accumulation de Gag ne serait détectable

qu'après 2 h de chase, au même moment où les produits de Gag sont « normalement » internalisés en absence de HLA-DR. De plus, il faut souligner qu'en présence de HLA-DR l'accumulation de Gag dans les CMVs reste toujours sensible à la déplétion du cholestérol en surface mais demeure inchangée en présence de chlorpromazine (Figure 3, Chapitre 4).

Par ailleurs, l'expression de HLA-DR n'affecte pas la quantité du précurseur Pr55^{Gag} détecté dans les CMVs au temps 0 h, suggérant que HLA-DR n'affecte pas l'internalisation des produits non clivés (Figure 2, Chapitre 4). En ce sens, nous avons montré au chapitre 2 (Figure 2), 3 (Figure 6 et 7) et 4 (Figure 4) que l'expression de HLA-DR n'induit l'accumulation intracellulaire que des produits complètement matures de Gag (p24). Étant donné que la p24 se trouve normalement associée à des particules virales matures, ces données suggèrent que HLA-DR n'agit que sur des virions. En fait, ceci est soutenu par l'observation de particules virales complètement matures dans des compartiments intracellulaires suite à l'expression de HLA-DR (Figure 5, Chapitre 3).

Les données présentées ci-dessus suggèrent fortement que HLA-DR augmente l'internalisation de particules virales à partir de la MP. Toutefois, elles ne donnent aucune information sur l'endroit où HLA-DR doit se trouver (MP vs CMVs) afin d'être fonctionnel. Nous avons adressé cette question à l'aide d'une ubiquitine E3 ligase récemment identifiée, MARCH8 (Goto, Ishido et al. 2003; Bartee, Mansouri et al. 2004). MARCH8 appartient à une famille de protéines capables d'induire l'endocytose et la dégradation de nombreuses protéines cellulaires incluant le CMH-II, en induisant leur ubiquitination (Goto, Ishido et al. 2003; Bartee, Mansouri et al. 2004; Ohmura-Hoshino, Goto et al. 2006; Ohmura-Hoshino, Matsuki et al. 2006). Par ailleurs, l'expression de MARCH8 dans un système reconstitué avec des cellules HEK 293T est suffisante pour diminuer drastiquement l'expression de surface de HLA-DR et induire son accumulation dans les CMVs.

Remarquablement, nous avons observé que HLA-DR n'est plus capable de relocaliser Gag ou de diminuer la relâche virale en présence de MARCH8 (Figure 7, Appendice 3). Ces données préliminaires suggèrent fortement qu'une certaine quantité de HLA-DR doit demeurer à la MP afin de relocaliser Gag. Il serait intéressant de vérifier si l'ubiquitination de HLA-DR par MARCH8 est impliquée dans le phénomène. Ceci pourrait tout simplement se faire en exprimant des mutants ponctuels des résidus lysines présents dans les queues cytoplasmiques de HLA-DR et en évaluant leur effet sur la relâche virale ainsi que sur le trafic et la relocalisation de Gag. De plus, il serait intéressant de vérifier la contribution de MARCH8 au trafic intracellulaire de Gag dans les macrophages et particulièrement chez les CD4⁺ chez qui il a été montré que cette E3 ligase modulait l'expression de surface du CMH-II (Ohmura-Hoshino, Matsuki et al. 2006; Shin, Ebersold et al. 2006).

Curieusement, les données présentées ci-dessus indiquent que MARCH8 tout comme le TDN K44A de la dynamine sont capables de récupérer la localisation de Gag à la MP en présence de HLA-DR. Toutefois, c'est seulement MARCH8 qui est capable de rétablir la relâche virale. Ceci suggère que HLA-DR pourrait affecter la localisation de Gag en deux étapes. En effet, il se peut que HLA-DR affecte la relâche virale en induisant, de façon directe ou indirecte, l'adhésion des particules virales à la surface cellulaire; par la suite il provoquerait leur internalisation. En présence de MARCH8 il n'y aurait pas suffisamment de HLA-DR en surface pour induire l'adhésion des particules virales. Par contre, le mécanisme d'action du TDN de la dynamine serait différent; il agirait plus tardivement en empêchant tout simplement l'internalisation des virions déjà « attachés » suite à l'expression de HLA-DR. Ainsi, la diminution de l'endocytose permet de récupérer Gag à la MP, mais puisque les virus sont déjà « attachés », la relâche virale ne peut être rétablie en présence du TDN K44A. En fait, ceci est appuyé par

l'apparition de grandes quantités de Gag à la MP en présence du TDN K44A et HLA-DR (Figure 1, Chapitre 4).

Déterminants viraux

Nous avons discuté précédemment sur la possibilité que HLA-DR agisse directement sur des particules virales formées et retenues à la surface cellulaire. Nous avons testé directement cette possibilité en évaluant l'effet de HLA-DR sur la relocalisation d'un mutant du motif PTAP dans la protéine p6 de Gag. Tel que décrit dans la revue de littérature, des mutations dans ce motif induisent l'accumulation de particules virales immatures attachées à la surface cellulaire. En fait, ceci diffère complètement de l'accumulation de particules complètement matures à l'intérieur de compartiments intracellulaires, suite à l'expression de HLA-DR. Remarquablement, HLA-DR est incapable de modifier la localisation de ce mutant (Figure 4, Chapitre 4). Ce résultat s'ajoute à une liste d'études qui a souligné l'importance de ce motif dans la localisation de Gag dans des compartiments endosomaux de classe E (von Schwedler, Stuchell et al. 2003), dans des endosomes enrichies biochimiquement (Goff, Ehrlich et al. 2003) ou dans des endosomes tardifs (Neil, Eastman et al. 2006).

En fait, ce résultat suggère que soit la fission des membranes virales et cellulaires ou alternativement le recrutement des protéines VPS de classe E soient nécessaires à la relocalisation de Gag par HLA-DR. Afin de discerner entre ces deux possibilités nous avons vérifié la capacité de HLA-DR à relocaliser un mutant de Gag qui ne peut multimériser (ce qui affecte l'assemblage de particules virales) (Cimarelli, Sandin et al. 2000) mais qui possède un motif PTAP sauvage (et donc susceptible de recruter les facteurs VPS de classe E). Les données présentées dans la figure 8 (Appendice 3) supportent la première hypothèse qui indique que la fission des membranes

virales et cellulaires (mais également l'assemblage) est nécessaire car HLA-DR est incapable de relocaliser ce mutant vers des compartiments intracellulaires.

Par ailleurs, nous avons aussi montré que l'enveloppe virale module l'effet de HLA-DR sur Gag. En effet, la relocalisation de Gag par HLA-DR est grandement augmentée suite à l'expression de l'enveloppe virale. De plus, nos données suggèrent que l'interaction entre Env et la MA est nécessaire pour ce phénomène (Figure 5, Chapitre 4). En fait, l'enveloppe pourrait augmenter le ciblage de Gag au site d'action de HLA-DR. En ce sens, il a déjà été montré que l'enveloppe virale était responsable du bourgeonnement polarisé de Gag dans des cellules polarisées (Lodge, Gottlinger et al. 1994) ce qui suggère qu'il affecte le trafic de Gag. De plus, il a été montré que le ciblage de Gag vers des microdomaines de la membrane plasmique qui supportent l'assemblage du VIH-1 (les TEMs) était augmenté suite à l'expression d'Env (Nydegger, Khurana et al. 2006). Alternativement, il est aussi possible qu'une interaction entre l'enveloppe et HLA-DR augmente l'adhésion des particules virales à la surface cellulaire. En ce sens, nous avons observé que HLA-DR interagit avec l'enveloppe virale (Figure 9 A, Appendice 3); nos données préliminaires indiquent que ce serait plus précisément avec la gp41 (Figure 9 C, Appendice 3). Toutefois, nous avons observé qu'Env lie aussi le mutant tronqué de HLA-DR (délétion de ses deux queues cytoplasmiques, TMTM) (Figure 9 B, Appendice 3), qui est incapable de modifier la localisation de Gag (Chapitre 3). Ainsi, l'interaction entre Env et HLA-DR serait nécessaire mais pas suffisante pour augmenter l'internalisation de Gag vers des compartiments intracellulaires. En fait, il serait important d'établir si cette interaction survient à la MP. De plus, une analyse approfondie de la localisation de HLA-DR à la MP ainsi que de son mutant tronqué serait importante pour établir une corrélation entre leur présence dans certains microdomaines (TEMs, radeaux lipidiques) et leur effet sur Gag. En ce sens, l'analyse de leur incorporation

dans les particules virales pourrait donner des évidences sur une éventuelle différence dans leur localisation à la MP. Finalement, l'analyse de leur cinétique d'internalisation pourrait aussi indiquer si l'internalisation de HLA-DR est importante pour modifier la localisation de Gag.

Limite des voies expérimentales utilisées / expériences futures

La plupart des expériences présentées dans cette thèse ont été effectuées à l'aide des cellules HEK 293T. L'expression transitoire des protéines dans ces cellules est largement répandue comme modèle d'étude car elles sont faciles à manipuler et elles permettent l'expression des protéines à des très hauts niveaux (surexpression) ce qui peut être nécessaire pour certaines techniques comme la détection d'une protéine lors des très courts marquages métaboliques (ex : lors des « pulse (10 min)-chase » décrits dans le Chapitre 2). Par ailleurs, certains résultats obtenus à l'aide de cette approche de surexpression dans les cellules HEK 293T ont pu être appliqués dans des systèmes plus physiologiques. Par exemple, l'effet positif de la protéine Vpu sur l'infektivité des particules virales dû à la dégradation du récepteur CD4 a été établi dans les cellules HEK 293T et confirmé dans la même étude chez des PBMCs (Levesque, Zhao et al. 2003). Toutefois, il est évident que les résultats générés à l'aide d'un système de surexpression doit être confirmé dans un système plus physiologique.

Dans le Chapitre 2/Article 1 de cette thèse nous avons étudié le trafic intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1 dans les cellules HEK 293T. Toutefois, des études supplémentaires visant à déterminer le trafic intracellulaire de la protéine Gag nouvellement synthétisée dans des cellules normalement infectées par le VIH-1 permettraient de valider ces résultats. Il faudrait donc adapter et caractériser le fractionnement cellulaire décrit dans ce chapitre chez des macrophages et des lymphocytes T CD4 primaires.

L'utilisation de ces cellules serait un atout car tel qu'indiqué dans la section 4 de l'introduction (« Site d'assemblage viral : PM vs CMVs ») les macrophages sont reconnus pour avoir une accumulation des virus matures dans des compartiments intracellulaires tandis que chez les lymphocytes T CD4 les virus s'accumulent de façon prédominante à la MP. Cette étude permettrait de comparer le trafic de Gag dans ces deux types cellulaires et d'évaluer si Gag est ciblé de façon prédominante à la MP dans des cellules normalement infectées par le VIH. Un point critique d'une telle étude demeure toujours la séparation efficace de la MP des CMVs; il faudra donc porter une attention particulière à la migration des marqueurs de ces deux compartiments après fractionnement. De plus, les macrophages ou les lymphocytes T CD4 primaires devraient être infectés (plutôt que transfectés) afin de s'approcher le plus possible d'un contexte physiologique. Par ailleurs, le fractionnement cellulaire devrait se faire au pic de réplication virale afin de s'assurer une détection efficace de la protéine Gag nouvellement synthétisée.

Afin de démontrer le rôle de certains mécanismes d'endocytose dans le trafic intracellulaire de Gag nous avons eu recours à des mutants transdominants négatifs (ex : DynK44A) ou à des drogues qui bloquent certaines de ces voies (ex : chlorpromazine, filipin, M β CD) (Chapitres 2 et 4). Toutefois, il faut toujours garder à l'esprit que les mutants transdominants négatifs ou les drogues peuvent avoir des effets pleiotropiques. Par exemple, nous avons déjà indiqué que l'utilisation des drogues liant le cholestérol résulte en une diminution de l'ordre de 50-60% de la relâche virale (Figure 4, Appendice 3). Afin de diminuer ou d'éviter ce type de problèmes il serait important d'utiliser des ARN d'interférence qui cibleraient spécifiquement certaines composantes impliquées dans les différentes voies d'endocytose étudiées. Par exemple, des ARN d'interférence contre la chaîne lourde des molécules de clathrine ou contre AP2 permettraient d'étudier l'endocytose clathrine-dépendante tandis que des ARN d'interférence ciblant

spécifiquement la cavéoline 1 permettrait d'évaluer le rôle des cavéolines dans le trafic intracellulaire de Gag dans les types cellulaires étudiés.

Par ailleurs, nos études visant à identifier des facteurs cellulaires capables de moduler le trafic intracellulaire de Gag ont permis d'identifier les molécules classiques du CMH-II, incluant HLA-DR, comme étant suffisantes pour modifier la localisation à l'équilibre de Gag de la MP vers des CMVs. En fait, nous nous sommes intéressés à l'effet que le CMH-II pourrait avoir sur la localisation de Gag de part sa capacité à induire des compartiments endosomaux analogues aux CMVs. Dans le Chapitre 3 nous avons étudié l'effet du CMH-II sur la localisation de Gag dans des cellules épithéliales car c'est dans ce système que l'effet du CMH-II sur l'induction des compartiments intracellulaires fût établi (Calafat, Nijenhuis et al. 1994). En outre, ces cellules étaient attractives car elles n'expriment pas le CMH-II, ce qui nous a permis d'étudier de façon indépendante l'effet des molécules du CMH-II classiques et non classiques sur la localisation du virus. Toutefois, bien que les résultats générés dans les cellules HEK 293T aient été reproduits dans des cellules HeLa exprimant de façon stable des molécules du CMH-II, il ne faut pas oublier que les niveaux exprimés étaient supraphysiologiques. Donc, bien que d'un point de vue mécanistique ces cellules aient été très utiles car elles ont permis d'établir un nouveau lien entre le VIH-1 et le CMH-II, il ne demeure pas moins que les résultats obtenus soulèvent plusieurs questions qui ne peuvent pas être répondues à l'aide du même système. La question la plus importante qui ressort du Chapitre 3 est le rôle que les molécules du CMH-II jouent dans le trafic de Gag dans des cellules normalement infectées par le VIH telles que les macrophages, les CD4 et les lymphocytes T CD4 activés. En fait, ceci pourrait être accompli en empêchant, par ARN d'interférence, l'expression du transactivateur du CMH-II (CIITA), ce qui permettrait de bloquer l'expression de toutes les molécules du CMH-II. Alternativement, l'expression de l'ubiquitine 3 ligase MARCH8 à l'aide d'un vecteur lentiviral permettrait de diminuer spécifiquement l'expression de surface du CMH-II.

Dans ces deux systèmes, une étude approfondie de la réplication virale entre des cellules exprimant ou pas les molécules du CMH-II devrait être effectué. Par ailleurs, la formation des synapses virologiques ainsi que la transmission virale entre des macrophages ou des CD4, avec des cellules T pourrait aussi être évaluée. De plus, des courts marquages métaboliques suivis d'un fractionnement cellulaire capable de séparer efficacement la MP des CMVs chez ces cellules (exprimant ou pas le CMH-II) ainsi que des immunoprécipitations anti-Gag permettraient d'évaluer si les molécules du CMH-II jouent un rôle dans le trafic intracellulaire de Gag chez des cellules normalement infectées par le VIH. Les expériences énoncées ci-dessus permettraient de confirmer dans un système physiologique les résultats présentés dans les chapitres 2 à 4 de cette thèse.

CHAPITRE 6:
CONCLUSIONS ET CONTRIBUTIONS MAJEURES

Globalement, les résultats présentés dans cette thèse auront permis d'identifier la MP comme étant le site d'assemblage du VIH-1 dans une lignée cellulaire qui supporte l'accumulation de Gag à la MP ainsi que dans des CMVs. Ces travaux ont par ailleurs permis de mettre au point une technique de fractionnement cellulaire qui pourrait être utilisée dans d'autres champs d'études s'intéressant au trafic des protéines entre la MP et les CMVs. De plus, nos travaux auront permis de mettre à jour une nouvelle interaction fonctionnelle entre Gag et HLA-DR et soulèvent la possibilité que le CMH-II soit capable de réguler l'accumulation du VIH-1 dans des compartiments intracellulaires des CD, macrophages ainsi que chez des lymphocytes T activés. Ainsi, il est possible que le CMH-II soit un facteur cellulaire impliqué dans la propagation du VIH-1 chez les individus infectés.

En résumé, voici les contributions majeures de ce travail de recherche :

- 1- Développement d'un fractionnement cellulaire capable de séparer efficacement la MP des CMVs dans des cellules HEK 293T exprimant le VIH-1.**
- 2- Démonstration que dans les cellules HEK 293T le site d'assemblage du VIH-1 est la MP.**
- 3- Démonstration que Gag ainsi que ses produits matures s'accumulent dans les CMVs via un mécanisme sensible à la déplétion du cholestérol de surface.**
- 4- Identification des molécules du CMH-II comme étant capables de relocaliser Gag et des virus infectieux vers des CMVs; ce qui se traduit par une diminution de la relâche virale.**
- 5- Identification des queues cytoplasmiques des chaînes α et β de HLA-DR comme étant essentielles au processus de relocalisation de Gag par le CMH-II.**

- 6- Démonstration que le mécanisme de relocalisation de Gag par le CMH-II se fait via une augmentation de l'internalisation de particules virales à partir de la MP.**
- 7- Démonstration que l'enveloppe virale module l'activité du CMH-II sur Gag.**

En plus des articles présentés aux chapitres 2, 3 et 4 de cette thèse, j'ai aussi développé une nouvelle technique de purification de la protéine Nef du VIH-1 dans le but d'identifier des peptides spécifiques qui lient cette protéine à l'aide de la technique dite « phage-display ». Cette technique fut l'objet d'une publication : « Finzi A., Cloutier J. and Cohen EA. Two-step purification of His-tagged Nef protein in native condition using heparin and immobilized metal ion affinity chromatographies. *J Virol Methods*. 2003 Jul;111(1):69-73 ». Par ailleurs, j'ai aussi participé à une revue de littérature sur le rôle de la diminution de l'expression de surface du récepteur CD4 pendant l'infection au VIH-1. Ma contribution dans cette revue a été de résumer les mécanismes utilisés par la protéine Nef du VIH-1 pour diminuer l'expression de surface de CD4. Cette revue fut aussi l'objet d'une publication : « Levesque K., Finzi A., Binette J. Cohen EA. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr HIV Res*. 2004 Jan;2(1):51-9 ». Ces deux articles sont présentés dans les chapitres 8 et 9 respectivement.

CHAPITRE 7:
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Abada, P., B. Noble, et al. (2005). "Functional domains within the human immunodeficiency virus type 2 envelope protein required to enhance virus production." *J Virol* **79**(6): 3627-38.
- Abazeed, M. E., J. M. Blanchette, et al. (2005). "Cell-free transport from the trans-golgi network to late endosome requires factors involved in formation and consumption of clathrin-coated vesicles." *J Biol Chem* **280**(6): 4442-50.
- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes Dev* **15**(17): 2177-96.
- Accola, M. A., S. Hoglund, et al. (1998). "A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly." *J Virol* **72**(3): 2072-8.
- Accola, M. A., B. Strack, et al. (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**(12): 5395-402.
- Aderem, A. (2003). "Phagocytosis and the inflammatory response." *J Infect Dis* **187 Suppl 2**: S340-5.
- Agostini, I., J. M. Navarro, et al. (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB." *J Mol Biol* **261**(5): 599-606.
- Agostini, I., S. Popov, et al. (2000). "Heat-shock protein 70 can replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex." *Exp Cell Res* **259**(2): 398-403.
- Agromayor, M. and J. Martin-Serrano (2006). "Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo." *J Biol Chem* **281**(32): 23083-91.

- Akkina, R. K., R. M. Walton, et al. (1996). "High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G." J Virol **70**(4): 2581-5.
- Alam, S. L., J. Sun, et al. (2004). "Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers." Embo J **23**(7): 1411-21.
- Alfadhli, A., T. C. Dhenub, et al. (2005). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly." J Virol **79**(23): 14498-506.
- Alin, K. and S. P. Goff (1996). "Amino acid substitutions in the CA protein of Moloney murine leukemia virus that block early events in infection." Virology **222**(2): 339-51.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-8.
- Aloia, R. C., H. Tian, et al. (1993). "Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5181-5.
- Amara, A. and D. R. Littman (2003). "After Hrs with HIV." J Cell Biol **162**(3): 371-5.
- Amarasinghe, G. K., J. Zhou, et al. (2001). "Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition." J Mol Biol **314**(5): 961-70.
- Amerik, A. Y., J. Nowak, et al. (2000). "The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways." Mol Biol Cell **11**(10): 3365-80.
- Andersen, J. L., J. L. Dehart, et al. (2006). "HIV-1 Vpr-Induced Apoptosis Is Cell Cycle Dependent and Requires Bax but Not ANT." PLoS Pathog **2**(12): e127.

- Anderson, H. A., Y. Chen, et al. (1996). "Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae." Mol Biol Cell **7**(11): 1825-34.
- Anderson, R. G. and K. Jacobson (2002). "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." Science **296**(5574): 1821-5.
- Ao, Z., X. Yao, et al. (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**(6): 3170-7.
- Araki, N., T. Hatae, et al. (2003). "Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fc γ -receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages." J Cell Sci **116**(Pt 2): 247-57.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., et al. (1992). "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines." Science **258**(5090): 1935-8.
- Auewarakul, P., P. Wacharapornin, et al. (2005). "Uncoating of HIV-1 requires cellular activation." Virology **337**(1): 93-101.
- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." Traffic **6**(1): 2-9.
- Babst, M., T. K. Sato, et al. (1997). "Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p." Embo J **16**(8): 1820-31.
- Babst, M., B. Wendland, et al. (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." Embo J **17**(11): 2982-93.
- Bachand, F., X. J. Yao, et al. (1999). "Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor." J Biol Chem **274**(13): 9083-91.
- Bache, K. G., A. Brech, et al. (2003). "Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes." J Cell Biol **162**(3): 435-42.

- Bache, K. G., T. Slagsvold, et al. (2004). "The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation." Mol Biol Cell **15**(9): 4337-46.
- Bai, C., P. Sen, et al. (1996). "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box." Cell **86**(2): 263-74.
- Bajno, L., X. R. Peng, et al. (2000). "Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation." J Cell Biol **149**(3): 697-706.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barat, C., O. Schatz, et al. (1993). "Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase." J Mol Biol **231**(2): 185-90.
- Barboric, M., R. M. Nissen, et al. (2001). "NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II." Mol Cell **8**(2): 327-37.
- Barnard, A. L., T. Igakura, et al. (2005). "Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes." Blood **106**(3): 988-95.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Bartee, E., M. Mansouri, et al. (2004). "Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins." J Virol **78**(3): 1109-20.
- Baur, A. S., E. T. Sawai, et al. (1994). "HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization." Immunity **1**(5): 373-84.

- Bayer, N., D. Schober, et al. (2001). "Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry." J Biol Chem **276**(6): 3952-62.
- Behnia, R. and S. Munro (2005). "Organelle identity and the signposts for membrane traffic." Nature **438**(7068): 597-604.
- Belzile, J. P., G. Duisit, et al. (2007). "HIV-1 Vpr-Mediated G2 Arrest Involves the DDB1-CUL4A(VPRBP) E3 Ubiquitin Ligase." PLoS Pathog **3**(7): e85.
- Benaroch, P., M. Yilla, et al. (1995). "How MHC class II molecules reach the endocytic pathway." Embo J **14**(1): 37-49.
- Berditchevski, F. and E. Odintsova (2007). "Tetraspanins as regulators of protein trafficking." Traffic **8**(2): 89-96.
- Beriault, V., J. F. Clement, et al. (2004). "A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization." J Biol Chem **279**(42): 44141-53.
- Bidou, L., G. Stahl, et al. (1997). "In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal." Rna **3**(10): 1153-8.
- Bikoff, E. K., L. Y. Huang, et al. (1993). "Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression." J Exp Med **177**(6): 1699-712.
- Blauvelt, A., H. Asada, et al. (1997). "Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways." J Clin Invest **100**(8): 2043-53.
- Blot, V., F. Perugi, et al. (2004). "Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2357-67.

