

2m 11.2573.7

Université de Montréal

**Maturation polarisée du virus de l'immunodéficience humaine dans les
lymphocytes**

par

Jean Philippe Lalonde

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

en microbiologie et immunologie

Novembre 1996

©Jean Philippe Lalonde, 1996



2011.02.08

W
4
U58
1998
V.025

Université de Montréal

Métastases hépatiques de virus de l'immunodéficience humaine
Trophocytaires

Jean-François Lapierre

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M.Sc.)

en microbiologie et immunologie

Novembre 1998

Directeur de la thèse: Dr. J. Lapierre



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Maturation polarisée du virus de l'immunodéficience humaine dans les
lymphocytes**

présenté par

Jean-Philippe Lalonde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Gabriel Drapeau, président-rapporteur

Dr Guy Lemay, directeur de recherche

Dr Éric A. Cohen, codirecteur

Dr Guy Boileau, membre du jury

Mémoire accepté le: _____

15. 12. 1997

SOMMAIRE

La différenciation de membranes cellulaires en domaines distincts est un phénomène que l'on considère de plus en plus comme étant généralisé. Des types cellulaires très différents peuvent sans doute utiliser des mécanismes de ciblage communs pour le trafic de leurs protéines à des domaines membranaires spécifiques. Le phénomène de différenciation membranaire chez les lymphocytes a été décrit pour la première fois lorsque l'on a remarqué que les lymphocytes développent des projections cytoplasmiques appelées uropodes lors de leur activation. Il avait déjà été observé qu'une polarisation du bourgeonnement du VIH était présente lorsque des monocytes ou lymphocytes étaient en contact avec des cellules épithéliales ou avec une matrice extracellulaire solide de fibronectine, le résultat étant la relâche virale à un pôle de la cellule. Dans le cas des cellules épithéliales, de courtes séquences d'acides aminés dans le domaine intracytoplasmique de plusieurs protéines, incluant celle du VIH, ont été identifiées comme étant un déterminant majeur du ciblage aux membranes basolatérales. Notre objectif était de vérifier si un signal de polarisation similaire pourrait être reconnu chez les lymphocytes et être impliqué dans la polarisation du bourgeonnement viral. Dans cet ouvrage, nous avons donc tenté de comprendre plus en détail le mécanisme de polarisation dans les lymphocytes en utilisant des lignées lymphocytaires chroniquement infectées avec différents virus VIH. Ces virus sont tous identiques, à l'exception de mutations au niveau des acides aminés impliqués dans le signal de polarisation chez les cellules épithéliales. Suite à la réplication de ces différents virus, l'établissement de lignées chroniquement infectées permet d'éviter les problèmes d'interprétation dûs aux possibles différences dans les cinétiques de multiplication virale. Les techniques d'immunofluorescence et de microscopie électronique nous ont permis de démontrer que la tyrosine proximale à la membrane cellulaire est un acide aminé essentiel dans le phénomène de polarisation. Une co-localisation du VIH et de la myosine cellulaire a aussi été démontrée pour le virus de

type sauvage, tandis que la mutation qui abolit la polarisation, bloque également cette co-localisation.

Le phénomène de ciblage pourrait jouer un rôle important dans la transmission du virus entre cellules, et ce spécialement au niveau des muqueuses. Définir et mieux comprendre le mécanisme de la transmission sexuelle, précisément la façon dont le VIH infecte et traverse la surface des muqueuses est évidemment essentiel à une meilleure compréhension de la pathogénèse du VIH.

MOTS CLEFS: Lymphocytes; Bourgeoisement;

VIH-1; Glycoprotéines; Transport polarisé.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.	II
SOMMAIRE.	III
TABLE DES MATIÈRES.	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.	X
DÉDICACE.	XIV
CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE.	1
Première partie : Le virus de l'immunodéficience humaine.	
1. Introduction.	2
2. Découverte du SIDA.	3
3. Pathologie du SIDA.	4
4. Structure du virion et du génome.	6
5. Cycle de multiplication du VIH.	7
5.1 Événements pré-intégration.	7
5.2 Événements post-intégration.	10
5.3 Les protéines Tat et Rev.	10
6. Synthèse et assemblage des protéines virales de structure.	11
6.1 Les polyprotéines Gag et Gag-Pol.	11
6.2 Les glycoprotéines du VIH.	12
6.3 L'assemblage et le bourgeonnement.	15
7. Les protéines accessoires du VIH.	16
7.1 La protéine Vif.	16
7.2 La protéine Vpu.	17
7.3 La protéine Nef.	17
7.4 La protéine Vpr.	18

Deuxième partie : Les cellules polarisées et le VIH.	19
1. Introduction.	
1.1 La polarisation cellulaire.	19
1.2 Les cellules épithéliales comme modèle de la polarisation.	19
1.3 La polarisation dans les lymphocytes.	21
1.3.1 Le phénomène de polarisation.	21
1.3.2 Les cytokines et la polarisation dans les lymphocytes.	22
1.4 Les autres cellules polarisées.	23
2. La maturation polarisée des virus.	23
2.1 Dans les cellules épithéliales.	23
2.2 Dans les lymphocytes.	24
3. Mécanismes impliqués dans la polarisation des cellules et du bourgeonnement viral.	25
3.1 Le contact cellule-cellule.	25
3.2 Le cytosquelette et la polarisation.	26
3.2.1 Dans les cellules épithéliales.	27
3.2.2 Dans les lymphocytes.	27
3.3 L'interaction du cytosquelette avec différents virus.	28
4. Les signaux de ciblage et le VIH.	29
5. But du projet.	32

CHAPITRE 2: ARTICLE.

JEAN-PHILIPPE LALONDE, JULIE DESCHAMBAULT,
ROBERT LODGE, ÉRIC A. COHEN and GUY LEMAY

A Tyrosine-Based Intracytoplasmic Signal of the HIV-1
Envelope Glycoprotein Is Involved in Restriction of Budding
at One Pole of Infected Lymphocytes 36

ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIALS AND METHODS	41
RESULTS	44
DISCUSSION	48
ACKNOWLEDGEMENTS	51
REFERENCES	51
FIGURES	61

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION 74

DISCUSSION	75
ANNEXE SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES	88
CONCLUSION	98

CHAPITRE 4: BIBLIOGRAPHIE ET REMERCIEMENTS 99

BIBLIOGRAPHIE	100
REMERCIEMENTS	120

LISTE DES FIGURES

À l'intérieur de la revue bibliographique.

1. Représentation schématique de la structure et du génome du virus de l'immunodéficience humaine. page 34

À l'intérieur de l'article.

2. (1 dans l'article) Cinétique de multiplication virale suite à la transfection d'ADN proviral dans les cellules Jurkat-TA. page 62
3. (2 dans l'article) Analyse par cytofluorométrie de l'expression à la surface de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. page 64
4. (3 dans l'article) Cellules chroniquement infectées par le VIH-1 et observées par immunofluorescence. page 66
5. (4 dans l'article) Histogramme des résultats de l'immunofluorescence pour différents virus mutants. page 68
6. (5 dans l'article) Cellules transfectées avec différents virus mutants du VIH-1 et observées par microscopie électronique page 70
7. (6 dans l'article) Association entre le cytosquelette et le bourgeonnement viral. page 72

LISTE DES FIGURES (SUITE)

À l'intérieur de l'annexe

8. Plasmides utilisés pour la création de lignées permanentes exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 dans les cellules épithéliales MDCK. page 93
9. Représentation schématique de la sélection des lignées permanentes exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. page 95
10. Vérification de l'incorporation d'enveloppe en trans dans des lignées exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 de manière inductible. page 97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN, ARNm, ARNt	Acide ribonucléique (messager, de transfert)
ATP, GTP	Adénosine (Guanosine) tri-phosphate
CDC	Center for disease control (Centre pour le contrôle des maladies)
C1 à C5	Régions constantes 1 à 5
CD4	Protéine membranaire des cellules T auxiliaires liant la <i>gp120</i> du VIH
CMH-II	Classe majeure d'histocompatibilité de type II
Env	Enveloppe (d'où les gènes et protéines virales)
Gag	Group antigen (d'où les gènes ou protéines responsables de la structure virale)
gp41	Glycoprotéine 41 (transmembranaire du VIH-1)
gp120	Glycoprotéine 120 (de surface du VIH-1)
gp160	Glycoprotéine 160 (le précurseur de la <i>gp120</i> et de la <i>gp41</i>)
HTLV	Human T-cell leukemia virus; Virus de la leucémie humaine de type T

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (SUITE)

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (Molécule d'adhésion intercellulaire)
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IN	Intégrase
LAV	Lymphadenopathy associated virus (Virus causant des pathologies lymphoïdes)
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LTR	Long Terminal Repeat; Longue répétition terminale
MA	Protéine de la matrice
MCP	Monocyte chemotactic protein (Protéine chémostatique pour monocyte)
MDCK	(Cellules) Madin Darby Canine Kidney
MIP	Macrophage inflammatory protein (Protéine inflammatoire de macrophage)
MuLV	Murine leukemia virus; Virus de la leucémie murine
nm (mm, cm)	nanomètre (millimètre, centimètre)
NC	Nucléocapside
NRE	Negative response element (élément de réponse négative)

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (SUITE)

p17, p24, p9, p6	Protéines <i>gag</i> matures du VIH-1: <i>p17</i> (de la matrice), <i>p24</i> (de la capsid), <i>p9</i> (de la nucléocapsid) et <i>p6</i>
PF	Platelet factor (facteur de plaquette)
PR	Protéase
Pr55gag, Pr160gag-pol (du VIH-1)	Protéine <i>gag</i> qui est le précurseur de <i>p17</i> , <i>p24</i> , <i>p9</i> , <i>p6</i> et, dans le cas de <i>p160</i> , des enzymes virales
Psi	Élément d'encapsidation en Cis
Pol	Gène des rétrovirus codant, entre autres, pour l'intégrase et la transcriptase inverse
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (Protéine exprimée et sécrétée par des cellules T normales et régulée lors de l'activation)
RT	Reverse transcriptase (Transcriptase inverse)
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SRP	Signal response particle (Particule de reconnaissance de signaux)
SV40	Simian virus 40; Virus simien 40
RE	Réticulum endoplasmique

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (SUITE)

TAR	Tat activating response element (Élément de réponse à la protéine Tat)
TNF	Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale)
V1 à V5	Régions variables 1 à 5
VIH (1 ou 2)	Virus de l'immunodéficience humaine (type 1 ou 2)
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VSV-G	Glycoprotéine G du VSV

**À ma mère et amie Micheline,
pour son support constant à travers
mes études et ma carrière sportive**

et

**À ma femme Rebecca
pour m'avoir donné la
confiance nécessaire pour
compléter ce mémoire**

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

PREMIÈRE PARTIE : LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

1. INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience humaine (SIDA). Cette maladie est sans équivoque l'un des problèmes médicaux parmi les plus importants de notre décennie. Une projection conservatrice de l'organisation mondiale de la santé estime le nombre d'individus infectés par le VIH entre 20 à 30 million d'ici l'an 2000, dont 5 à 10 million seront des enfants (Jasny, 1993). Au cours des dernières années, les progrès rapides qui ont marqué la recherche sur le SIDA démontrent plusieurs découvertes importantes sur l'efficacité de différentes thérapies pharmacologiques en combinaisons. Ces thérapies sont d'autant plus efficaces si elles sont appliquées lors d'une intervention précoce. Plusieurs questions restent toutefois à répondre concernant la pathogénèse associée au SIDA et les mécanismes responsables de sa progression. Confrontée à un adversaire aussi subtil et redoutable que le VIH, la communauté scientifique doit tenter de mieux comprendre les stratégies de réplication de ce virus afin de s'y opposer de façon aussi sélective et efficace que possible.

2. DÉCOUVERTE DU SIDA

Au début des années 80, plusieurs groupes, dont le centre pour le contrôle des maladies (CDC), ont rapporté une augmentation de maladies rares comme le sarcome de Kaposi et des pneumonies chez des patients qui étaient victimes d'un nouveau syndrome causant une immunodéficience acquise (Gottlieb, et al., 1981, Gyorkey, et al., 1984, Masur, et al., 1981, Siegal, et al., 1981). Ils proposent alors que ce nouveau syndrome d'immunodéficience, qu'ils appelleront "SIDA", est acquis suite à l'infection par un agent transmissible lors de contact sexuel, par des produits sanguins, et de mère à enfant. Quelques années plus tard, l'équipe du Dr. Montagnier isole à partir de cellules ganglionnaires un agent infectieux possédant toutes les caractéristiques d'un rétrovirus, qui fut nommé LAV pour "Lymphadenopathy associated virus" (Barré-Sinoussi, 1983, Montagnier, et al., 1984). Au cours de l'année 1983, l'équipe du Dr. Robert Gallo découvre un virus similaire à ceux causant des lymphomes de type T et qui serait génétiquement apparenté à la famille des rétrovirus; il nomme donc ce virus HTLV-III (Gallo, 1984). Par la suite, d'autres groupes, dont celui du Dr. Jay Levy, démontrèrent qu'un seul rétrovirus est responsable du développement des symptômes associés au SIDA (Levy, et al., 1984). Ce n'est qu'en 1986 que le virus du SIDA reçoit l'appellation de VIH-1 par le comité international de taxonomie des virus. Un peu après cette découverte de VIH-1, un sous-type différent est découvert en Afrique de l'ouest que l'on appelle VIH-2 (Clavel, et al., 1986).

3. PATHOLOGIE DU SIDA

Le virus du SIDA appartient à la famille des *Retroviridae*, sous-famille des *Lentivirinae*. Cette sous-famille inclue plusieurs virus différents pouvant infecter divers groupes d'espèces animales (Coffin, 1992, Haase, 1986, Levy, 1986). Le SIDA est une maladie très complexe qui est le résultat de l'infection par le VIH. Cette complexité est due en partie au fait que le VIH n'infecte pas uniquement les lymphocytes CD4⁺, sa cible principale, mais se retrouve également dans d'autres classes de cellules du système immunitaire, telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Le virus peut aussi infecter certaines cellules du système nerveux central, de la moëlle épinière, et de l'épithélium intestinal (Levy, 1993). Le SIDA a été décrit comme se déroulant en 3 phases cliniques (Pantaleo, et al., 1993, Pantaleo, et al., 1993). La phase aiguë, aussi appelée "primo-infection", est longue de quelques semaines et se caractérise par une énorme production virale dans le sang périphérique. Cette production virale permet au virus de se propager à travers un grand nombre d'organes et de tissus cibles, mais spécialement dans le système lymphoréticulaire où il y aura une réplication massive par la suite. La plupart des individus nouvellement infectés développent des symptômes non-spécifiques dans un délai de 1 à 3 semaines. Certains de ces symptômes sont très légers, et consistent en des maux de tête, des douleurs rétro-orbitales, des douleurs musculaires, des maux de gorge, de la fièvre, ainsi que des gonflements au niveau des ganglions lymphatiques (Cooper, et al., 1985, McMillan, et al., 1989). D'autres manifestations cliniques du SIDA sont beaucoup plus prononcées, comme des candidioses (McMillan, et al., 1989), de la diarrhée à répétition (Carne, et al., 1985), des pneumonies (Tindall, et al., 1993) et des mononucléoses (Tindall, et al., 1988, Tindall, et al., 1993) qui peuvent persister pendant plusieurs mois. La phase clinique suivante est la plus longue et la plus imprévisible. Elle est d'une durée moyenne de 7 ans mais peut varier énormément. Cette période est généralement marquée par l'absence de signes cliniques ou de symptômes et

une diminution de la présence d'antigènes viraux dans le sang. Durant cette "latence clinique" il est difficile d'isoler du virus dans le sang et très peu de cellules semblent infectées, à cause de la réponse immunitaire de l'hôte (Haseltine, 1989); cette absence de virus en périphérie est trompeuse. Des études ont mis en évidence la présence de variations au niveau de la séquence nucléotidique du VIH sous forme intégrée dans le génome des cellules monocytaires des ganglions lymphatiques. Cette découverte importante nous démontre que c'est à cet endroit que se produit la réplication massive du virus (Ho, et al., 1989). Ces études, et d'autres plus récentes, démontrent aussi la réplication massive du virus dans les cellules lymphocytaires et les macrophages (Ho, 1996, Pantaleo, et al., 1993). Cette réplication virale implique une lutte constante entre le système immunitaire et le VIH en périphérie. Lors de la "latence clinique", il existe donc un équilibre entre l'infection d'un très grand nombre de cellules lymphocytaires, la réplication virale, et le renouvellement de ces cellules détruites. Cet équilibre sera présent jusqu'à ce qu'il y ait un manque chronique de ces cellules essentielles causant une déficience immunitaire. Durant la 3^{ème} et dernière phase de l'infection, ce sont les symptômes de cette déficience immunitaire que l'on retrouve. Ils sont caractérisés par l'apparition de virus circulant, une multitude d'infection opportunistes, de la néoplasie, et le décès suite à une immunodéficience presque totale (Ho, et al., 1989, Levy, 1993).

4. STRUCTURE DU VIRION ET DU GÉNOME

L'apparence en microscopie électronique du VIH-1 mature est celle d'un cône dense cylindré recouvert d'une enveloppe lipidique acquise au cours du bourgeonnement à la membrane plasmique de la cellule infectée. La particule virale possède un diamètre d'environ 110 nm et possède à sa surface une protéine d'enveloppe virale qui, par microscopie électronique, apparaît comme des projections en forme de spicules constituées de 72 unités trimériques. La particule virale, lorsque complète, possède deux molécules d'ARN monocaténaire d'environ 9.3 Kb qui sont étroitement associées aux protéines de la nucléocapside (p9, p6) et à la transcriptase inverse (p64, p51) (Gelderblom, 1991). Ce complexe autour de l'ARN viral est recouvert par la protéine majeure de la capsid (la p24). Une autre protéine du VIH, la protéine de la matrice (p17), s'interpose entre la glycoprotéine de l'enveloppe et la p24. On retrouve aussi, incorporé dans le virion, un ARN de transfert (ARNt) lysine cellulaire, qui servira d'amorce au processus de réverse transcription virale (Barat, et al., 1989). Au cours du bourgeonnement, le virus entraîne avec lui plusieurs des protéines cellulaires présentes sur la membrane plasmique de la cellule hôte. Parmi ces molécules, quelques-unes se retrouvent en faible quantité comme une molécule d'adhésion inter-cellulaire (Intercellular adhesion molecule, ICAM-1) et une protéine associée à la fonction lymphocytaire (Lymphocyte-function associated protein, LFA-1) (Henderson, et al., 1987, Meerloo, et al., 1992), tandis que d'autres, telles que la cyclophyline et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont beaucoup plus abondantes (Gelderblom, 1991, Henderson, et al., 1987).

5. CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIH

Le VIH et les autres lentivirus ont un cycle de multiplication en plusieurs parties semblable à celui de tous les rétrovirus. Le phénomène d'intégration du matériel génétique viral au génome cellulaire ainsi que la capacité du VIH d'infecter des cellules quiescentes sont des événements décisifs dans le cycle de multiplication et la persistance de ce rétrovirus. Ces notions essentielles ont des implications multiples, en terme de réplication virale persistante, d'évasion à la réponse immunitaire, et de pathogénèse de l'infection virale. C'est pourquoi il est beaucoup plus facile de diviser ce cycle de multiplication en deux grandes étapes : les événements pré et post-intégrations.

5.1. Évènements pré-intégration

Le VIH est retrouvé dans plusieurs tissus et le virus peut infecter plusieurs types de cellules humaines en culture. Par rapport à d'autres virus, le VIH ne peut être qualifié de pléiotropique, et on ne le retrouve souvent qu'en très faible quantité dans certains tissus ou types cellulaires. Le nombre de ces types cellulaires et tissus infectables permet tout de même de faire plusieurs liens avec des manifestations cliniques que l'on retrouve lors de la pathogénèse du virus.