- Bonnerot, C., M. S. Marks, et al. (1994). "Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain." Embo J **13**(4): 934-44.
- Booth, A. M., Y. Fang, et al. (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." J Cell Biol **172**(6): 923-35.
- Booth, J. W., W. S. Trimble, et al. (2001). "Membrane dynamics in phagocytosis." Semin Immunol **13**(6): 357-64.
- Borsetti, A., A. Ohagen, et al. (1998). "The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly." J Virol **72**(11): 9313-7.
- Bouamr, F., B. R. Houck-Loomis, et al. (2007). "The C-terminal portion of the Hrs protein interacts with Tsg101 and interferes with human immunodeficiency virus type 1 Gag particle production." J Virol **81**(6): 2909-22.
- Bouamr, F., J. A. Melillo, et al. (2003). "PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]." J Virol **77**(22): 11882-95.
- Bour, S., F. Boulrice, et al. (1991). "Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **65**(12): 6387-96.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (1996). "The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?" J Virol **70**(2): 820-9.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation." J Virol **69**(3): 1510-20.

- Bouso, P. and E. A. Robey (2004). "Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy." *Immunity* **21**(3): 349-55.
- Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, et al. (2001). "HIV-1 infection requires a functional integrase NLS." *Mol Cell* **7**(5): 1025-35.
- Bowzard, J. B., R. P. Bennett, et al. (1998). "Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue." *J Virol* **72**(11): 9034-44.
- Braaten, D., E. K. Franke, et al. (1996). "Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription." *J Virol* **70**(6): 3551-60.
- Brocker, T., M. Riedinger, et al. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." *J Exp Med* **185**(3): 541-50.
- Brodsky, F. M., C. Y. Chen, et al. (2001). "Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 517-68.
- Brown, B. K., N. Karasavvas, et al. (2007). "Monoclonal antibodies to phosphatidylinositol phosphate neutralize human immunodeficiency virus type 1: role of phosphate-binding subsites." *J Virol* **81**(4): 2087-91.
- Brown, C. M. and N. O. Petersen (1999). "Free clathrin triskelions are required for the stability of clathrin-associated adaptor protein (AP-2) coated pit nucleation sites." *Biochem Cell Biol* **77**(5): 439-48.
- Brown, P. O., B. Bowerman, et al. (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**(8): 2525-9.
- Brugger, B., B. Glass, et al. (2006). "The HIV lipidome: a raft with an unusual composition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2641-6.

- Brunger, A. T. and B. DeLaBarre (2003). "NSF and p97/VCP: similar at first, different at last." FEBS Lett **555**(1): 126-33.
- Bryant, M. and L. Ratner (1990). "Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 523-7.
- Bukrinsky, M. (2004). "A hard way to the nucleus." Mol Med **10**(1-6): 1-5.
- Bukrinsky, M. I. and O. K. Haffar (1998). "HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr." Mol Med **4**(3): 138-43.
- Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." Nature **365**(6447): 666-9.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. (1994). "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." Nature **371**(6492): 37-43.
- Buonocore, L. and J. K. Rose (1990). "Prevention of HIV-1 glycoprotein transport by soluble CD4 retained in the endoplasmic reticulum." Nature **345**(6276): 625-8.
- Burleigh, L., P. Y. Lozach, et al. (2006). "Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells." J Virol **80**(6): 2949-57.
- Butticaz, C., O. Michielin, et al. (2007). "Silencing of both β -TrCP1 and HOS (β -TrCP2) Is Required To Suppress Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu-Mediated CD4 Down-Modulation." J Virol **81**(3): 1502-5.

- Caffrey, M., M. Cai, et al. (1998). "Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41." Embo J **17**(16): 4572-84.
- Cairns, T. M. and R. C. Craven (2001). "Viral DNA synthesis defects in assembly-competent Rous sarcoma virus CA mutants." J Virol **75**(1): 242-50.
- Calafat, J., M. Nijenhuis, et al. (1994). "Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures." J Cell Biol **126**(4): 967-77.
- Campbell, S. and A. Rein (1999). "In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain." J Virol **73**(3): 2270-9.
- Campbell, S. and V. M. Vogt (1995). "Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1." J Virol **69**(10): 6487-97.
- Cantin, R., J. F. Fortin, et al. (1997). "The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells." Blood **90**(3): 1091-100.
- Cantin, R., J. F. Fortin, et al. (1997). "The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity." J Virol **71**(3): 1922-30.
- Cao, H., S. Weller, et al. (2005). "Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport." Nat Cell Biol **7**(5): 483-92.
- Carr, J. M., H. Hocking, et al. (1999). "Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes." Virology **265**(2): 319-29.

- Cavrois, M., J. Neidleman, et al. (2007). "In Vitro Derived Dendritic Cells trans-Infect CD4 T Cells Primarily with Surface-Bound HIV-1 Virions." PLoS Pathog **3**(1): e4.
- CDC (1981). "Pneumocystis pneumonia--Los Angeles." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **30**(21): 250-2.
- Celli, S., Z. Garcia, et al. (2005). "CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo." J Exp Med **202**(9): 1271-8.
- Center, R. J., R. D. Leapman, et al. (2002). "Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface." J Virol **76**(15): 7863-7.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." Cell **89**(2): 263-73.
- Charneau, P., M. Alizon, et al. (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." J Virol **66**(5): 2814-20.
- Charneau, P., G. Mirambeau, et al. (1994). "HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome." J Mol Biol **241**(5): 651-62.
- Chatellard-Causse, C., B. Blot, et al. (2002). "Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization." J Biol Chem **277**(32): 29108-15.
- Chen, R., E. Le Rouzic, et al. (2004). "Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages." J Biol Chem **279**(27): 28419-25.
- Cheng, Z. J., R. D. Singh, et al. (2006). "Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids." Mol Membr Biol **23**(1): 101-10.
- Cherepanov, P., G. Maertens, et al. (2003). "HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells." J Biol Chem **278**(1): 372-81.

- Chertova, E., O. Chertov, et al. (2006). "Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages." J Virol **80**(18): 9039-52.
- Chesebro, B., R. Buller, et al. (1990). "Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells." J Virol **64**(1): 215-21.
- Chitnis, A., D. Rawls, et al. (2000). "Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa?" AIDS Res Hum Retroviruses **16**(1): 5-8.
- Chow, A., D. Toomre, et al. (2002). "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane." Nature **418**(6901): 988-94.
- Cimarelli, A., S. Sandin, et al. (2000). "Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA." J Virol **74**(7): 3046-57.
- Ciuffi, A., M. Llano, et al. (2005). "A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration." Nat Med **11**(12): 1287-9.
- Clapham, P. R., D. Blanc, et al. (1991). "Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus." Virology **181**(2): 703-15.
- Clark, S. J., M. S. Saag, et al. (1991). "High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection." N Engl J Med **324**(14): 954-60.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-6.
- Clavel, F., M. Guyader, et al. (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2." Nature **324**(6098): 691-5.
- Cohen, E. A., G. Dehni, et al. (1990). "Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein." J Virol **64**(6): 3097-9.

- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, et al. (1988). "Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1." Nature **334**(6182): 532-4.
- Collins, B. M., A. J. McCoy, et al. (2002). "Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex." Cell **109**(4): 523-35.
- Collins, K. L., B. K. Chen, et al. (1998). "HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes." Nature **391**(6665): 397-401.
- Collins, R. F., A. D. Schreiber, et al. (2002). "Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis." J Immunol **169**(6): 3250-6.
- Connor, R. I., B. K. Chen, et al. (1995). "Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes." Virology **206**(2): 935-44.
- Consortium, T. M. S. (1999). "Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium." Nature **401**(6756): 921-3.
- Conte, M. R. and S. Matthews (1998). "Retroviral matrix proteins: a structural perspective." Virology **246**(2): 191-8.
- Cooper, A. and Y. Shaul (2006). "Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles." J Biol Chem **281**(24): 16563-9.
- Cooper, D. A., A. A. Imrie, et al. (1987). "Antibody response to human immunodeficiency virus after primary infection." J Infect Dis **155**(6): 1113-8.
- Coppolino, M. G., R. Dierckman, et al. (2002). "Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis." J Biol Chem **277**(46): 43849-57.
- Cosson, P. (1996). "Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1." Embo J **15**(21): 5783-8.

- Costa, L. J., N. Chen, et al. (2006). "Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1." Retrovirology **3**: 33.
- Courgnaud, V., X. Pourrut, et al. (2001). "Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family." J Virol **75**(2): 857-66.
- Courgnaud, V., M. Salemi, et al. (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**(16): 8298-309.
- Cox, D., D. J. Lee, et al. (2000). "A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 680-5.
- Craig, H. M., M. W. Pandori, et al. (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**(19): 11229-34.
- Craven, R. C., R. N. Harty, et al. (1999). "Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras." J Virol **73**(4): 3359-65.
- Craven, R. C., A. E. Leure-duPree, et al. (1995). "Genetic analysis of the major homology region of the Rous sarcoma virus Gag protein." J Virol **69**(7): 4213-27.
- Cresswell, P. (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." Cell **84**(4): 505-7.
- Crise, B., L. Buonocore, et al. (1990). "CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor." J Virol **64**(11): 5585-93.

- Cullen, B. R. (2006). "Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors." J Virol **80**(3): 1067-76.
- Daar, E. S., T. Moudgil, et al. (1991). "Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **324**(14): 961-4.
- Dagleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Damiani, M. T. and M. I. Colombo (2003). "Microfilaments and microtubules regulate recycling from phagosomes." Exp Cell Res **289**(1): 152-61.
- Damke, H., T. Baba, et al. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." J Cell Biol **127**(4): 915-34.
- Darlix, J. L., M. Lapadat-Tapolsky, et al. (1995). "First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses." J Mol Biol **254**(4): 523-37.
- Darlix, J. L., A. Vincent, et al. (1993). "Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA." C R Acad Sci III **316**(8): 763-71.
- Davidson, H. W. (1999). "Direct transport of newly synthesized HLA-DR from the trans-Golgi network to major histocompatibility complex class II containing compartments (MIICS) demonstrated using a novel tyrosine-sulfated chimera." J Biol Chem **274**(38): 27315-22.
- Deacon, N. J., A. Tsykin, et al. (1995). "Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients." Science **270**(5238): 988-91.
- Dean, M., M. Carrington, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." Science **273**(5283): 1856-62.

- Decroly, E., S. Benjannet, et al. (1997). "Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160." FEBS Lett **405**(1): 68-72.
- Decroly, E., M. Vandenbranden, 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**(16): 12240-7.
- Delaguillaumie, A., J. Harriague, et al. (2004). "Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation." J Cell Sci **117**(Pt 22): 5269-82.
- Dell'Angelica, E. C., H. Ohno, et al. (1997). "AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression." Embo J **16**(5): 917-28.
- Demirov, D. G. and E. O. Freed (2004). "Retrovirus budding." Virus Res **106**(2): 87-102.
- Demirov, D. G., A. Ono, et al. (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**(2): 955-60.
- Deneka, M., A. Pelchen-Matthews, et al. (2007). "In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53." J Cell Biol.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Deschambeault, J., J. P. Lalonde, et al. (1999). "Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission." J Virol **73**(6): 5010-7.
- Di, A., D. J. Nelson, et al. (2003). "Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages." Mol Biol Cell **14**(5): 2016-28.

- Dimitrov, D. S., R. L. Willey, et al. (1993). "Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics." J Virol **67**(4): 2182-90.
- Dingwall, C., I. Ernberg, et al. (1989). "Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6925-9.
- Dong, X., H. Li, et al. (2005). "AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly." Cell **120**(5): 663-74.
- Doranz, B. J., J. Rucker, et al. (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.
- Dorfman, T., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **68**(12): 8180-7.
- Dorfman, T., F. Mammano, et al. (1994). "Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein." J Virol **68**(3): 1689-96.
- Downes, C. P., A. Gray, et al. (2005). "Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking." Trends Cell Biol **15**(5): 259-68.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-52.
- Dubay, J. W., S. R. Dubay, et al. (1995). "Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation." J Virol **69**(8): 4675-82.
- Dugast, M., H. Toussaint, et al. (2005). "AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes." J Biol Chem **280**(20): 19656-64.

- Earl, P. L., B. Moss, et al. (1991). "Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." J Virol **65**(4): 2047-55.
- Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, et al. (2005). "Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding." J Biol Chem **280**(1): 628-36.
- Engelman, J. A., C. C. Wykoff, et al. (1997). "Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth." J Biol Chem **272**(26): 16374-81.
- Engelman, J. A., X. Zhang, et al. (1998). "Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy." Am J Hum Genet **63**(6): 1578-87.
- Esser, M. T., D. R. Graham, et al. (2001). "Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation." J Virol **75**(13): 6173-82.
- Este, J. A. and A. Telenti (2007). "HIV entry inhibitors." Lancet **370**(9581): 81-8.
- Ewart, G. D., T. Sutherland, et al. (1996). "The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels." J Virol **70**(10): 7108-15.
- Fackler, O. T., X. Lu, et al. (2000). "p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef." Mol Cell Biol **20**(7): 2619-27.
- Fackler, O. T., W. Luo, et al. (1999). "Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions." Mol Cell **3**(6): 729-39.
- Farjot, G., A. Sergeant, et al. (1999). "A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1." J Biol Chem **274**(24): 17309-17.

- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Finzi, A., A. Brunet, et al. (2006). "Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments." J Virol **80**(19): 9789-97.
- Fisher, R. D., H. Y. Chung, et al. (2007). "Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding." Cell **128**(5): 841-52.
- Fletcher, C. V. (2003). "Enfuvirtide, a new drug for HIV infection." Lancet **361**(9369): 1577-8.
- Ford, M. G., I. G. Mills, et al. (2002). "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin." Nature **419**(6905): 361-6.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1994). "Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae." J Biol Chem **269**(49): 30745-8.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-62.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem **67**: 1-25.
- Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology **251**(1): 1-15.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." Somat Cell Mol Genet **26**(1-6): 13-33.
- 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**(3): 1984-9.

- 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**(1): 341-51.
- Freed, E. O., D. J. Myers, et al. (1989). "Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160." J Virol **63**(11): 4670-5.
- Freed, E. O., D. J. Myers, et al. (1990). "Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4650-4.
- Fu, W., R. J. Gorelick, et al. (1994). "Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions." J Virol **68**(8): 5013-8.
- Furuta, R. A., C. T. Wild, et al. (1998). "Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41." Nat Struct Biol **5**(4): 276-9.
- Gabuzda, D., U. Olshevsky, et al. (1991). "Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor." J Acquir Immune Defic Syndr **4**(1): 34-40.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, et al. (1992). "Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins." J Virol **66**(6): 3306-15.
- Gaines, H., M. von Sydow, et al. (1987). "Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection." Lancet **1**(8544): 1249-53.
- Gaines, H., M. A. von Sydow, et al. (1990). "Immunological changes in primary HIV-1 infection." Aids **4**(10): 995-9.
- Gallay, P., T. Hope, et al. (1997). "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9825-30.

- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
- Gamble, T. R., S. Yoo, et al. (1997). "Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein." Science **278**(5339): 849-53.
- Ganesh, L., K. Leung, et al. (2004). "Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies." J Virol **78**(21): 11980-7.
- Ganser, B. K., S. Li, et al. (1999). "Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core." Science **283**(5398): 80-3.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*." Nature **397**(6718): 436-41.
- Garcia, E., M. Pion, et al. (2005). "HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse." Traffic **6**(6): 488-501.
- Garin, J., R. Diez, et al. (2001). "The phagosome proteome: insight into phagosome functions." J Cell Biol **152**(1): 165-80.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, et al. (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." Cell **107**(1): 55-65.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**(5): 587-97.
- Geleziunas, R., W. Xu, et al. (2001). "HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell." Nature **410**(6830): 834-8.

- Gervais, A., D. West, et al. (1997). "A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4653-8.
- Gilbert, J. M. and T. L. Benjamin (2000). "Early steps of polyomavirus entry into cells." J Virol **74**(18): 8582-8.
- Gitti, R. K., B. M. Lee, et al. (1996). "Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein." Science **273**(5272): 231-5.
- Gluschankof, P. and M. Suzan (2002). "HIV-1 gag polyprotein rescues HLA-DR intracellular transport in a human CD4+ cell line." Virology **300**(1): 160-9.
- Goff, A., L. S. Ehrlich, et al. (2003). "Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release." J Virol **77**(17): 9173-82.
- Goh, W. C., M. E. Rogel, et al. (1998). "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo." Nat Med **4**(1): 65-71.
- Gold, E. S., N. S. Morrissette, et al. (2000). "Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis." Immunity **12**(3): 285-92.
- Golub, T. and P. Caroni (2005). "PI(4,5)P₂-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility." J Cell Biol **169**(1): 151-65.
- Gorodinsky, A. and D. A. Harris (1995). "Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin." J Cell Biol **129**(3): 619-27.
- Gorski, J., P. Rollini, et al. (1984). "Molecular organization of the HLA-SB region of the human major histocompatibility complex and evidence for two SB beta-chain genes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(13): 3934-8.

- Goto, E., S. Ishido, et al. (2003). "c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity." J Biol Chem **278**(17): 14657-68.
- Gotthardt, D., H. J. Warnatz, et al. (2002). "High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases." Mol Biol Cell **13**(10): 3508-20.
- Gottlinger, H. G. (2001). "The HIV-1 assembly machine." Aids **15 Suppl 5**: S13-20.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (1993). "Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7381-5.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (1991). "Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3195-9.
- Gottwein, E., J. Bodem, et al. (2003). "The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release." J Virol **77**(17): 9474-85.
- Gottwein, E., S. Jager, et al. (2006). "Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect." J Virol **80**(13): 6267-75.
- Gottwein, E. and H. G. Krausslich (2005). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination." J Virol **79**(14): 9134-44.
- Gould, S. J., A. M. Booth, et al. (2003). "The Trojan exosome hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10592-7.
- Graham, D. R., E. Chertova, et al. (2003). "Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts." J Virol **77**(15): 8237-48.

- Greenberg, S., J. el Khoury, et al. (1991). "Ca²⁺-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages." J Cell Biol **113**(4): 757-67.
- Greenberg, S. and S. Grinstein (2002). "Phagocytosis and innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 136-45.
- Greenway, A. L., D. A. McPhee, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis." J Virol **76**(6): 2692-702.
- Grigorov, B., F. Arcanger, et al. (2006). "Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines." J Mol Biol **359**(4): 848-62.
- Gross, I., H. Hohenberg, et al. (1997). "In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus." Eur J Biochem **249**(2): 592-600.
- Gruenberg, J. and H. Stenmark (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 317-23.
- Gupta, P., R. Balachandran, et al. (1989). "Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody." J Virol **63**(5): 2361-5.
- Haffar, O. K., S. Popov, et al. (2000). "Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." J Mol Biol **299**(2): 359-68.
- Hallenberger, S., V. Bosch, et al. (1992). "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160." Nature **360**(6402): 358-61.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, et al. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." Science **226**(4674): 544-7.

- Hanna, Z., D. G. Kay, et al. (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." Cell **95**(2): 163-75.
- Harila, K., I. Prior, et al. (2006). "Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag." J Virol **80**(8): 3765-72.
- Harris, R. S., K. N. Bishop, et al. (2003). "DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection." Cell **113**(6): 803-9.
- Harrison, R. E., C. Bucci, et al. (2003). "Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP." Mol Cell Biol **23**(18): 6494-506.
- Harty, R. N., M. E. Brown, et al. (2000). "A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13871-6.
- Harty, R. N., J. Paragas, et al. (1999). "A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding." J Virol **73**(4): 2921-9.
- Hatzioannou, T., D. Perez-Caballero, et al. (2005). "Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells." J Virol **79**(1): 176-83.
- Hazuda, D. J., S. D. Young, et al. (2004). "Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques." Science **305**(5683): 528-32.
- He, J., S. Choe, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity." J Virol **69**(11): 6705-11.

- Heidecker, G., P. A. Lloyd, et al. (2004). "Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release." J Virol **78**(12): 6636-48.
- Helseth, E., U. Olshevsky, et al. (1990). "Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion." J Virol **64**(12): 6314-8.
- Hemler, M. E. (2005). "Tetraspanin functions and associated microdomains." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 801-11.
- Henderson, L. E., M. A. Bowers, et al. (1992). "Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences." J Virol **66**(4): 1856-65.
- Hermida-Matsumoto, L. and M. D. Resh (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55(gag) and p17MA." J Virol **73**(3): 1902-8.
- Hermida-Matsumoto, L. and M. D. Resh (2000). "Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging." J Virol **74**(18): 8670-9.
- 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.
- Hill, C. P., D. Worthylake, et al. (1996). "Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 3099-104.
- Himathongkham, S. and P. A. Luciw (1996). "Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells." Virology **219**(2): 485-8.

- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." Nature **374**(6518): 190-2.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, et al. (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." Nature **339**(6223): 389-92.
- Ho, D. D., T. R. Rota, et al. (1985). "Antibody to lymphadenopathy-associated virus in AIDS." N Engl J Med **312**(10): 649-50.
- Hofmann, K. and L. Falquet (2001). "A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems." Trends Biochem Sci **26**(6): 347-50.
- Hofmann, W., D. Schubert, et al. (1999). "Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection." J Virol **73**(12): 10020-8.
- Hogg, R. S., M. V. O'Shaughnessy, et al. (1997). "Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals." Lancet **349**(9061): 1294.
- Holevinsky, K. O. and D. J. Nelson (1998). "Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages." Biophys J **75**(5): 2577-86.
- Holmes, R. K., F. A. Koning, et al. (2007). "APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G." J Biol Chem **282**(4): 2587-95.
- Hooker, C. W. and D. Harrich (2003). "The first strand transfer reaction of HIV-1 reverse transcription is more efficient in infected cells than in cell-free natural endogenous reverse transcription reactions." J Clin Virol **26**(2): 229-38.
- Hovanessian, A. G., J. P. Briand, et al. (2004). "The caveolin-1 binding domain of HIV-1 glycoprotein gp41 is an efficient B cell epitope vaccine candidate against virus infection." Immunity **21**(5): 617-27.

- Hu, Q., I. Frank, et al. (2004). "Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue." J Exp Med **199**(8): 1065-75.
- Huang, M., J. M. Orenstein, et al. (1995). "p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease." J Virol **69**(11): 6810-8.
- Huang, Y., W. A. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-3.
- Huet, T., R. Cheynier, et al. (1990). "Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1." Nature **345**(6273): 356-9.
- Hwang, S. S., T. J. Boyle, et al. (1991). "Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1." Science **253**(5015): 71-4.
- Igakura, T., J. C. Stinchcombe, et al. (2003). "Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton." Science **299**(5613): 1713-6.
- Inoko, H., A. Ando, et al. (1985). "Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha." J Immunol **135**(3): 2156-9.
- Jacks, T., M. D. Power, et al. (1988). "Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression." Nature **331**(6153): 280-3.
- Jacotot, E., L. Ravagnan, et al. (2000). "The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore." J Exp Med **191**(1): 33-46.
- Jameson, S. C., K. A. Hogquist, et al. (1995). "Positive selection of thymocytes." Annu Rev Immunol **13**: 93-126.
- Jiang, M., J. Mak, et al. (1993). "Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1." J Virol **67**(6): 3246-53.

- Johnson, D. C. and M. T. Huber (2002). "Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread." J Virol **76**(1): 1-8.
- Johnson, M. C., H. M. Scobie, et al. (2002). "Nucleic acid-independent retrovirus assembly can be driven by dimerization." J Virol **76**(22): 11177-85.
- Joki-Korpela, P., V. Marjomaki, et al. (2001). "Entry of human parechovirus 1." J Virol **75**(4): 1958-67.
- Jolly, C., K. Kashefi, et al. (2004). "HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse." J Exp Med **199**(2): 283-93.
- Jolly, C. and Q. J. Sattentau (2004). "Retroviral spread by induction of virological synapses." Traffic **5**(9): 643-50.
- 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**(18): 12088-94.
- Jolly, C. L., I. Mitar, et al. (2007). "Requirement for an intact T cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient HIV-1 assembly and spread." J Virol.
- Jones, T. A., G. Blaug, et al. (1990). "Assembly of gag-beta-galactosidase proteins into retrovirus particles." J Virol **64**(5): 2265-79.
- Joshi, A., K. Nagashima, et al. (2006). "Mutation of dileucine-like motifs in the human immunodeficiency virus type 1 capsid disrupts virus assembly, gag-gag interactions, gag-membrane binding, and virion maturation." J Virol **80**(16): 7939-51.
- Jouvenet, N., S. J. Neil, et al. (2006). "Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly." PLoS Biol **4**(12): e435.
- Jowett, J. B., V. Planelles, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle." J Virol **69**(10): 6304-13.
- Kaksonen, M., Y. Sun, et al. (2003). "A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization." Cell **115**(4): 475-87.

- Karacostas, V., E. J. Wolffe, et al. (1993). "Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles." Virology **193**(2): 661-71.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 893-905.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, et al. (2003). "Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting." J Cell Biol **162**(3): 413-23.
- Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, et al. (2006). "Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1." Science **313**(5786): 523-6.
- Kelly, A. P., J. J. Monaco, et al. (1991). "A new human HLA class II-related locus, DM." Nature **353**(6344): 571-3.
- Keppler, O. T., N. Tibroni, et al. (2006). "Modulation of specific surface receptors and activation sensitization in primary resting CD4+ T lymphocytes by the Nef protein of HIV-1." J Leukoc Biol **79**(3): 616-27.
- Kerr, L. D., J. Inoue, et al. (1991). "The rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation." Genes Dev **5**(8): 1464-76.
- Khorchid, A., R. Halwani, et al. (2002). "Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction." J Virol **76**(8): 4131-7.
- Kikonyogo, A., F. Bouamr, et al. (2001). "Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11199-204.

- Kilby, J. M., S. Hopkins, et al. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nat Med **4**(11): 1302-7.
- Kim, S. Y., R. Byrn, et al. (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression." J Virol **63**(9): 3708-13.
- Kino, T., A. Gragerov, et al. (1999). "The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor." J Exp Med **189**(1): 51-62.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005). "Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers." Biochim Biophys Acta **1745**(3): 273-86.
- Kleijmeer, M. J., S. Morkowski, et al. (1997). "Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments." J Cell Biol **139**(3): 639-49.
- Klimkait, T., K. Strebel, et al. (1990). "The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release." J Virol **64**(2): 621-9.
- Klotman, M. E., S. Kim, et al. (1991). "Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 5011-5.
- Kondo, E. and H. G. Gottlinger (1996). "A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr." J Virol **70**(1): 159-64.
- Korber, B., B. Gaschen, et al. (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." Br Med Bull **58**: 19-42.

- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." J Virol **68**(7): 4650-5.
- Kramer, B., A. Pelchen-Matthews, et al. (2005). "HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 136-42.
- Krausslich, H. G., M. Facke, et al. (1995). "The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity." J Virol **69**(6): 3407-19.
- Krizanova, O., F. Ciampor, et al. (1982). "Influence of chlorpromazine on the replication of influenza virus in chick embryo cells." Acta Virol **26**(4): 209-16.
- Kropshofer, H., S. O. Arndt, et al. (1997). "HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH." Immunity **6**(3): 293-302.
- Kropshofer, H., S. Spindeldreher, et al. (2002). "Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes." Nat Immunol **3**(1): 61-8.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, et al. (1998). "A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules." Embo J **17**(11): 2971-81.
- Kurzchalia, T. V., P. Dupree, et al. (1992). "VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles." J Cell Biol **118**(5): 1003-14.
- Lai, M., E. S. Zimmerman, et al. (2005). "Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo." J Virol **79**(24): 15443-51.
- Lama, J., A. Mangasarian, et al. (1999). "Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner." Curr Biol **9**(12): 622-31.

- Langelier, C., U. K. von Schwedler, et al. (2006). "Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release." J Virol **80**(19): 9465-80.
- Laufer, T. M., J. DeKoning, et al. (1996). "Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex." Nature **383**(6595): 81-5.
- Le Blanc, I., M. C. Prevost, et al. (2002). "The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process." J Virol **76**(19): 10024-9.
- Le, P. U., G. Guay, et al. (2002). "Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **277**(5): 3371-9.
- Le Rouzic, E., N. Belaidouni, et al. (2007). "HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase." Cell Cycle **6**(2): 182-8.
- Lee, J. S., J. Trowsdale, et al. (1982). "Sequence of an HLA-DR alpha-chain cDNA clone and intron-exon organization of the corresponding gene." Nature **299**(5885): 750-2.
- Lemp, G. F., S. F. Payne, et al. (1990). "Survival trends for patients with AIDS." Jama **263**(3): 402-6.
- Lemp, G. F., S. F. Payne, et al. (1990). "Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco." Jama **263**(11): 1497-501.
- Lenburg, M. E. and N. R. Landau (1993). "Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4." J Virol **67**(12): 7238-45.
- Leonard, J., C. Parrott, et al. (1989). "The NF-kappa B binding sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are not required for virus infectivity." J Virol **63**(11): 4919-24.

- Leverrier, Y., K. Okkenhaug, et al. (2003). "Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages." *J Biol Chem* **278**(40): 38437-42.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (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**(30): 28346-53.
- Levy, J. A. (1993). "Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection." *Microbiol Rev* **57**(1): 183-289.
- Levy, S. and T. Shoham (2005). "The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes." *Nat Rev Immunol* **5**(2): 136-48.
- Li, Y., P. M. Flanagan, et al. (1994). "RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection." *Science* **263**(5148): 805-7.
- Liao, W. H. and C. T. Wang (2004). "Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Pr160 gag-pol mutants with truncations downstream of the protease domain." *Virology* **329**(1): 180-8.
- Liao, Z., D. R. Graham, et al. (2003). "Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells." *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**(8): 675-87.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2001). "Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains." *J Virol* **75**(17): 7913-24.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies." *J Virol* **78**(11): 6013-23.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367-77.
- Llano, M., D. T. Saenz, et al. (2006). "An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration." *Science* **314**(5798): 461-4.

- Lobie, P. E., R. Sadir, et al. (1999). "Caveolar internalization of growth hormone." Exp Cell Res **246**(1): 47-55.
- Lodge, R., L. Delamarre, et al. (1997). "Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein." J Virol **71**(7): 5696-702.
- Lodge, R., H. Gottlinger, et al. (1994). "The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells." J Virol **68**(8): 4857-61.
- Lodge, R., J. P. Lalonde, et al. (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**(4): 695-705.
- Lopez-Verges, S., G. Camus, et al. (2006). "Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(40): 14947-52.
- Lu, H., L. Zawel, et al. (1992). "Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II." Nature **358**(6388): 641-5.
- Lu, X., X. Wu, et al. (1996). "CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1." Curr Biol **6**(12): 1677-84.
- Lu, Y. L., P. Spearman, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions." J Virol **67**(11): 6542-50.
- Luban, J., K. L. Bossolt, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B." Cell **73**(6): 1067-78.
- Macia, E., M. Ehrlich, et al. (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Dev Cell **10**(6): 839-50.

- Madani, N. and D. Kabat (1998). "An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein." J Virol **72**(12): 10251-5.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." Cell **47**(3): 333-48.
- Madrid, R., K. Janvier, et al. (2005). "Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity." J Biol Chem **280**(6): 5032-44.
- Madhus, I. H., K. Sandvig, et al. (1987). "Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornaviruses." J Cell Physiol **131**(1): 14-22.
- Mak, J., M. Jiang, et al. (1994). "Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles." J Virol **68**(4): 2065-72.
- Maldonado-Baez, L. and B. Wendland (2006). "Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators." Trends Cell Biol **16**(10): 505-13.
- Malim, M. H. and B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency." Cell **65**(2): 241-8.
- Mammano, F., A. Ohagen, et al. (1994). "Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis." J Virol **68**(8): 4927-36.
- Mancebo, H. S., G. Lee, et al. (1997). "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro." Genes Dev **11**(20): 2633-44.
- Mangeat, B., P. Turelli, et al. (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." Nature **424**(6944): 99-103.

- Mansky, L. M. (1996). "The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene." Virology **222**(2): 391-400.
- Mansky, L. M., S. Preveral, et al. (2000). "The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate." J Virol **74**(15): 7039-47.
- Marassi, F. M., C. Ma, et al. (1999). "Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14336-41.
- Margottin, F., S. P. Bour, et al. (1998). "A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif." Mol Cell **1**(4): 565-74.
- Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." Cell **114**(1): 21-31.
- Mariani, R. and J. Skowronski (1993). "CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5549-53.
- Marjomaki, V., V. Pietiainen, et al. (2002). "Internalization of echovirus 1 in caveolae." J Virol **76**(4): 1856-65.
- Martin, G., Y. Beausejour, et al. (2005). "Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles." Virology **335**(2): 286-90.
- Martin-Serrano, J., S. W. Eastman, et al. (2005). "HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway." J Cell Biol **168**(1): 89-101.
- Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, et al. (2004). "Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding." J Virol **78**(11): 5554-63.
- Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, et al. (2003). "Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using

- alternative adaptor proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12414-9.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2001). "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress." Nat Med **7**(12): 1313-9.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2003). "Role of ESCRT-I in retroviral budding." J Virol **77**(8): 4794-804.
- Massiah, M. A., M. R. Starich, et al. (1994). "Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein." J Mol Biol **244**(2): 198-223.
- Matsuki, Y., M. Ohmura-Hoshino, et al. (2007). "Novel regulation of MHC class II function in B cells." Embo J **26**(3): 846-54.
- Matthews, T., M. Salgo, et al. (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 215-25.
- May, R. C. and L. M. Machesky (2001). "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1061-77.
- McCormick, P. J., J. A. Martina, et al. (2005). "Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7910-5.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, et al. (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." Cell **53**(1): 55-67.
- McDonald, D., L. Wu, et al. (2003). "Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions." Science **300**(5623): 1295-7.
- McLaughlin, S. and D. Murray (2005). "Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics." Nature **438**(7068): 605-11.
- McNiven, M. A. (1998). "Dynamin: a molecular motor with pinchase action." Cell **94**(2): 151-4.

- McNiven, M. A., H. Cao, et al. (2000). "The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places." Trends Biochem Sci **25**(3): 115-20.
- Meyerholz, A., L. Hinrichsen, et al. (2005). "Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation." Traffic **6**(12): 1225-34.
- Minshall, R. D., C. Tiruppathi, et al. (2000). "Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway." J Cell Biol **150**(5): 1057-70.
- Miyauchi, K., J. Komano, et al. (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**(8): 4720-9.
- Momany, C., L. C. Kovari, et al. (1996). "Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein." Nat Struct Biol **3**(9): 763-70.
- Monaco, J. J. and H. O. McDevitt (1984). "H-2-linked low-molecular weight polypeptide antigens assemble into an unusual macromolecular complex." Nature **309**(5971): 797-9.
- Moris, A., C. Nobile, et al. (2004). "DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation." Blood **103**(7): 2648-54.
- Morita, E. and W. I. Sundquist (2004). "Retrovirus budding." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 395-425.
- Mousavi, S. A., L. Malerod, et al. (2004). "Clathrin-dependent endocytosis." Biochem J **377**(Pt 1): 1-16.
- 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**(8): 3548-54.
- 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**(1): 343-8.
- Murata, M., J. Peranen, et al. (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10339-43.
- Muriaux, D., S. Costes, et al. (2004). "Role of murine leukemia virus nucleocapsid protein in virus assembly." J Virol **78**(22): 12378-85.
- Muriaux, D., J. Mirro, et al. (2001). "RNA is a structural element in retrovirus particles." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5246-51.
- Muthumani, K., D. S. Hwang, et al. (2002). "HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells." J Biol Chem **277**(40): 37820-31.
- Nabavi, N., G. J. Freeman, et al. (1992). "Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression." Nature **360**(6401): 266-8.
- Nabi, I. R. and P. U. Le (2003). "Caveolae/raft-dependent endocytosis." J Cell Biol **161**(4): 673-7.
- Neil, S. J., S. W. Eastman, et al. (2006). "HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane." PLoS Pathog **2**(5): e39.
- Neville, M., F. Stutz, et al. (1997). "The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export." Curr Biol **7**(10): 767-75.
- Newman, E. N., R. K. Holmes, et al. (2005). "Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity." Curr Biol **15**(2): 166-70.
- Nguyen, D. G., A. Booth, et al. (2003). "Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway." J Biol Chem **278**(52): 52347-54.

- 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**(7): 3264-72.
- Niedergang, F., E. Colucci-Guyon, et al. (2003). "ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages." J Cell Biol **161**(6): 1143-50.
- Nieva, J. L., S. Nir, et al. (1994). "Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage." Biochemistry **33**(11): 3201-9.
- Nikko, E., A. M. Marini, et al. (2003). "Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway." J Biol Chem **278**(50): 50732-43.
- Nitahara-Kasahara, Y., M. Kamata, et al. (2007). "A novel nuclear import of Vpr promoted by importin {alpha} is crucial for HIV-1 replication in macrophages." J Virol.
- Nunn, M. F. and J. W. Marsh (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family." J Virol **70**(9): 6157-61.
- Nydegger, S., M. Foti, et al. (2003). "HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes." Traffic **4**(12): 902-10.
- Nydegger, S., S. Khurana, et al. (2006). "Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1." J Cell Biol **173**(5): 795-807.
- Odorizzi, C. G., I. S. Trowbridge, et al. (1994). "Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment." J Cell Biol **126**(2): 317-30.
- Odorizzi, G., D. J. Katzmann, et al. (2003). "Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1893-903.

- Ohkuma, Y. and R. G. Roeder (1994). "Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation." Nature **368**(6467): 160-3.
- Ohmura-Hoshino, M., E. Goto, et al. (2006). "A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases." J Biochem (Tokyo) **140**(2): 147-54.
- Ohmura-Hoshino, M., Y. Matsuki, et al. (2006). "Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR." J Immunol **177**(1): 341-54.
- Okada, K., J. M. Boss, et al. (1985). "Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(10): 3410-4.
- Olazabal, I. M., E. Caron, et al. (2002). "Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis." Curr Biol **12**(16): 1413-18.
- Ono, A., S. D. Ablan, et al. (2004). "Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14889-94.
- Ono, A., D. Demirov, et al. (2000). "Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding." J Virol **74**(11): 5142-50.
- Ono, A. and E. O. Freed (1999). "Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus." J Virol **73**(5): 4136-44.
- 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**(24): 13925-30.
- 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**(3): 1552-63.

- Ono, A., J. M. Orenstein, et al. (2000). "Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly." J Virol **74**(6): 2855-66.
- Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, et al. (1988). "Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study." J Virol **62**(8): 2578-86.
- Orentas, R. J. and J. E. Hildreth (1993). "Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(11): 1157-65.
- Ott, D. E., L. V. Coren, et al. (2003). "Retroviruses have differing requirements for proteasome function in the budding process." J Virol **77**(6): 3384-93.
- 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**(1): 97-103.
- Paillart, J. C. and H. G. Gottlinger (1999). "Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting." J Virol **73**(4): 2604-12.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." Cell **78**(5): 773-85.
- Pantaleo, G., J. F. Demarest, et al. (1994). "Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV." Nature **370**(6489): 463-7.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." Nature **362**(6418): 355-8.

- Parent, L. J., R. P. Bennett, et al. (1995). "Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins." J Virol **69**(9): 5455-60.
- Parton, R. G., B. Joggerst, et al. (1994). "Regulated internalization of caveolae." J Cell Biol **127**(5): 1199-215.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 185-94.
- Patel, J. C., A. Hall, et al. (2002). "Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcγR-mediated phagocytosis." Mol Biol Cell **13**(4): 1215-26.
- Patnaik, A., V. Chau, et al. (2000). "Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13069-74.
- Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, et al. (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." J Cell Biol **162**(3): 443-55.
- Pelkmans, L., T. Burli, et al. (2004). "Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic." Cell **118**(6): 767-80.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, et al. (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." Nat Cell Biol **3**(5): 473-83.
- Pelkmans, L., D. Puntener, et al. (2002). "Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae." Science **296**(5567): 535-9.
- Perez, M., R. C. Craven, et al. (2003). "The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12978-83.
- Perlman, M. and M. D. Resh (2006). "Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag." Traffic **7**(6): 731-45.

- Peters, P. J., J. J. Neefjes, et al. (1991). "Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments." Nature **349**(6311): 669-76.
- Phillips, D. M. (1994). "The role of cell-to-cell transmission in HIV infection." Aids **8**(6): 719-31.
- Pho, M. T., A. Ashok, et al. (2000). "JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis." J Virol **74**(5): 2288-92.
- Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. (1993). "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." Science **259**(5102): 1749-54.
- Pieters, J., O. Bakke, et al. (1993). "The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail." J Cell Sci **106 (Pt 3)**: 831-46.
- Piller, S. C., J. W. Dubay, et al. (2000). "Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity." J Virol **74**(24): 11717-23.
- Pohlmann, S., E. J. Soilleux, et al. (2001). "DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2670-5.
- Pol, A., M. Calvo, et al. (1999). "The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21)." Hepatology **29**(6): 1848-57.
- Polo, S., S. Sigismund, et al. (2002). "A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins." Nature **416**(6879): 451-5.

- Poon, B., K. Grovit-Ferbas, et al. (1998). "Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents." Science **281**(5374): 266-9.
- Poon, B., J. B. Jowett, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard." J Virol **71**(5): 3961-71.
- Poon, D. T., L. V. Coren, et al. (2000). "Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging." J Virol **74**(8): 3918-23.
- Pornillos, O., S. L. Alam, et al. (2002). "Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein." Nat Struct Biol **9**(11): 812-7.
- Pornillos, O., J. E. Garrus, et al. (2002). "Mechanisms of enveloped RNA virus budding." Trends Cell Biol **12**(12): 569-79.
- Pornillos, O., D. S. Higginson, et al. (2003). "HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein." J Cell Biol **162**(3): 425-34.
- Puffer, B. A., L. J. Parent, et al. (1997). "Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein." J Virol **71**(9): 6541-6.
- Purcell, D. F. and M. A. Martin (1993). "Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity." J Virol **67**(11): 6365-78.
- Raposo, G., M. Moore, et al. (2002). "Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments." Traffic **3**(10): 718-29.
- Re, F., D. Braaten, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B." J Virol **69**(11): 6859-64.

- Reicin, A. S., G. Kalpana, et al. (1995). "Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration." J Virol **69**(9): 5904-7.
- Resh, M. D. (2004). "A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(2): 417-8.
- Resh, M. D. (2005). "Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles." AIDS Rev **7**(2): 84-91.
- Richman, D. D. (2001). "HIV chemotherapy." Nature **410**(6831): 995-1001.
- Richterova, Z., D. Liebl, et al. (2001). "Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei." J Virol **75**(22): 10880-91.
- Riese, R. J. and H. A. Chapman (2000). "Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation." Curr Opin Immunol **12**(1): 107-13.
- Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." Mol Biol Cell **10**(4): 961-74.
- Rose, K. M., M. Marin, et al. (2005). "Regulated production and anti-HIV type 1 activities of cytidine deaminases APOBEC3B, 3F, and 3G." AIDS Res Hum Retroviruses **21**(7): 611-9.
- Rosen, C. A., E. Terwilliger, et al. (1988). "Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2071-5.
- Rosenberg, Z. F. and A. S. Fauci (1989). "The immunopathogenesis of HIV infection." Adv Immunol **47**: 377-431.
- Roshal, M., B. Kim, et al. (2003). "Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R." J Biol Chem **278**(28): 25879-86.
- Ross, T. M. and B. R. Cullen (1998). "The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in

- conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7682-6.
- Ross, T. M., A. E. Oran, et al. (1999). "Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein." Curr Biol **9**(12): 613-21.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-82.
- Rous, B. A., B. J. Reaves, et al. (2002). "Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes." Mol Biol Cell **13**(3): 1071-82.
- Roy, J., G. Martin, et al. (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**(8): 4779-88.
- Roy, S., U. Delling, et al. (1990). "A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation." Genes Dev **4**(8): 1365-73.
- Rudner, L., S. Nydegger, et al. (2005). "Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling." J Virol **79**(7): 4055-65.
- Rupper, A., B. Grove, et al. (2001). "Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2449-60.
- Saad, J. S., E. Loeliger, et al. (2006). "Point Mutations in the HIV-1 Matrix Protein Turn Off the Myristyl Switch." J Mol Biol.
- Saad, J. S., J. Miller, et al. (2006). "Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11364-9.
- Sakaida, H., T. Hori, et al. (1998). "T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection." J Virol **72**(12): 9763-70.

- Sakurai, A., J. Yasuda, et al. (2004). "Regulation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4." Microbes Infect **6**(2): 150-6.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
- Sandefur, S., R. M. Smith, et al. (2000). "Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag)." J Virol **74**(16): 7238-49.
- Sandefur, S., V. Varthakavi, et al. (1998). "The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag." J Virol **72**(4): 2723-32.
- Sato, H., J. Orenstein, et al. (1992). "Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles." Virology **186**(2): 712-24.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." J Exp Med **174**(2): 407-15.
- Sawaya, B. E., K. Khalili, et al. (1998). "Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription." J Biol Chem **273**(32): 20052-7.
- Sayah, D. M., E. Sokolskaja, et al. (2004). "Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1." Nature **430**(6999): 569-73.
- Schindler, M., S. Wurfl, et al. (2003). "Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles." J Virol **77**(19): 10548-56.

- Schmidt, A., M. Wolde, et al. (1999). "Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid." Nature **401**(6749): 133-41.
- Schmitt, A. P., G. P. Leser, et al. (2005). "Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus." J Virol **79**(5): 2988-97.
- Schols, D., R. Pauwels, et al. (1992). "Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis." Virology **189**(1): 374-6.
- Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.
- Schrofelbauer, B., Y. Hakata, et al. (2007). "HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 4130-5.
- Schrofelbauer, B., Q. Yu, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases." J Virol **79**(17): 10978-87.
- Schubert, U., S. Bour, et al. (1996). "The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains." J Virol **70**(2): 809-19.
- Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, et al. (1996). "Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells." FEBS Lett **398**(1): 12-8.
- Schubert, U., D. E. Ott, et al. (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**(24): 13057-62.
- Schwartz, O., V. Marechal, et al. (1996). "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein." Nat Med **2**(3): 338-42.

- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1990). "Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **64**(6): 2519-29.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1990). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs." J Virol **64**(11): 5448-56.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1992). "Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs." Mol Cell Biol **12**(1): 207-19.
- Sever, S., H. Damke, et al. (2000). "Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis." J Cell Biol **150**(5): 1137-48.
- Sharma, D. K., J. C. Brown, et al. (2005). "The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis." Cancer Res **65**(18): 8233-41.
- Sharma, D. K., J. C. Brown, et al. (2004). "Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol." Mol Biol Cell **15**(7): 3114-22.
- Sharma, D. K., A. Choudhury, et al. (2003). "Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling." J Biol Chem **278**(9): 7564-72.
- Sharma, P., R. Varma, et al. (2004). "Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes." Cell **116**(4): 577-89.
- Sharova, N., C. Swingle, et al. (2005). "Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans." Embo J.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-50.

- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2003). "The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif." Nat Med **9**(11): 1404-7.
- Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." Traffic **4**(11): 785-801.
- Shih, S. C., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis." Nat Cell Biol **4**(5): 389-93.
- Shin, J. S., M. Ebersold, et al. (2006). "Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination." Nature **444**(7115): 115-8.
- Shioda, T., J. A. Levy, et al. (1991). "Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene." Nature **349**(6305): 167-9.
- Sieczkarski, S. B. and G. R. Whittaker (2002). "Dissecting virus entry via endocytosis." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1535-45.
- Siekevitz, M., S. F. Josephs, et al. (1987). "Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I." Science **238**(4833): 1575-8.
- Silvie, O., S. Charrin, et al. (2006). "Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites." J Cell Sci **119**(Pt 10): 1992-2002.
- Simon, J. H., N. C. Gaddis, et al. (1998). "Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype." Nat Med **4**(12): 1397-400.
- Simon, J. H. and M. H. Malim (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes." J Virol **70**(8): 5297-305.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.