Une des percées majeures dans l'étude du VIH fût la découverte que le récepteur principal du virus à la surface des cellules cibles est la molécule de CD4 (Dalglish, et al., 1984, Klatzmann, et al., 1984). Le rôle essentiel de CD4 dans l'élaboration de la réponse immunitaire supporte la présence de cette glycoprotéine sur une grande variété de cellules d'origine hématopoiétique. Ainsi, les lymphocytes T matures et immatures, cellules essentielles au système immunitaire, constituent l'une des cibles prévalentes du VIH-1. Il a aussi été démontré *in vitro* que le VIH-1 est capable d'infecter des cellules n'exprimant pas la molécule CD4, telles les cellules nerveuses (Harouse, et al., 1991),

les cellules fibroblastiques (Tateno, et al., 1989), et les cellules épithéliales (Heise, et al., 1991, Kotler, et al., 1991, Levy, et al., 1989, Mathijs, et al., 1988, Nelson, et al., 1988). Par la suite, il a aussi été démontré que certaines cellules humaines exprimant un haut niveau de CD4 à leur surface ne pouvaient être infectées par le virus (Chesebro, et al., 1990, Evans, et al., 1987, Kikukawa, et al., 1986, Maddon, et al., 1986, Sattentau, et al., 1993). Pendant plusieurs années, de nombreuses équipes ont donc cherché un co-récepteur qui serait l'élément manquant à la molécule CD4 lors de l'interaction entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale. Plusieurs co-récepteurs ont été proposés, dont la molécule CD26 (Callebaut, et al., 1993). Mais, plus récemment, des expériences très élégantes ont identifié une protéine appelée "fusine" qui serait utilisée comme co-récepteur lors de l'infection des lymphocytes. Cette fusine lorsqu'exprimée avec le CD4 à la surface de la lignée murine NIH-3T3, permet la fusion avec des cellules qui portent la glycoprotéine d'enveloppe du VIH ayant un tropisme pour les lymphocytes (Feng, et al., 1996). La découverte de la Fusine, couplée à de nombreuses observations concernant l'effet des cytokines de la famille C-C, comme RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , a aussi mené à une découverte très intéressante. Cinq groupes différents ont pu identifier six nouveaux co-récepteurs, tous faisant partie de cette famille des récepteurs de cytokines (Alkhatib, et al., 1996, Choe, et al., 1996, Deng, et al., 1996, Doranz, et al., 1996, Dragic, et al., 1996). Ces co-récepteurs seraient plutôt utilisés lors de l'infection par des virus à tropisme pour les macrophages et les monocytes. En plus d'avoir découvert ces co-récepteurs, un récepteur alternatif a aussi été identifié pour les cellules n'exprimant pas la molécule CD4, comme les cellules nerveuses et certaines cellules épithéliales. Le galactocérébroside (GalC) s'est avéré essentiel à l'infection de ces cellules (Bhat, et al., 1991, Yahi, et al., 1992). Par contre, l'élucidation du mécanisme et l'identification de co-récepteurs potentiels lors de l'utilisation du GalC à la surface des cellules restent à faire. Il demeure toutefois, étant donné que ce récepteur GalC n'est utilisé que lors de l'infection d'un très petit nombre de cellules, que beaucoup plus d'études ont été consacrées à l'interaction du virus avec son récepteur principal, le CD4.

Lors de l'interaction entre le VIH-1 et la molécule CD4, il a été proposé qu'une interaction de haute affinité puisse induire des changements conformationnels de l'enveloppe virale lors de l'attachement du virus à sa cellule cible portant la molécule CD4 (Stein, et al., 1987). Ce changement conformationnel n'a pu être démontré qu'à l'aide d'anticorps spécifiques pour la glycoprotéine de l'enveloppe. Il a été conclu que la glycoprotéine d'enveloppe, lors de l'interaction avec CD4, expose un peptide fusogénique se trouvant dans la gp41 et cause la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire. Cette interaction entre l'enveloppe virale et le CD4 permet aussi une interaction du co-récepteur et c'est seulement suite à ces événements que la pénétration de la capsid et le relâchement du contenu viral dans le cytoplasme est possible. Suite à ces événements, l'ARN génomique viral se retrouve dans le cytoplasme, et est copié en ADN bicaténaire par la transcriptase inverse virale. Lors de cette copie en ADN bicaténaire, l'enzyme génère des séquences répétées, appelées LTR (Long terminal repeat), qui se trouvent en 5' et en 3' de l'ADN bicaténaire dit proviral. Cet ADN proviral est ensuite transporté vers le noyau en un complexe de pré-intégration, incluant plusieurs protéines virales et des protéines cellulaires. Ce transport se fait de façon active, puisqu'il est ATP dépendant, mais semble être indépendant du cycle cellulaire (Bukrinsky, et al., 1992). Ce processus de transport actif rend le VIH quelque peu différent des autres rétrovirus et est critique pour sa pathogénèse, puisqu'il permet au virus d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, comme par exemple les lymphocytes au repos, les macrophages et les neurones. Par la suite, un processus d'intégration se fait de façon aléatoire dans le patrimoine génétique de la cellule infectée à l'aide d'une enzyme virale que l'on appelle intégrase. Une fois intégré le génome du VIH est sujet au contrôle transcriptionnel de la cellule hôte ainsi qu'à son propre contrôle transcriptionnel (Virelizier, 1989).

5.2. Événements post-intégration

La transcription basale du génome VIH intégré dans l'ADN cellulaire dépend de la fixation de facteurs de transcription cellulaires appropriés sur diverses séquences du LTR. L'activité du LTR dépend de motifs spécifiques permettant la transcription du génome viral et de trois régions régulatrices agissant en coopération (Jones, et al., 1986, Kato, et al., 1991, Lu, et al., 1990, Nabel and Baltimore, 1987). Ces régions sont la séquence NRE (Negative response element) qui semble être impliquée dans la régulation négative de l'expression virale; la région TAR (Tat activating response element) située sur l'ARN qui, suite à la liaison d'une protéine virale appelée Tat, permet d'augmenter la transcription, et finalement un site de liaison pour un facteur de transcription ubiquitaire cellulaire appelé SP1. Le promoteur proprement dit est une boîte TATA classique, dont l'activité est contrôlée par une région activatrice (le "enhancer"). Grâce à ces différents motifs, le VIH-1 a développé une stratégie utilisant des protéines cellulaires et donnant lieu à une infection qui est à la fois persistante, lente et progressive (Laughlin and Pomerantz, 1994).

5.3 Protéines régulatrices Tat et Rev

Suite à l'activation basale de la transcription virale à partir du LTR, on assiste à l'expression d'ARNm viraux multi-épissés exprimés de façon précoce et codant pour les protéines Tat, Rev, et Nef. Les protéines Tat (Arya, et al., 1985, Sodroski, et al., 1984) et Rev (Feinberg, et al., 1986) sont des protéines essentielles à la réplication virale. La protéine Tat est responsable de la transactivation du VIH-1 et permet une forte expression des différents gènes viraux impliqués dans la réplication virale (Kao, et al., 1987). C'est une structure en épingle de 59 nucléotides située en 5' des ARN viraux et appelée TAR (Tat responsive element) qui est responsable de cet effet (Jakobovitz, et al., 1988, Rosen, et al., 1985). Lorsqu'un niveau seuil de la protéine Rev est produit, on assiste à

une transition de la synthèse des ARNm multi-épissés (Tat, Rev, et Nef au début de l'infection virale), vers des ARNm mono-épissés et non-épissés (codant pour des protéines de structure) (Cullen, 1991). Rev contrôle l'épissage et le transport, du noyau au cytoplasme, de ces ARNm viraux codant pour des protéines exprimées tardivement dans l'infection (Peterlin, et al., 1993). Le RRE "Rev responsive Element", ou élément de réponse à Rev, est une structure en épingle à cheveux qui se trouve sur tous les ARN non-épissés ou mono-épissés comme l'ARNm codant pour l'enveloppe (Le, et al., 1990). C'est cette structure (le RRE) qui confère à cette classe d'ARNm une expression dépendante de la synthèse de Rev (Daefler, et al., 1990, Heaphy, et al., 1990).

6. SYNTHÈSE ET ASSEMBLAGE DES PROTÉINES VIRALES DE STRUCTURE

6.1 Polyprotéines Gag et Gag-Pol.

Une des parties communes au cycle de multiplication de tout rétrovirus est la synthèse et l'assemblage des différentes protéines virales de structure. Il a été proposé que, suite à leur synthèse sur les ribosomes libres cytoplasmiques, les précurseurs pr55^{Gag} et pr160^{Gag-Pol} sont acheminés vers la membrane et s'attachent à cette dernière grâce à leur extrémité myristilée (Veronese, et al., 1988). Le précurseur pr160^{Gag-Pol} est produit suite à un glissement ribosomal lors de la lecture du précurseur Gag, ce qui cause un changement de cadre de lecture et permet la synthèse des enzymes virales requises aux différentes étapes du cycle de multiplication (Gelderblom, 1991, Kieny, 1990).

Tel que déjà décrit, le précurseur Gag donne naissance par clivage protéolytique à plusieurs composantes essentielles à la formation de la particule virale infectieuse (Sanchez-Pescador, et al., 1985, Veronese, et al., 1988). On retrouve, entre autres, les deux protéines majeures du virion: la protéine p24 de la capside et la protéine p17 de la matrice (Levy, et al., 1989). On retrouve aussi une protéine hydrophilique, la p7 qui lie l'ARN du génome viral, tandis que la p6 unique au VIH jouerait un rôle lors de la relâche virale. D'autres protéines comme celles de la nucléocapside, la p2 et p1, sont aussi des produits de clivage du précurseur Gag par la protéase virale.

La protéine de la capside est libérée à partir de la portion centrale de Gag par deux clivages effectués par la protéase virale. La p24 est, selon différents auteurs, 100 fois plus abondante dans le virion que la gp120, ainsi que 10 fois plus que la polymérase (Arthur, et al., 1992, Levy, 1993). Elle constitue, avec la protéine de l'enveloppe, le principal déterminant antigénique du virus (Langedijk, et al., 1990, Tatsumi, et al., 1990, Veronese, et al., 1988).

La protéine de la matrice est codée par une séquence en 5' du gène Gag. Cette protéine joue plusieurs rôles, entre autre dans l'incorporation de l'enveloppe, et dans le processus de décapsidation suite à la pénétration du virus (Yu, et al., 1992, Yu, et al., 1992). La p17 est aussi myristylée en N-terminal ce qui permet son association à la membrane cellulaire (Schultz, et al., 1988).

6.2 Les glycoprotéines du VIH.

La glycoprotéine de l'enveloppe virale est codée par le gène ENV. Sa production est dépendante de la protéine Rev. En l'absence de Rev, le virus est incapable de générer les ARNm codant pour les protéines de structure et devient donc incapable d'achever son cycle de réplication. Pour sa synthèse, la partie N-terminale du précurseur de la glycoprotéine de l'enveloppe s'attache par son peptide signal hydrophobe de 28 à 30 acides aminés à la membrane du réticulum endoplasmique. Ce peptide signal est reconnu

par une particule de reconnaissance de signaux (SRP) qui se lie à la chaîne polypeptidique naissante et aux ribosomes et les dirige vers un récepteur à la surface de la membrane du RE. Le peptide signal du VIH comporte une région chargée positivement en amino-terminal, une région riche en tryptophane, et une région centrale hydrophobe essentielle à sa fonction (Ellerbrok, et al., 1992). Le peptide signal de la glycoprotéine du VIH est peu propice à son expression. Il a été démontré que si on élimine les charges positives, ou si on substitue son peptide signal pour un peptide signal hétérologue, l'efficacité de production et de transport de la protéine à la membrane est grandement augmentée (Li, et al., 1994). Suite à l'attachement à la membrane du RE, la gp160 destinée à être transportée à la membrane plasmique cellulaire subit une translocation à travers la membrane du RE mais n'est pas libérée dans la lumière; elle reste ancrée dans la double couche par une alpha-hélice hydrophobe. Après ce processus, on assiste à la formation de ponts disulfures qui permettent le repliement des monomères dans le réticulum (Fennie and Lasky, 1989), et c'est suite à ce repliement que l'on assiste à une oligomérisation de ces monomères qui s'associent en des complexes de 2, 3, et 4 molécules de gp160 (Earl, et al., 1991). Lors de sa maturation à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, le précurseur gp160 de la glycoprotéine d'enveloppe est clivé par une protéase cellulaire appelée Furine ce qui résulte en la production d'une partie externe, la gp120, et d'une partie transmembranaire, la gp41 (Capon and Ward, 1991). Les oligomères néosynthétisés sont transportés par des vésicules de transport du RE vers la face cis de l'appareil de Golgi où ils termineront leur oligomérisation. Lors de ces déplacements, l'enveloppe du VIH est soumise à des glycosylations de type O et N. Ces modifications post-traductionnelles semblent essentielles au précurseur protéique gp160 pour sa maturation et sa fonction (Li, et al., 1993, Ratner, 1992). Suite à cette chaîne très complexe d'évènements, seule une petite proportion des molécules (5-10 %) possède la bonne conformation et la bonne composition de sucres leur permettant de se rendre à la surface cellulaire. Les autres molécules sont dégradées à l'intérieur de la cellule (Willey, et al., 1988). Il est important

de mentionner que l'enveloppe du VIH forme aussi des complexes avec la molécule CD4 dans le RE et que ces complexes sont très toxiques pour la cellule.

La comparaison de séquence des nucléotides de plusieurs isolats du VIH permet de diviser le gène Env en cinq domaines invariables (C1-C5) et cinq hypervariables (V1-V5) pour la gp120 (Starcich, et al., 1986, Sullivan, et al., 1993, Willey, et al., 1988). La région hypervariable V3 constitue le déterminant antigénique dominant du virus, alors que les régions V4 et V5 interagissent avec le récepteur CD4 (Kowalski, et al., 1987, Lasky, et al., 1987); plusieurs autres domaines fonctionnels se retrouvent aussi à l'intérieur des protéines gp120 et sont conservés parmi les diverses souches virales (Bahraoui, et al., 1989, Kowalski, et al., 1987).

Pour sa part, la gp41 démontre très peu de variation de séquence et comporte aussi plusieurs domaines fonctionnels. La partie extracytoplasmique de la gp41 possède, entre autres : la région responsable de la fusion membranaire (Kowalski, et al., 1991), plusieurs régions importantes dans l'interaction avec la gp120, un pont disulfure et quelques régions glycosylées. Des analyses par ordinateur prédisent deux α -hélices dans le domaine cytoplasmique de la gp41 (Miller, et al., 1991). De manière encore plus intéressante, on retrouve deux régions dans la queue intracytoplasmique qui peuvent lier la calmoduline, impliquant un rôle possible dans la transduction de signal (Miller, et al., 1993, Srinivas, et al., 1992). Il est difficile de ne pas remarquer que le domaine cytoplasmique de la gp41 est inhabituellement long par rapport à celui des autres rétrovirus. Il est très probable que le mécanisme d'incorporation de l'enveloppe dans la particule virale implique une interaction avec des protéines de Gag, comme la p17 (Freed and Martin, 1995, Mammano, et al., 1995). Mais une telle interaction ne semble pas toujours requise puisque des mutants de délétions dans la gp41, peuvent être incorporés (Freed and Martin, 1995, Gabuzda, et al., 1992, Mammano, et al., 1995, Wilk, et al., 1992).

6.3 Assemblage et bourgeonnement

L'assemblage des virions du VIH-1 se fait au niveau de la membrane plasmique, comme celui d'un rétrovirus de type C. Lors d'une première étape, il semble y avoir une interaction entre les précurseurs poly-protéiques (Pr55^{gag}) (Gelderblom, 1991, Wills and Craven, 1991). Par la suite, le complexe nucléoprotéique bourgeonne de la membrane plasmique en entraînant avec lui les oligomères de l'enveloppe virale. Finalement, on peut observer au microscope électronique des croissants d'apparence dense formés de complexes nucléoprotéiques comprenant Pr55^{gag}, Pr160^{gag-pol} ainsi que l'ARN viral. Une dernière étape est toutefois nécessaire avant d'avoir une particule virale infectieuse, il s'agit du clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale. D'autres éléments sont aussi nécessaires pour que ce processus d'assemblage puisse se faire. Un de ces éléments est un signal d'encapsidation présent dans la partie 5' de l'ARN viral et qui est reconnu par le domaine NC (nucléocapside) du précurseur polyprotéique Gag permettant l'encapsidation de l'ARN (Gorelick, et al., 1990). On a aussi pu remarquer que la myristilation des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol est nécessaire pour qu'une association à la membrane s'accomplisse (Gottlinger, et al., 1989). Malgré le grand nombre d'études sur la morphogénèse du VIH quelques phénomènes très intéressants demeurent mal compris. Par exemple, on a pu observer qu'il est possible pour le VIH d'incorporer des glycoprotéines d'enveloppe de différents rétrovirus, ce processus s'appelle pseudotypage et donne un tropisme accru au virus (Deminie and Emerman, 1993, Landau, et al., 1991, Lusso, et al., 1990, Spector, et al., 1990). Il est aussi intrigant de remarquer que même si l'enveloppe est essentielle à l'infectivité du virus, elle n'est pas nécessaire au processus de bourgeonnement lui-même (Gheysen, et al., 1989, Ruta, et al., 1979, Shields, et al., 1978, Smith, et al., 1990).

7. LES PROTÉINES ACCESSOIRES DU VIH

En plus des trois gènes de structure Gag, Pol, et Env, communs à tous les rétrovirus (Varmus, 1988), le génome du VIH-1 code pour au moins six protéines auxiliaires qui sont: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu et Vpr (Haseltine, 1991, Kieny, 1990, Levy, 1993, Vaishnav and Wong-Staal, 1991). Alors que les protéines de régulation Tat et Rev sont essentielles à la réplication virale, les protéines accessoires Nef, Vpu et Vpr ne sont pas requises pour la réplication *in vitro*. Par contre, la conservation de ces différents gènes accessoires au niveau de divers isolats viraux semble démontrer un rôle central dans l'infection et la pathogénèse *in vivo*.

7.1 La protéine accessoire Vif

Le gène Vif code pour une protéine de 24 kDa. L'expression de cette protéine donne lieu à un phénotype qui s'exprime tardivement durant le cycle de multiplication du VIH. Les premières études fonctionnelles avaient mis en évidence que les virions libres, produits en l'absence de cette protéine, étaient 1000 fois moins infectieux (Fisher, et al., 1987). L'implication de Vif est plus prononcée dans le processus d'infection et de propagation du virus sur des cultures primaires de lymphocytes et de macrophages (Fan and Peden, 1992, Gabuzda, et al., 1992), ce qui suggère un rôle *in vivo*. Même si le mécanisme d'action de Vif n'est pas présentement connu, elle possède la capacité de s'associer intimement avec la membrane cellulaire (Goncalves, et al., 1994, Michaels, et al., 1993). Il est donc très probable que cette protéine joue un rôle dans l'assemblage ou la maturation de la particule virale. Il n'est donc pas étonnant que les virus produits en absence de Vif semblent présenter des défauts de maturation lorsqu' observé en microscopie électronique (Gabuzda, et al., 1992).

7.2 La protéine accessoire Vpu

La protéine Vpu est produite à partir d'un ARNm bicistronique codant aussi pour le glycoprotéine d'enveloppe (Schwartz, et al., 1990). La présence de Rev est aussi nécessaire pour la production de Vpu qui est produite tardivement dans le cycle de multiplication. La fonction primaire de Vpu est d'augmenter l'efficacité du relâchement des particules virales à partir de la membrane des cellules exprimant cette protéine (Cohen, et al., 1988, Strebel, et al., 1989, Strebel, et al., 1988, Terwilliger, et al., 1989). Cette augmentation du relâchement viral est toutefois non-spécifique, car Vpu possède aussi la capacité de favoriser la relâche d'autres rétrovirus (Gottlinger, et al., 1993). Il semble que Vpu cause la dégradation spécifique du récepteur CD4 dans le RE et ralentit aussi le transit des glycoprotéines entre le RE et l'appareil de Golgi (Lenburg and Landau, 1993, Vincent and Abdul Jabbar, 1995, Willey, et al., 1992). Un effet bien documenté de Vpu est la réduction des effets cytopathiques causés par la formation de syncytia lors de l'infection virale (Terwilliger, et al., 1989, Yao, et al., 1993).

7.3 La protéine accessoire Nef

Le gène Nef code pour une protéine de 216 acides aminés. Cette protéine se retrouve exclusivement chez les *lentivirinae* des primates. Quoique cette protéine ne soit pas requise pour la multiplication virale en culture cellulaire, une implication très importante de Nef dans la progression clinique a été établie (Kestler, et al., 1991). Le mécanisme induisant cet effet est toujours inconnu même s'il est possible d'imaginer une association quelconque de Nef avec une protéine cellulaire (Harris and Coates, 1993, Niederman, et al., 1993, Sawai, et al., 1994). L'expression de Nef est aussi associée à la réduction de l'expression de CD4 à la surface cellulaire (Sanfridson, et al., 1994). Ce mécanisme serait lié à une augmentation spécifique de la vitesse d'endocytose de CD4 (Aiken, et al., 1994).

7.4 Protéine accessoire Vpr

La protéine Vpr est une protéine de 14 Kda exprimée tardivement et sous le contrôle de Rev (Cohen, et al., 1990, Garrett, et al., 1991). La séquence de la protéine Vpr est bien conservée chez les isolats du VIH-1, VIH-2 et du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) suggérant l'importance de cette protéine dans le cycle de multiplication des lentivirus (Chakrabarti, et al., 1987, Fukasawa, et al., 1988, Ogawa, et al., 1989). Il n'est donc pas étonnant que Vpr confère des avantages de production virale même si elle semble être cellule-spécifique, puisque son effet observé surtout dans les macrophages (Balotta, et al., 1993, Connor, et al., 1995, Hattori, et al., 1990). Vpr a aussi été démontrée comme étant capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Jowett, et al., 1995, Rogel, et al., 1995). Contrairement à la protéine Vif, qui est incorporée dans la particule virale en très faible quantité, la protéine Vpr est présente dans le virion en quantité similaire à la polyprotéine Gag (Cohen, et al., 1990, Yu, et al., 1990). Une localisation au noyau de Vpr ainsi que son abondance dans la particule virale sont très utiles au VIH. L'état de repos des lymphocytes mémoires circulants, ou l'absence de division cellulaire de certains autres types cellulaires, empêche l'intégration de plusieurs rétrovirus dans le génome de ces cellules (Cohen, et al., 1990, Stevenson, et al., 1990). Ceci explique très probablement pourquoi le VIH, en plus de la p17 (matrice), incorpore Vpr en grande quantité, permettant ainsi de s'assurer du transport actif de son complexe de pré-intégration et de l'infection de plusieurs types de cellules quiescentes.