- Skowronski, J., D. Parks, et al. (1993). "Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene." Embo J **12**(2): 703-13.
- Sodroski, J., W. C. Goh, et al. (1986). "A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication." Nature **321**(6068): 412-7.
- Sokolskaja, E., D. M. Sayah, et al. (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **78**(23): 12800-8.
- Sol-Foulon, N., A. Moris, et al. (2002). "HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread." Immunity **16**(1): 145-55.
- Sottile, J. and J. Chandler (2005). "Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process." Mol Biol Cell **16**(2): 757-68.
- Sourisseau, M., N. Sol-Foulon, et al. (2007). "Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes." J Virol **81**(2): 1000-12.
- South, T. L. and M. F. Summers (1993). "Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC." Protein Sci **2**(1): 3-19.
- Spies, T., R. Sorrentino, et al. (1985). "Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 5165-9.
- Spira, A. I., P. A. Marx, et al. (1996). "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques." J Exp Med **183**(1): 215-25.

- Springael, J. Y., E. Nikko, et al. (2002). "Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking." FEBS Lett **517**(1-3): 103-9.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, et al. (1986). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS." Cell **45**(5): 637-48.
- Stephens, L., C. Ellson, et al. (2002). "Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis." Curr Opin Cell Biol **14**(2): 203-13.
- Stern, L. J., J. H. Brown, et al. (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." Nature **368**(6468): 215-21.
- Stewart, S. A., B. Poon, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest." J Virol **71**(7): 5579-92.
- Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, et al. (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." Traffic **3**(5): 321-30.
- Stopak, K., C. de Noronha, et al. (2003). "HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability." Mol Cell **12**(3): 591-601.
- St-Pierre, Y., N. Nabavi, et al. (1989). "A functional role for signal transduction via the cytoplasmic domains of MHC class II proteins." J Immunol **143**(3): 808-12.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2000). "A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13063-8.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2003). "AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding." Cell **114**(6): 689-99.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2002). "Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis." J Virol **76**(11): 5472-9.

- Strebel, K., T. Klimkait, et al. (1988). "A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product." Science **241**(4870): 1221-3.
- Strecker, T., R. Eichler, et al. (2003). "Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]." J Virol **77**(19): 10700-5.
- Stremlau, M., C. M. Owens, et al. (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." Nature **427**(6977): 848-53.
- Stuchell, M. D., J. E. Garrus, et al. (2004). "The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding." J Biol Chem **279**(34): 36059-71.
- Stumptner-Cuvelette, P., M. Jouve, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Biol Cell **14**(12): 4857-70.
- Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, et al. (2001). "HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12144-9.
- Subbramanian, R. A., A. Kessous-Elbaz, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages." J Exp Med **187**(7): 1103-11.
- Subbramanian, R. A., X. J. Yao, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity." J Mol Biol **278**(1): 13-30.
- Subtil, A., I. Gaidarov, et al. (1999). "Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6775-80.

- Suspene, R., P. Sommer, et al. (2004). "APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase." Nucleic Acids Res **32**(8): 2421-9.
- Suzuki, Y. and R. Craigie (2007). "The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses." Nat Rev Microbiol **5**(3): 187-96.
- Swanson, C. M., B. A. Puffer, et al. (2004). "Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly." Embo J **23**(13): 2632-40.
- Swingler, S., B. Brichacek, et al. (2003). "HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection." Nature **424**(6945): 213-9.
- Swingler, S., A. Mann, et al. (1999). "HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages." Nat Med **5**(9): 997-103.
- Tagawa, A., A. Mezzacasa, et al. (2005). "Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters." J Cell Biol **170**(5): 769-79.
- Tan, K., J. Liu, et al. (1997). "Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12303-8.
- Tang, S., T. Murakami, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants containing cores with abnormally high levels of capsid protein and virtually no reverse transcriptase." J Virol **77**(23): 12592-602.
- Taura, T., H. Krebber, et al. (1998). "A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7427-32.
- Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, et al. (1989). "Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5163-7.

- Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." *Nature* **372**(6504): 363-5.
- Thali, M., J. P. Moore, et al. (1993). "Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding." *J Virol* **67**(7): 3978-88.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, et al. (2002). "Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking." *Mol Biol Cell* **13**(1): 238-50.
- Thomson, M. M. and R. Najera (2005). "Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update." *AIDS Rev* **7**(4): 210-24.
- Tiganos, E., J. Friborg, et al. (1998). "Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." *Virology* **251**(1): 96-107.
- Tiganos, E., X. J. Yao, et al. (1997). "Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule." *J Virol* **71**(6): 4452-60.
- Tiruppathi, C., W. Song, et al. (1997). "Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway." *J Biol Chem* **272**(41): 25968-75.
- Tonnelle, C., R. DeMars, et al. (1985). "DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression." *Embo J* **4**(11): 2839-47.
- Traub, L. M. (2003). "Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection." *J Cell Biol* **163**(2): 203-8.
- Tristem, M., C. Marshall, et al. (1992). "Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr." *Embo J* **11**(9): 3405-12.
- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* **288**(5465): 522-7.

- Turville, S. G., J. J. Santos, et al. (2004). "Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells." Blood **103**(6): 2170-9.
- Unternaehrer, J. J., A. Chow, et al. (2007). "The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 234-9.
- van Ham, M., M. van Lith, et al. (2000). "Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO." J Exp Med **191**(7): 1127-36.
- Varthakavi, V., R. M. Smith, et al. (2003). "Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15154-9.
- Verli, H., A. Calazans, et al. (2006). "Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures." J Mol Graph Model.
- VerPlank, L., F. Bouamr, et al. (2001). "Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7724-9.
- Vieira, H. L., D. Haouzi, et al. (2000). "Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator." Cell Death Differ **7**(12): 1146-54.
- Vilhardt, F., O. Plastre, et al. (2002). "The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation." J Biol Chem **277**(44): 42136-43.
- Villadangos, J. A., R. J. Riese, et al. (1997). "Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism." J Exp Med **186**(4): 549-60.
- Vincent, M. J. and M. Abdul Jabbar (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a potential regulator of proteolysis and

- protein transport in the mammalian secretory pathway." Virology **213**(2): 639-49.
- Vincent, M. J., N. U. Raja, et al. (1993). "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 **67**(9): 5538-49.
- Vincent, P., E. Priceputu, et al. (2006). "Activation of p21-activated kinase 2 and its association with Nef are conserved in murine cells but are not sufficient to induce an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice." J Biol Chem **281**(11): 6940-54.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, et al. (1996). "Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9724-9.
- von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, et al. (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**(15): 6992-6.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, et al. (2003). "The protein network of HIV budding." Cell **114**(6): 701-13.
- Wang, H., N. J. Machesky, et al. (2004). "Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release." J Virol **78**(3): 1503-12.
- Wang, L., S. Mukherjee, et al. (1995). "Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat." J Biol Chem **270**(43): 25564-9.
- Wang, L. H., K. G. Rothberg, et al. (1993). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." J Cell Biol **123**(5): 1107-17.

- Ward, D. M., M. B. Vaughn, et al. (2005). "The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells." J Biol Chem **280**(11): 10548-55.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (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**(4): 451-62.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1997). "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." Nature **387**(6631): 426-30.
- Welman, M., G. Lemay, et al. (2007). "Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex." Virus Res **124**(1-2): 103-12.
- Welsch, S., O. T. Keppler, et al. (2007). "HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages." PLoS Pathog **3**(3): e36.
- White, J. M. (1992). "Membrane fusion." Science **258**(5084): 917-24.
- Wiegand, H. L., B. P. Doehle, et al. (2004). "A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins." Embo J **23**(12): 2451-8.
- Wieggers, K., G. Rutter, et al. (1999). "Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid." Virology **257**(1): 261-74.
- Wiley, R. D. and S. Gummuluru (2006). "Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 738-43.
- Wilk, T., T. Pfeiffer, et al. (1996). "Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain." Virology **218**(1): 269-74.

- Willey, R. L., J. S. Bonifacino, et al. (1988). "Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9580-4.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." J Virol **66**(1): 226-34.
- Wilson, W., M. Braddock, et al. (1988). "HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems." Cell **55**(6): 1159-69.
- Wolfe, N. D., W. M. Switzer, et al. (2004). "Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters." Lancet **363**(9413): 932-7.
- Wyand, M. S., D. J. Ringler, et al. (1989). "Cellular localization of simian immunodeficiency virus in lymphoid tissues. II. In situ hybridization." Am J Pathol **134**(2): 385-93.
- Xu, X. N., B. Laffert, et al. (1999). "Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain." J Exp Med **189**(9): 1489-96.
- Yamada, E. (1955). "The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse." J Biophys Biochem Cytol **1**(5): 445-58.
- Yao, X. J., J. Friberg, et al. (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**(2): 615-23.
- Yao, X. J., A. J. Mouland, et al. (1998). "Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells." J Virol **72**(6): 4686-93.
- Yasuda, J. and E. Hunter (1998). "A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release." J Virol **72**(5): 4095-103.

- Yu, Q., R. Konig, et al. (2004). "Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 435-42.
- Yu, X., Y. Yu, et al. (2003). "Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex." Science **302**(5647): 1056-60.
- Yu, X., X. Yuan, et al. (1992). "The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions." J Virol **66**(8): 4966-71.
- Yuan, B., X. Li, et al. (1999). "Mutations altering the moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle." Embo J **18**(17): 4700-10.
- Yuan, X., Z. Matsuda, et al. (1990). "Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein." AIDS Res Hum Retroviruses **6**(11): 1265-71.
- Yuan, X., X. Yu, et al. (1993). "Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor." J Virol **67**(11): 6387-94.
- Zamborlini, A., Y. Usami, et al. (2006). "Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19140-5.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.
- Zhang, H., B. Yang, et al. (2003). "The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA." Nature **424**(6944): 94-8.
- Zhang, Y. and E. Barklis (1997). "Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation." J Virol **71**(9): 6765-76.

- Zhang, Y., H. Qian, et al. (1998). "Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain." J Virol **72**(3): 1782-9.
- Zhou, W. and M. D. Resh (1996). "Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein." J Virol **70**(12): 8540-8.

**CHAPITRE 8:
APPENDICE 1
(ARTICLE 4)**

Le but de ce travail était d'établir une nouvelle méthode de purification de la protéine Nef du VIH-1 afin de l'utiliser comme substrat pour identifier des peptides spécifiques à Nef, à l'aide de la technique dite « Phage-display ».

Ce travail, sous forme d'article fut publié dans The Journal of Virological Methods en juillet 2003. 111(1):69-73.

Journal of Virological Methods 111 (2003) 69-73

Short communication

**Two-step purification of His-tagged Nef protein in native condition
using heparin and immobilized metal ion affinity chromatographies**

Andrés Finzi, Jonathan Cloutier and Éric A. Cohen *

Laboratoire de Rétrovirologie Humaine, Département de Microbiologie et
Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128,
Succursale Centre-ville, Montreal, Que., Canada H3C 3J7

Received 9 January 2003; received in revised form 28 April 2003; accepted 28
April 2003

* Corresponding author. Tel.: 514-343-5967; fax: 514-343-5995.
E-mail address: [REDACTED] (E.A. Cohen).

Abstract

The Nef protein encoded by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been shown to be an important factor of progression of viral growth and pathogenesis in both in vitro and in vivo. The lack of a simple procedure to purify Nef in its native conformation has limited molecular studies on Nef function. A two-step procedure that includes heparin and immobilized metal ion affinity chromatographies (IMACs) was developed to purify His-tagged Nef (His(6)-Nef) expressed in bacteria in native condition. During the elaboration of this purification procedure, we identified two closely SDS-PAGE-migrating contaminating bacterial proteins, SlyD and GCHI, that co-eluted with His(6)-Nef in IMAC in denaturing condition and developed purification steps to eliminate these contaminants in native condition. Overall, this study describes a protocol that allows rapid purification of His(6)-Nef protein expressed in bacteria in native condition and that removes metal affinity resin-binding bacterial proteins that can contaminate recombinant His-tagged protein preparation.

Keywords: His-Nef; Heparin affinity chromatography; IMAC; Purification; SlyD; GCHI

Nef is a multifunctional protein of ~27 kDa encoded by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that has been shown to be an important determinant of progression of viral growth and pathogenesis. Nef downregulates expression of several T-cell receptors, enhances viral infectivity and production, and activates T-cells (Arold and Baur, 2001). Although this protein has been the subject of intense research, the molecular mechanisms underlying most of its functions are still not completely understood (Arold and Baur, 2001; Geyer et al., 2001). One of the aspects limiting molecular studies on Nef function is the lack of a high-level purification method for the protein in native condition. The development of a simple and rapid approach to purify recombinant Nef protein in native condition has the potential to facilitate structural and functional studies as well as the identification of new cellular or viral partners. Several studies have reported procedures to purify recombinant Nef. Glutathione-S-transferase (GST)-tagged Nef was purified to homogeneity in its native conformation using glutathione sepharose matrix. However, given the size of the GST tag and its potential effect on the overall protein structure, this approach requires a proteolytic cleavage step which can affect protein recovery (Lee et al., 1996). In contrast, Nef or His-tagged Nef (His(6)-Nef) was purified as such using heparin affinity column (Kohleisen et al., 1996) or immobilized metal ion affinity chromatographies (IMACs) (Federico et al., 2001), respectively. However, these procedures were carried out under denaturing conditions and required a refolding step during Nef purification (Kohleisen et al., 1996; Federico et al., 2001). This study describes a two-step purification approach that includes heparin and IMAC to purify His(6)-Nef protein expressed in bacteria in native conformation. A similar approach was successfully used previously to obtain a 14 800-fold enrichment of selenoprotein P from human plasma (Sidenius et al., 1999).

IMAC is a very powerful method for purifying recombinant proteins with histidine affinity tails in their native state or in denaturing conditions. In

contrast to GST tag, the relatively small size of His tails have, in general, minimal effects on the overall structure and biological functions of proteins (Lindner et al., 1992; Oswald et al., 1994; Janknecht et al., 1997). The nef gene encoded by the pNL4-3 HIV-1 infectious molecular clone (Adachi et al., 1986) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the upstream primer 5'- TAAGATGGGATCCAAGTGGTCAA-3' and the downstream primer 5'- CCTTG TAGCGAGCTCGATGTC- 3'. The PCR product encoding Nef was digested with BamHI and SacI and cloned downstream of the T5 promoter/lac operator element, in-frame with the RGS (His)_x/6 tag into the 5'BamHI/3' SacI sites of the pQE 30 vector (Qiagen). Overproduction of His(6)-Nef was performed at 30 8C in Escherichia coli BL21 cells given that it was reported that large amounts of Nef become soluble when Nef-expressing bacteria are grown at 30 8C (Wolber et al., 1992). Nef expression was induced during 3 h by addition of 0.1 mM of isopropylthiogalactoside (IPTG) when bacterial cultures reached an OD of 0.6.

Initially, a one-step purification of His(6)-Nef using IMAC (TALON IMAC resin, Clontech) was attempted in native condition following the manufacturer protocol. Unfortunately, a strong protein background was obtained and attempts to eliminate it using increasing salt and imidazole concentrations were unsuccessful (data not shown). Purification of His(6)-Nef in denaturing conditions (8 M urea), using IMAC (TALON IMAC resin, Clontech) as reported (Federico et al., 2001) was attempted. Briefly, IPTG-induced bacteria were harvested and resuspended in 8 M urea, 50 mM sodium phosphate (pH 8.0), and 300 mM NaCl. After an ultrasonication step, the bacterial lysate was centrifuged 15 min at 10 000 _g and the His(6)-Nef-containing supernatant passed through a TALON IMAC resin. Proteins retained on the column were eluted in five equal fractions of 1 ml each containing 150 mM imidazole. Samples from the eluted preparations were separated by SDS-PAGE and analyzed by Coomassie blue staining. As shown

in Fig. 1A, lane 2, two major bands, 29 and 27 kDa, were detected. Only the 29 kDa band (Fig. 1B, lane 2) and the Nef protein cleaved from a GST-Nef fusion as described (Williams et al., 2002) (Fig. 1B, lane 4) reacted with a rabbit polyclonal Nef-specific antiserum (Zazopoulos and Haseltine, 1992) in standard Western blotting conditions (Mouland et al., 2002) indicating that the 29 kDa band corresponded to His(6)-Nef. To determine whether the 27 kDa protein corresponded to a protein that co-purified with His(6)-Nef as a complex or alternatively co-eluted with His(6)-Nef, non-transformed *E. coli* BL21 cells were IPTG-induced and treated using the same conditions described above. The lysate was applied to IMAC column and samples of the eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE. Interestingly, a protein band migrating at 27 kDa was detected in the eluted fractions (Fig. 1A, lane 1) indicating that the 27 kDa protein band initially observed using Nef-expressing *E. coli* BL21 cells, corresponded most likely to a bacterial contaminant presumably bound to the metal column that co-eluted with His(6)-Nef. The contaminant protein band was isolated from a Coomassie blue-stained SDS-PAGE, washed twice with 50% acetonitrile and analyzed by tandem mass spectrometry using LCQ DECA ion-trap mass spectrometer (ThermoFinnigan) in Dr. Steven Gygi's Mass Spectroscopy facility (Harvard Medical School). Two bacterial proteins were found to be associated with this 27 kDa band. One corresponded to SlyD (GenBank database accession number P30856), a protein that was also referred to as wondrous histidine-rich protein (WHP) (Wulfing et al., 1994). The second protein corresponded to GTP cyclohydrolase I (GCHI; GenBank database accession number P27511). SlyD (molecular weight: 20.8 kDa and apparent relative mass: 27 kDa) is the host protein required for *E. coli* lysis upon infection with bacteriophage fX174. SlyD was reported to have a rotamase (peptidylproline cis-trans-isomerase) activity and was shown recently to have a nucleotide binding property that is enhanced in the presence of transition metal ions (in particular Zn^{2+}) (Mitterauer et al., 1999). This is consistent with its affinity for metal ions: the

protein binds Ni^{2+} and Zn^{2+} tightly and Cu^{2+} and Co^{2+} with lower affinity (Wulfing et al., 1994). SlyD was shown previously to co-purify with His-tagged recombinant proteins in IMAC (Wulfing et al., 1994; Mitterauer et al., 1999; Scholz et al., 1999) presumably because of its COOH-terminal metal-binding motif that contains almost 30 potentially metal-binding amino acids (Wulfing et al., 1994).

The other contaminant, GCHI, has a molecular weight of 24.7 kDa and an apparent relative mass of 27.9 kDa. This enzyme catalyzes the conversion of GTP to dihydroneopterin triphosphate. To our knowledge, GCHI was never reported to co-purify with His-tagged proteins in IMAC. The enzyme contains only 10 histidines but three of them, located in the well-exposed C-terminal region (Auerbach and Nar, 1997), may bind cobalt ions. It is clear that given the affinity of GCHI to Talon-based cobalt resin, IMAC is certainly a procedure that could allow purification of GCHI. Despite the presence of 15 histidines in the metalbinding motif of SlyD, the anti-His antibody (RGS, Qiagen) did not react with the protein contaminant (Fig. 1C, lane 1). In contrast, this antibody recognized specifically the His-tag of His(6)-Nef protein in Western blotting (Fig. 1C, lanes 2 and 3) but as expected did not react with a Nef protein lacking a His-tag (Fig. 1C, lane 4).

In order to remove SlyD and GCHI from His(6)-Nef protein preparation, the heparin-binding activity of Nef (Kohleisen et al., 1996) was exploited. In contrast to the Kohleisen group, non-denaturing conditions were used to lyse bacteria and to solubilize Nef. A detailed protocol of His(6)-Nef purification in native condition is shown in Table 1. Briefly, pelleted bacteria were resuspended in a buffer containing 10 mM sodium phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche) (equilibration buffer 1). Lysis was accomplished by ultrasonication. Bacterial debris and insoluble aggregates were separated by centrifugation at 10 000 g for 15 min. Even though bacteria were grown at 30 °C, a significant proportion

of His(6)-Nef protein could not be solubilized and remained in the pellet fraction (Fig. 2A, lane 4). The His(6)-Nef-containing supernatant (Fig. 2A, lane 3) was passed onto a 1 ml heparin-sepharose column (Hi-TrapTM, Amersham Pharmacia Biotech) that was then extensively washed with 15 ml of equilibration buffer 1. His(6)-Nef protein was found to be retained by the heparin column since only trace amounts of the protein were detected in the flow-through fraction (Fig. 2A, compare lanes 3 and 5). Bound His(6)-Nef was eluted using increasing NaCl concentration. In agreement with Kohleisen et al. (1996), most of the recombinant protein eluted at NaCl concentration ranging between 200 and 300 mM (Fig. 2A, lanes 7 and 8). In contrast to the Kohleisen group, we could not purify Nef to homogeneity using solely heparin affinity chromatography (Fig. 2C, lane 1). Nef-containing fractions were pooled and applied onto a 2 ml cobalt-based IMAC resin first equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 250 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail EDTA-free (equilibration buffer 2). The column was washed with 15 ml of equilibration buffer 2 and 15 ml of the same buffer containing 5 mM imidazole. Almost all the His(6)-Nef proteins were retained by the IMAC column (Fig. 2B, compare lanes 1 and 2). Recombinant Nef was eluted in five equal fractions of 1 ml each containing 100 mM imidazole and assayed by Western blotting with an anti-Nef antibody (Fig. 2B, lanes 3-7; Fig. 1B, lane 3). The slight difference in migration observed between native and denatured Nef is likely due to the presence of urea in denatured sample, but not in native protein sample (Fig. 1B and C, compare lanes 2 and 3). The purity of His(6)-Nef protein preparations was evaluated densitometrically by Coomassie blue staining of SDS-PAGE and found to consistently reach approximately 95% (Fig. 2C, lanes 2-6). It is clear that the 27 kDa contaminating protein band was eliminated using this purification procedure (Fig. 1A, compare lanes 2 and 3; Fig. 2C, lanes 2-6). Routinely, 0.2 mg of pure His(6)-Nef was obtained from 0.5 l of bacterial suspension.

In conclusion, this protocol allows rapid purification of Nef protein without using denaturing conditions that could interfere with the structure of the protein, and thus does not require an *in vitro* refolding step. In addition, it prevents the co-elution of bacterial proteins that bind metal affinity resin and that as such has the potential to contaminate recombinant His-tagged protein preparation. Recombinant His(6)-Nef protein was recently used to screen a phage surface display of a randomly generated heptameric peptide library to select peptides binding Nef. Interestingly, several Nef-binding peptides were selected some of which shared perfect homology to binding domain of known cellular partner of Nef (Finzi and Cohen, in preparation). This data strongly suggest that recombinant His(6)-Nef protein purified using this two-step procedure retained some functionality and therefore will be useful to study further some of the fascinating mechanisms underlying Nef functions.

Acknowledgements

The authors would like to thank Martin Clement and Ghislaine Duisit for advice and assistance. This work was supported by grants from the CANVAC network of excellence, the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Fonds de la Recherche en Santé du Quebec (FRSQ) to EAC.

References

Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., Martin, M.A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59, 284-291.

Arold, S.T., Baur, A.S., 2001. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Biochem. Sci.* 26, 356-363.

Auerbach, G., Nar, H., 1997. The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *J. Biol. Chem.* 378, 185-192.

Federico, M., Percario, Z., Olivetta, E., Fiorucci, G., Muratori, C., Micheli, A., Romeo, G., Affabris, E., 2001. HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood* 98, 2752-2761.

Geyer, M., Fackler, O.T., Peterlin, M., 2001. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.* 2, 580-585.

Janknecht, R., De Martynhoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Hawkins, R.E., 1997. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8972.

Kohleisen, B., Gaedigk-Nitschko, K., Ohlmann, M., Gotz, E., Ostolaza, H., Goni, F.M., Erfle, V., 1996. Heparin-binding capacity of the HIV-1 Nef-

protein allows one-step purification and biochemical characterization. *J. Virol. Methods* 60, 89-101.

Lee, C.H., Saksela, K., Mirza, U.A., Chait, B.T., Kuriyan, J., 1996. Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with an Src family SH3 domain. *Cell* 85, 931-942.

Lindner, P., Guth, B., Wu" lding, C., Krebber, C., Steipe, B., Muller, F., Pluckthun, A., 1992. Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: a comparison of proteins and protocols. *Methods* 4, 41-56.

Mitterauer, T., Nanoff, C., Ahorn, H., Freissmuth, M., Hohenegger, M., 1999. Metal-dependent nucleotide binding to the *Escherichia coli* rotamase SlyD. *Biochem. J.* 342, 33-39.

Mouland, A.J., Coady, M., Yao, X.J., Cohen, E.A., 2002. Hypophosphorylation of poly(A) polymerase and increased polyadenylation activity are associated with human immunodeficiency virus type 1 Vpr expression. *Virology* 292, 321-330.

Oswald, T., Wende, W., Pingoud, A., Rinas, U., 1994. Comparison of N-terminal affinity fusion domains: effect on expression level and product heterogeneity of recombinant restriction endonuclease EcoRV. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 73-77.

Scholz, C., Maier, P., Dolinski, K., Heitman, J., Schmid, F.X., 1999. R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low

prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays. FEBS 443, 367-369.

Sidenius, U., Farver, O., Jons, O., Gammelgaard, B., 1999. Comparison of different transition metal ions for immobilized metal affinity chromatography of selenoprotein P from human plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 735, 85-91.

Williams, M., Roeth, J.F., Kasper, M.R., Fleis, R.I., Przybycin, C.G., Collins, K.L., 2002. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J. Virol.* 76, 12173-12184.

Wolber, V., Rensland, H., Brandmeier, B., Sagemann, M., Horrmann, R., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A., 1992. Expression, purification and biochemical characterization of the human immunodeficiency virus 1 nef gene product. *Eur. J. Biochem.* 205, 1115-1121.

Wulfing, C., Lombardero, J., Plu"ckthun, A., 1994. An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* 264, 2895-2901.

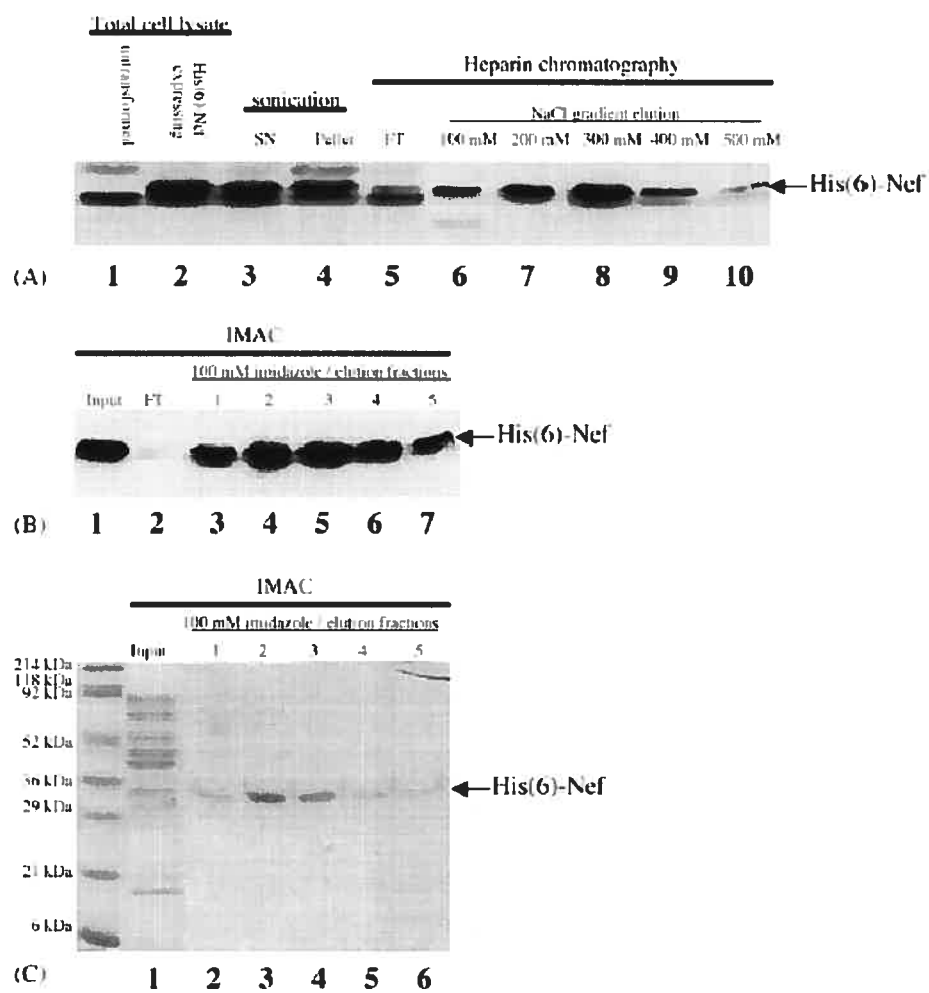
Zazopoulos, E., Haseltine, W.A., 1992. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Nef function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6634-6638.

Table 1
Two-step purification protocol of His(6)-Nef protein in native condition

-
- 1 Grow transformed bacteria (0.5 l) at 30 °C until bacterial culture reaches an OD of 0.6
 - 2 Induce His(6)-Nef expression during 3 h by addition of 0.1 mM IPTG
 - 3 Harvest bacteria by centrifugation at 3500 × *g* for 15 min at 4 °C
 - 4 Resuspend bacterial pellet in 20 ml of 10 mM sodium phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche) (equilibration buffer 1)
 - 5 Lyse cells by ultrasonication
 - 6 Centrifuge 15 min at 10 000 × *g* at 4 °C
 - 7 Pass supernatant through a 1 ml heparin-sepharose column (HiTrap™, Amersham Pharmacia Biotech)
 - 8 Wash column with 15 ml of equilibration buffer 1
 - 9 Elute His(6)-Nef protein using a 100–500 mM NaCl gradient. Most His(6)-Nef elute between 200 and 300 mM NaCl
 - 10 Pool His(6)-Nef-containing fractions and pass them through a 2 ml cobalt-based IMAC resin, first equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 250 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail EDTA-free (equilibration buffer 2)
 - 11 Wash the IMAC column first with 15 ml of equilibration buffer 2 and then with 15 ml of the same buffer containing 5 mM imidazole
 - 12 Elute His(6)-Nef protein in five equal fractions of 1 ml each with equilibration buffer 2 containing 100 mM imidazole
-

Fig. 1. SlyD and GCHI can contaminate His(6)-Nef preparations purified by IMAC in denaturing conditions. (A) Coomassie blue staining. Lane 1: untransformed *E. coli* BL21 lysate purified by IMAC (denaturing condition). Lane 2: His(6)-Nef-expressing *E. coli* BL21 lysate purified by IMAC (denaturing condition). Lane 3: His(6)-Nef-expressing *E. coli* BL21 lysate purified by heparin chromatography and IMAC in native condition. (B) Western blotting with an anti-Nef antibody. Lane 4: Nef protein purified as a GST-Nef fusion using sepharose matrix in native condition and cleaved by thrombin. (C) Western blotting with the anti-histidine RGS(H)4 antibody.

Fig. 2. Purification of His(6)-Nef protein by heparin_sepharose chromatography and IMAC. (A) Western blotting with an anti-Nef antibody. Lane 1: total cell lysate from IPTG-induced untransformed *E. coli* BL21 cells. Lanes 2-10: His(6)-Nef-expressing *E. coli* BL21 cell lysate. Lane 2: total cell lysate after IPTG induction. Lane 3: supernatant after sonication (SN). Lane 4: pellet after sonication. Lane 5: flow through (FT) from heparin column. Lanes 6 -10: fractions eluted at NaCl concentration of 100, 200, 300, 400 and 500 mM, respectively. His(6)-Nef is indicated by an arrow. The lower molecular weight band represents a non-specific band recognized by the anti-Nef antibody even in untransformed bacteria. (B) Western blotting with an anti-Nef antibody. Lane 1: pool of the 200/300 mM NaCl eluted fractions from the heparin affinity column (input). Lane 2: FT from the IMAC column. Lanes 3-7: eluates from the IMAC column using 100 mM imidazole. (C) Protein separation by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Lane 1: pool of the 200/300 mM NaCl eluted fractions from the heparin column (input). Lanes 2-6: eluates from the IMAC column using 100 mM imidazole. His(6)-Nef is indicated by an arrow.



**CHAPITRE 9:
APPENDICE 2
(ARTICLE 5)**

Le but de ce travail était de résumer les connaissances actuelles sur le rôle de la diminution de l'expression de surface du récepteur CD4 pendant l'infection au VIH-1. Ma contribution dans cette revue a été de résumer les mécanismes utilisés par la protéine Nef du VIH-1 pour diminuer l'expression de surface de CD4.

Cet article, sous forme d'article, fut publié dans Current HIV Research en janvier 2004. 2(1):51-9.

ROLE OF CD4 RECEPTOR DOWN-REGULATION DURING HIV-1 INFECTION

Karine Levesque¹, Andrés Finzi¹, Julie Binette¹ and Éric A. Cohen*

Laboratory of Human Retrovirology, Department of Microbiology and Immunology. Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre Ville, Montreal, Canada, H3C 3J7

¹ These authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be sent: 

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus has evolved several redundant mechanisms to remove its receptor, the CD4 molecule, from the cell surface. Indeed, HIV-1 encodes three proteins, Nef, Vpu and Env, that have a profound effect on CD4 trafficking and catabolism. Given this functional convergence, it is believed that cell surface CD4 regulation constitutes an important determinant of viral replication and pathogenesis *in vivo*. This review highlights recent progress made in our understanding of the molecular mechanisms underlying the down-regulation of the CD4 receptor by HIV-1 and describes our current comprehension of the role of CD4 down-regulation during HIV-1 infection.

INTRODUCTION

Human cells expressing the CD4 surface protein are primary targets for human immunodeficiency virus (HIV) infection. Viral entry is initiated when trimeric surface gp120 protein (SU) on the virion engages CD4 on the host cell, inducing conformational changes that promote binding to specific chemokine receptors. Despite the essential role played by CD4 during viral entry, HIV infection induces a rapid and potent down-regulation of CD4 molecules expressed at the cell surface. Indeed, HIV-1 encodes three proteins that have a profound effect on CD4 trafficking and catabolism. Early in infection, the Nef accessory protein down-modulates CD4 molecules that are already present at the cell surface by accelerating their endocytosis and subsequent degradation in lysosomes. At later stages of infection, the envelope gp160 precursor, through its high receptor binding affinity, retains newly synthesized CD4 in the endoplasmic reticulum (ER). Finally, the accessory viral protein U (Vpu) regulates the half-life of CD4 by inducing the degradation of viral receptors complexed to Env-gp160 precursors in the ER, thereby releasing gp160 and allowing its maturation and transport through the vesicular sorting pathway. Since HIV-1 has evolved several redundant mechanisms to remove its own receptor from the cell surface, it is believed that CD4 down-regulation confers a selective replicative advantage to the virus *in vivo*. This review highlights recent advances in our understanding of the multiple molecular mechanisms underlying the down-regulation of the CD4 receptor by HIV-1 and describes our current understanding of the role of CD4 down-regulation during HIV-1 infection.

THE CD4 RECEPTOR

The CD4 antigen is a type I integral membrane glycoprotein of 55-kDa that is expressed primarily at the surface of class II major histocompatibility complex (MHC-II)-restricted T lymphocytes, thymocytes, and cells of the macrophage-monocyte lineage. It consists of an N-terminal extracellular

domain, a membrane-spanning region and a short cytoplasmic tail that harbours two cysteine residues (C₄₂₀ and C₄₂₂) responsible for the physical association of CD4 with the Src family protein tyrosine kinase p56^{lck} [66,96].

The CD4 molecule plays a key role in the development and activation of helper T cells. During the antigenic response, the physiological role of CD4 is to stabilize interactions between T cells and antigen-presenting cells [30] and to transduce a signal, critical for antigen responsiveness of CD4⁺ T cells, upon binding to nonpolymorphic regions of the MHC-II molecule [18,36,57,99]. The initiation of the signal transduction cascade that ultimately leads to full activation of T cells occurs mainly through the association of CD4 with p56^{lck} [51,70]. Recent evidence indicates that both CD4 and p56^{lck} accumulate preferentially in subdomains of the plasma membrane designated as lipid rafts [71]. These microdomains, which are primarily composed of sphingolipids and cholesterol, are enriched with molecules involved in T cell activation such as GPI-linked proteins, surface receptors and tyrosine kinases, suggesting that lipid rafts may serve as the functional modules for signal transduction and membrane trafficking [15,97].

In T lymphocytes, CD4 is normally retained at the cell surface through association with p56^{lck}. Upon T cell activation by antigen presenting cells, antibody-mediated cross-linking of cell surface protein or treatment of cells with phorbol ester, CD4 endocytosis is induced [79]. CD4 internalisation involves dissociation of p56^{lck} and the activation of an endocytosis signal in the cytoplasmic domain of CD4. This signal consists of a dileucine motif (L₄₁₃L₄₁₄), but is only active when adjacent serine residues (S₄₀₈ and/or S₄₁₅) are phosphorylated [82]. CD4 internalization into clathrin-coated vesicles is triggered when AP-2 clathrin adaptor complexes, which are heterotetrameric protein complexes that regulate the assembly of clathrin-coated pits at the cell surface, interact with the CD4 dileucine signal [82]. Within endosomes, CD4 is

either recycled back to the cell surface, possibly following dephosphorylation, or is sorted to late endosomes/lysosomes where it is degraded [79].

The CD4 molecule is the primary receptor for HIV entry, thus explaining the propensity of this virus to infect certain T-cells and macrophages, ultimately leading to immune dysfunction [28,54]. Entry of HIV-1 into susceptible cells is a multiphasic process that is initiated by the high affinity (< 10 nM) interaction occurring between CD4 and the trimeric viral envelope glycoprotein gp120 [72]. Conformational changes of gp120 upon CD4 binding trigger interactions of gp120 with HIV-1 co-receptors, CCR5 or CXCR4 chemokine receptors [73]. Subsequently, this binding to co-receptors exposes the Env gp41 transmembrane glycoprotein and promotes fusion of viral and cellular membranes. Despite the critical role played by the CD4 receptor during viral entry, it is well established that HIV-1, like many enveloped viruses, down-regulates the cell surface expression of its cognate receptor [28,54]. However, although this effect is achieved by most viruses through simple retention of Env-receptor complexes in the ER [12], HIV-1 has developed a more complex strategy, engaging two additional proteins, Nef and Vpu, besides Env to efficiently down-regulate the CD4 receptor [20].

NEF

Nef is a small (27-kDa) myristoylated protein that is abundantly expressed in the early stages of viral replication [56]. Several evidence indicate that Nef is a key factor of viral progression and pathogenesis. First, subset of individuals that do not show any sign of disease after long period of HIV infection, the so-called long-term nonprogressors (LTNPs) individuals, harbors Nef-deleted virus. Second, rhesus macaques infected with Nef-defective simian immunodeficiency virus (SIV) display low-level viral replication and show a severely delayed course of disease progression [29,52]. Furthermore, expression of Nef in transgenic mice induces some of the pathologies

associated with HIV-1 infection and acquired immune deficiency syndrome (AIDS), including immunodeficiency and depletion of CD4-positive cells [43]. Nef has been associated to several functions *in vitro*, ranging from the down-modulation of specific membrane receptors, the perturbation of signaling pathways, and the stimulation of virion infectivity (for a review: [4,37]). However, the best characterized of its effects are its ability to down-modulate cell surface expression of the virus receptor CD4 and class I major histocompatibility complex (MHC-I).

The cell surface CD4 down-regulation induced by Nef is believed to involve two-steps, which include: 1) enhanced rate of receptor internalization which results in the formation of CD4-specific endocytic vesicles and the accumulation of CD4 in early endosomes; and 2) efficient transport of CD4 to lysosomes where the receptor is degraded [25,32,40,68,81,94]. As described in Figure 1, this two-step process mediated by Nef reflects the sequential involvement and recruitment of specific components of the protein trafficking and sorting machineries [6,14,41,63,64,80]. In order to induce CD4 internalization, Nef first mediates the dissociation of p56^{lck} from CD4 by a mechanism that is still not understood but that does not involve CD4 phosphorylation [35,85]. A direct interaction between Nef and a region located in the cytoplasmic domain of CD4 (residues 407-418) that includes the nascent endocytosis motif (L₄₁₃L₄₁₄) is believed to take place, although this interaction has been difficult to demonstrate and is likely to be of low affinity [45,83,88]. The Nef residues involved in this interaction were mapped to a pocket formed of distant residues, including WLE₅₇₋₅₉, GGL₉₅₋₉₇ and L₁₁₀ [42,45,88]. Nef has also the ability to interact with clathrin adaptor complexes (AP). These heterotetrameric protein complexes recruit integral membrane proteins bearing tyrosine (YXXΦ, where X is any residue and Φ is a hydrophobic amino acid) or dileucine-based sorting signals and regulate the assembly of clathrin-coated pits at the cell surface (AP-2), the *trans*-Golgi network (TGN) (AP-1 and AP-

3), and early endosomes (AP-3) [10]. HIV-1 Nef contains such a sorting dileucine motif (L₁₆₄L₁₆₅) in its C-terminal flexible loop and it is believed that this motif is involved in the association of Nef with both AP-1 and AP-2 adaptor complexes. Association with AP-2 is believed to enhance endocytosis of cell surface CD4, while interaction with AP-1 may influence sorting of newly synthesized CD4 from the TGN to endosomes [41,80] (Fig. 1). Interestingly, even though both HIV-1 and SIV/HIV-2 Nef appear to mediate the internalization of CD4 by interacting with components of the AP complex, it seems that differences do exist at the level of the type of sorting signals and AP effectors involved. Sequences found to be important for CD4 down-regulation by SIV Nef are located in the N-terminus of the protein and harbour two motifs containing YXX Φ type signals that were shown to efficiently bind, at least *in vitro*, the μ subunit of AP-1 and AP-2 [80]. By contrast, HIV-1 Nef lacks the N-terminal YXX Φ signal and instead appears to bind adaptors through a dileucine-containing sequence as mentioned earlier. Indeed, the μ subunit of AP-1, which mediates sorting events between the TGN and the endosomal-lysosomal compartment, was reported to directly interact and to co-localize with HIV-1 Nef [14,26,59]. It is believed that this interaction may influence sorting of newly synthesized CD4 from the TGN to endosomes [80]. This could explain how HIV-1 Nef prevents CD4 transport from the TGN to the cell surface [1,68]. Furthermore, AP-3 was also recently reported to co-localize with HIV-1 Nef in a juxtannuclear region near the center of the cell and was indeed proposed to direct the sorting of CD4 from TGN to lysosomes where degradation of the receptor occurs [26]. So, given the fact that the μ subunit of AP-2 was reported to associate with HIV-1 Nef with a much lesser degree than AP1 [14,26,59] it is possible that sorting in the Golgi complex may have a more dominant role in HIV-1-mediated CD4 down-modulation, whereas enhanced endocytosis at the cell surface may be more important for HIV-2 and SIV Nef. Alternatively, the weak affinity observed between HIV-1 Nef and AP2 may suggest that in contrast to SIV Nef, the interaction is indirect

and requires a bridging co-factor. The human homologue of the yeast *VMA13* gene which encodes the subunit H of the vacuolar ATPase (V1H) could be a candidate to link Nef to the AP complex [64] (Fig. 1). Indeed, direct interactions between Nef and V1H were correlated with the ability of Nef to internalize CD4 suggesting that V1H could connect Nef to the endocytic machinery [38,64]. Interestingly, V1H was recently shown to bind to the medium chain of AP-2 both *in vitro* and *in vivo* [38].

In addition to enhancing CD4 endocytosis, Nef also appears to target the receptor from early endosomes to the late degradation compartments by the recruitment of the β -subunit of the endosomal COP-I coatomer (β -COP) (Fig. 1). The early demonstration that Nef interacted with β -COP in yeast two-hybrid assay [6] and the subsequent indication that a β -COP-containing subcomplex of coatomer is involved in the transport from early to late endosomes both *in vitro* and *in vivo* [2] suggested how Nef might influence CD4 sorting in late endosomes. Indeed, a di-acidic (E₁₅₄E₁₅₅) motif adjacent to the di-leucine (L₁₆₄L₁₆₅)-containing motif in the C-terminal loop of Nef was proposed to function as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes [81]. However, a recent report [50] indicates that these residues are not involved in the binding to β -COP nor in Nef-mediated CD4 down-regulation. Additional studies will be required to characterize the residues of Nef necessary for binding to β -COP and to confirm the relevance of this interaction in Nef-mediated CD4 down-modulation. **VPU** Besides the role of Nef in the down-regulation of cell surface CD4, HIV-1 codes for another protein, Vpu, which is implicated in the degradation of newly synthesized CD4 in combination with the function of the Env protein [20]. The HIV-1 *vpu* gene encodes for an 81 amino acids protein that is not expressed by HIV-2 or most SIVs except for some HIV-1-related monkey isolates such as SIVcpz and the newly isolated SIVgsn [22,24,47,103]. Vpu expression is coordinately regulated with the envelope glycoprotein precursor, gp160, as

both Vpu and gp160 are translated from the same bicistronic Rev-dependent mRNA by leaky scanning of the Vpu initiation codon [95]. The protein has the topology of a class I integral membrane protein with an N-terminal hydrophobic region of 27 amino acids, which constitutes the membrane-spanning domain, and a charged C-terminal hydrophilic domain of 54 residues facing the cytoplasm [67]. Vpu appears to be primarily expressed on intracellular membranes, presumably at the level of the ER and the Golgi, although electron-microscopy studies of HIV-1 infected cells have revealed that the protein can also be detected in association with the plasma membrane (Yao, X-J and Cohen, E.A, unpublished results). Biochemical studies have shown that the protein is post-translationally phosphorylated [33,91-93,102] and is capable of forming homo-oligomers [67]. In tissue culture, Vpu displays two principal biological activities, which are functionally and genetically distinguishable: 1) it enhances the release of virions from the cell surface [55,90,103,105] and 2) it induces the degradation of CD4 molecules trapped in intracellular complexes with Env in the ER [119]. These two biological activities involve two separable domains in the Vpu protein. The N-terminal membrane spanning domain is believed to mediate the enhancement of viral particle release [77,90,106] while the cytoplasmic domain is thought to be responsible for degradation of the CD4 receptor [21,90,107].

During the late stages of HIV-1 infection, simultaneous expression of both the CD4 receptor and the viral envelope glycoprotein precursor in the ER leads to the formation of gp160-CD4 complexes that sequester both proteins in this compartment [11,16,27,49]. Like in other viral systems, retention of the CD4 receptor in the ER through the high receptor binding affinity of the Env gp160 precursor contributes to the reduction of cell surface CD4 receptor levels by blocking the transport of CD4 molecules to the plasma membrane [27,49,100]. This ER retention of CD4 is believed to result from the very inefficient transport of gp160 itself and thus increases in importance late in

infection when the viral glycoprotein gp160 precursor is expressed at high levels [116]. Initially, Willey et al. found that Vpu induces the rapid degradation of CD4 molecules complexed to gp160 in the ER [119]. This finding raised the possibility that Vpu not only contributes to CD4 receptor down-regulation by specifically targeting CD4 molecules complexed to gp160 but also stimulates the release of gp160 and enhances its maturation, trafficking and incorporation into progeny virions, thereby affecting assembly of infectious particles [53,110,119]. Although several reports have provided evidence indicating that HIV-1 gp160 is released more efficiently from the ER upon Vpu-mediated CD4 degradation [110,119], recent data indicate that this does not translate into more Env glycoproteins being incorporated into nascent viral particles. Analysis of virions released from cells expressing Vpu⁺ or Vpu-defective HIV-1 provirus did not reveal any significant difference in the levels of incorporated Env glycoproteins [61,104]. Current evidence indicates that HIV-1 Env is not directly involved in Vpu-mediated CD4 degradation. The role of Env appears limited to its ability to retain CD4 in the ER given that efficient CD4 degradation can be observed in the absence of Env as long as CD4 is retained in the ER by means of an ER retention signal or treatment of cells with Brefeldin A (BFA), a fungal metabolite known to block protein sorting from the ER to the Golgi apparatus [60,118]. Under these conditions, Vpu mediates a rapid degradation of CD4 in the ER with CD4 half-life being reduced from 6h to approximately 15 min [118]. Nevertheless, the fact that CD4 localization in the ER is a pre-requisite for Vpu-mediated degradation suggests that cellular factors essential for CD4 degradation are located in the ER [21].