DEUXIÈME PARTIE : LES CELLULES POLARISÉES ET LE VIH

1. INTRODUCTION

1.1 La polarisation cellulaire

Le trafic intracellulaire de molécules à des compartiments distincts de la cellule est absolument requis pour le fonctionnement normal de la machinerie de biosynthèse et le métabolisme cellulaire. À la sortie de l'appareil de Golgi, certaines protéines portent un signal entraînant leur transport vers des compartiments cellulaires particuliers tels que les endosomes, les lysosomes ou certaines voies de sécrétion. C'est ce transport vésiculaire sélectif que l'on appelle ciblage. Le ciblage de différentes protéines vers leurs compartiments respectifs se fait à partir de signaux, qui sont de plus en plus identifiés comme étant présents sur la protéine elle-même. Ces signaux sont essentiels au transport vectoriel spécifique de molécules vers la membrane plasmique et génèrent une polarisation des structures cellulaires et de la membrane plasmique elle-même.

1.2 Les cellules épithéliales comme modèle de la polarisation.

Dans le cas des cellules épithéliales polarisées, comme celles que l'on retrouve au niveau de l'intestin et au niveau de l'épithélium vaginal, les protéines porteuses de signaux spécifiques sont distribuées de façon distincte à la membrane plasmique (Rodriguez-Boulan and Powell, 1992). On peut aussi remarquer cette asymétrie au niveau de la composition distincte en lipides de chaque domaine membranaire (Compans and Srinivas, 1991).

La membrane plasmique des cellules épithéliales polarisées est divisée en deux domaines distincts ayant chacun une composition protéique et lipidique différente: un domaine apical faisant face à la lumière de l'organe, et un domaine basolatéral assurant la

cohésion des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire en contact avec les fluides corporels. Les structures particulières retrouvées au niveau apical, comme les microvillosités des cellules intestinales ou rénales et les cils des cellules épithéliales des bronches ou de la trachée, contribuent à définir la surface apicale comme étant le domaine cellulaire le plus spécialisé. À l'opposé, le domaine basolatéral représenterait la membrane cellulaire dans son état le moins différencié (Compans and Srinivas, 1991, Mostov, et al., 1992, Simons and Wandinger-Ness, 1990).

Chaque cellule est liée aux cellules voisines par trois types de jonctions: (i) les jonctions serrées (*zonulae occludentes*) (ii) intermédiaires (*zonulae adherentes*) ainsi que (iii) les desmosomes (*maculae adherentes*) (Simons and Fuller, 1985). Ces jonctions sont responsables des interactions entre les cellules et elles préviennent le mélange des composants des membranes apicale et basolatérale (Farquhar and Plade, 1963). Les compositions distinctes des deux domaines membranaires en protéines et en lipides sont ainsi reliées à leurs fonctions particulières. Par exemple, les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, les transporteurs d'acides aminés et de glucose se retrouvent du côté basolatéral (Mostov, et al., 1992); les protéines apicales, comme plusieurs hydrolases, sont souvent associées aux échanges avec le milieu luminal de l'organe.

En plus des jonctions qui séparent les surfaces apicale et basolatérale pour former des barrières à la diffusion latérale des molécules dans la membrane, quelques autres caractéristiques permettent de définir le phénotype de polarisation des cellules épithéliales, comme : (i) les interactions directes entre les cellules formées par des molécules d'adhésion ICAM's, (ii) et la distribution polarisée des organites cytoplasmiques de même que du cytosquelette.

Il existe plusieurs lignées cellulaires différentes qui possèdent un phénotype de polarisation épithéliale. Dans ces différentes lignées, les mécanismes spécifiques de ciblage peuvent toutefois être très différents (Rodriguez-Boulant and Powell, 1992). Les cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) sont dérivées du rein de chien et présentent plusieurs caractéristiques d'une lignée cellulaire épithéliale polarisée (Roth and

Compans, 1981, Simons and Fuller, 1985). La facilité avec laquelle ces cellules se prêtent aux manipulations expérimentales a fait de cette lignée une des plus étudiées et la mieux caractérisée. Plusieurs autres lignées épithéliales peuvent toutefois être utilisées comme les HT-29 et les Caco-2 (dérivées d'un colon humain), ainsi que les ME-180 (dérivées d'un épithélium vaginal), pour n'en nommer que quelques unes.

1.3 La polarisation dans les lymphocytes.

1.3.1 Le phénomène de polarisation.

Le phénomène de polarisation chez les lymphocytes a été décrit pour la première fois lorsque l'on a remarqué que les lymphocytes développent des projections cytoplasmiques appelées uropodes lors de leur activation. Cette polarisation des structures est caractéristique des lymphocytes migrants (Wilkinson, 1987, Wilkinson and Higgins, 1987). Ces lymphocytes ont obtenu ce nom à cause d'une technique de quantification qui dénombre le nombre de lymphocytes activés en vérifiant leur capacité de migrer à travers un gel de collagène (Haston, et al., 1982, Schor, et al., 1983). Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes acquièrent une morphologie très caractéristique. Ils ont une partie frontale un peu plus pointue, un corps ovale, et ils sont orientés dans une direction bien particulière. Ce changement morphologique les rend très faciles à différencier des lymphocytes non-activés sphériques.

Ce phénotype de polarisation, que l'on retrouve par exemple lors de la stimulation inflammatoire, se produit en 2 stades (Wilkinson, 1986). Dans un premier temps, les cellules non-motiles au repos acquièrent la capacité de mouvement lorsqu'elles entrent dans le stade G1 du cycle cellulaire suite à une réponse antigénique ou à un activateur polyclonal. Lorsqu'activées, les cellules peuvent répondre au deuxième stimuli, comme celui donné par les cytokines (Wilkinson and Watson, 1990). Un grand nombre de cytokines ont été identifiées comme ayant la capacité d'induire cette réponse et la

polarisation des lymphocytes, mais elles seront traitées plus loin. Il est important de mentionner que la polarisation dans les cellules d'origine lymphoïde n'est pas un phénomène dû uniquement au contact cellule-cellule. Même si le contact intracellulaire peut induire cette polarisation, la simple présence de cytokines est suffisante pour obtenir ce phénotype sur des cellules qui se trouvent isolées (del Pozo, et al., 1995, Wilkinson and Watson, 1990). La polarisation lymphocytaire est un champ d'étude de plus en plus important, non seulement pour la compréhension des mécanismes intracellulaires impliqués dans ce phénomène, mais aussi dans la réponse immunitaire en général.

1.3.2 Les cytokines présentes lors de la polarisation des lymphocytes.

Il a été récemment proposé que les cytokines, aussi nommées chémokines chémoattractives peuvent induire l'adhésion, la polarisation, et la migration de différentes cellules leucocytaires (Oppenheim, et al., 1991). Les cytokines sont des polypeptides de 70-80 A.A. (8-10 Kd), caractérisés par la présence de 4 résidus cystéines conservés. Ils ont été regroupés en 2 familles : la sous-famille α , aussi appelée "C-X-C", qui inclut l'interleukine 8, NAP-1, PF-4, IP-10, et la sous famille β , aussi appelée "C-C" qui inclut les RANTES, MCP-1,2 et 3, MIP-1a,b, et I-309, pour n'en nommer que quelques unes (Oppenheim, et al., 1991). Il est important de mentionner que les lymphocytes T sont capables de sécréter des cytokines comme IL-8, RANTES, MIP-1a,b, et MCP-1 (Oppenheim, et al., 1991, Schall and Bacon, 1994) et créer une sorte de boucle d'auto-réponse. Il a été rapporté que les cytokines libérées lors des interactions lymphocytaires avec les cellules endothéliales et les cellules épithéliales induisent une polarisation et permettent la redistribution chez ces mêmes lymphocytes de molécules d'adhésion comme ICAM-3, CD43 et CD44 vers la région de contact. Même si ce phénomène semble général à première vue, il y a une spécificité au niveau des molécules d'adhésion et des glycoprotéines qui peuvent se retrouver au point de

polarisation. Par exemple, la majorité des molécules soient LFA-1, b-1 intégrines, CD45, CD3, CD2, CD7, et CD5, ne sont pas redistribuées vers le point de contact. D'autres types de stimulants non-spécifiques, comme le phorbol ester et la phytohématoglutinine, se sont aussi avérés incapables de stimuler la polarisation au niveau du lymphocyte (del Pozo, et al., 1995). Ce phénomène de polarisation membranaire semble très important puisqu'il est aussi présent chez d'autres cellules leukocytaires, comme les macrophages et monocytes.

1.4 Les autres cellules polarisées

La différenciation de membranes cellulaires en domaines distincts n'est pas limitée aux exemples discutés plus tôt (Mellman, et al., 1993, Rodriguez-Boulan and Powell, 1992). Par exemple, dans le cas des cellules neuronales, il est possible de distinguer la membrane axonale des corps cellulaires et dendrites. Les protéines qui sont normalement destinées à la membrane apicale sont aussi généralement ciblées à l'axone lorsqu'exprimées dans les cellules neuronales, tandis que les protéines basolatérales sont principalement transportées aux dendrites et corps cellulaires (Dotti, et al., 1993, Dotti and Simons, 1990, Rodriguez-Boulan and Powell, 1992). On suppose que plusieurs autres types cellulaires, peuvent démontrer une sorte de différenciation de leur surface cellulaire.

2. LA MATURATION POLARISÉE DES VIRUS

2.1 Dans les cellules épithéliales.

L'incorporation de l'enveloppe virale est une étape essentielle pour l'infectivité du virus. Les virus enveloppés portent une membrane lipidique qui est acquise lors de ce processus de bourgeonnement à la membrane cellulaire. Le groupe de Rodriguez-Boulan

a démontré que les virus enveloppés bourgeonnent à un domaine précis des cellules épithéliales polarisées (Rodriguez-Boulan and Sabatini, 1978). Par exemple, dans les cellules épithéliales MDCK, le virus influenza et les paramyxovirus bourgeonnent uniquement du côté apical (Rodriguez-Boulan, 1983); au contraire, le VSV (virus de la stomatite vésiculaire) démontre une maturation des particules virales du côté basolatéral (Thomas, et al., 1993, Thomas and Roth, 1994). Le transport des glycoprotéines membranaires d'enveloppe virale à des domaines spécifiques a été par la suite démontré pour toutes sortes de virus.

2.2 Dans les lymphocytes

Une observation très intéressante au point de vue de la transmission du VIH a été faite par le groupe de Phillips et ses collaborateurs. Ils ont observé qu'une polarisation du bourgeonnement du VIH était présente chez des monocytes ou lymphocytes lorsqu'ils sont en contact avec des cellules épithéliales (Bourinbaïar and Phillips, 1991, Phillips and Bourinbaïar, 1992, Phillips, et al., 1994) ou avec une matrice extracellulaire solide de fibronectine (Pearce-Pratt, et al., 1994). Il avait déjà été suggéré que la région de contact entre cellules, ou entre cellules et support solide, puisse être considérée comme analogue aux surfaces basolatérales des cellules épithéliales (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Cette suggestion découle des observations de cellules MDCK en suspension; les virus qui normalement bourgeonnent du côté basolatéral sont libérés spécifiquement au point de contact cellule-cellule ou cellule-matrice, tandis que les virus à bourgeonnement apical se retrouvent libérés sur toute la surface de la cellule.

3. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA POLARISATION DES CELLULES ET DU BOURGEONNEMENT VIRAL.

3.1 Le contact cellule-cellule.

Lors de la différenciation des cellules épithéliales, la conversion de cellules mésenchymales non polaires en cellules épithéliales polarisées se produit en réponse à un signal inducteur (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Cette différenciation, régulée par les molécules d'adhésion comme l'uvomoruline ou E-cadhérine (Gumbiner and Simons, 1987), mène à la synthèse d'autres protéines d'adhésion comme la laminine A et semble stimuler le développement de la membrane apicale des cellules MDCK (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Ces protéines, concentrées au niveau des membranes latérales, seraient impliquées dans l'adhésion entre les cellules (Ekblom, et al., 1986, Klein, et al., 1988). Il semblerait que les molécules d'adhésion ICAM ont la capacité d'induire une polarisation des cellules épithéliales même en absence de jonctions serrées (McNeill, et al., 1990). D'autres types cellulaires, comme les lymphocytes, possèdent un profil distinct de molécules d'adhésion de surface qui leur permet de se localiser dans un tissu ou de se fixer à d'autres types cellulaires. Les membres de la famille des intégrines et les ICAM sont les candidats les plus probables pour ce rôle. Les intégrines sont impliquées dans l'adhésion des cellules à des composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine et la laminine (Cepek, et al., 1993). Un des membres de la sous-famille $\beta 1$ des intégrines, le LFA-1 ($\alpha\beta 2$) est exprimé dans les lymphocytes T et joue un rôle dans l'adhésion cellule-cellule des lymphocytes et la localisation de ces derniers lors de l'inflammation (Dustin and Springer, 1991).

L'interaction de LFA-1 avec ses ligands (ICAM-1,2, et 3) est un processus très régulé et joue un rôle important dans l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales vasculaires et épithéliales intestinales (Campanero, et al., 1993, de Fougerolles, et al., 1994, Fawcett, et al., 1992). ICAM-3 est le récepteur le plus abondant de LFA-1, et il a

été proposé que cette molécule joue un rôle important dans la réponse immunitaire (Acevedo, et al., 1993, Fawcett, et al., 1992). La liaison de ICAM-3 induit une phosphorylation de résidus tyrosines chez différents substrats se trouvant au niveau du point de polarisation, et induit l'activation des lymphocytes, tout en régulant l'expression d'autres molécules d'adhésion (Campanero, et al., 1993, Hernandez-Caselles, et al., 1993). L'interaction de ICAM-3 avec des Ac spécifiques induit la polarisation des lymphocytes, et ICAM-3 est l'une des seules molécules qui se trouve concentrée à l'uropode (Campanero, et al., 1994).

3.2 Le cytosquelette et la polarisation

La démonstration de la présence de l'actine et de la myosine dans plusieurs types cellulaires d'origine non-musculaire a mené plusieurs groupes à des spéculations diverses sur le rôle de certaines protéines du cytosquelette dans plusieurs processus cellulaires (Pour revue voir (Huxley, 1973, Pollard and Weihing, 1974)). L'actine possède une séquence primaire en acides aminés très conservée et est très abondante dans le cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes (Alberts, et al., 1990). Il joue un rôle important dans la contraction musculaire, la motilité, la mitose, le maintien de la forme et de la taille cellulaire, ainsi que lors des changements de forme qui peuvent se produire lors de la phagocytose, la sécrétion, et autres processus vitaux pour la cellule (Pollard and Weihing, 1974). Cette protéine, et d'autres molécules du cytosquelette, pourrait donc être impliquée dans la polarisation cellulaire et ce point sera maintenant examiné.

Alors que certaines protéines du cytosquelette ont une distribution majoritairement cytoplasmique, la plupart des cellules animales possèdent un réseau particulièrement dense de certaines protéines, comme l'actine et ses protéines associées, juste en dessous de la membrane plasmique. Ce réseau constitue le cortex cellulaire qui donne une force mécanique à la surface de la cellule et permet à celle-ci de changer de forme et de se déplacer. Dans l'organisation du cytosquelette, on remarque que les filaments d'actine

sont reliés ensemble par un réseau tridimensionnel très complexe de différentes protéines de réticulation et de protéines de mouvement. De leur côté, les microtubules, à l'aide de la protéine hétérodimérique tubuline, s'allongent à partir de centrosomes qui agissent comme centres organisateurs (revue par (Carlier, 1991)). Comme nous le verrons plus tard, plusieurs virus semblent prendre avantage de cette organisation du cytosquelette pour induire un changement morphologique des cellules et faciliter l'infection des cellules voisines ainsi que la multiplication virale.

3.2.1 Dans les cellules épithéliales.

Au niveau des cellules épithéliales le cytosquelette semble jouer un rôle important dans la polarisation cellulaire. Les résultats publiés démontrent une différence au niveau de l'effet des inhibiteurs du cytosquelette selon le type de ciblage à l'étude. Des observations sur des cellules MDCK traitées à la colchicine, un agent qui affecte l'organisation des microtubules, démontrent la perte de la maturation polarisée du virus de la grippe (influenza) qui bourgeonne normalement du côté apical. En revanche, d'autres groupes ne trouvent aucun effet du même inhibiteur sur la relâche polarisée du virus VSV (*virus de la stomatite vésiculaire*) qui lui, tout comme le VIH, bourgeonne du côté basolatéral (Rindler, et al., 1987, Salas, et al., 1986). Cet effet différentiel de la colchicine sur le ciblage de protéines apicales et basolatérales fut aussi retrouvé chez les cellules intestinales CaCo2 (Eilers, et al., 1989).

3.2.2 Dans les lymphocytes

Comme mentionné plus tôt, les cellules leukocytaires passent d'une morphologie arrondie à une morphologie polaire lors de leur activation. On observe un changement de la distribution d'actine filamenteuse d'une répartition diffuse et cytoplasmique vers une distribution localisée à un pôle de la cellule lors de cette activation (Howard and Oresajo,

1985). Ce mécanisme semble impliquer un réarrangement du cytosquelette dans la cellule T qui est déclenché par des interactions spécifiques à la surface de la cellule-cible. Cette polarisation observée suite à la présence de certaines cytokines, peut être déclenchée par des interactions avec les molécules d'adhésion cellulaire comme ICAM-3 (Arroyo, et al., 1994, Campanero, et al., 1993, Campanero, et al., 1994, Hernandez-Caselles, et al., 1993, Juan, et al., 1994). Ceci explique que le contact cellule-cellule puisse induire ce phénomène.

Le groupe de Phillips a rapporté une forte induction de la polarisation du bourgeonnement du VIH suite à un traitement à la colchicine de lymphocytes infectés. Les deux drogues nocodazole et vinblastine, qui inhibent également la polymérisation de la tubuline, ont eu le même effet que la colchicine. À l'inverse, la drogue taxol qui stabilise les microtubules est arrivée à prévenir la polarisation (Pearce-Pratt, et al., 1994).

Au niveau des cellules épithéliales et des cellules lymphocytaires, il y a donc un rôle très probable du cytosquelette dans la polarisation du bourgeonnement viral. Ce rôle semble plus important au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, mais le mécanisme précis de maturation des protéines virales et cellulaires est encore mal compris. La relative absence de spécificité des inhibiteurs de cytosquelette utilisés lors de ces expériences est une des causes principales de l'absence de résultats plus clairs.

3.3 L'interaction du cytosquelette avec différents virus.

Lors de l'infection par la plupart des virus, on assiste à des changements rapides de la morphologie cellulaire. Ces changements de morphologie sont souvent en corrélation avec une altération du cytosquelette. Il n'est donc pas étonnant que l'idée d'une interaction entre différents virus et le cytosquelette date d'aussi loin que 1977. Il n'est pas clair si l'altération de la morphologie cellulaire est simplement le résultat d'une destruction cellulaire suite à la multiplication rapide du virus, ou à une interaction directe entre les protéines virales et les éléments du cytosquelette (Melki, et al., 1994, Simon, et

al., 1990). Un des moyens parmi les plus employés pour révéler l'interaction de différents virus avec les éléments du cytosquelette est la co-localisation. Ce genre de co-localisation fut rapporté pour un grand nombre de virus comme : SV40 (Kasamatsu, et al., 1983), Poxvirus (Hiller, et al., 1981), VSV (Melki, et al., 1994), Tobavirus (Heinlein, et al., 1995), Paramyxovirus (Giuffre, et al., 1982), et le VIH (Fais, et al., 1995, Pearce-Pratt, et al., 1994, Perotti, et al., 1996, Sasaki, et al., 1995), pour n'en nommer que quelques uns. Les protéines du cytosquelette, rapportées comme étant co-localisées avec des protéines virales, sont tout aussi diverses: actine, myosine, tubuline, ainsi que des protéines des filaments intermédiaires comme la vimentine. On a même rapporté dans quelques cas la nécessité de protéines du cytosquelette, comme la β -tubuline (Moyer, et al., 1990), ou de l'interaction myosine-actine pour la production ou le bourgeonnement de particules virales (Sasaki, et al., 1995). Plusieurs points restent toutefois à éclaircir concernant ces interactions et leur rôle exact dans l'infection virale.