Vpu-mediated CD4 degradation is a multistep process that is triggered by the direct physical binding of Vpu to the cytoplasmic tail of CD4 [12] (Fig.2). Mutational and deletion analysis of the cytoplasmic tail of CD4 have delineated a Vpu-responsive sequence encompassing residues 416-419

(EKKT) as well as an alpha helix structure located in the proximal region of the viral receptor cytoplasmic tail [60,111,117,124]. Although some studies have suggested that the transmembrane (TM) region of CD4 may also contribute to CD4 sensitivity to Vpu-induced degradation, the precise role of this domain remains to be defined [17,84,117]. Structural analysis of Vpu indicates that the cytoplasmic domain of the protein consists of two discrete amphipatic alpha helices, encompassing amino acid positions 35-50 (helix 2) and 58-70 (helix 3), respectively, joined together by a short flexible hinge region containing two highly conserved serine residues (S52 and S56) that are phosphorylated by the ubiquitous casein kinase II in HIV-1-infected human cells [31,46,91,122]. Towards the C-terminal end, another short helix or a turn appears to exist depending on the experimental conditions that are used [31,115]. Structure-function relationship studies performed in our laboratory indicate that mutations affecting the integrity of the first cytoplasmic alpha-helix of Vpu or the hydrophobic interface within this amphipatic helical structure, interfere with the binding to CD4 [107] (Binette, J. and Cohen, E.A unpublished results), thus suggesting that the first cytoplasmic helix of Vpu is involved in the direct physical interaction with CD4. Although the binding of Vpu to CD4 is necessary to induce degradation, it is not sufficient [13]. Conversely, phosphorylation of Vpu at S52 and S56, while not required for CD4 binding is essential for Vpu-mediated CD4 degradation and is indeed involved in the recruitment of a cellular co-factor, human beta transducin-repeat containing protein (h- β TrCP), which corresponds to the specificity component of an E3 ubiquitin ligase complex (SCF $_{\beta$ -TrCP) implicated in the ubiquitin-conjugating pathway [69]. h- β TrCP contains a WD-40 repeat region, which recognizes Vpu in a phosphorylation-dependent manner and an F-box domain, which recruits Skp1 a component of the E3 ubiquitin ligase complex responsible for the ubiquitination of protein destined for degradation [5] (Fig.2). These findings combined with the demonstrated sensitivity of Vpu-mediated CD4 degradation to specific proteasome inhibitors and the

requirement of an intact ubiquitin-conjugating system strongly suggest that Vpu targets CD4 to proteolysis by acting as a connector between the viral receptor and the ubiquitin-proteasome degradative machinery [34,89]. Interestingly, a number of cellular proteins, such as the Wnt signalling pathway intermediate, β -catenin, and the NF κ B inhibitor, I κ B α , are targeted to degradation by the proteasome through pathways involving the SCF $_{\beta$ -TrCP E3 complex also involved in CD4 degradation [120,121,123]. The motif recognized by h- β TrCP in these proteins contains a pair of phosphoserine residues similar to those found in Vpu and corresponds to the consensus motif: DSG Φ XS; where S is a phosphoserine. Following phosphorylation of serine residues found within this consensus motif, I κ B α and β -catenin are ubiquitinated at specific lysine residues and targeted for degradation by the proteasome through a process that is mediated by h- β TrCP [121]. In this regard, Vpu is different from other known substrates of h- β TrCP since it is resistant to degradation and indeed remains stable throughout the process of CD4 degradation [21,107]. The molecular mechanism allowing Vpu to prevent its own degradation following recruitment of h- β TrCP remains not understood. It is possible that Vpu has the capacity to mask its lysine residues that might constitute potential target for ubiquitination upon recruitment of SCF $_{\beta$ -TrCP, while efficiently expose those present in the cytoplasmic domain of CD4 (Fig.2). Although the molecular machinery that is recruited by Vpu to target CD4 for degradation is now reasonably well defined, it remains unclear how ER-associated CD4 encounters cytoplasmic proteasome complexes. Whether Vpu action involves a retrotranslocation of CD4 from the ER to the cytoplasm, a mechanism used by human cytomegalovirus US2 and US11 proteins to target newly synthesized MHC-I heavy chain for rapid degradation by the proteasome [113,114], a direct degradation of the cytoplasmic tail of CD4 by the proteasome, or a different undefined mechanism remains to be determined. Furthermore, it still remains unclear whether interaction of Vpu with CD4 and subsequent recruitment of the ubiquitin-proteasome pathway through h- β TrCP

are sufficient to induce CD4 degradation. In that regard, the role of Vpu multimerization in this process remains undefined. Mutational analysis of the Vpu amphipatic alpha helices reveals that several Vpu mutants that are still capable of interacting with CD4 and h- β TrCP like wild type Vpu, are unable to mediate CD4 degradation (Binette, J. and Cohen, E.A, unpublished results), thus suggesting that Vpu action on CD4 involves very likely other steps or perhaps other co-factors. Finally, it remains not clear at present whether CD4 needs to be mono-ubiquitinated or poly-ubiquitinated in order to be degraded by the proteasome since direct evidence of ubiquitinated forms of CD4 in presence of Vpu is still lacking. More studies in this area will not only shed light on the molecular mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation but will also enhance our understanding of basic processes involved in ER-associated degradation (ERAD) of proteins.

FUNCTIONAL ROLE OF CELL SURFACE CD4 DOWN-REGULATION DURING HIV-1 INFECTION.

The fact that CD4 down-regulation is mediated by multiple gene function during HIV-1 infection implies that cell surface CD4 regulation must be an important determinant for viral replication and pathogenesis. Studies with monkeys have specifically evaluated the role of CD4 down-modulation in SIV pathogenesis *in vivo*. Mutations that interfere with Nef ability to down-regulate CD4 were found to strongly reduce viremia in infected monkeys and indeed reverted efficiently to restore the CD4 down-modulation function [48]. Furthermore, a recent study using the simian-human immunodeficiency virus (SHIV) / pig-tailed macaque model has demonstrated that mutations of Vpu at sites which are critical for the protein ability to degrade CD4, attenuate virus pathogenicity or revert to wild type sequence [98]. Several observations also support an important role of CD4 down-regulation in HIV-1 pathogenesis. One study has shown that Nef alleles isolated from LTNPs are less efficient in CD4 down-regulation than those found in progressors and asymptomatic carriers

[108]. Another study analyzed the modulation of HIV-1 Nef functions during progression to disease. Late Nef alleles isolated after progression to AIDS showed an enhanced ability to down-modulate CD4 as compared to Nef alleles isolated at early stages of infection [19]. However, it is only more recently that a series of studies have reported an enhancing effect of CD4 down-regulation on HIV-1 replication using *in vitro* as well as *in vivo* models. Using HIV-1 virus harbouring well-defined Nef mutants, Lundquist and colleagues observed a strong correlation between the ability of Nef to down-regulate CD4 during acute HIV-1 infection of activated primary T cells lymphocytes and HIV-1 replication efficiency in T cells [65]. Furthermore, Glushakova and colleagues recently reported that CD4 down-regulation by HIV-1 Nef correlated with the efficiency of viral replication and the severity of CD4⁺ T cell depletion in lymphoid cell histocultures [39]. Stoddart and colleagues evaluated the pathogenic potential of recombinant viruses that are specifically impaired for Nef-mediated CD4 down-regulation in severe combined immunodeficiency (SCID) mice implanted with human foetal thymus and liver, a model in which virus-mediated depletion of thymocytes is known to be Nef-dependent, and found that these viruses displayed attenuated pathogenicity, as measured by thymocyte depletion. However, in this model, the change of cytopathicity associated with the loss of Nef-mediated CD4 down-regulation did not significantly correlate with changes in the replication of mutant viruses in activated PBMC [101]. More recently, Arganaraz and colleagues have analyzed in detail the CD4 down-modulating activity of primary *nef* alleles obtained during asymptomatic infection or after progression to AIDS and found that genetic variation in *nef* occurring during progression to disease conferred stronger CD4 down-modulating properties to the virus [3]. Importantly this study revealed that HIV-1 strains carrying late *nef* alleles with increased CD4 down-modulating activities displayed infectivity and viral replication properties significantly enhanced when compared with early versions of *nef*, suggesting that mutations in *nef* selected during disease

progression may impact the outcome of disease by enhancing the replicative and pathogenic properties of HIV-1.

Interestingly, several recent reports have highlighted the importance of cell surface CD4 down-regulation by Nef or/and Vpu in augmenting viral production and infectivity in cell culture systems [3,23,58,61,65,87,104] (Fig.3). Ross and colleagues reported that overexpression of CD4 in HIV-1-transfected human embryonic kidney cells (293T) leads to a significant reduction of the overall amounts of virus released. Given that this CD4-mediated inhibition of viral release was dependent on the specific interaction between CD4 and the viral envelope glycoprotein precursor and was relieved by Nef, they proposed that CD4 down-regulation prevents trapping and aggregation of nascent progeny virion at the cell surface, an effect reminiscent of the function of the influenza virus neuraminidase protein [76] (Fig.3C). Although this effect of cell surface CD4 on viral release was observed in conditions where CD4 was overexpressed, it is unclear whether physiological levels of surface CD4 would exert a similar effect in HIV target cells [44]. A second report showed that expression of high levels of CD4 at the cell surface of 293T cells induced a drastic reduction in the infectivity of released virion [58]. Viral particles produced in the absence of Nef or/and Vpu were found to be less infectious because they incorporate fewer envelope glycoproteins and substantial amounts of CD4 molecules [58]. More recently, Cortes and colleagues extended these studies to Jurkat T cell lines and found that physiological levels of surface CD4 interfere in an Env-dependent manner with the infectivity of released virus, presumably because less Env glycoproteins were incorporated into viral particles [23]. These authors proposed that accumulation of CD4 at the cell surface may alter virus infectivity by a mechanism involving primarily recruitment and sequestration of gp120 molecules away from budding sites, which are believed to be associated with lipid rafts at the cell plasma membrane [3,23,58,74,75] (Fig 3D). This effect of

CD4 down-regulation on HIV-1 infectivity was recently confirmed by two different groups using HIV-1 isogenic except for the expression of Vpu or/and Nef [61,104]. However, these studies could not correlate the effect of CD4 down-regulation on viral infectivity to difference in the level of envelope glycoproteins incorporated into progeny virions. Rather, our laboratory found that accumulation of CD4 at the cell surface of Vpu-deficient HIV-1 producing cells leads to efficient recruitment of CD4 into virions while at the same time promoting the formation of nonfunctional gp120-CD4 complexes at the virion surface [61] (Fig. 3D). The most obvious model that emerges from our data is that accumulation of CD4 at the cell surface and subsequent recruitment into HIV-1 viral particles affects virion infectivity by forming complexes with gp120 at the virion surface thereby saturating CD4 binding sites on gp120 molecules and decreasing the level of functional Env at the virion surface. The discrepancy regarding the level of Env glycoproteins incorporated in the presence or absence of Nef or/and Vpu is unclear at this point. One possibility is that the mechanism by which Nef and Vpu contribute to viral infectivity may be distinct but complementary, although Tanaka and colleagues failed to observe an effect on Env incorporation in virions using Vpu or/and Nef mutations [104]. Clearly, more studies are required to better understand the molecular mechanism underlying the effect of Vpu and Nef-mediated down-regulation of cell surface CD4 on viral infectivity. Nevertheless, the fact that both Vpu and Nef were found to be required for production of fully infectious HIV-1 viral particles in CD4⁺ T cells and activated primary cells suggest that these accessory proteins through their ability to downregulate CD4, are therefore likely to facilitate viral spread *in vivo* and thus contribute to HIV-1 pathogenicity. Additional studies will also be required in more physiological models to establish whether the correlation existing between CD4 down-regulation and pathogenicity is linked to enhanced viral replication and spread.

There are other plausible reasons why CD4 down-modulation may be beneficial to HIV-1. Elimination of the virus receptor at the cell surface to prevent reinfection has been demonstrated with some retroviruses [12] including HIV [8,62,104,112]. It has been reported that reinfection of HIV-1 infected T cells leads to accumulation of proviral DNA which was toxic to cells [9,78,86]; thus there might be a selective advantage for the virus to inhibit superinfection although this phenomenon is unlikely to be relevant in the periphery *in vivo* and is likely to be more important in HIV-1-infected lymph nodes where there are high levels of virus. Additionally, there is evidence that signal transduced through binding to CD4 or through CD4 oligomerisation at the cell surface may negatively regulate HIV-1-LTR directed gene expression or may induce apoptosis and cytopathic effects [109]. Presumably, one effect of cell surface CD4 down-regulation would be to prevent the transduction of these signals before production and release of new progeny virions occurs. However, there is still some controversy as to whether these transduced signals are of negative or positive nature [7,109]. Finally, it has been proposed that the CD4-associated protein tyrosine kinase, p56^{lck}, could be released following Nef-mediated removal of CD4 from the cell surface, and thus be available to phosphorylate various substrates such as the T-cell receptor ζ chain. Such event, by modifying the overall state of T-cell activation, could establish an intracellular environment more appropriate for HIV-1 replication. So although recent reports have highlighted the importance of cell surface CD4 down-regulation in augmenting viral production and infectivity [3,23], the other potential consequences of CD4 down-regulation merit further investigation.

CONCLUSION

HIV-1 induced CD4 down-regulation is believed to be an important determinant governing viral replication and pathogenicity *in vivo*. Up to now, this HIV-1 function has not been targeted for therapeutic intervention. Given the accumulating evidence pointing toward an important role for CD4 down-modulation in pathogenesis *in vivo*, it is increasingly believed that drugs inhibiting this function might alter the course of the disease and provide clinical benefits for HIV-1 infected individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jacques Thibodeau for discussions. Eric A. Cohen is the recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Canadian Network for Vaccine and Immunotherapeutics to EAC.

KEYWORDS

HIV-1, CD4 down-regulation, replication, pathogenesis, Nef, Env, Vpu

REFERENCES

- [1] Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. (1994). *Cell*. 76: 853-864.
- [2] Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J. (1996). *Journal of Cell Biology*. 133: 29-41.
- [3] Arganaraz E, Schindler M, Kirchhoff F, Cortes MJ, Lama J. (2003). *Journal of Biological Chemistry*. 278: 33912-33919.
- [4] Arold ST, Baur AS. (2001). *Trends in biochemical sciences*. 26: 356-363.
- [5] Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. (1996). *Cell*. 86: 263-274.
- [6] Benichou S, Bomsel M, Bodeus M, Durand H, Doute M, Letourneur F, Camonis J, Benarous R. (1994). *Journal of Biological Chemistry*. 269: 30073-30076.
- [7] Benkirane M, Jeang KT, Devaux C. (1994). *EMBO Journal*. 13: 5559-5569.
- [8] Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR. (1993). *Journal of Experimental Medicine*. 177: 1561-1566.
- [9] Bergeron L, Sodroski J. (1992). *Journal of Virology*. 66: 5777-5787.
- [10] Bonifacino J, Traub L. (2003). *Annual review of biochemistry*. 72: 395-447.
- [11] Bour S, Boulerice F, Wainberg MA. (1991). *Journal of Virology*. 65: 6387-6396.
- [12] Bour S, Geleziunas R, Wainberg MA. (1995). *Microbiological reviews*. 59: 63-93.
- [13] Bour S, Schubert U, Strebel K. (1995). *Journal of Virology*. 69: 1510-1520.
- [14] Bresnahan PA, Yonemoto W, Ferrell S, Williams-Herman D, Geleziunas R, Greene WC. (1998). *Current Biology*. 8: 1235-1238.
- [15] Brown DA, Rose JK. (1992). *Cell*. 68: 533-544.
- [16] Buonocore L, Rose JK. (1990). *Nature*. 345: 625-628.

- [17] Buonocore L, Turi TG, Crise B, Rose JK. (1994). *Virology*. 204: 482-486.
- [18] Cammarota G, Scheirle A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, Sinigaglia F. (1992). *Nature*. 356: 799-801.
- [19] Carl S, Greenough TC, Krumbiegel M, Greenberg M, Skowronski J, Sullivan JL, Kirchhoff F. (2001). *Journal of Virology*. 75: 3657-3665.
- [20] Chen BK, Gandhi RT, Baltimore D. (1996). *Journal of Virology*. 70: 6044-6053.
- [21] Chen MY, Maldarelli F, Karczewski MK, Willey RL, Strebel K. (1993). *Journal of Virology*. 67: 3877-3884.
- [22] Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. (1988). *Nature*. 334: 532-534.
- [23] Cortes MJ, Wong-Staal F, Lama J. (2002). *Journal of Biological Chemistry*. 277: 1770-1779.
- [24] Courgnaud V, Salemi M, Pourrut X, Mpoudi-Ngole E, Abela B, Auzel P, Bibollet-Ruche F, Hahn B, Vandamme AM, Delaporte E, Peeters M. (2002). *Journal of Virology*. 76: 8298-8309.
- [25] Craig HM, Pandori MW, Guatelli JC. (1998). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 11229-11234.
- [26] Craig HM, Reddy TR, Riggs NL, Dao PP, Guatelli JC. (2000). *Virology*. 271: 9-17.
- [27] Crise B, Buonocore L, Rose JK. (1990). *Journal of Virology*. 64: 5585-5593.
- [28] Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. (1984). *Nature*. 312: 763-767.
- [29] Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, et al. (1995). *Science*. 270: 988-991.
- [30] Doyle C, Strominger JL. (1987). *Nature*. 330: 256-259.
- [31] Federau T, Schubert U, Flossdorf J, Henklein P, Schomburg D, Wray V. (1996). *International Journal of Peptide and Protein Research*. 47: 297-310.

- [32] Foti M, Mangasarian A, Piguet V, Lew DP, Krause KH, Trono D, Carpentier JL. (1997). *Journal of Cell Biology*. 139: 37-47.
- [33] Friborg J, Ladha A, Gottlinger H, Haseltine WA, Cohen EA. (1995). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 8: 10-22.
- [34] Fujita K, Omura S, Silver J. (1997). *Journal of General Virology*. 78 (Pt 3): 619-625.
- [35] Garcia JV, Miller AD. (1991). *Nature*. 350: 508-511.
- [36] Gay D, Maddon P, Sekaly R, Talle MA, Godfrey M, Long E, Goldstein G, Chess L, Axel R, Kappler J, et al. (1987). *Nature*. 328: 626-629.
- [37] Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. (2001). *EMBO Reports*. 2: 580-585.
- [38] Geyer M, Yu H, Mandic R, Linnemann T, Zheng YH, Fackler OT, Peterlin BM. (2002). *Journal of Biological Chemistry*. 277: 28521-28529.
- [39] Glushakova S, Munch J, Carl S, Greenough TC, Sullivan JL, Margolis L, Kirchhoff F. (2001). *Journal of Virology*. 75: 10113-10117.
- [40] Greenberg M, DeTulleo L, Rapoport I, Skowronski J, Kirchhausen T. (1998). *Current Biology*. 8: 1239-1242.
- [41] Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J. (1997). *EMBO Journal*. 16: 6964-6976.
- [42] Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A. (1996). *Biochemistry*. 35: 10256-10261.
- [43] Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. (1998). *Cell*. 95: 163-175.
- [44] Harris M. (1999). *Current Biology*. 9: R459-461.
- [45] Harris MP, Neil JC. (1994). *Journal of Molecular Biology*. 241: 136-142.
- [46] Henklein P, Kinder R, Schubert U, Bechinger B. (2000). *FEBS Letters*. 482: 220-224.
- [47] Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. (1990). *Nature*. 345: 356-359.

- [48] Iafrate AJ, Carl S, Bronson S, Stahl-Hennig C, Swigut T, Skowronski J, Kirchhoff F. (2000). *Journal of Virology*. 74: 9836-9844.
- [49] Jabbar MA, Nayak DP. (1990). *Journal of Virology*. 64: 6297-6304.
- [50] Janvier K, Craig H, Le Gall S, Benarous R, Guatelli J, Schwartz O, Benichou S. (2001). *Journal of Virology*. 75: 3971-3976.
- [51] Julius M, Newell K, Maroun C, Haughn L. (1991). *Seminars in Immunology*. 3: 161-166.
- [52] Kestler HW, 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. (1991). *Cell*. 65: 651-662.
- [53] Kimura T, Nishikawa M, Ohyama A. (1994). *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 115: 1010-1020.
- [54] Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. (1984). *Nature*. 312: 767-768.
- [55] Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. (1990). *Journal of Virology*. 64: 621-629.
- [56] Klotman ME, Kim S, Buchbinder A, DeRossi A, Baltimore D, Wong-Staal F. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 5011-5015.
- [57] Konig R, Huang LY, Germain RN. (1992). *Nature*. 356: 796-798.
- [58] Lama J, Mangasarian A, Trono D. (1999). *Current Biology*. 9: 622-631.
- [59] Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, Berlioz-Torrent C, Liu L, Benarous R, Heard JM, Schwartz O. (1998). *Immunity*. 8: 483-495.
- [60] Lenburg ME, Landau NR. (1993). *Journal of Virology*. 67: 7238-7245.
- [61] Levesque K, Zhao YS, Cohen EA. (2003). *Journal of Biological Chemistry*. 278: 28346-28353.
- [62] Little SJ, Riggs NL, Chowers MY, Fitch NJ, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC. (1994). *Virology*. 205: 578-582.
- [63] Lock M, Greenberg ME, Iafrate AJ, Swigut T, Muench J, Kirchhoff F, Shohdy N, Skowronski J. (1999). *EMBO Journal*. 18: 2722-2733.

- [64] Lu X, Yu H, Liu SH, Brodsky FM, Peterlin BM. (1998). *Immunity*. 8: 647-656.
- [65] Lundquist CA, Tobiume M, Zhou J, Unutmaz D, Aiken C. (2002). *Journal of Virology*. 76: 4625-4633.
- [66] Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R. (1985). *Cell*. 42: 93-104.
- [67] Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. (1993). *Journal of Virology*. 67: 5056-5061.
- [68] Mangasarian A, Foti M, Aiken C, Chin D, Carpentier JL, Trono D. (1997). *Immunity*. 6: 67-77.
- [69] Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. (1998). *Molecular Cell*. 1: 565-574.
- [70] Miceli MC, Parnes JR. (1993). *Advances in Immunology*. 53: 59-122.
- [71] Millan J, Cerny J, Horejsi V, Alonso MA. (1999). *Tissue Antigens*. 53: 33-40.
- [72] Moore JP. (1990). *AIDS*. 4: 297-305.
- [73] Moore JP, Trkola A, Dragic T. (1997). *Current Opinion in Immunology*. 9: 551-562.
- [74] Nguyen DH, Hildreth JE. (2000). *Journal of Virology*. 74: 3264-3272.
- [75] Ono A, Freed EO. (2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 13925-13930.
- [76] Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. (1974). *Virology*. 61: 397-410.
- [77] Paul M, Mazumder S, Raja N, Jabbar MA. (1998). *Journal of Virology*. 72: 1270-1279.
- [78] Pauza CD, Galindo JE, Richman DD. (1990). *Journal of Experimental Medicine*. 172: 1035-1042.
- [79] Pelchen-Matthews A, Parsons IJ, March M. (1993). *Journal of Experimental Medicine*. 178: 1209-1222.

- [80] Piguet V, Chen YL, Mangasarian A, Foti M, Carpentier JL, Trono D. (1998). *EMBO Journal*. 17: 2472-2481.
- [81] Piguet V, Gu F, Foti M, Demaurex N, Gruenberg J, Carpentier JL, Trono D. (1999). *Cell*. 97: 63-73.
- [82] Pitcher C, Höning S, Fingerhut A, Bowers K, Marsh M. (1999). *Molecular Biology of the Cell*. 10: 677-691.
- [83] Preusser A, Briese L, Baur AS, Willbold D. (2001). *Journal of Virology*. 75: 3960-3964.
- [84] Raja NU, Vincent MJ, Abdul Jabbar M. (1994). *Virology*. 204: 357-366.
- [85] Rhee SS, Marsh JW. (1994). *Journal of Virology*. 68: 5156-5163.
- [86] Robinson HL, Zinkus DM. (1992). *Journal of Virology*. 64: 4836-4841.
- [87] Ross TM, Oran AE, Cullen BR. (1999). *Current Biology*. 9: 613-621. [88] Rossi F, Gallina A, Milanese G. (1996). *Virology*. 217: 397-403.
- [89] Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orlowski M, Strebel K, Yewdell JW. (1998). *Journal of Virology*. 72: 2280-2288.
- [90] Schubert U, Bour S, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Maldarell F, Strebel K. (1996). *Journal of Virology*. 70: 809-819.
- [91] Schubert U, Henklein P, Boldyreff B, Wingender E, Strebel K, Porstmann T. (1994). *Journal of Molecular Biology*. 236: 16-25.
- [92] Schubert U, Schneider T, Henklein P, Hoffmann K, Berthold E, Hauser H, Pauli G, Porstmann T. (1992). *European Journal of Biochemistry*. 204: 875-883.
- [93] Schubert U, Strebel K. (1994). *Journal of Virology*. 68: 2260-2271.
- [94] Schwartz O, Dautry-Varsat A, Goud B, Marechal V, Subtil A, Heard JM, Danos O. (1995). *Journal of Virology*. 69: 528-533.
- [95] Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN. (1990). *Journal of Virology*. 64: 5448-5456.
- [96] Shaw AS, Amrein KE, Hammond C, Stern DF, Sefton BM, Rose JK. (1989). *Cell*. 59: 627-636.
- [97] Simons K, Ikonen E. (1997). *Nature*. 387: 569-572.

- [98] Singh DK, Griffin D, Pacyniak E, Jackson M, Werle MJ, Wisdom B, Sun F, Hout DR, Pinson DM, Gunderson RS, Powers MF, Wong SW, Stephens EB. (2003). *Virology*. 313: 435-451.
- [99] Sleckman BP, Peterson A, Jones WK, Foran JA, Greenstein JL, Seed B, Burakoff SJ. (1987). *Nature*. 328: 351-353.
- [100] Stevenson M, Meier C, Mann AM, Chapman N, Wasiaik A. (1988). *Cell*. 53: 483-496.
- [101] Stoddart CA, Geleziunas R, Ferrell S, Linqvist-Stepps V, Moreno ME, Bare C, Xu W, Yonemoto W, Bresnahan PA, McCune JM, Greene WC. (2003). *Journal of Virology*. 77: 2124-2133.
- [102] Strebel K, Klimkait T, Maldarelli F, Martin MA. (1989). *Journal of Virology*. 63: 3784-3791.
- [103] Strebel K, Klimkait T, Martin MA. (1988). *Science*. 241: 1221-1223.
- [104] Tanaka M, Ueno T, Nakahara T, Sasaki K, Ishimoto A, Sakai H. (2003). *Virology*. 311: 316-325.
- [105] Terwilliger EF, Cohen EA, Lu YC, Sodroski JG, Haseltine WA. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 5163-5167.
- [106] Tiganos E, Friborg J, Allain B, Daniel NG, Yao XJ, Cohen EA. (1998). *Virology*. 251: 96-107.
- [107] Tiganos E, Yao XJ, Friborg J, Daniel N, Cohen EA. (1997). *Journal of Virology*. 71: 4452-4460.
- [108] Tobiume M, Takahoko M, Yamada T, Tatsumi M, Iwamoto A, Matsuda M. (2002). *Journal of Virology*. 76: 5959-5965.
- [109] Tremblay M, Meloche S, Gratton S, Wainberg MA, Sekaly RP. (1994). *EMBO Journal*. 13: 774-783.
- [110] Vincent MJ, Abdul Jabbar M. (1995). *Virology*. 213: 639-649.
- [111] Vincent MJ, Raja NU, Jabbar MA. (1993). *Journal of Virology*. 67: 5538-5549.

- [112] Volsky DJ, Simm M, Shahabuddin M, Li G, Chao W, Potash M. (1996). *Journal of Virology*. 70: 3823-3833.
- [113] Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. (1996). *Cell*. 84: 769-779.
- [114] Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL. (1996). *Nature*. 384: 432-438.
- [115] Willbold D, Hoffmann S, Rosch P. (1997). *European Journal of Biochemistry*. 245: 581-588.
- [116] Willey RL, Bonifacino JS, Potts BJ, Martin MA, Klausner RD. (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 9580-9584.
- [117] Willey RL, Buckler-White A, Strebel K. (1994). *Journal of Virology*. 68: 1207-1212.
- [118] Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. (1992). *Journal of Virology*. 66: 7193-7200.
- [119] Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. (1992). *Journal of Virology*. 66: 226-234.
- [120] Winston JT, Koepf DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. (1999). *Current Biology*. 9: 1180-1182.
- [121] Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. (1999). *Genes and Development*. 13: 270-283.
- [122] Wray V, Federau T, Henklein P, Klabunde S, Kunert O, Schomburg D, Schubert U. (1995). *International Journal of Peptide and Protein Research*. 45: 35-43.
- [123] Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP. (2003). *Molecular Cell* 11: 1445-1456.
- [124] Yao XJ, Friborg J, Checroune F, Gratton S, Boisvert F, Sekaly RP, Cohen EA. (1995). *Virology*. 209: 615-623.

Figure 1. (1) Nef triggers the rapid endocytosis of CD4 at the plasma membrane by connecting CD4 and clathrin coated pits. Interaction of Nef with clathrin adaptor protein complex AP2 (directly or via the H subunit of the vacuolar ATPase (V1H)) via a dileucine sorting motif (L₁₆₄L₁₆₅) directs CD4 from the plasma membrane to the endosomal compartment. Nef can also direct CD4 from the *trans*-Golgi network (TGN) to endosomes presumably via AP1. **(2)** The targeting of CD4 from endosomes to lysosomes presumably involves the recruitment of β -COP by Nef via a di-acidic motif (E₁₅₄E₁₅₅). Nef can also directly target CD4 from TGN to lysosomes via AP3.

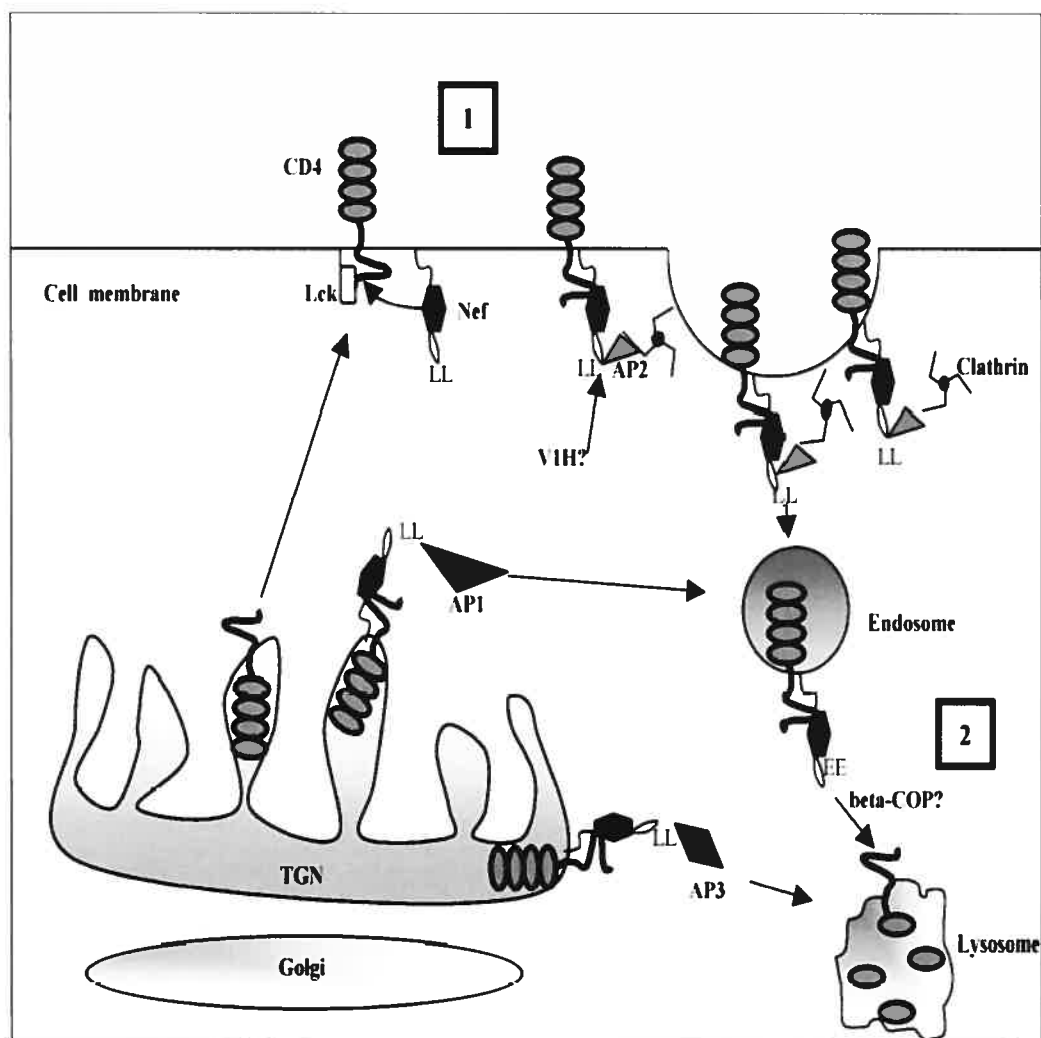


Figure 2. Model of the CD4 degradation mediated by Vpu. (1) The gp160 (Env) interacts with CD4 via its high affinity receptor binding domain, trapping CD4 in the ER. (2) Vpu interacts with CD4 cytoplasmic tail presumably via a domain located in the first helix of Vpu cytoplasmic domain (helix 2). (3) Vpu binds β -TrCP, the specificity component of an ubiquitin ligase complex (E3) that recognizes a consensus site in Vpu comprising the two phosphoserines at positions 52 and 56 (Pi). The interaction between Vpu and β -TrCP recruits Skp1p and the remaining components of the E3 complex $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$, including an E2 that is bound to activated ubiquitin (Ub) molecules. (4) It is believed that CD4 is mono- or poly-ubiquitinated by this E3 complex once it is bound to Vpu. (5) Following ubiquitination, CD4 is possibly retranslocated to the cytoplasm where degradation by the 26S proteasome occurs.

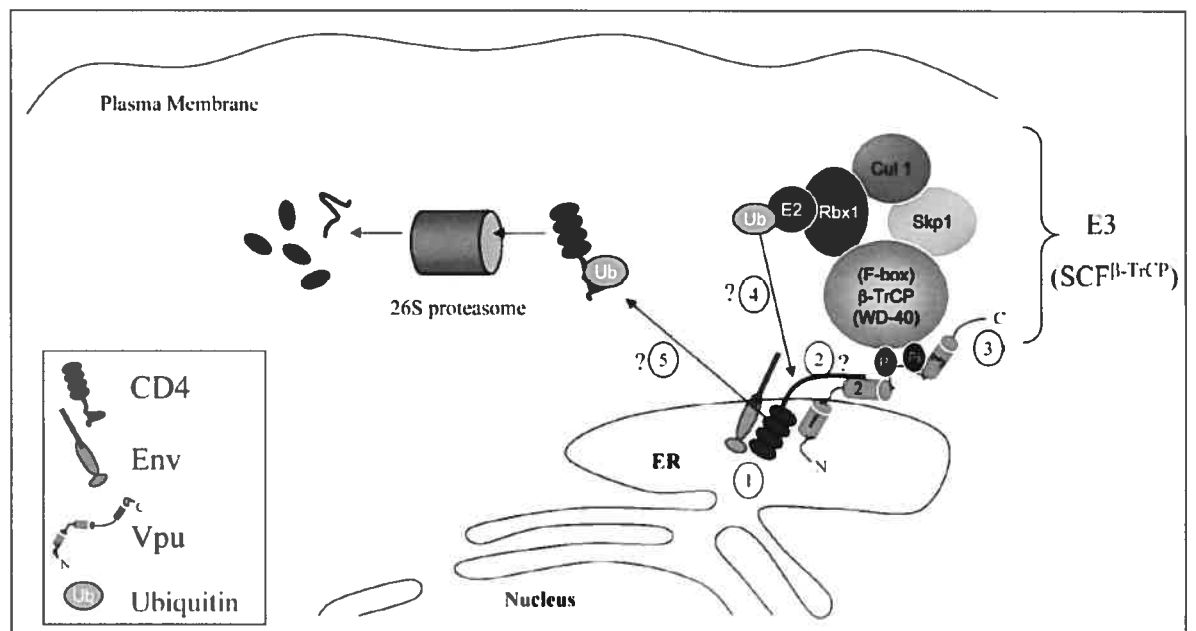
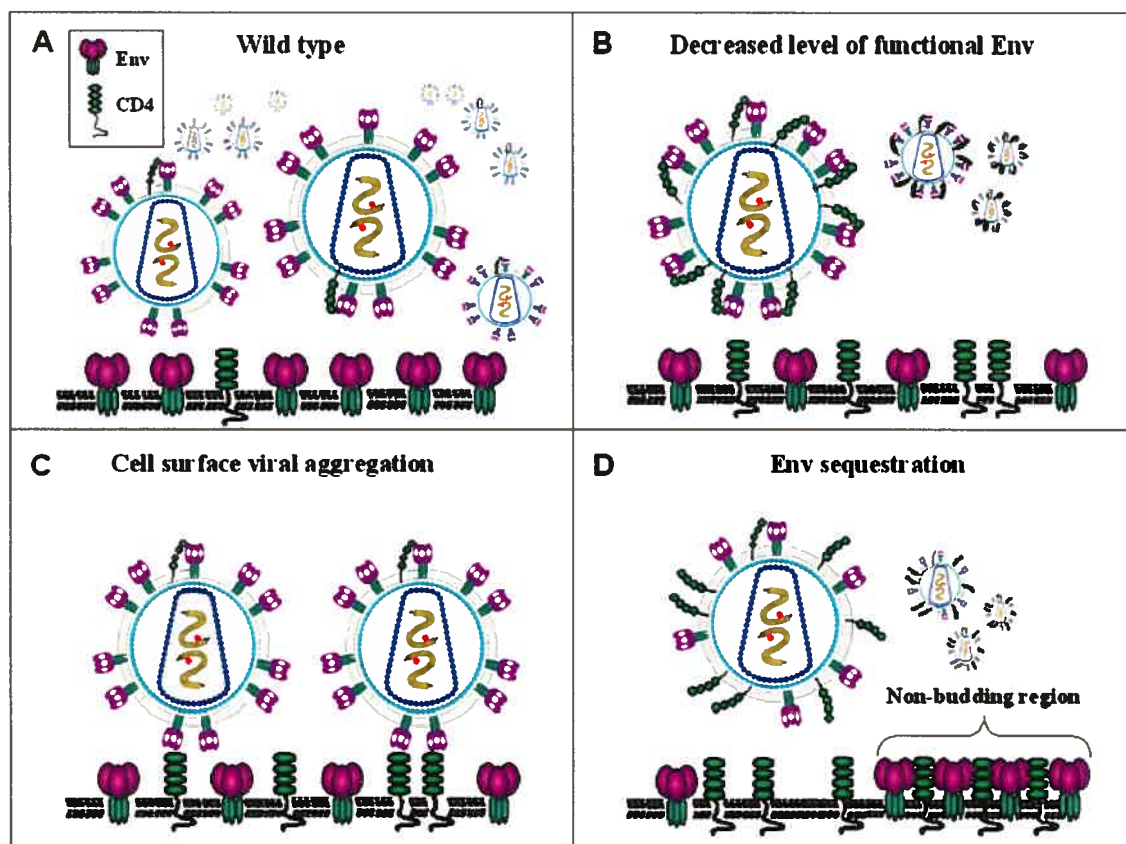


Figure 3. Different proposed models of CD4-mediated inhibition of HIV-1 infectivity. A) In the course of wild type virus infection, both Nef and Vpu contribute to CD4 down-modulation thus decreasing dramatically its cell surface expression and virion incorporation during viral morphogenesis. Consequently, fully infectious particles are efficiently released from the infected cells. B) In the absence of Vpu expression, the CD4 molecule is being incorporated into the nascent viral particle due to its increased expression at the cell surface. This ultimately results in a viral infectivity impairment that is mechanistically explained by the formation of CD4/gp120 complexes at the surface of the virion. C) In the absence of Vpu and/or Nef, CD4 levels are markedly increased at the cell surface. The aggregation model proposes that high cell surface CD4 expression inhibits HIV-1 progeny virion release from the infected cells by trapping the virus at the cell surface. D) In the absence of Nef and Vpu, high cell surface CD4 expression induce a reduction in the infectivity potential of released virions by sequestering the viral Env by CD4 into non-budding area of the plasma membrane. While CD4 is well incorporated into nascent virions, it also blocks efficiently Env incorporation in the budding virions.



ABBREVIATION LIST

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

AP: clathrin Adaptor Complexes

β -COP: β -subunit of the endosomal COP-I coatomer

BFA: Brefeldin A

E3: Ubiquitin ligase complex

Env: gp160 protein

ER: Endoplasmic Reticulum

ERAD: ER-Associated Degradation

HIV: Human Immunodeficiency Virus

h- β TrCP: human beta transducin-repeat containing protein

LTNPs: Long-Term Non Progressors

MHCI: class I Major Histocompatibility Complex

MHCII : class II Major Histocompatibility Complex

SCF ^{β TrCP}: Ubiquitin ligase complex (E3) SCF containing the specificity component h- β TrCP

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SHIV: Simian-Human Immunodeficiency Virus

SIV: Simian Immunodeficiency Virus

SU: gp120 protein

TGN: Trans-Golgi Network

TM: Transmembrane

Ub: Ubiquitin

V1H: subunit H of the Vacuolar ATPase

Vpu: Viral protein U

CHAPITRE 10:
APPENDICE 3
(Figures Supplémentaires)

Figure 1. Plasma membrane migration after subcellular fractionation using a linear optiprep gradient (Chapter 2) in presence of different endocytosis inhibitors. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus or cotransfected together with dynamin K44A or Caveolin 1 expressors (kindly provided by Dr JP Gratton, IRCM, Montreal, Canada). Alternatively, cells were cotransfected with HxBc2 together with 300 pmol of siRNA against Eps15 (J-004005-05, Dharmacon). Forty-eight hours post-transfection cells were washed three times with ice-cold PBS and then labeled in PBS containing 480 µg/ml of sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) for 30 minutes at 0°C. Cells were then washed with cold PBS-Tris 50 mM to quench the remaining biotinylation reagent. Cells were then washed twice with cold PBS. Cells were subsequently mechanically lysed and subjected to sub-cellular fractionation as described in the Materials and Methods section of Chapter 2. Of note, due to the high density of fractions 10-14, we could not perform dot-blot analysis for cell surface biotinylation. Therefore, biotinylated cell surface proteins were loaded on SDS-PAGE (12.5%) and allowed to enter the gel by short migration. Fractions were subsequently analyzed by western blot using a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham, Baie d'Urfe, QC, Canada). For the analysis of cell surface biotinylation in drug-treated cells (chlorpromazine 10 µg/ml, MβCD 8 mM, filipin 4 µg/mL, dynasore 80 µM), drugs were added for 30 min at 37°C in DMEM before subjecting cells to the procedure described above (drugs were present throughout the experiment). Chlorpromazine, MβCD and filipin were purchased from Sigma-Aldrich, (Oakville, ON, Canada). Dynasore was kindly provided by Dr T. Kirchhausen (Harvard Medical School, Boston, USA). Some endocytosis inhibitors induced plasma membrane migration to the bottom of the gradient (A) whereas sterol-binding drugs (MβCD, filipin) and chlorpromazine did not (B).

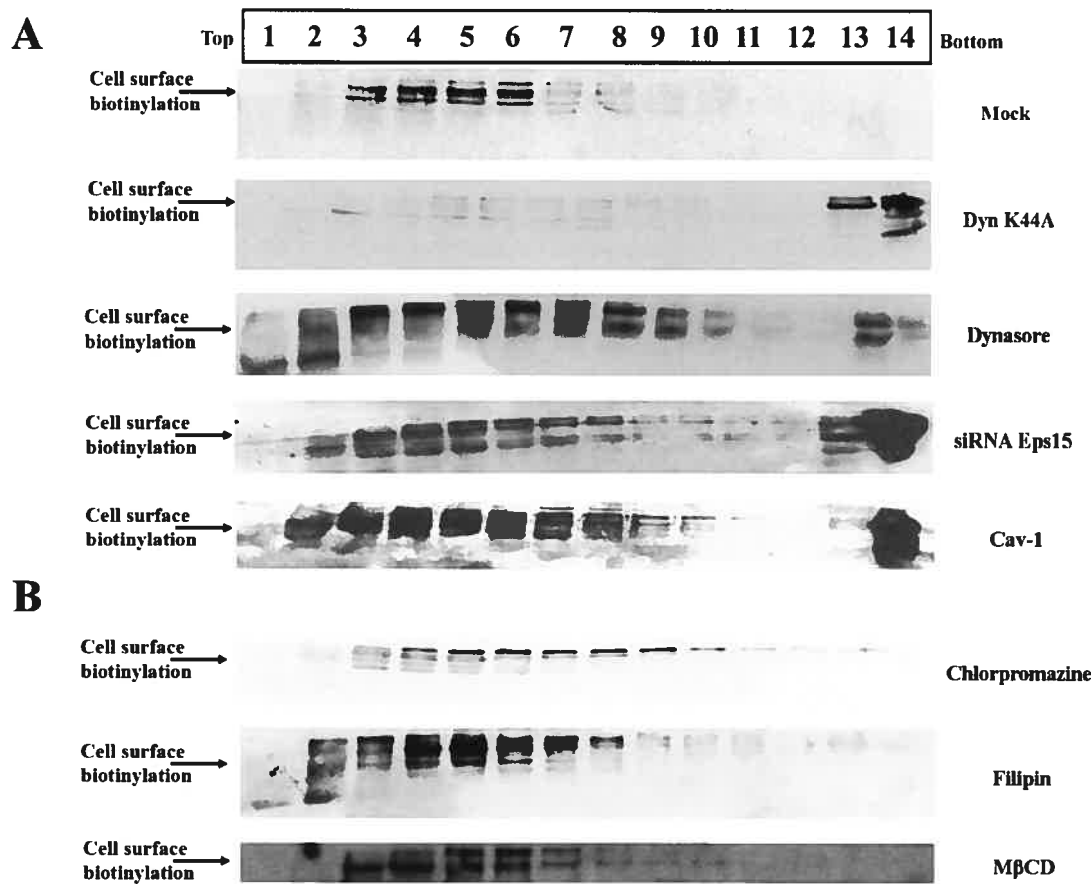


Figure 2. The effect of cholesterol depletion on Gag accumulation within LE/MVB-enriched fractions is reversible. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in absence (A) or presence of MβCD (8 mM) (B); alternatively, MβCD-treated cells were extensively washed and chased in DMEM containing excess of unlabelled methionine and cysteine but without the drug (C) prior to cell lysis and sub-cellular fractionation as described in Materials and Methods of Chapter 2. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. (D) Quantification of mature Gag products (p24/p25) present in LE/MVB-enriched fractions was performed using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0. Mature Gag products accumulating in LE/MVB-enriched fractions was arbitrarily set to 100. Data shown represents the average +/-SD of two independent experiments.