4. LES SIGNAUX DE CIBLAGE ET LE VIH

Les premières expériences concernant le ciblage de la protéine de l'enveloppe du VIH (gp160) ont pu démontrer que cette protéine, exprimée hors du contexte d'une particule virale, possédait par elle-même tous les éléments requis pour la diriger vers la membrane basolatérale des cellules épithéliales. (Owens and Compans, 1989). Cette importance de l'enveloppe du VIH-1 dans le ciblage de la particule virale fut confirmée à l'aide de vecteurs vaccinia exprimant les protéines de la capsid et de l'enveloppe sur des vecteurs séparés (Owens, et al., 1991). Le ciblage de la particule virale dans les cellules MDCK semble nécessiter une association de l'enveloppe et des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-pol via la portion matrice (p17) de Gag; des substitutions dans la p17, qui la rendent incapable d'incorporer l'enveloppe virale, empêchent la polarisation (Lodge, et al., 1994). Plusieurs revues très détaillées décrivent les signaux impliqués dans le ciblage des protéines (Matter and Mellman, 1994, Rodriguez-Boulan

and Powell, 1992, Rodriguez-Boulan and Zurzolo, 1993, Simons and Wandinger-Ness, 1990). Des conclusions générales ont été tirées à partir du fait que plusieurs protéines virales et cellulaires démontrent des signaux communs pour leur ciblage. Par exemple, il a été conclu que les signaux dirigeant les protéines vers la membrane apicale, comme ceux retrouvés dans la protéine HA du virus influenza, se trouvait dans le domaine extracellulaire (Roth, et al., 1987). Dans le cas des signaux basolatéraux, comme ceux retrouvés chez la protéine G de VSV (Thomas, et al., 1993, Thomas and Roth, 1994), la protéine p15E de MuLV (Stephens and Compans, 1986) et la gp41 du VIH (Lodge, et al., 1994), le domaine intracytoplasmique semble responsable du ciblage.

Plus récemment, de courtes séquences d'acides aminés dans le domaine intracytoplasmique de plusieurs protéines ont été identifiées comme étant le déterminant majeur du ciblage basolatéral. Des résidus tyrosines, spécialement dans un contexte de motif Y-X-X-(aliphatique/aromatique), sont souvent présents et cruciaux pour ce type de ciblage. Plusieurs groupes différents ont pu démontrer ce type de signaux sur des protéines cellulaires et virales (Honing and Hunziker, 1995, Matter, et al., 1992, Ohno, et al., 1995, Thomas, et al., 1993, Thomas and Roth, 1994). Un autre groupe a pu obtenir un ciblage basolatéral de la protéine HA, normalement apicale, en substituant une cystéine pour une tyrosine dans son domaine intracytoplasmique (Brewer and Roth, 1991). L'identification des signaux intracytoplasmiques des protéines n'est toutefois pas aussi simple qu'il pourrait sembler à première vue. Des signaux d'endocytose et de dégradation lysosomale ont aussi été identifiés chez plusieurs protéines et reliés à la présence de certains résidus tyrosines (Hopkins, 1992, Prill, et al., 1993, Pytowski, et al., 1995, Trowbridge, et al., 1993). Ces signaux se retrouvent parfois au même endroit que le signal de polarisation, comme dans le cas du VIH (Lodge, et al., 1996, Rowell, et al., 1995); chez d'autres protéines les mêmes types de signaux sont complètement séparés (Schafer, et al., 1995). Tous les signaux ne sont pas nécessairement à base de tyrosines, des signaux d'endocytose à base de motifs di-leucine ont été identifiés chez certaines protéines comme le CD3 (Letourneur and Klausner, 1992) et le CD4 (Aiken, et

al., 1994). Un article a aussi rapporté que l'espace entre le signal basolatéral et la partie transmembranaire est très important pour définir le signal de ciblage (Rohrer, et al., 1996). À travers tous ces résultats, on peut remarquer un rôle très important de la structure secondaire dans les signaux de ciblage. Plusieurs signaux d'endocytose et de polarisation, comme celui du VIH, sont impliqués dans des tours beta causés par des prolines près de ces signaux. Des mutations qui affectent cette structure secondaire affectent aussi les signaux de ciblage de ces protéines (Trowbridge, et al., 1993).

Dans le cas des lymphocytes, plusieurs observations mentionnées plus tôt nous portent à croire que ces signaux à base de tyrosines ont très probablement un rôle dans le bourgeonnement polarisé du VIH. Il faut tout de même tenir compte que des protéines cellulaires peuvent avoir un rôle dans la polarisation du virus. Il a été suggéré qu'il y aurait un rôle possible de la molécule d'adhésion (LFA-1) dans la formation de syncytium induite par le VIH (Hildreth and Orentas, 1989). Une induction d'apoptose lors du contact cellule-cellule a été observée de même qu'une augmentation de la réplication virale chez les monocytes suite à ce même type de contact (Maldarelli, et al., 1995, Shattock, 1996). Dans le cas des cellules dendritiques, la transmission du VIH par ces cellules à des cellules T non-infectées, se fait uniquement par contacts intercellulaires (Cameron, et al., 1992). Ces quelques exemples, parmi plusieurs autres, démontrent un lien certain entre les contacts cellulaires effectués par les lymphocytes avec différents types cellulaires et la pathogénèse du VIH. Plusieurs autres observations semblent supporter un lien entre la réplication du VIH et les molécules d'adhésion cellulaire.

Le virus VIH ne semble donc que prendre avantage de la polarisation cellulaire et se retrouve ainsi dans une position avantageuse pour infecter ses cellules cibles (Wilkinson, 1987). D'autres virus, comme le HTLV (Zacharopoulos, et al., 1992) et même le virus Epstein Barr, peuvent probablement utiliser des processus quelques peu semblables pour favoriser leur dissémination (Leibowitz and Cupkie, 1975, Liebowitz and Kieff, 1989, Liebowitz, et al., 1987).

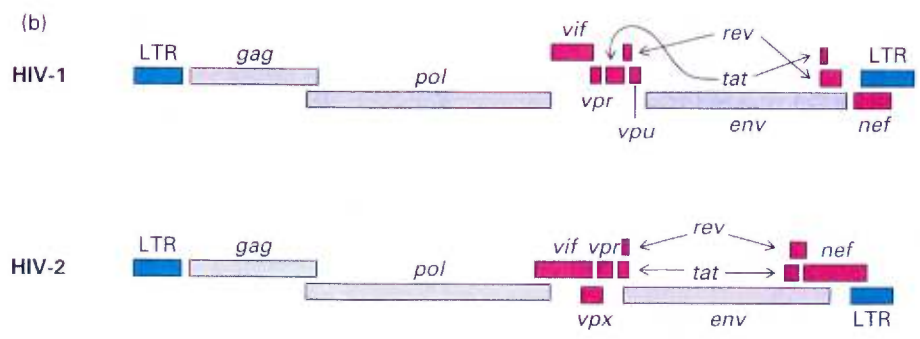
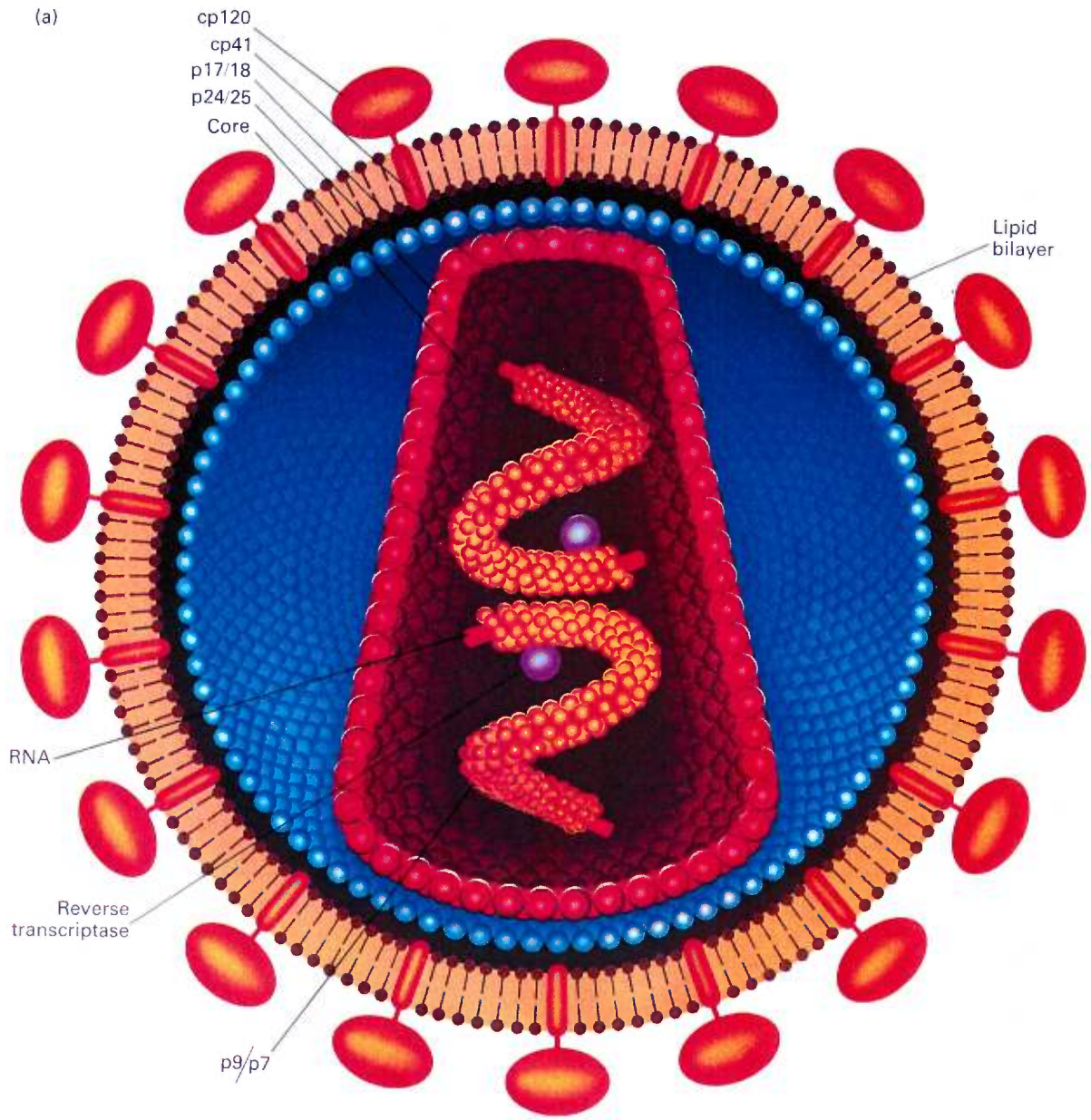
5. BUT DU PROJET:

Une forme de polarisation membranaire a été observée à la surface des lymphocytes (Phillips, et al., 1994) et des données préliminaires que nous avons obtenues par immunofluorescence semblent démontrer que le bourgeonnement du VIH se fait à un pôle du lymphocyte. Le but général de ce projet est de déterminer si ce phénotype de polarisation observé chez les lymphocytes pourrait jouer un rôle dans la transmission du VIH aux cellules épithéliales des muqueuses uro-génitales. Cette polarisation serait avantageuse pour le VIH en facilitant la transmission cellule-cellule. Notre objectif plus restreint pour le projet présenté dans ce mémoire était de déterminer si la restriction du bourgeonnement du VIH-1 à un pôle du lymphocyte implique le même signal de polarisation que celui observé dans les cellules épithéliales. Récemment, il a été démontré que la substitution d'une tyrosine dans la queue intracytoplasmique de l'enveloppe du virus d'immunodéficience simienne entraînait une répartition uniforme de la protéine de l'enveloppe à la surface des lymphocytes infectés.

Des mutations connues pour affecter le bourgeonnement polarisé du VIH dans les cellules épithéliales ont donc été introduites dans un génome complet du VIH-1 pour observer leur effet sur la maturation du virus dans des lignées lymphocytaires JURKAT chroniquement infectées. La localisation des protéines virales lors de l'assemblage de ces différents virus mutants est observée par immunofluorescence et leur importance dans la relâche du virus a été vérifiée par microscopie électronique. L'implication de certaines protéines du cytosquelette a aussi été vérifiée par co-localisation avec la protéine majeure de la capsid (p24).

Une étude détaillée du ciblage de la protéine d'enveloppe dans les lymphocytes et de son implication dans la transmission aux cellules épithéliales peut mener à une meilleure compréhension de ce phénomène dans la multiplication virale et la pathogénèse. Ce phénomène pourrait possiblement, par la suite, devenir une nouvelle cible thérapeutique contre l'infection par le VIH.

FIG.1 Représentation schématique de la structure et du génome du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
(figure tirée de Darnell et al., 1993)



CHAPITRE 2

ARTICLE

Le contenu de cet article comporte la contribution des étudiants suivants comme co-auteurs: Julie Deschambault, est le témoin pour les résultats d'immunofluorescence en double aveugle et Robert Lodge a participé à la génération du mutant proviral HXBc2 (Y795S) ainsi qu' à la rédaction de cet article.

A Tyrosine-Based Intracytoplasmic Signal of the HIV-1 Envelope Glycoprotein Is Involved in Restriction of Budding at One Pole of Infected Lymphocytes

JEAN-PHILIPPE LALONDE^{1,2}, JULIE DESCHAMBEAULT¹,
ROBERT LODGE¹, ÉRIC A. COHEN¹ AND GUY LEMAY^{1,2*}

*¹Département de Microbiologie et Immunologie and ²Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Université de Montréal, Montréal (Qué.),
Canada H3C 3J7*

*Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station centre-ville, Montréal (Qué.), Canada H3C 3J7. Tel: (514)-343-2422; Fax: (514)-343-5701; Email: lemayg@ere.umontreal.ca

Running title: Polarized HIV Budding in Lymphocytes

Maturation and release of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is polarized at the leading edges of monocytes and lymphocytes. Even though actin and the major viral capsid protein (p24) were shown to be co-localized at the pseudopod in these cells, the intracellular mechanism or targeting signals involved are yet to be identified. We have recently demonstrated the presence of a signal for specific targeting of HIV-1 virions to the basolateral membrane in polarized epithelial Madin Darby canine kidney cells (MDCK). Substitution of the four intracytoplasmic tyrosines, using site-directed mutagenesis, was used to demonstrate that the membrane-proximal tyrosine in the transmembrane glycoprotein (gp41) is an essential component of this signal. In the present study, immunofluorescence and electron microscopy allowed us to establish that this same tyrosine-based signal is involved in the polarized localization of HIV-1 budding in lymphocytes. Alterations of this tyrosine-containing motif can increase the amount of envelope glycoprotein at the cell surface; supporting previous suggestions that this motif can also promote endocytosis. A specific co-localization of the major viral capsid protein (p24) with the intermediate filament cytoskeletal protein myosin was also observed. This co-localization at the cellular pole where budding occurs was abolished in mutant viruses altered in the tyrosine-based signal. In these mutants, cytoskeletal elements are still located at one pole of the cells while viral budding occurs throughout all the cell surface. The chronically-infected cell lines producing either wild-type or mutant viruses could eventually be used to study the role of polarized viral budding in cell-to-cell viral transmission.

Keywords; lentiviruses/lymphocytes/polarized viral budding/tyrosine-based signal/human immunodeficiency virus

The last step in the viral multiplication cycle of enveloped viruses is the maturation and release of viral particles. In the case of most retroviruses, including the human immunodeficiency virus (HIV-1), this is accomplished by budding at the plasma membrane where the viral envelope glycoproteins are incorporated in the released virions. Retroviruses are peculiar among enveloped viruses in the sense that viral glycoproteins are not required for the actual budding process (8, 17, 46). In the absence of these proteins, the viral capsids will be assembled and released with the lipid envelope devoid of the viral glycoproteins; as a result, the virions will be non-infectious.

It is now well established that the plasma membrane surface of eucaryotic cells presents distinct protein and lipid composition in specific membrane domains (4, 19, 49, 56). Although most studies concern epithelial cells models, in which well-defined apical and basolateral surfaces can be distinguished, the same phenomenon also seems to exist in other cell types. Lymphocytes are one such example of cells exhibiting a form of polarization at their membrane surface. This has been described on activated lymphocytes, developing cytoplasmic projections called uropodes (2, 64-66). It was also shown that specific cytokines are able to induce this polarization phenotype (7).

In accordance with the differentiated nature of the plasma membrane surface, viral budding is often seen as "polarized"; viral release being targeted at specific regions of the membrane surface. This generally results from the transport of viral envelope glycoproteins to a defined membrane surface. This phenomenon has been mostly studied in epithelial cells showing that different viruses will preferentially, or exclusively, bud from either the apical or basolateral domain (48, 51, 62). There is much less information concerning polarized viral release in other cell types, although some reports have shown the polarized release of some viruses in infected neuronal cells. In this case, budding can occur either from axonal extensions or the cell body depending on the virus (6, 9, 10, 50).

In the last few years, there has been accumulating evidence for a polarized release of human immunodeficiency virus (HIV-1) in epithelial cells. It has been shown that this

release is generally strongly restricted to the basolateral surface; in the absence of envelope glycoprotein, viral release occurs from both the apical and basolateral poles of the cells (13, 31, 37). Interestingly, budding of HIV virions was also seen to be polarized at the surface of infected lymphocytes (12, 38, 41, 42, 53). Viral release is mostly observed at one pole generally corresponding to intercellular contact sites or contact sites between lymphocytes and a solid support (38, 39). Both types of contact may generate a cell surface analogous to the basolateral domain. Supporting this idea, it has been shown that viruses destined to the basolateral surface of epithelial cells are released through these surfaces when isolated epithelial cells are allowed to re-attach on a solid support, or interact with each other in suspension (48, 49). It has also been suggested that cytoskeletal elements located just beneath the cell surface may play an important role in the differentiation of distinct membrane domains for epithelial cells, as well as in the reorganization of cell morphology in the case of lymphocytes (2, 34, 63). A specific distribution of cytoskeletal elements underlying sites of HIV budding was shown and this supports the idea that cytoskeletal elements are also involved in viral assembly (53).

Although their exact nature remains controversial, it is now generally believed that specific targeting signals are present on proteins destined to specific membrane domains. Basolateral signals seem to consist of either di-leucine motifs (29), or more commonly tyrosine-based motifs in a general Y-X-X-aliphatic/aromatic consensus (5, 23, 25, 33, 35, 60). Such tyrosine-based motifs are also often associated with endocytosis signals and there can be an overlap between these two kinds of motifs (24, 43, 44, 61). It has been reported that substitution of a tyrosine, analogous to the substitutions shown to abolish HIV polarized budding in epithelial cells, results in a decreased endocytosis and accumulation of envelope glycoproteins at the cell surface of either HIV-1 or simian immunodeficiency virus (SIV) infected lymphocytes (26, 52, 54). Some evidence was also presented for a uniform cell surface glycoprotein distribution of

a similar SIV mutant, in contrast to the wild-type envelope that appears to be mostly restricted to one pole of infected lymphocytes (26, 54).

In the present study we examined the viral multiplication kinetics and budding polarization phenotype of mutant HIV viruses in transfected Jurkat-TA lymphocytes. The kinetics of cell killing and development of viral production, as measured by reverse transcriptase assay, were similar for different mutants in which intracytoplasmic tyrosine residues were individually substituted. Substitution of the membrane-proximal tyrosine residue resulted in a small increase of envelope glycoprotein exposed at the cell surface. This same tyrosine residue is also important to the polarization of budding observed in lymphocytes and co-localization between viral budding and the myosin intermediate filaments.

MATERIALS AND METHODS

Proviral constructs. The site-directed mutagenesis of all envelope expression vectors has been previously described (32). A *KpnI-KpnI* fragment (nucleotides 3701-5893) from the wild-type HIV provirus HXBc2 (14, 45) was introduced in the mutated envelope expression vectors to re-establish the original sequences essential for Tat expression (16). All proviral constructs were derived by subcloning a *Sall-BamHI* fragment (nt 5331-8017) from these different mutated hybrid envelope fragments into an HXBc2 proviral construct harboring a *BglIII-BglIII* deletion (nucleotides 7163-7628) in the region encoding the envelope glycoprotein. This strategy facilitated screening of proviruses reconstructed with the different mutated, but full-length, glycoprotein-encoding fragments. All mutations were confirmed by DNA sequencing. All experiments described in the present manuscript were performed with two separate clones of each proviral DNAs.

Cell lines and antisera. The CD4+ human lymphoid cell line (Jurkat-TA) was maintained in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (3). The SV40-transformed African green monkey kidney COS-7 cell line used in this study was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 8% fetal calf serum and 1% antibiotics. The HIV-1 positive human serum 162 and the normal human serum used in this study has been previously described elsewhere (27). Other antibodies used were the mouse anti-p24 and anti-gp120 monoclonal antibodies (ABT), rabbit anti-actin (ICN Biomedicals), rabbit anti-myosin (ICN Biomedicals), fluorescein-conjugated goat anti-mouse (Boehringer-Manheim), fluorescein-conjugated goat anti-human (Sigma) and rhodamine-conjugated goat anti-rabbit (Sigma).

Transfection of Jurkat-TA lymphocytes. Human Jurkat-TA lymphocytic cells were transfected with the different proviral DNA constructs (15 µg of proviral DNA

per 10^7 cells) using a DEAE-Dextran technique essentially as previously described (58, 68).

Kinetics of cell survival. The number of surviving transfected cells was determined each three days using trypan blue exclusion as a criteria for viability. Cells were then centrifuged, resuspended in fresh media, and diluted to a concentration of 500,000 cells/ml for further growth.

Reverse transcriptase assay. The presence of virus in the cell supernatant was measured each three days following transfection by performing a standard reverse transcriptase assay as previously described (28). Briefly, 50 μ l of filtered cell supernatant was mixed with 50 μ l of assay cocktail containing Tris-HCl 50mM pH 7.5, MgCl₂ 5mM, KCl 150 mM, EGTA 0.5 mM, Triton X-100 0.05%, Ethylene glycol 2%, DTT 5mM, GSH 3mM, poly (rA)-oligo (dT) 50 μ g/ml, [3H] dTTP 10 μ Ci. The quantification of virus was also confirmed using a p24 ELISA assay (Coulter Diagnostics).