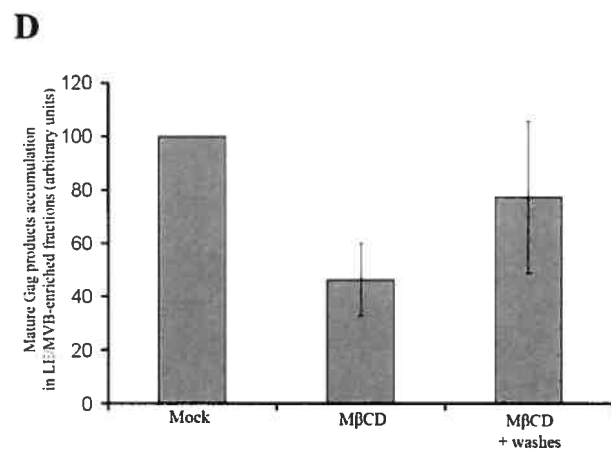
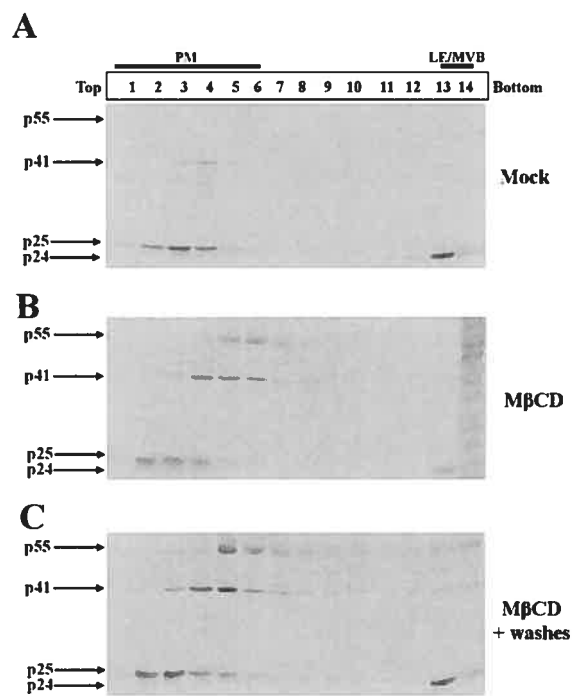


Figure 3. HIV-1 Gag membrane association in presence of endocytosis inhibitors. HEK 293T cells were transfected with the protease defective HxBc2 PR-Env- provirus. Two days after transfection cells were pre-treated with chlorpromazine (10 $\mu\text{g/ml}$), filipin (4 $\mu\text{g/ml}$) or M β CD (8 mM) for 30 min, subsequently metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 0 h (A) and 2 h (B) in presence of the drugs, prior to cell lysis and flotation onto a discontinuous sucrose gradient as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. Quantification of the relative amounts of Pr55^{Gag} in the interface of the 10-65% sucrose layer (membranes, M) and in high density fractions (cytosol, C) was performed using a PhosphorImager equipped with ImageQuant software 5.0. Data shown are means \pm standard deviations of 2 independent experiments.

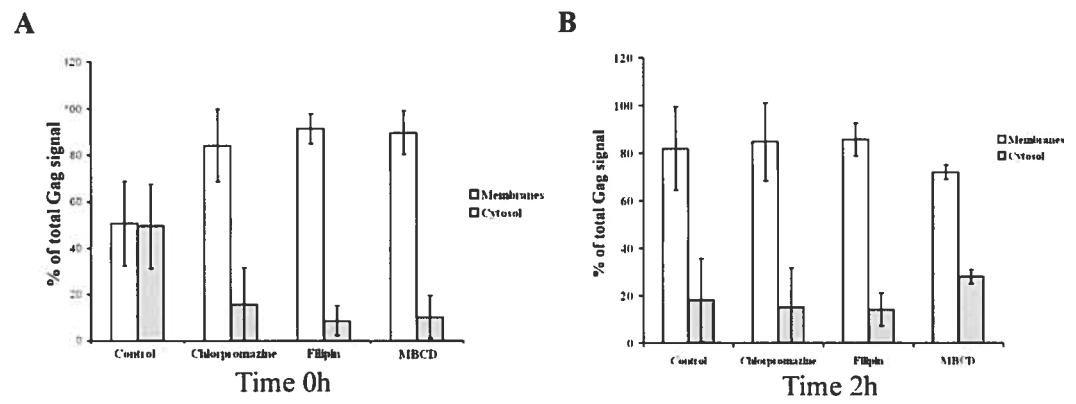


Figure 4. Effect of sterol-binding drugs on viral release efficiency.

HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection cells were pre-treated with M β CD (8 mM) or filipin (4 μ g/ml) for 30 min before being metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in presence of the drugs. Viral particles released during the 2 h chase period were recovered by ultracentrifugation through a 20% (wt/v) sucrose cushion as described in Materials and Methods. Cell and virion lysates were immunoprecipitated with an anti-p24 Ab. Viral release efficiency for mock-treated cells was arbitrarily set to 100 and was calculated as the amount of virion-associated-Gag as a fraction of total Gag (cell plus virion). Data shown is representative of four independent experiments +/-SD.

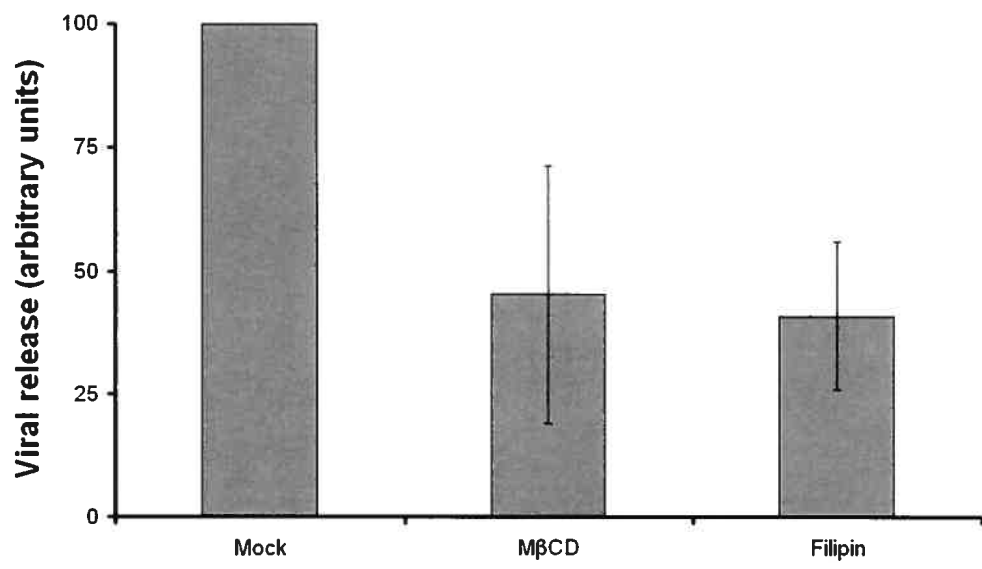
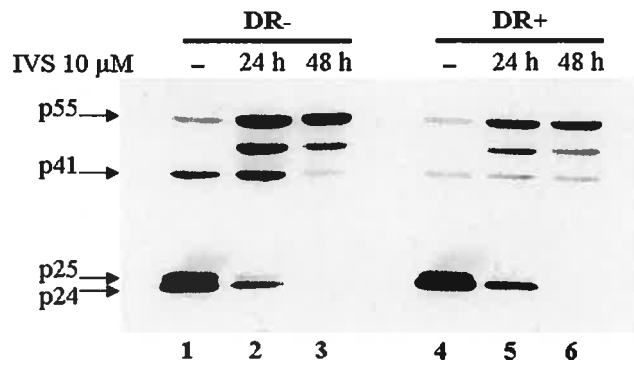


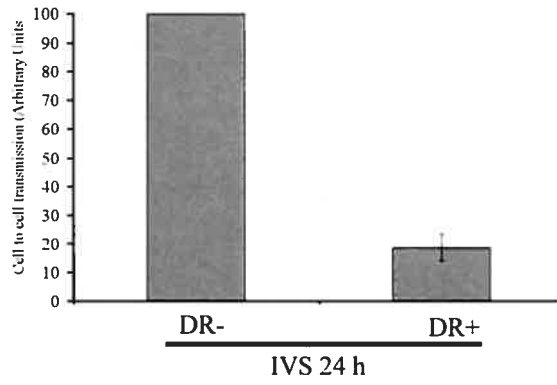
Figure 5. HLA-DR expression decreases cell to cell transmission.

HEK 293T cells were cotransfected with HxBc2 provirus and empty or HLA-DR vectors. IVS (10 μ M) was added to the culture medium at the time of transfection (48h) to completely block Gag processing and therefore production of infectious viral particles. Alternatively, accumulation of infectious viral particles was allowed for 24 h (as described in Fig.7 of chapter 3) by adding IVS to the medium 24 h posttransfection (24 h). Gag processing in each transfectant was analyzed by western blotting using a monoclonal anti-p24 Ab 48 h posttransfection (A). In parallel, 3×10^5 HEK 293T were washed with DMEM to remove cell-free virus and were subsequently co-cultured with 5×10^5 CEM-GFP cells to allow cellular transmission for 3 h. CEM-GFP cells were subsequently recovered, washed three times with RPMI to remove cell-free viruses as well as IVS (to allow viral replication) and incubated at 37°C for 3 days before quantifying the percentage of GFP+ cells by FACS. (B) Cell to cell transmission of infectious viruses that were formed prior to addition of the inhibitor (24 h). Even though HLA-DR samples presents more Gag mature products (p24) (compare lanes 2 and 5, Panel A), HLA-DR-positive cells transmit less efficiently the virus to T cells. (C) Cellular transmission of viruses that were constantly produced in presence of IVS (48 h). Panel C represent backgrounds levels of this assay given that when IVS is added at the time of transfection no mature Gag products (p24) are detected (see lanes 3 and 6, Panel A). GFP+ counts were arbitrarily set to 100 for HLA-DR-negative-24h-IVS treated samples. Data shown represents the average of three independent experiments +/-SD.

A



B



C

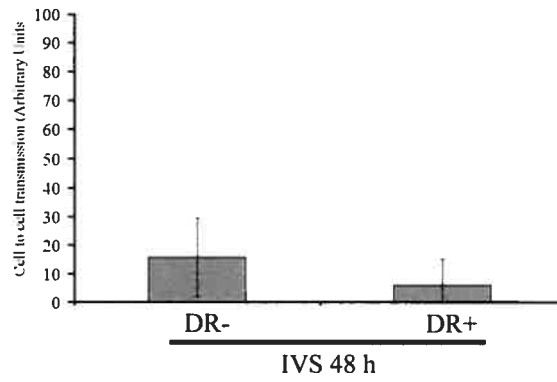


Figure 6. HLA-DR expression does not affect infectivity of released viral particles.

HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 infectious provirus together with empty or HLA-DR expressors. Two days after transfection the extracellular medium was harvested, clarified by low-speed centrifugation and released viruses were subsequently normalized by RT activity. Viral infectivity was measured by MAGI assay (the procedure was already described in the Materials and Methods of Chapter 3). Infectivity of virus released from HLA-DR negative cells were arbitrarily set to 100. Data shown is representative of two independent experiments +/-SD.

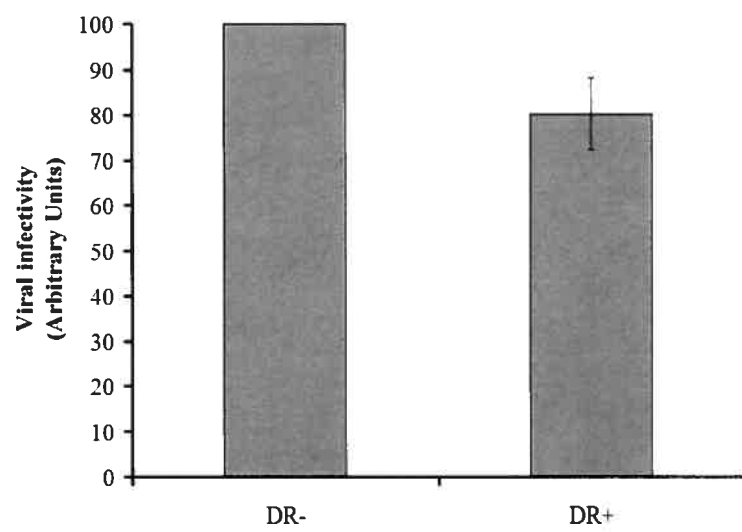


Figure 7. HLA-DR is unable to affect Gag localization or viral release in presence of MARCH8. HEK 293T cells were co-transfected with plasmids encoding HLA-DR (DR+) or empty vector (DR-) together with the HxBc2 provirus in presence or absence of MARCH8 (M8) (kindly provided by Dr V. Steimle, Sherbrooke University, Canada). (A) Two days after transfection, Gag localization was evaluated by immunofluorescence using a rabbit anti-p24 polyclonal antibody (catalog no. 4250; NIH AIDS Reference and Reagent Program). Diffuse or punctuate Gag-associated-staining was quantified in two hundred cells per sample. Data shown are means \pm SD of two independent experiments. Alternatively, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met/Cys for 2 h, and Gag-associated products in cell and virion lysates were immunoprecipitated using a monoclonal anti-p24 Ab (B). (C) Quantitation of virus release efficiency. (D) In addition, cell lysates were immunoprecipitated with an anti-HLA-DR Ab (L243). Viral release efficiency was calculated as described in Materials and Methods. Data shown in panels B-D is representative of 2 independent experiments.

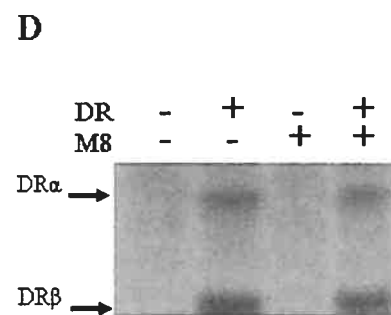
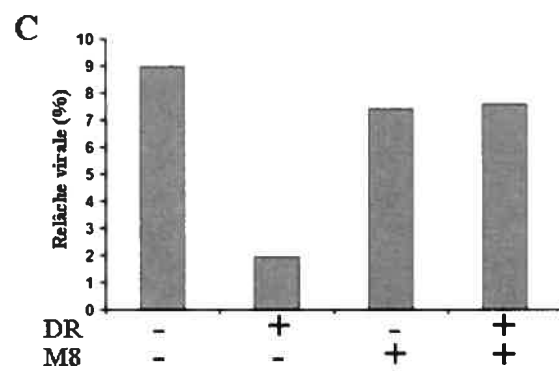
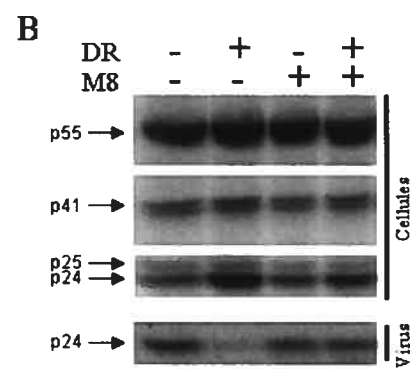
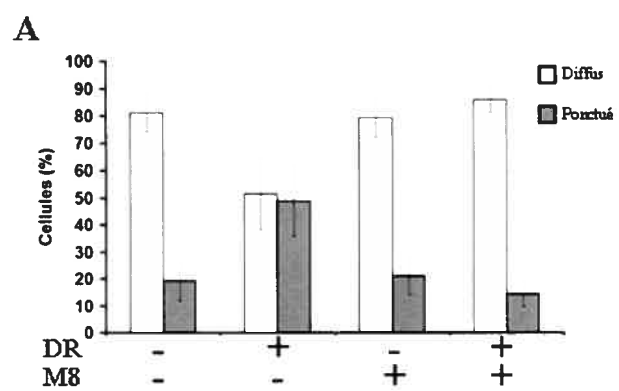
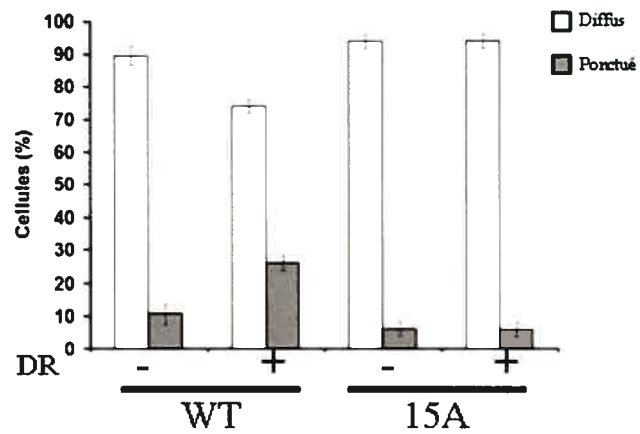
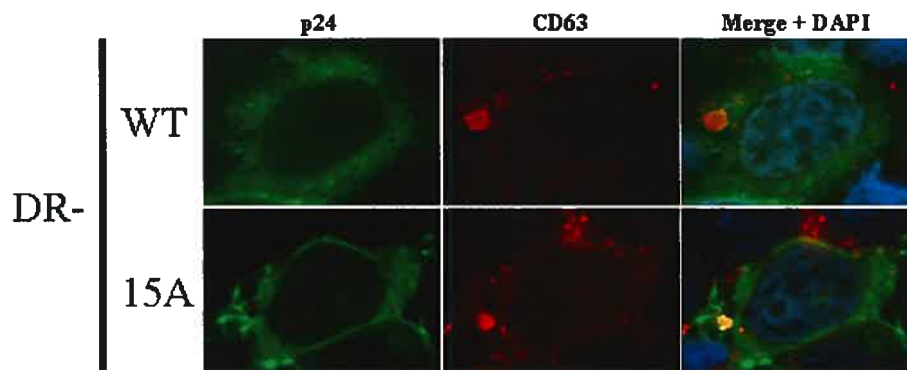


Figure 8. HLA-DR is unable to affect the localization of a multimerization defective Gag mutant. HEK 293T cells were co-transfected with plasmids encoding HLA-DR (DR+) or empty vector (DR-) together with a plasmid encoding WT Gag (pNLSE-HxBc2) or a mutant that cannot multimerise due to mutations of all its NC basic amino acids critical for Gag-Gag interactions (pNLHX15A) (Cimarelli, Sandin et al. 2000) (kindly provided by Dr E. Freed, NCI, Frederick, USA). (A) Two days after transfection, Gag localization was evaluated by immunofluorescence using a rabbit anti-p24 polyclonal antibody (catalog no. 4250; NIH AIDS Reference and Reagent Program) together with HLA-DR (L243) or CD63 (H5C6) Abs (B). Diffuse or punctuate Gag-associated-staining was quantified in two hundred cells per sample (A). Data shown are means \pm SD of two independent experiments.

A



B



C

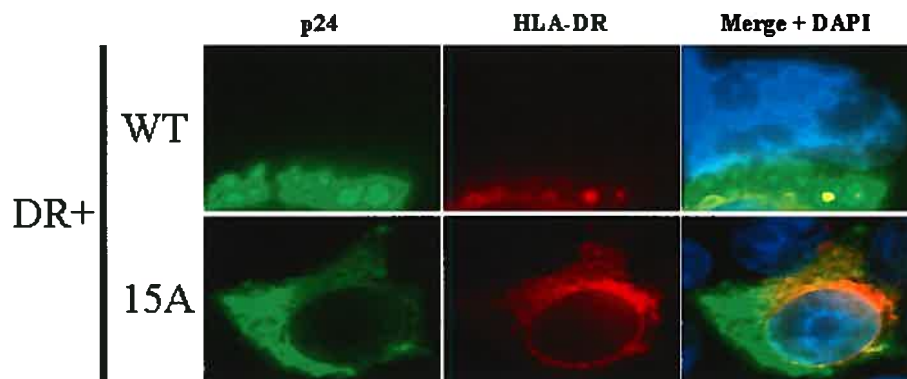


Figure 9. HIV-1 envelope binds HLA-DR as well as its truncated mutant. HEK 293T cells were co-transfected with HxBc2 or its Env- counterpart together with empty (DR-) or HLA-DR (DR+) vectors. (A) Two days after transfection cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met/Cys for 2 h, and HIV-1-associated products in cell lysates were immunoprecipitated using a mix of a monoclonal anti-p24 Ab together with a previously described human anti-HIV serum, that strongly reacts with Env (no 162, (Levesque, Zhao et al. 2003)). Alternatively, cells were immunoprecipitated with an anti-HLA-DR Ab (L243, bottom panel). (B) HEK 293T cells were co-transfected with HxBc2 together with DR or its tail-less mutant (TM). (C) HEK 293T cells were co-transfected with gp160 (pIIIenv), gp120 (pIIIgp120) and gp41 (pTRenv) expressors (Gabuzda, Lever et al. 1992) together with HLA-DR. For panels B and C, cells and immunoprecipitations were processed as described in panel A.

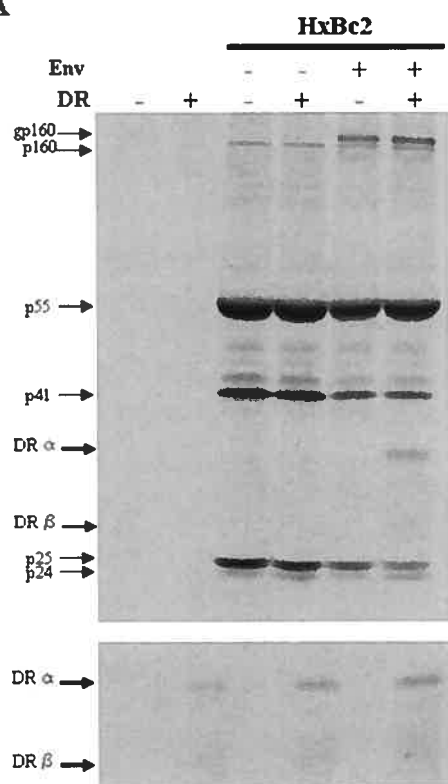
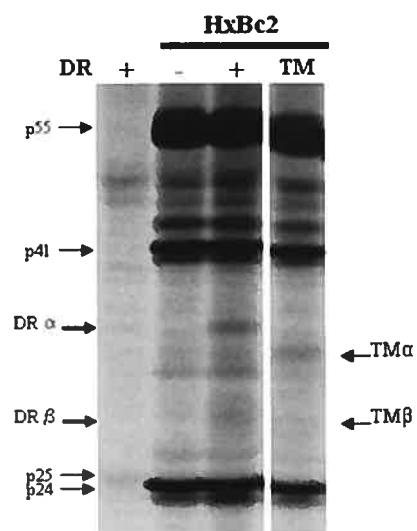
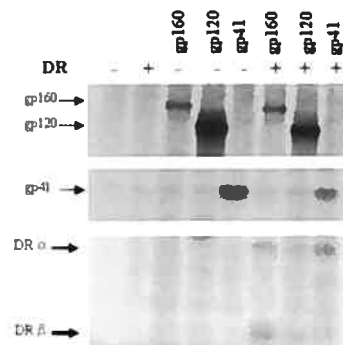
A**B****C**

Figure 10. **Ultrastructural analysis of high-density fractions from mock-transfected cells.** HEK 293T cells were mock-transfected and mechanically homogenized 48 h later. PNS production and subcellular fractionation were performed as described in the Materials and Methods section of Chapter 2. Fourteen fractions were collected from the top of the gradients and fractions 13 and 14 were pooled, fixed, ultracentrifuged, and observed by conventional transmission EM. Scale bar represent 100 nm. The structure shown is representative of structures found at the bottom of the gradient from two independent experiments.