FACS analysis. The presence of viral envelope glycoprotein at the cell surface was confirmed and measured by fluorescence activated cell sorter (FACS). Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS (Phosphate-buffered saline) before being processed. Briefly, cells were incubated in a 1/200 dilution of anti-HIV viral antiserum and, following this adsorption for one hour on ice, cells were washed three times with PBS and re-incubated with a 1/100 dilution of fluorescein-conjugated goat anti-human antibody. Following incubation and three washes in PBS, cells were analyzed using a FACStar cytofluorometer (Beckton Dickinson).

Immunofluorescence analysis. Immunofluorescence for immunological detection of budding viral particles was performed on cells centrifuged directly onto glass slides using cytospin II (Shandon Southern Products Ltd.). The cells were then fixed and permeabilized with 100 % cold acetone, pre-incubated for 30 min in PBS containing 2 % non-fat milk, and then incubated for 2h with mouse anti-p24 capsid protein antiserum at a 1/100 dilution. The cells were then washed, and re-incubated for 30 min with a 1/50 dilution of fluorescein-conjugated goat anti-mouse antibody before final washes. Double-

labeling was also performed by simultaneous incubation of fixed and permeabilized cells with both mouse anti-p24 and rabbit anti-myosin antiserum. For these studies cells were rather resuspended in cytoskeleton buffer (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0.4 mM KH₂PO₄; 5.5 mM glucose; 4 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 2 mM EGTA; 10 mM MES; pH 6.1 (47) and fixed with glutaraldehyde to preserve locomotor morphology as described (20, 57). Following washes, simultaneous incubation was performed with anti-immunoglobulins conjugated to fluorescein (for p24 detection) or rhodamine (for myosin visualization). Cells were examined using fluorescence microscopy with a Axioskop microscope (Zeiss, Germany) using adequate filters for visualization of the green fluorescence (fluorescein using 530 nm wavelength) or red fluorescence (rhodamine using 545 nm wavelength).

Electron microscopy. Processing for electron microscopy was done essentially using standard procedures. Briefly, suspensions of infected cells were centrifuged and resuspended in cytoskeleton buffer before being fixed overnight at 4 °C in 2.5 % glutaraldehyde prepared in the same buffer. Cells were washed three times with a 0.1M sodium cacodylate solution containing 3% sucrose and left overnight in the same buffer at 4 °C. Post fixation was accomplished with osmium tetroxyde 1.33% in a collidine solution for 2 hours at 21 °C. After dehydration and positive coloration, cells were examined using a Hitachi 7100 electron microscope.

Establishment of chronically-infected cells. After maximum cell death and cytotoxicity induced by HIV during viral multiplication, the remaining cells were amplified as total population and used for subsequent experiments (Figure 1B). In some experiments, the chronically-infected Jurkat-TA cells were activated overnight with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; SIGMA) at a final concentration of 160nM to upregulate HIV-1 gene expression.

RESULTS

Kinetics of viral multiplication. Before undertaking any detailed studies concerning the polarized budding of mutant HIV-1, we had to examine if the chosen mutations affected other properties of the envelope and thus the multiplication of the virus. The different mutations in the intracytoplasmic portion of the gp41 glycoprotein, the region previously demonstrated as essential for polarized budding in the epithelial cell model, were thus introduced in a complete infectious HIV-1 proviral clone. The different plasmids containing mutated HIV-1 proviral DNA were transfected, in parallel with wild-type DNA, in human Jurkat-TA lymphocytes. In each of these mutants, one of the four intracytoplasmic tyrosine residues was replaced for a serine residue, a non-conservative substitution that removes the aromatic ring while keeping an hydroxyl side chain. The tyrosine 712 was also substituted for an alanine (non-conservative substitution), or a phenylalanine (which conserves the aromatic ring). As shown in Fig. 1A, there was a slight delay in maximal cell death induced by viruses containing the tyrosine 795 and 802 mutations (Y795S and Y802S); all other mutant viruses yielded results identical to wild-type. There was also a similar delay in reaching the peak viral titer (Fig.1B). In each case, the major decrease in cell viability corresponded to the time of viral titer peak. This decrease was then followed by establishment of chronically-infected cell lines releasing relatively low virus titers with little viral-induced cell killing. The cell death phase is also accompanied by the formation of abundant syncytia without any noticeable difference for the different mutants (data not shown). There is thus a minor alteration in the potential of the Y795S and Y802S mutant viruses to multiply, although all other mutant viruses remained similar to the wild-type virus.

Cell surface expression of the different mutant glycoproteins.

Having established that the different tyrosine mutants have essentially normal replicative properties, we further analyzed the presence of envelope glycoprotein at the cell surface using flow cytometric analysis (FACS). The analysis was performed on cells taken at a

time point slightly before achieving maximal virus titer (9 or 15 days depending on the virus), corresponding to the peak in cell death and syncytia formation. Mutations of the membrane-proximal tyrosine 712 residue did reveal a slight increase in cell surface glycoprotein while all other mutants were essentially identical to wild-type (Fig. 2A and C). In parallel, the same analysis was also performed on chronically-infected lymphocytes (21 days post-transfection) induced with PMA; this treatment favors the up-regulation of HIV-1 gene expression (15). Under these conditions, about 50% of the cells were positive by FACS analysis and the fluorescence intensity of positive cells was 2-3 fold lower than observed at the peak of viral production (Fig. 2B). Nevertheless, relative levels of surface envelope glycoproteins observed with the different mutants were similar with such chronically-infected cell populations compared to the cells at the peak of viral production (Fig. 2B and D). It therefore appears that, although there is no apparent consequences on viral multiplication, the amount of cell surface envelope glycoprotein is slightly increased by mutation of the membrane-proximal tyrosine only; conservative phenylalanine substitution of this same amino acid residue generated a somewhat intermediate phenotype.

Polarization of viral budding. The site of viral budding was then examined using immunofluorescence on fixed and permeabilized cells. This allowed us to use an antibody directed against the major capsid protein p24 in order to localize the region of the cell surface where budding of the capsid occurs. The preferential viral budding through one pole of the cell was easily demonstrated when the cells infected with wild-type virus were examined at the time of peak viral titer (Fig. 3B). Since these experiments were performed on fixed and permeabilized cells for the detection of a non-membrane protein, the phenomenon observed could not be due to antibody "capping" but must be the consequence of an actual transport of the protein to this specific region at the inner membrane surface of the cells. Essentially identical results were observed when chronically-infected cells were examined, except that only a percentage of the cells had a sufficient expression level for immunofluorescence detection. We have also examined the

budding of a mutant virus defective for the envelope expression. This mutant proviral DNA was *trans*-complemented by co-transfection with a wild-type envelope expression vector; the enveloped virions produced were then used to infect Jurkat-TA lymphocytes. Budding of the resulting non-enveloped virions produced after 48 hours in these lymphocytes was clearly non-polarized, the p24 protein being located all around the cells (Fig.4 and data not shown). This supports our initial assumption that the polarization of budding is a property associated with the viral envelope glycoprotein.

When the different envelope glycoprotein mutants were examined, it was quite clear that the membrane-proximal tyrosine is essential for this polarization phenotype, as previously observed for the polarization phenotype in epithelial cells. The distribution of fluorescence appeared uniform at the surface of infected lymphocytes without any apparent patches or preferential pole of release (Fig. 3C). Cells were examined by two different investigators who were unaware of the nature of the different samples. One hundred cells were counted for each sample and each cell was scored as positive or negative for the polarization phenotype. The mean results of four different observations between the two observers are expressed in percentage of polarized cells and summarized in Figure 4. The data confirmed that tyrosine 712 is critical for the polarization phenotype of viral budding in lymphocytes. A conservative substitution for a phenylalanine only had a partial effect as also observed on the polarized budding in epithelial cells. Polarization of viral release was also directly confirmed by electron microscopy which showed that the detection of p24 by immunofluorescence in a specific region of the cell surface did, in fact, reflect that viral budding is specifically restricted to these plasma membrane regions (Fig. 5A and 5B). Wild-type virus was released exclusively at one pole of the cells while the Y712S mutant was found in the form of complete or budding virions on plasma membrane essentially all around the cells.

Co-localization of viral budding and cytoskeletal elements. In a last set of experiments, we performed immunofluorescence analysis on chronically-infected lymphocytes to determine if alterations in the polarization phenotype also affect the

previously described co-localization between some cytoskeletal elements and the budding site. In this study, we looked at both the myosin and actin proteins since they have been reported to co-localize with HIV during the budding process. We found that actin is most concentrated at the cell pole where viral budding occurs; although significant amounts of actin were also found to be present all around the periphery of the cell. This localization was identical in uninfected cells as well as in cells infected with either the wt or mutant virus Y712S (data not shown), although this mutant virus showed no polarization of its p24 localization. When we analyzed the myosin intermediate filament protein, we found that it was specifically and almost exclusively localized to the pseudopod in either uninfected or infected cells. The viral p24 protein was co-localized at the same pole in the case of the wild-type virus, while this was clearly not the case for the non-polarized Y712S mutant (Fig. 6).

DISCUSSION

In the present study, we investigated if the amino acid motif previously identified as a basolateral targeting signal for HIV-1 budding in epithelial cells could also play a role during viral maturation in lymphocytes. Different evidences suggested such a possible role. In epithelial cells, the region of contact with other cells or with a solid support are considered analogous to basolateral surfaces; viruses normally budding at the basolateral surface (for example vesicular stomatitis virus) are specifically released at cell-cell or cell-substrate interfaces, while an apically-targeted virus (influenza virus) is mostly released through free cell surfaces. A serie of observations has shown a preferential budding of HIV-1 and HTLV-I at the contact site when infected lymphocytes, or monocytes, are in contact with epithelial cells (1, 41, 42, 69). Additional studies further showed that this specific budding at one pole of infected cells is not restricted to cell-to-cell contact sites but can also be found on individual infected monocytes (40).

We have now shown that the intracytoplasmic tyrosine residue 712 is involved in this polarized budding phenotype for lymphocytes, as it was the case in polarized epithelial MDCK cells. In the last few years, similar tyrosine-based signals have been found in various basolateral proteins and have also been assigned to various types of targeted protein delivery (5, 23, 25, 33, 35, 59, 60). In the case of HIV, a signal has been proposed for endocytosis of the glycoprotein at the cell surface (52) but a more recent study has rather shown that this signal may be observed only if the glycoprotein is expressed in the absence of the viral capsid proteins (11), thus preventing release of the envelope at the cell surface through viral budding. However, in the present study, we still observed a small increase of envelope at the cell surface in the Y712F mutant and an even more important increase in both the Y712S and Y712A mutants. Substitution of other intracytoplasmic residues had no effect. There is thus clearly an overlapping between the signals responsible for basolateral delivery and for increase of HIV-1

envelope glycoprotein at the cell surface; it still needs to be established if this increase is actually due to an effect on endocytosis. It also needs to be established if both phenomena of targeting and endocytosis are important during viral multiplication and/or viral pathogenesis.

It should be mentioned that the presence of a tyrosine-based signal involved in the polarized budding of SIV had been previously suggested. In this case, the polarization of the envelope glycoprotein at the cell surface was affected when the membrane-proximal tyrosine 723 was substituted (26).

There is accumulating evidence concerning the role of the cytoskeleton in cellular polarization. Accordingly, cytoskeletal and extracellular matrix elements have been shown to co-localize with viral proteins in cells infected with various viruses (21, 22, 30, 55). In the case of HIV, this co-localization was shown with the viral p24, p17, and reverse transcriptase associated with cellular actin, intercellular cell adhesion molecule, and myosin respectively (12, 38, 40, 53). Recently, it has even been demonstrated that some cytoskeletal proteins can be found inside the HIV-1 virion (36). In the present study, we demonstrated a loss of co-localization between the myosin intermediate filament and HIV viral budding upon substitution of the membrane proximal tyrosine in the viral envelope glycoprotein. The mutation affects only the polarized budding of the HIV-1 viral particle but does not affect the polarization of the cytoskeleton in itself. These results suggest that, in addition to probable interaction with other viral capsid proteins, the intracytoplasmic domain of the envelope glycoprotein is involved in the direct or indirect interaction between viral particles and host-cell cytoskeletal elements.

The polarized budding phenotype of HIV could have important consequences in the dissemination of the virus. In other viruses it was shown that analogous tyrosine-based signals are essential and can be involved in different stages of the infection. In the case of bovine leukemia virus (BLV), a tyrosine-based motif was shown to be essential for infection and maintenance of high viral load in infected animals (67); a similar motif in the envelope of alphaviruses is essential for the actual viral budding process (70). In

the case of BLV, two of the three motifs in the intracytoplasmic tail of the transmembrane protein are apparently involved in signal transduction pathways (67). This is not surprising considering that cytoskeleton elements in polarized lymphocytes can be co-localized with signal transducing protein kinase C (PKC) (18). Also, during T-cell activation, there is an induction of tyrosine phosphorylation of different substrates at the site of polarization. It is thus quite possible that HIV takes advantage of a normal cellular process, by which various specific molecules are re-localized to the pseudopod during lymphocyte activation, in order to facilitate an efficient viral transmission from infected to uninfected cells. It will be interesting to look at the effect of this polarization signal in the context of transmission between lymphocytes and epithelia. This polarization signal could possibly become a new therapeutic target to limit cell-to-cell propagation of the HIV virus.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Serge Sénéchal for performing FACS analysis and his help in interpretation of the results. We thank M. Robert Alain from IAF (Institut Armand Frappier) for performing electron microscopic observations. We thank Carole Danis, Nicole Rougeau, Isabelle Courchesne and Johanne Mercier for technical support. This work was supported by a NHRDP/MRC grant (to G.L. and É.A.C) as well as a FCAR group grant. É.A.C. is the recipient of a career award from the NHRDP and G.L. is the recipient of a scholarship from the FRSQ. J.P.L. is the recipient of a FCAR studentship through the Groupe de recherche en transport membranaire, J.D. and R.L. are recipients of NHRDP studentships.

REFERENCES

1. **Bourinbaiar, A. S., and D. M. Phillips.** 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. AIDS* **4**:56-63.
2. **Carpén, O., I. Virtanen, V. P. Lehto, and E. Saksela.** 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J. Immunol.* **131**:2695.
3. **Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.
4. **Compans, R. W., and R. V. Srinivas.** 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:141-181.
5. **Dagermont, C., A. Le Bivic, S. Rothemberger, B. Iacopetta, and L. C. Kuhn.** 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of

transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.* **12**:1713-1721.

6. **de Hoop, M. J., and C. G. Dotti.** 1993. Membrane traffic in polarized neurons in culture. *J. Cell Sci. Suppl.* **17**:85-92.
7. **del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid.** 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* **131**:495-508.
8. **Delchambre, M., D. Gheysen, D. Thines, C. Thiriart, E. Jacobs, E. Verdin, M. Horth, A. Burny, and F. Bex.** 1989. The gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* **13**:2653-2660.
9. **Dotti, C. G., J. Kartenbeck, and K. Simons.** 1993. Polarized distribution of the viral glycoproteins of vesicular stomatitis, fowl plague and Semliki Forest viruses in hippocampal neurons in culture: a light and electron microscopy study. *Brain Res.* **610**:141-147.
10. **Dotti, C. G., and K. Simons.** 1990. Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* **62**:63-72.
11. **Egan, M. C., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J. Virol.* **70**:6547-6556.
12. **Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. C. Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani.** 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *AIDS* **9**:329-335.

13. **Fantini, J., S. Baghdiguian, N. Yahi, and J. C. Chermann.** 1991. Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology* **185**:904-907.
14. **Fisher, A. G., E. Collalti, L. Ratner, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1985. A molecular clone of HTLV-III with biological activities. *Nature* **316**:262-265.
15. **Folks, K. S., K. A. Clouse, J. Justement, A. Rabson, E. Duh, J. H. Kehrl, and A. S. Fauci.** 1989. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2365-2368.
16. **Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**:3306-3315.
17. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-112.
18. **Gregorio, C. C., E. A. Repasky, V. M. Fowler, and J. D. Black.** 1994. Dynamic properties of ankyrin in T lymphocytes: colocalization with spectrin and protein kinase C beta. *J. Cell Biol.* **125**:345-358.
19. **Handler, J. S.** 1989. Overview of epithelial polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **51**:729-740.
20. **Haston, W. S.** 1987. F-actin distribution in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Sci.* **88**:495-501.
21. **Heinlein, M., B. L. Epel, H. S. Padgett, and R. N. Beachy.** 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**:1983-1985.

22. **Hiller, G., C. Jungwirth, and K. Weber.** 1981. Fluorescence microscopical analysis of the life cycle of vaccinia virus in chick embryo fibroblasts. Virus-cytoskeleton interactions. *Exp. Cell Res.* **132**:81-87.
23. **Honing, S., and W. Hunziker.** 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **128**:321-332.
24. **Hopkins, C. R.** 1992. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.* **17**:27-32.
25. **Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman.** 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**:907-920.
26. **LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, and J. A. Hoxie.** 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* **69**:5217-5227.
27. **Lavallée, C., X. J. Yao, A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1994. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* **68**:1926-1934.
28. **Lee, M. H., K. Sano, F. E. Morales, and D. T. Imagawa.** 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1717-1721.
29. **Letourneur, F., and R. D. Klausner.** 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**:1143-1157.

30. **Liebowitz, D., R. Kopan, E. Fuchs, J. Sample, and E. Kieff.** 1987. An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2299-2308.
31. **Lodge, R., H. Göttlinger, D. Gabuzda, É. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68**:4857-4861.
32. **Lodge, R., J.-P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* **16**: 695-705.
33. **Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman.** 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**:741-753.
34. **McNeill, H., M. Ozawa, R. Kemler, and W. J. Nelson.** 1990. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* **62**:309-316.
35. **Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino.** 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**:1872-1875.
36. **Ott, D. E., L. V. Coren, B. P. Kane, L. K. Busch, D. G. Johnson, R. C. Sowder II, E. N. Chertova, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1996. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **70**:7734-7743.
37. **Owens, R. J., and R. W. Compans.** 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **63**:978-982.

38. **Pearce-Pratt, R., D. Malamud, and D. M. Phillips.** 1994. Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:2898-2905.
39. **Pearce-Pratt, R., and D. M. Phillips.** 1993. Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Biol. Reprod.* **48**:431-445.
40. **Perotti, M.-E., X. Tan, and D. M. Phillips.** 1996. Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes. *J. Virol.* **70**:5916-5921.
41. **Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaiar.** 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**:261-273.
42. **Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, X. Tan, and R. Pearce-Pratt.** 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends Microbiol.* **2**:454-458.
43. **Prill, V., L. Lehmann, K. von Figura, and C. Peters.** 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.* **12**:2181-2193.

44. **Pytowski, B., T. W. Judge, and T. E. McGraw.** 1995. An internalization motif is created in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor by substitution of a tyrosine at the first position of a predicted tight turn. *J. Biol. Chem.* **270**:9067-9073.
45. **Ratner, L., A. Fisher, L. L. Jagodzinski, H. Mitsuya, R. S. Liou, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1987. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **3**:57-69.
46. **Rhee, S. S., and E. Hunter.** 1990. Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J. Virol.* **64**:4383-4389.
47. **Rinnerthaler, G., M. Herzog, M. Klappacher, H. Kunka, and J. V. Small.** 1991. Leading edge movement and ultrastructure in mouse macrophages. *J. Struct. Biol.* **106**:1-16.
48. **Rodriguez-Boulan, E.** 1983. Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Mod. Cell Biol.* **1**:119-170.
49. **Rodriguez-Boulan, E., and W. J. Nelson.** 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**:718-725.
50. **Rodriguez-Boulan, E., and S. K. Powell.** 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:395-427.
51. **Rodriguez-Boulan, E., and D. D. Sabatini.** 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:5071-5075.
52. **Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano.** 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.* **155**:473-488.

53. **Sasaki, H., M. Nakamura, T. Ohno, Y. Matsuda, Y. Yuda, and Y. Nonomura.** 1995. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2026-2030.
54. **Sauter, M. M., A. Pelchenmatthews, R. Bron, M. Marsh, C. C. Labranche, P. J. Vance, J. Romano, B. S. Haggarty, T. K. Hart, W. M. F. Lee, and J. A. Hoxie.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.* **132**:795-811.
55. **Simon, K. O., P. A. Whitaker-Dowling, J. S. Youngner, and C. C. Widnell.** 1990. Sequential disassembly of the cytoskeleton in BHK21 cells infected with vesicular stomatitis virus. *Virology* **177**:289-297.
56. **Simons, K., and S. D. Fuller.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**:243-288.
57. **Sullivan, S. J., G. Daukas, and S. H. Zigmond.** 1984. Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* **99**:1461-1467.
58. **Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5163-5167.
59. **Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* **268**:3313-3320.

60. **Thomas, D. N. C., and M. G. Roth.** 1994. The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence by having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.* **269**:15732-15739.
61. **Trowbridge, I. S., J. F. Collawn, and C. R. Hopkins.** 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:129-161.
62. **Tucker, S. P., and R. W. Compans.** 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* **42**:187-247.
63. **Vasiliev, J. M.** 1991. Polarization of pseudopodial activities. *J. Cell Sci.* **98**:1-4.
64. **Wilkinson, P. C.** 1987. Leucocyte locomotion: behavioural mechanisms for accumulation. *J. Cell Sci. Suppl.* **8**:103-119.
65. **Wilkinson, P. C.** 1986. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology* **57**:281-289.
66. **Wilkinson, P. C., and A. Higgins.** 1987. OKT3-activated locomotion of human blood lymphocytes: a phenomenon requiring contact of T cells with Fc receptor-bearing cells. *Immunology* **60**:445-451.
67. **Willems, L., J. S. Gatot, M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, and R. Kettmann.** 1995. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J. Virol.* **69**:4137-4141.

68. **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 predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* **69**:7032-7044.
69. **Zacharopoulos, V. R., M. E. Perotti, and D. M. Phillips.** 1992. Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type I. *J. Virol.* **66**:4601-4605.
70. **Zhao, H., B. Lindqvist, H. Garoff, C. H. von Bonsdorff, and P. Liljestrom.** 1994. A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the alphavirus envelope protein is essential for budding. *EMBO J.* **13**:4204-4211.

FIG.1. Viral multiplication kinetics following transfection of Jurkat-TA cells. Cells were transfected with either wild-type or various mutant proviral DNAs as described in the text. Progression of cell death was followed as described in Material and Methods (panel A). The kinetics of viral production was also followed by reverse transcriptase assay and results are presented in panel B.

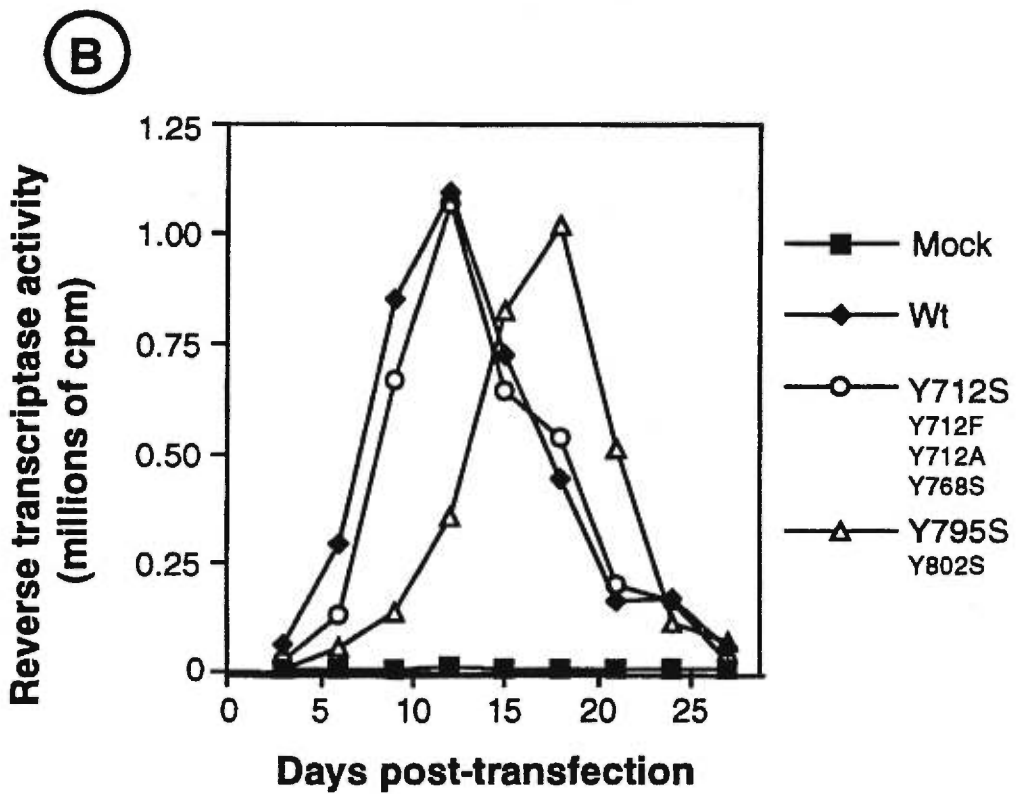
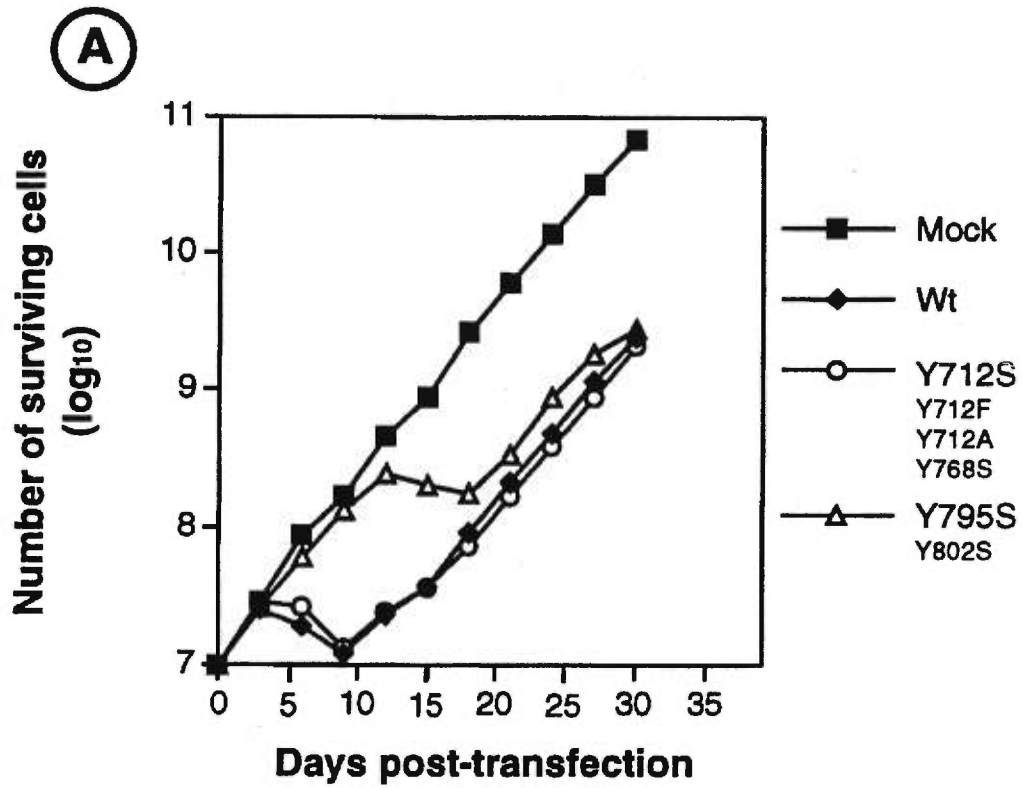


FIG.2. Cell surface expression of envelope glycoprotein. Transfected Jurkat-TA cells were analyzed by FACS using an anti-HIV antiserum on unfixed cells. The analysis was performed on day 9 post transfection (panel A and C) as well as on chronically-infected Jurkat-TA cells induced with PMA soon after chronic infection was established (panel B and D). Results are presented for the mock (non-infected), the Wild-type virus, mutant Y712S and Y712F; finally, the Y768S mutant virus is representative of all the other mutants.

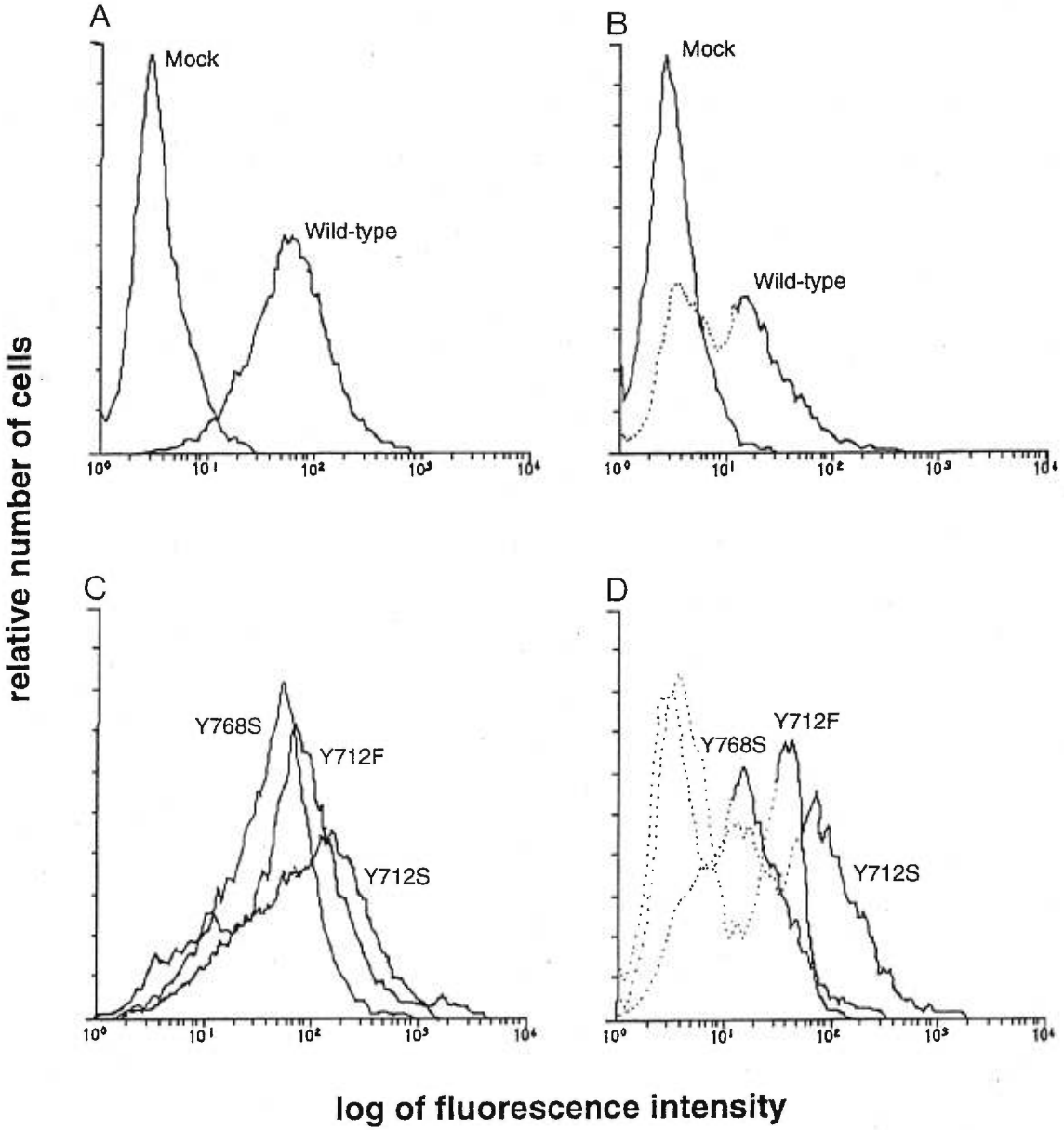


FIG. 3 Polarized localization of p24. Chronically-infected Jurkat-TA cells were induced with PMA and analyzed by immunofluorescence with anti-p24 antiserum as described in Material and Methods. Cell lines examined were control untransfected cells (panel A), cells transfected with wild-type proviral DNA exhibiting polarized localization of the p24 protein (panel B), and cells transfected with mutant Y712S DNA showing a lack of polarization (panel C). All pictures were taken at 400X magnification.

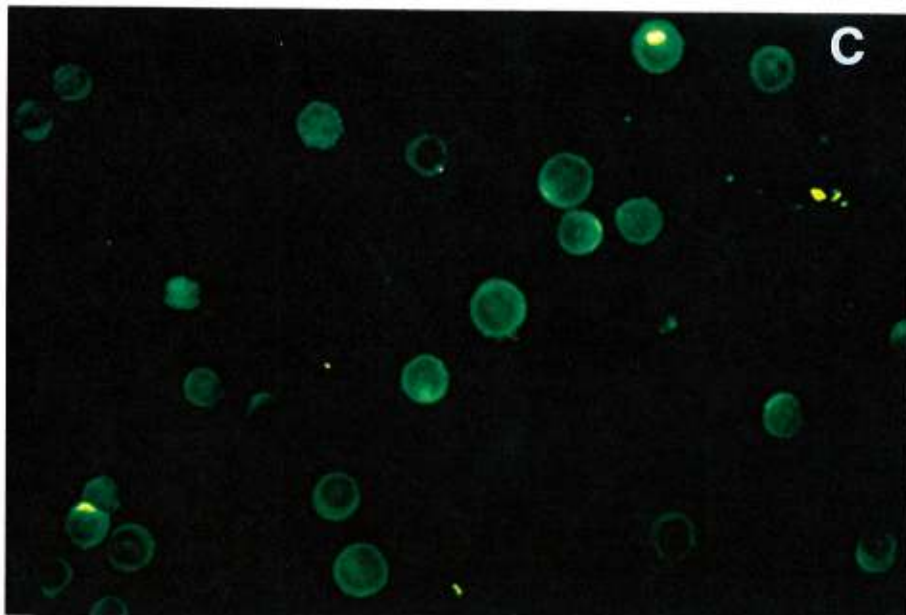
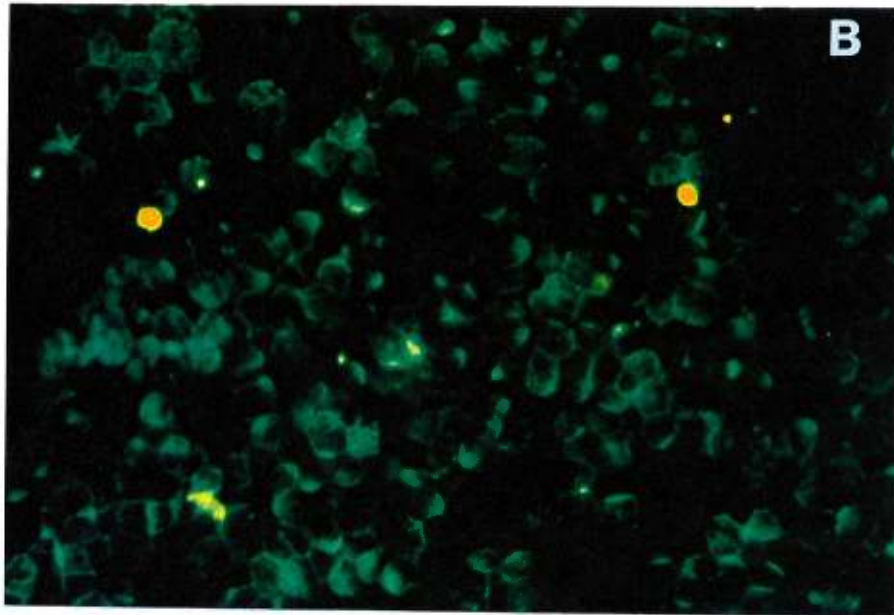
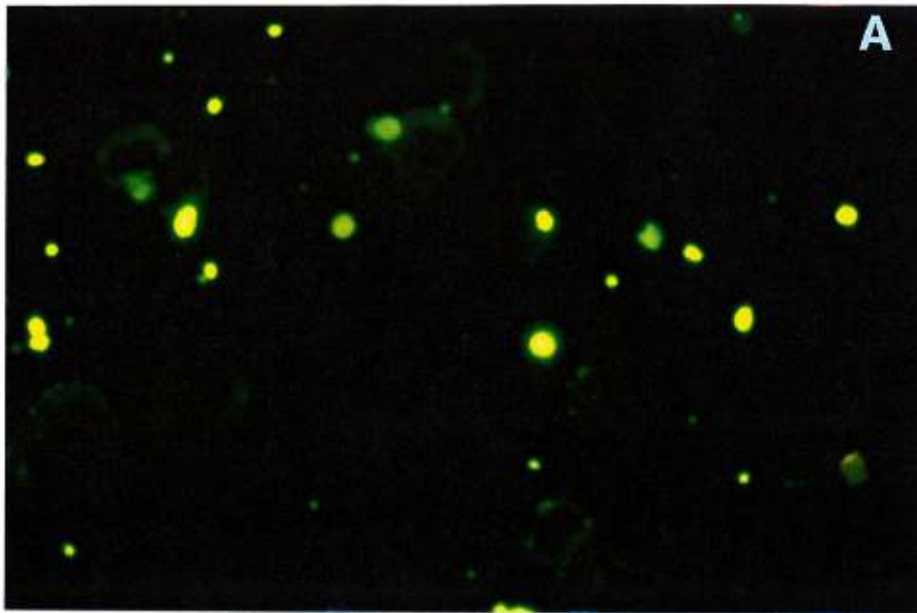


Figure 4. Transfected Jurkat-TA cells were permeabilized and examined by immunofluorescence with the anti-p24 antibody. Two independent readings were taken and one hundred cells were examined in each case. Polarization was scored as positive when clear restriction of p24 staining was observed to one pole of the cell, and as negative when p24 staining was seen over the entire plasma membrane. The wild-type and different mutants were examined as indicated. Results are presented in percentage for all proviral DNA constructs and are the mean of results obtained from two separate readings with error bars representing the variation observed between the two results.

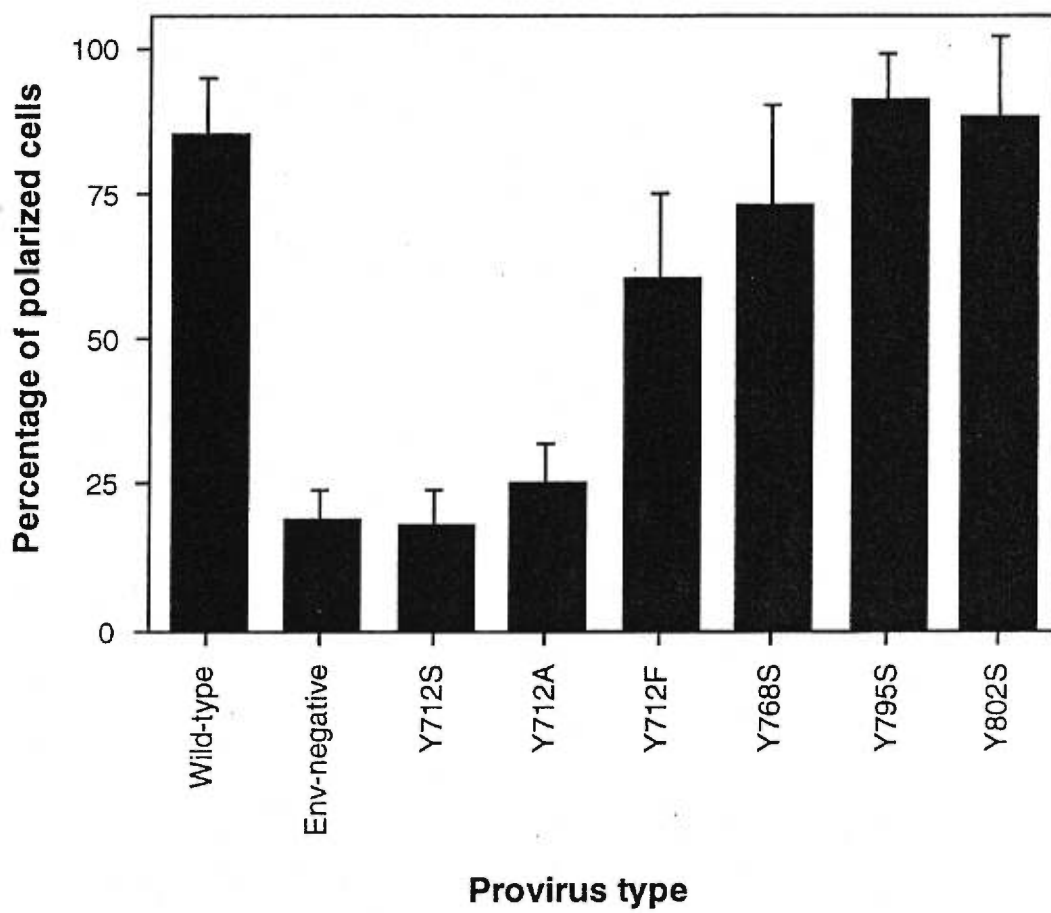


FIG.5. Site of viral budding on transfected cells. Electron microscopic analysis of transfected Jurkat-TA cells was performed at the time of maximal viral production (day 12). Jurkat cells were transfected with wild-type proviral DNA (panel A) or with mutant Y712S. Budding viral particles are indicated by arrows. Bar = 2 μ m

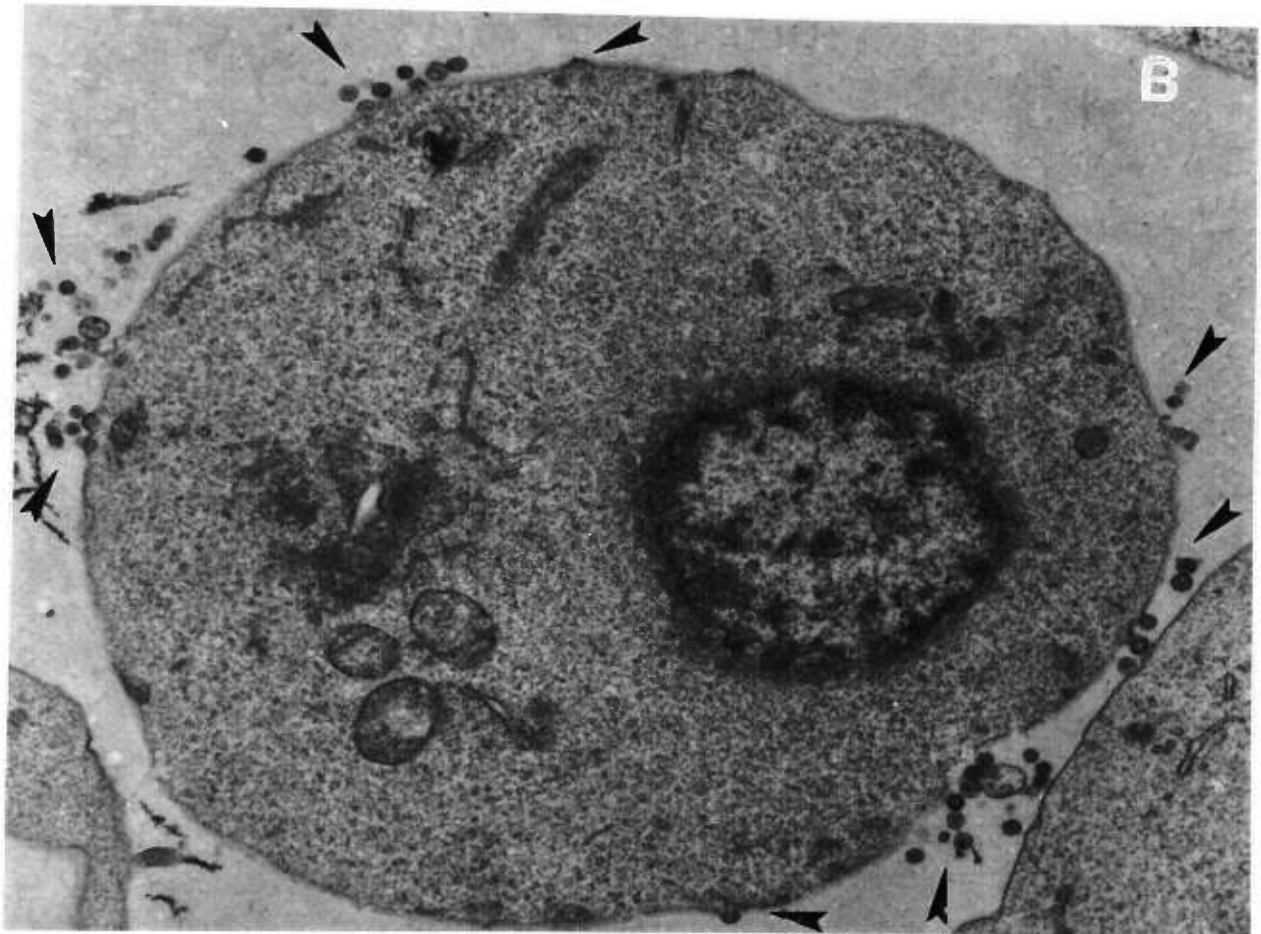
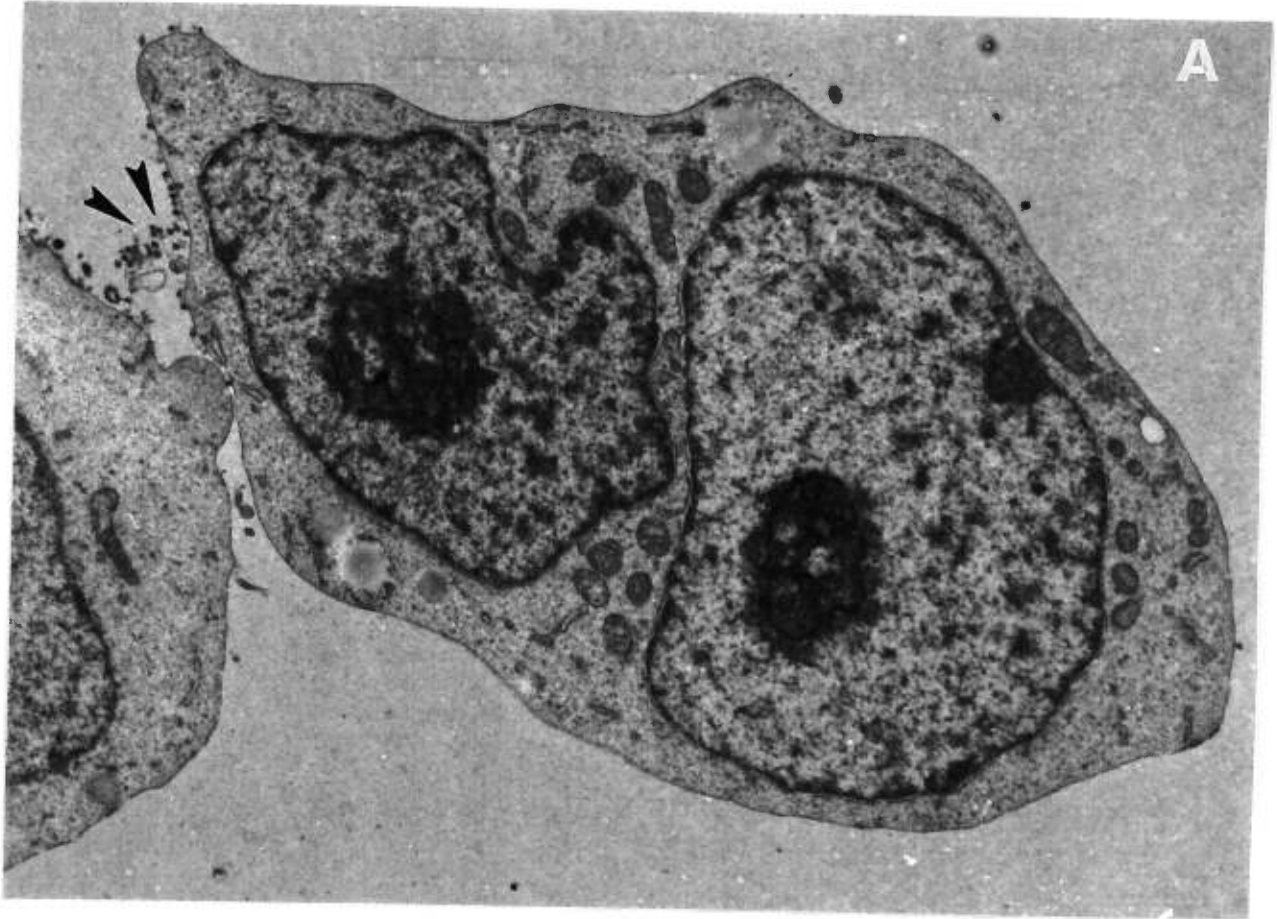
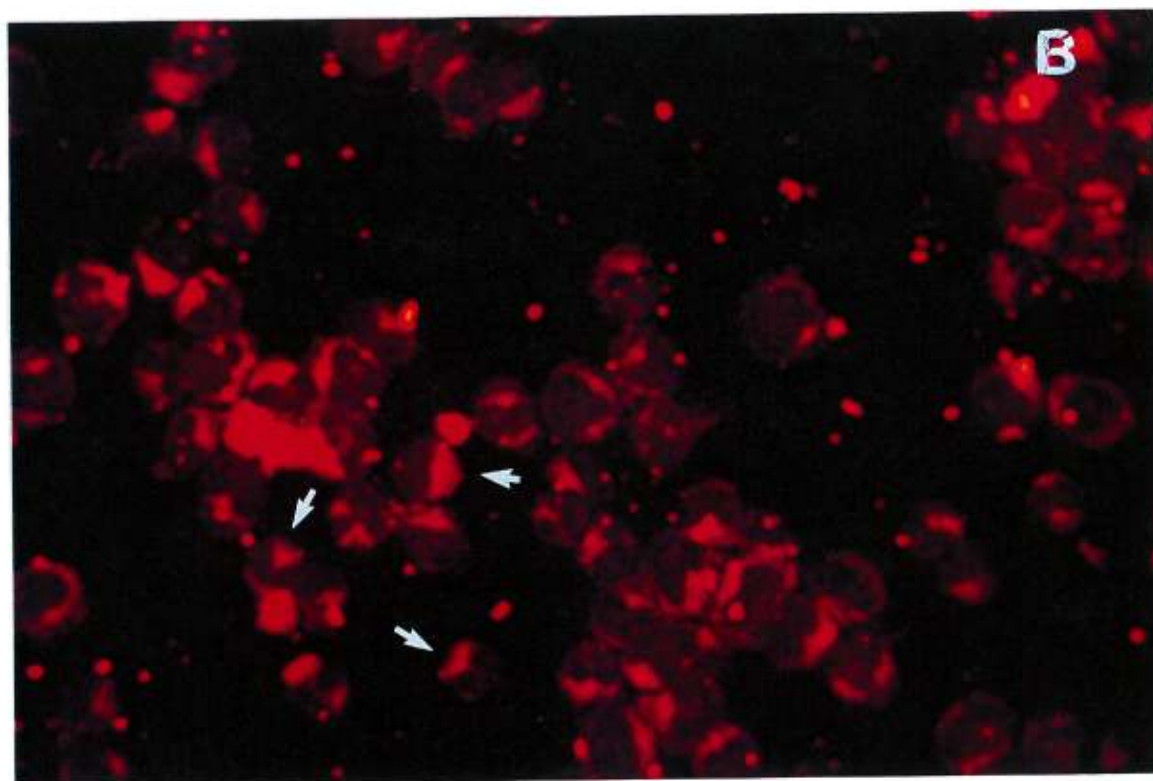
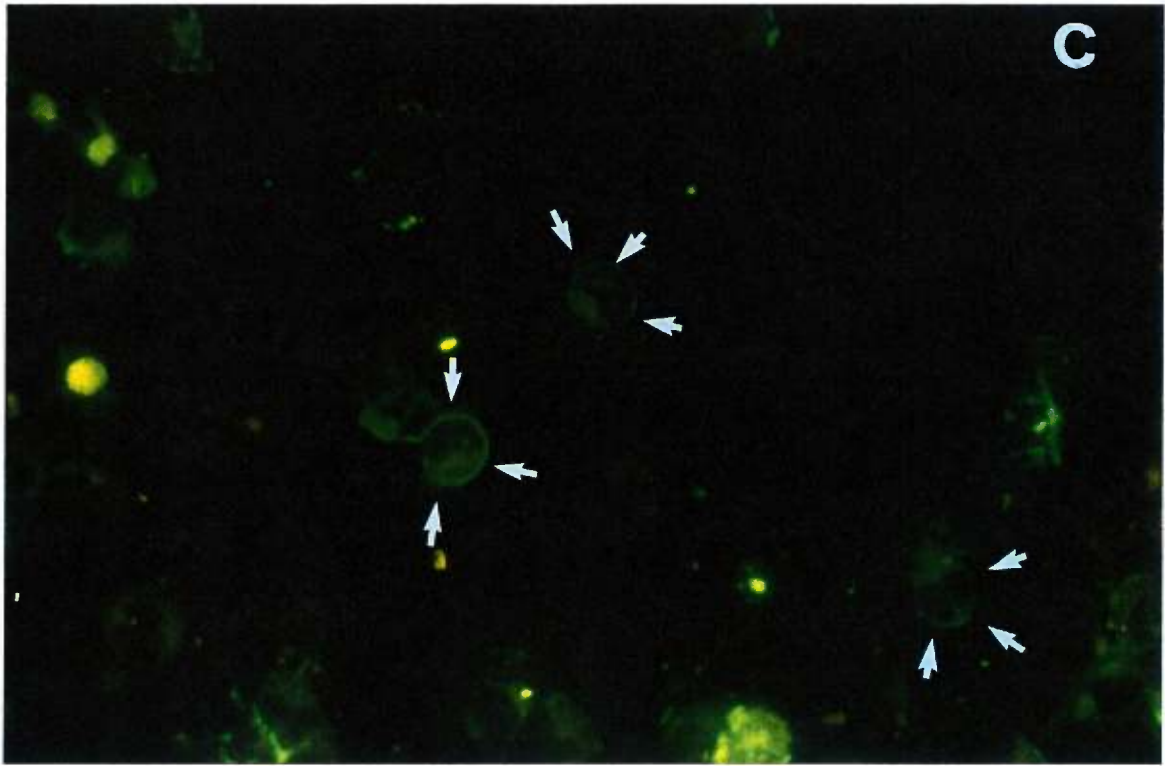


FIG.6 Cytoskeleton association of viral budding. Transfected Jurkat cells were analyzed after establishment of chronically-infected cell lines (21 days post transfection and induced with PMA/PHA). Double-labeling was performed to simultaneously reveal viral budding by detection of p24 (panel A and C) or cytoskeletal elements using an anti-myosin antibody (panel B and D). Cells transfected with either wild-type proviral DNA (Panel A and B) or of the polarization-defective mutant (Y712S) (Panel C and D) are shown. The same field is presented for corresponding samples in panels A and B or panel C and D for co-localization. Arrows show co-localization or lack of co-localization between the two proteins.





CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le but principal de mes travaux était de mieux comprendre le phénomène de polarisation du bourgeonnement du VIH dans les cellules lymphocytaires et éventuellement l'implication de ce phénomène dans la transmission aux cellules épithéliales ou autres types cellulaires. Pour l'étude de la polarisation cellulaire, le modèle des cellules épithéliales est le plus largement utilisé. Nous avons donc décidé de diviser l'étude du phénomène de la polarisation en deux approches différentes. La première est celle de la création d'une lignée épithéliale exprimant la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 de façon permanente. Étant donné les temps d'attente requis dans la création de ce type de lignées, la majorité des résultats obtenus concerne plutôt la deuxième partie, soit l'étude de la polarisation dans le modèle des lymphocytes. Ce mémoire de maîtrise traite donc principalement de ce phénomène de polarisation dans les lymphocytes, mais les résultats accumulés jusqu'à maintenant au niveau des lignées de cellules épithéliales seront présentés en annexe, à la fin de ce mémoire.

On a cru pendant longtemps que le VIH, lors de la transmission sexuelle, pénétrait dans l'organisme à partir de lésions dans l'épithélium intestinal ou vaginal. Il a été proposé par la suite que la transmission du virus puisse également se faire via les cellules mononucléaires infectées qui se trouvent dans les sécrétions des voies génitales (Phillips and Bourinbaïar, 1992, Phillips, et al., 1994. En plus des virions libres présents dans les sécrétions, les cellules mononucléaires infectées pourraient transmettre le virus à d'autres cellules du même type ainsi qu'à d'autres types cellulaires (Clemetson, et al., 1993, Ilaria, et al., 1992, Mermin, et al., 1991, Phillips, et al., 1992). La présence de virions associés aux cellules peut être une source importante de virus puisque, théoriquement, une cellule infectée peut produire des milliers de virions. Il faut aussi considérer le fait que d'autres éléments du système immunitaire se retrouvent au niveau des muqueuses et peuvent être impliqués dans l'immunité mucosale. On pense entre autres aux lymphocytes se trouvant dans la paroi intestinale et ceux des cavités buccale, nasale, et génito-urinaire, ainsi que ceux des glandes mammaires. Parmi ces

cellules, les lymphocytes associés aux cellules épithéliales de l'intestin constituent une large population des lymphocytes T de la paroi intestinale. Ces lymphocytes sont en contact avec la surface externe de la paroi intestinale et du côté basolatéral de la surface des cellules épithéliales (Cepek, et al., 1993). Ces lymphocytes de la paroi intestinale sont aussi spécialisés dans l'interaction avec les cellules épithéliales (Bandeira, et al., 1990, Cerf-Bensussan, et al., 1987, Lefrancois, 1991). Cette interaction procure un environnement très propice pour la transmission possible du VIH des cellules épithéliales vers les lymphocytes et l'inverse. Des travaux de pionniers par le groupe du Dr. David M. Phillips ont mis en évidence ce phénomène de transmission entre lymphocytes et cellules épithéliales. Leurs observations en microscopie électronique ont suggéré que la relâche du VIH est polarisée lors du contact entre lymphocytes ou monocytes infectés et cellules épithéliales de la muqueuse uro-génitale; c'est à dire que l'on retrouve le bourgeonnement du VIH seulement au point de contact entre cellules (Pearce-Pratt and Phillips, 1993, Tan, et al., 1993). Le même phénomène de polarisation du bourgeonnement est aussi remarqué lorsque des lymphocytes infectés sont mis en contact avec une matrice extracellulaire de fibronectine (Pearce-Pratt, et al., 1994). Par contre, aucun mécanisme n'a été proposé pour expliquer ce phénomène. La seule conclusion des auteurs face à ce phénomène est celle d'une implication possible du cytosquelette dans le bourgeonnement, suggérée par la co-localisation du bourgeonnement viral et de l'actine. Cette interaction directe ou indirecte, avec l'actine elle-même ou une protéine associée au cytosquelette, semble de plus en plus évidente. Il est probable que le contact intercellulaire n'est qu'un des possibles stimuli déclenchant la réorganisation du cytosquelette et par le fait même la polarisation du bourgeonnement viral. Mais, l'identification du lien possible entre une région présente sur une protéine du VIH et des protéines du cytosquelette reste à faire. Nous avons donc décidé d'aller plus loin dans la compréhension de ce phénomène en utilisant les différentes constructions plasmidiques qui étaient à notre disposition et qui permettent l'expression des différentes protéines virales.

Plusieurs raisons nous ont amené à émettre l'hypothèse que le signal de ciblage basolatéral observé dans les cellules épithéliales pouvait aussi être important dans la polarisation du bourgeonnement au niveau des lymphocytes. Premièrement, il y a très probablement une implication du cytosquelette et du contact cellule-cellule dans le mécanisme de polarisation des cellules épithéliales ainsi que dans celui des lymphocytes. Dans le cas des cellules épithéliales, il avait déjà été suggéré que les régions de contact entre cellules, ou entre cellules et support solide, pouvaient être considérées comme analogues aux surfaces basolatérales (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Cette suggestion a été faite suite à des observations sur des cellules MDCK en suspension. Dans ces cellules, les virus qui normalement bourgeonnent du côté basolatéral sont libérés spécifiquement au point de contact cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, tandis que les virus à bourgeonnement apical se retrouvent libérés sur toute la surface de la cellule. De courtes séquences d'acides aminés dans le domaine intracytoplasmique de plusieurs protéines, incluant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, ont été identifiées comme étant le déterminant majeur du ciblage basolatéral (Dagermont, et al., 1993, Honing and Hunziker, 1995, Hunziker, et al., 1991, Lodge, et al., 1996, Matter, et al., 1992, Ohno, et al., 1995, Thomas and Roth, 1994). Des résidus tyrosines, spécialement dans un contexte de motif Y-X-X-(aliphatique/aromatique), sont souvent cruciaux pour ce type de ciblage. Ces motifs de tyrosines se retrouvent à quatre reprises dans le domaine intracytoplasmique de la gp41 du VIH-1 soit en position 712, 768, 795, et 802. Pour le choix initial du type de substitution qui serait le plus profitable dans l'étude de la polarisation, nous voulions demeurer le plus uniforme possible. Pour les quatre tyrosines de la queue intracytoplasmique de la gp41, nous avons donc choisi un changement pour le même acide aminé, soit la sérine. Ce choix est justifié pour deux principales raisons. Dans le cas de la troisième tyrosine (Y795S), nous étions limité dans le choix des acides aminés, puisque cette séquence nucléotidique chevauche le deuxième cadre de lecture de Tat et de Rev. Certaines mutations dans cette région ont été identifiées comme ayant un effet néfaste sur la multiplication du virus (Cochrane, et al., 1991), la

substitution en sérine permet d'éviter ce problème. Deuxièmement, la substitution de tyrosines par des sérines nous permet d'enlever le noyau aromatique, tout en conservant le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la tyrosine. Pour les besoins de la discussion, les différentes mutations qui entraînent la substitution de tyrosines en sérines, sont nommés : Y712S, Y768S, Y795S, et Y802S. Dans un autre type de mutation que nous avons fait, soit la tyrosine 712 en phénylalanine, nous conservons le groupement aromatique présent normalement sur la tyrosine, donc ce changement est de type plus conservateur. Quelques protéines cellulaires possédant des signaux à base de tyrosine ont démontré un phénotype intermédiaire de polarisation lors d'une substitution en phénylalanine, d'où l'intérêt d'examiner une telle substitution (Thomas and Roth, 1994). D'autres mutations qui entraînent la substitution de la tyrosine 712 en alanine et en phénylalanine ont aussi été produites soient : Y712A, et Y712F. Comme nous le mentionnions dans la revue de littérature, les signaux de polarisation sont souvent impliqués dans un contexte de tour Béta. C'est pourquoi nous avons décidé de muter la proline 714 en alanine, P714A, afin de briser le tour beta et vérifier le rôle de cette structure dans le phénotype de polarisation (Collawn, et al., 1990, Trowbridge, et al., 1993).

Avant de regarder les résultats, il est aussi très important de se rappeler que le phénomène de distribution polarisée des molécules et structures cellulaires n'est pas unique aux cellules infectées mais se retrouve aussi de façon inhérente dans la cellule (Dougherty, et al., 1988, Dustin, et al., 1992). Lors de l'infection virale, le virus ne semble que prendre avantage de ce processus de polarisation qui est présent lors de l'activation des lymphocytes (Wilkinson, 1987, Wilkinson and Higgins, 1987) ou est nécessaire à la fonction et à la différenciation des cellules épithéliales. Le virus, lorsque relâché de manière polarisée dans les cellules épithéliales, se retrouve du côté basolatéral, et donc vers la circulation sanguine où se trouve les cellules cibles. Dans le cas des lymphocytes, le virus se retrouve au point de contact avec d'autres cellules lymphoïdes ou épithéliales ce qui pourrait bien lui permettre d'augmenter son efficacité de

transmission. Que ce soit au niveau des cellules épithéliales ou au niveau des lymphocytes, on croit de plus en plus que ce bourgeonnement polarisé puisse être un avantage marquant dans la dissémination du VIH. Différents virus peuvent probablement aussi utiliser ce phénomène de polarisation lymphocytaire, ou des processus semblables, pour leur dissémination. Par exemple, le HTLV, qui se transmet presque uniquement lors de contact cellule-cellule (Zacharopoulos, et al., 1992), a été remarqué au point de contact entre cellules lors de co-cultures de lymphocytes avec des cellules épithéliales (Bourinbaiar and Phillips, 1991, Pearce-Pratt, et al., 1994, Pearce-Pratt and Phillips, 1993, Phillips and Bourinbaiar, 1992). Le virus possède aussi un signal de polarisation dans les cellules épithéliales impliquant un motif à base de tyrosine (Lodge, et al., 1996).

Nous avons donc décidé, pour tenter de comprendre plus en détail le mécanisme de polarisation dans les lymphocytes, d'utiliser des lignées lymphocytaires chroniquement infectées avec différents virus VIH. Ces virus sont tous identiques, à l'exception des mutations décrites plus tôt au niveau des différents acides aminés tyrosines ou proline (acide aminé # 712, 768, 795, 802 pour les tyrosines ou # 714 pour la proline). De ces différents acides aminés, la tyrosine 712, du signal à base de tyrosine, a déjà été identifiée comme étant impliquée dans la polarisation pour les cellules épithéliales (Lodge, et al., 1996). Afin d'obtenir ces lignées lymphocytaires chroniquement infectées, nous avons décidé d'utiliser les cellules Jurkat-TA. Cette lignée cellulaire humaine CD4⁺ d'origine lymphoïde est transformée par le virus HTLV-1, et est très propice à la multiplication du VIH. Les différents ADN proviraux possédant ces différentes mutations sont introduits dans les cellules par transfection ce qui permet l'expression de toutes les protéines virales nécessaires à la multiplication du VIH. La cinétique de multiplication et de production de virus est mesurée par un essai enzymatique permettant de détecter la reverse transcriptase ainsi que par un test immunologique qui quantifie la protéine majeure de la capsid (la p24); ces deux tests de quantification sont effectués sur les surnageants des cellules. Avant l'établissement de lignées chroniquement infectées, plusieurs autres analyses sont effectuées lorsque la production

virale est à son maximum: 1) La quantité d'enveloppe à la surface des cellules est vérifiée par cytofluorométrie (FACS) (Figure 2), 2) On vérifie aussi la quantité et la nature des protéines virales dans les cellules et dans le surnageant contenant les virus relâchés des cellules.

Comme le démontre la figure 1 (Chapitre 2), la relâche maximale se produit au jour 12 pour la plupart des virus, tandis que pour certains autres on la retrouve plutôt au jour 18. Lors de l'établissement de la chronicité, la croissance cellulaire a été évaluée et apparaît très similaire pour les différentes lignées (figure 1). Pour chacune des lignées on observe d'abord une diminution drastique de la viabilité cellulaire lors du maximum de production virale; par la suite, chez les cellules chroniquement infectées capables de réguler de façon négative l'expression de CD4 et des protéines virales, on observe un rétablissement de la croissance exponentielle semblable à celle des cellules non-transfectées. L'utilisation de ces lignées chroniquement infectées permet donc d'éviter les problèmes d'interprétation dûs aux possibles différences dans les cinétiques de multiplication ou d'efficacité de transfection et permet d'induire de façon uniforme la production virale lorsque ces cellules sont traitées par des activateurs comme le PMA (Phorbol 12-myristylate 13-acetate) ou le PHA (Phytohémagglutinine). Ces deux produits sont connus comme inducteurs de transcription; dans le cas du PMA, on assiste à une induction rapide, tandis que le PHA cause pour sa part une réponse du même type mais plus lente et plus soutenue. Les lignées chroniquement infectées par le VIH sont formées de différents clones de cellules qui ont réussi à réguler de façon négative l'expression du récepteur CD4 ainsi que l'expression virale. Donc, lorsque la transcription est induite par des produits comme le PHA, on assiste à une production accrue de protéines virales et à une augmentation du bourgeonnement viral.

Suite à l'induction au PMA/PHA, la polarisation du bourgeonnement viral sur les différentes lignées chroniquement infectées peut être vérifiée par une technique d'immunofluorescence en double aveugle utilisant un anticorps dirigé contre la protéine majeure de la capsid, la p24. Lorsque la polarisation est présente, chez des lymphocytes

groupés ou même sous forme individuelle, on assiste à la concentration de la protéine majeure de la capsidie à un pôle du lymphocyte; au contraire, en absence de polarisation, on assiste à une répartition uniforme de la p24 sur toute la surface de la membrane interne des lymphocytes (figure 3b). Ces expériences ont démontré que les mêmes mutations connues comme pouvant affecter le bourgeonnement polarisé du VIH dans les cellules épithéliales, soit lorsque la tyrosine 712 est substituée pour un autre acide aminé, entraînent une absence de polarisation presque totale. Nous avons observé une absence de polarisation dans le cas des substitutions Y712S et Y712A, soit 18 % et 25 % respectivement, tandis que plus de 85 % des cellules lymphocytaires présentent un phénotype de bourgeonnement polarisé pour le virus de type sauvage. Cette même tyrosine 712, lorsque substituée en phénylalanine, semble produire un phénotype intermédiaire. Ceci n'est pas étonnant, puisqu'au niveau de différentes protéines cellulaires (Thomas and Roth, 1994), et même dans le cas du VIH (Lodge, et al., 1996), il a été démontré que la conservation du noyau aromatique permet une conservation partielle du phénotype de polarisation dans les cellules épithéliales. On a aussi pu observer que le provirus ayant une substitution au niveau de l'acide aminé proline 714 ne donnait aucune répllication virale. Cette absence de multiplication nous empêche malheureusement de tirer des conclusions concernant son rôle pour la polarisation dans les lymphocytes. Le mutant de substitution Y768S présente, pour sa part, un phénotype sauvage pour la polarisation ainsi que pour la multiplication virale.

Les autres substitutions dans les tyrosines plus distales de la queue intracytoplasmique de la gp41, soit les acides aminés 795 et 802, ne présentent aucun changement dans la polarisation. Ces deux dernières substitutions entraînent quand même un léger retard dans la multiplication virale (Figure 1). Nous avons utilisé la cytofluométrie pour vérifier que ces changements mineurs au niveau de la cinétique de multiplication virale, n'étaient pas dus à un effet sur la maturation des glycoprotéines. Pour ce faire, la quantité d'enveloppe virale à la surface des différentes lignées a été vérifiée au moment de la production maximale de virus dans le surnageant, ainsi que lors

de l'induction de lignées chroniquement infectées correspondantes. Cette expérience a été effectuée l'aide d'un anticorps provenant de sérum de patient séropositif. Étant donné que les cellules sont non-fixées, les antigènes disponibles à cet anticorps sont ceux de l'enveloppe exprimée à la surface. Cet anticorps devient donc un anticorps polyclonal efficace pour la détection d'enveloppe. On peut remarquer, dans la figure 2, des niveaux d'enveloppe exposée à la surface semblables et même supérieurs au type sauvage pour toutes les substitutions examinées.

Nous avons par la suite voulu vérifier si la présence de la glycoprotéine d'enveloppe virale est essentielle à la polarisation dans les lymphocytes. Bien qu'il soit impossible d'obtenir une multiplication virale sans protéine d'enveloppe, ces glycoprotéines peuvent toutefois être incorporées à la particule virale de façon transitoire lors de co-expression à partir d'un second plasmide. Pour ce faire, nous transfectons les deux plasmides, expresseur d'enveloppe et construction provirale sans enveloppe, dans des cellules de singe (cellules COS), qui ne permettent pas la réinfection par le virus VIH. Ces cellules produisent l'antigène T du virus SV40 qui permet la réplication à haut niveau des deux plasmides possédant l'origine de réplication appropriée. Les virus sortant de ces cellules COS possèdent une enveloppe virale qu'ils ont incorporée en trans, et qui leur permet d'infecter les cellules Jurkat-TA. Cependant, le génome infectant ne code pas pour la glycoprotéine et les virus bourgeonnant de ces cellules infectées en seront donc dépourvus. Suite à la vérification de ce contrôle, nous n'avons obtenu qu'un faible pourcentage des cellules démontrant une polarisation du bourgeonnement viral (Figure 4). Ceci démontre que le signal de polarisation du bourgeonnement viral dans les lymphocytes réside principalement au niveau de l'enveloppe du VIH, tel que déjà démontré dans le cas du signal de polarisation pour les cellules épithéliales (Lodge, et al., 1996).

À ce moment nous avons uniquement utilisé la protéine majeure de la capsid (la p24) pour détecter le bourgeonnement viral sans nécessairement regarder au niveau des particules virales elles-mêmes. Suite à ces travaux en immunofluorescence, nous avons

donc cru bon de vérifier par microscopie électronique si l'on pouvait aussi remarquer le changement de répartition des particules virales lors du bourgeonnement de certains mutants. Lors de cette caractérisation, étant donné le grand nombre d'échantillons, nous nous sommes concentrés sur une substitution qui affecte la polarisation en immunofluorescence (Y712S), une substitution qui n'a aucun effet (Y768S), ainsi que le virus de type sauvage. Comme le démontre la figure 5b, on peut aussi observer le bourgeonnement viral sur toute la surface des cellules Jurkat-TA ayant été transfectées par le provirus avec une substitution Y712S, tandis que l'on observe une polarisation des virions au niveau du pseudopode chez les lignées transfectées avec le plasmide proviral de type sauvage (figure 5a) ou substitution Y768S. Nous avons aussi observé le même phénomène de bourgeonnement polarisé chez les cellules isolées ou multinucléées (syncytium).

Suite à ces résultats d'immunofluorescence et de microscopie électronique, la prochaine étape logique serait de procéder à une étude plus détaillée de la co-localisation avec le cytosquelette. Il avait déjà été rapporté que le précurseur polyprotéique de Gag était possiblement associée avec le cytosquelette, plus précisément l'actine (Rey, et al., 1996); ce phénomène de co-localisation fut aussi rapportée avec la myosine. Dans ces expériences, il a été rapporté que l'actine est spécialement abondante au site de bourgeonnement du VIH, mais elle se retrouve également sur toute la périphérie du lymphocyte (Sasaki, et al., 1995). L'équipe du Dr. Phillips démontre, pour sa part, que l'actine se retrouve co-localisée avec le VIH lorsque les lymphocytes sont traités à la colchicine, et qu'elle se retrouve aussi co-localisée sans aucun traitement dans les monocytes infectés (Pearce-Pratt, et al., 1994, Perotti, et al., 1996). Malgré ces quelques différences observées par différents groupes au niveau de l'association VIH-cytosquelette, nous pouvons remarquer plusieurs exemples qui sont en accord avec un rôle de certain éléments du cytosquelette dans la relâche des virus. Par exemple, 1) des études morphologiques ont été faites, dans lesquelles une association très étroite a été remarquée entre des microfilaments et le bourgeonnement (Farquhar and Plade, 1963,

Rodriguez-Boulan and Powell, 1992); 2) des études biochimiques dans lesquelles l'actine, composante protéique des microfilaments, a été identifiée comme composante interne de plusieurs virus enveloppés (Bray, et al., 1994, Damsky, et al., 1977, Griffin and Compans, 1979, Moyer, et al., 1990, Murti, et al., 1985, Naito and Matsumoto, 1978); 3) d'autres études dans lesquels des drogues qui perturbent le cytosquelette, inhibent aussi la relâche ou la polarisation du bourgeonnement des virus enveloppés (Mellman, et al., 1993, Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). L'une des protéines soupçonnée de jouer un rôle dans le phénomène de bourgeonnement viral est l'actine. L'actine contrôle le mouvement de la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de la rougeole à la surface cellulaire (Ehrnst and Sundqvist, 1976, Ehrnst and Sundqvist, 1975) et semble aussi se distribuer dans la région de contact entre les cellules cytotoxiques et leurs cibles (Carpén, et al., 1983, Ryser, et al., 1982). À l'aide d'un inhibiteur comme la wortmannine, qui est plus spécifique que la plupart des autres inhibiteurs et qui agit en bloquant l'addition d'ATP sur la chaîne légère de la myosine, un rôle probable de l'interaction myosine-actine dans le bourgeonnement du VIH-1 a été démontré (Sasaki, et al., 1995). Pour différents virus, il a été suggéré que l'actine et la myosine puissent agir dans le processus de bourgeonnement viral; dans d'autre cas un rôle de la myosine a uniquement pu être démontré (Sasaki, et al., 1995). Ces études utilisent souvent divers inhibiteurs du cytosquelette; malheureusement, les études qui utilisent ces inhibiteurs de cytosquelettes ne sont pas sans équivoque. Par exemple, dans le cas des cytochalasines, ces drogues sont aussi connues pour leur inhibition de la glycosylation des protéines virales, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Des études plus détaillées utilisant des systèmes bien connus pour la caractérisation des interactions protéine-protéine, comme par exemple le système GST ou le système double-hybride, pourrait permettre de mieux comprendre le lien réel entre la polarisation et le cytosquelette. L'utilisation de ces types de système avec des signaux à bases de tyrosines a déjà mis en évidence des protéines associées aux phénomènes d'endocytose (Ohno, et al., 1995).

L'identification des signaux de polarisation et de la relation avec le cytosquelette prend un intérêt particulier dans l'optique de transmission du virus des lymphocytes vers d'autres types cellulaires. Il serait intéressant de voir si ces mutations qui affectent la répartition du virus à la surface des lymphocytes peuvent aussi affecter son efficacité pour la transmission aux cellules épithéliales. La transmission cellule-cellule a déjà été démontrée comme étant au moins 1000 fois plus efficace que celle des virions libres, donc elle représente le mode de transmission le plus efficace du VIH (Sato, et al., 1992). La possibilité d'utiliser des cellules dérivées de l'épithélium intestinal comme modèle pour la transmission du virus par voie anale (Phillips and Bourinbaiar, 1992), des cellules épithéliales dérivées du placenta humain pour la transmission transplacentale (Phillips, et al., 1992), et des cellules dérivées du cervix humain pour la transmission hétérosexuelle est très intéressante (Tan, et al., 1993). Il est aussi possible d'utiliser plusieurs types cellulaires au niveau du vecteur de transmission, comme des monocytes qui peuvent être chroniquement infectés avec le VIH. Pour simuler la première étape de l'infection, qui pourrait se produire lors de la transmission vers l'épithélium génital ou gastrointestinal, on pourrait ajouter une suspension de cellules lymphocytaires ou mononucléaires à une monocouche de cellules épithéliales et les laisser en co-culture pour plusieurs heures. Avant d'ajouter ces cellules T chroniquement infectées, on peut les traiter à la mytomycine C, ce qui les tue en moins de 2 jours en les bloquant en phase S de leur cycle cellulaire. La monocouche est laissée en culture pour plusieurs semaines, en prenant bien soin de laver les cellules non-adhérées. Par la suite, après 6-7 jours, on mesure la quantité de l'antigène p24 dans le surnageant. En parallèle, on peut faire l'infection des cellules épithéliales par des virions libres produits des cellules chroniquement infectées (induites au PMA) ou par des virions produits transitoirement par transfection de cellules COS. On regarde par la suite si la tyrosine 712 affecte la transmission aux cellules épithéliales, en plus de la répartition du virus à la surface des lymphocytes.

Plusieurs autres expériences pourraient nous permettre de vérifier le rôle possible de la polarisation dans la transmission du VIH *in vivo*. La caractérisation du virus présent lors de la primo-infection nous donne de l'information très importante sur le type de virus que l'on retrouve lors de la transmission sexuelle. Ces virus sont très homogènes, même si l'ensemble des virus produits par l'individu qui transmet l'infection est hétérogène (Zhu, et al., 1993). Les résultats sont semblables lors de la transmission de mère à enfant (Wolinsky, et al., 1992). Les individus nouvellement infectés semblent principalement infectés par une sous-population de virus qui ne produisent pas de syncytiums *in vitro*, et qui possèdent un tropisme pour les macrophages (Zhu, et al., 1993). Ces découvertes semblent démontrer que l'on assiste à une sélection en forme d'entonnoir lors de la transmission sexuelle à cause de l'efficacité de l'immunité mucoale (Zhu, et al., 1993). C'est à dire que même si plusieurs souches ou isolats viraux sont présents chez la personne transmettant le virus lors de la transmission sexuelle, seuls quelques isolats ont la capacité de déjouer le système immunitaire et d'infecter les cellules cibles. Une des expériences que nous proposons est de réintroduire les différentes mutations qui affectent la polarisation dans une souche virale ADA. Cette souche possède un tropisme pour les cellules de type macrophages. Suite à la construction de ces différents plasmides proviraux, le virus produit nous permettra de déterminer si le ciblage du bourgeonnement est aussi important chez les monocytes et d'examiner le rôle possible de cette polarisation *in vivo*.

Comme le démontre les résultats présentés dans ce mémoire de maîtrise, il y a un lien entre les signaux de polarisation que l'on retrouve dans différents types cellulaires. On a pu démontrer par immunofluorescence et par microscopie électronique que le signal de bourgeonnement polarisé, précédemment identifié chez les cellules épithéliales, est aussi un signal dans le cas de la polarisation du bourgeonnement du VIH dans les lymphocytes. Ce signal pour les lymphocytes ainsi que pour les cellules épithéliales réside dans la queue intracytoplasmique de la protéine transmembranaire (la gp41) de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. Une étude détaillée du ciblage de la protéine

d'enveloppe dans les lymphocytes et de son implication dans la transmission aux cellules épithéliales pourrait mener à une meilleure compréhension de l'importance du phénomène dans la multiplication virale et la pathogénèse. Ce mécanisme de ciblage pourrait possiblement devenir une nouvelle cible thérapeutique contre l'infection par le VIH.

Annexe sur les cellules épithéliales:

Certains symptômes rénaux et intestinaux, observés lors du développement du SIDA, pourraient être associés à la destruction du tissu épithélial par le VIH-1 (Moyer, et al., 1990, Nelson, et al., 1988). Dans le cadre d'études précédentes effectuées par notre laboratoire, il a été tenté d'établir des lignées de cellules épithéliales MDCK exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe. Cependant, à cause d'une toxicité évidente lors de l'expression constitutive de l'enveloppe virale, nous avons du recourir à d'autres moyens pour obtenir cette expression de l'enveloppe. Notre intention initiale pour mon projet de recherche était justement de générer des lignées épithéliales MDCK dans lesquelles l'expression de l'enveloppe du VIH-1 serait sous le contrôle d'un promoteur inductible (Gossen and Bujard, 1992). Le système inductible choisi pour ces études devait permettre l'induction de l'expression de l'enveloppe lorsque nécessaire, mais aussi garder l'expression à un minimum en absence d'induction, évitant ainsi la toxicité. Pour obtenir une lignée cellulaire MDCK qui exprimait l'enveloppe du VIH sous forme inductible, nous avons initialement transfecté la lignée parentale MDCK avec le plasmide qui exprime un transactivateur chimérique composé du répresseur tétracycline fusionné à la partie C-terminale du domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus de l'herpes; le plasmide étant nommé pREP4-tTA (Pignac-Kobinger, et al., 1996). La procédure de sélection des clones est décrite à la figure 9. En résumé, suite à cette transfection, nous sélectionnons pour l'expression du gène de résistance à l'hygromycine en ajoutant 250 µg/ml d'hygromycine B. Douze clones ont été isolés et vérifiés pour l'expression du transactivateur et le meilleur clone cellulaire (#12) a été conservé pour la suite de l'étude (Voir figure 9). Ces clones ont été vérifiés pour l'expression du transactivateur par transfection transitoire avec un plasmide identique à celui qui sera utilisé pour contrôler l'expression de l'enveloppe, mais qui possède le gène rapporteur CAT codant pour l'enzyme chloramphénicol acetyl transferase. Cet enzyme est dosé dans les différents clones cellulaires en présence et en absence de tétracycline, et le clone

#12 nous a démontré la meilleure induction en absence de tétracycline, alors qu'en présence de cet antibiotique l'activité CAT était à peine détectable. Par la suite, nous avons cloné un fragment d'ADN codant pour les glycoprotéines d'enveloppe du VIH (gp160), en aval du promoteur minimal du cytomégalovirus (CMV) fusionné à des séquences de l'opérateur tétracycline, promoteur précédemment utilisé pour l'expression de CAT, ce qui génère le plasmide pREP9-Env (Figure 8). Le clone cellulaire #12 exprimant le transactivateur a été transfecté avec ce vecteur d'expression d'enveloppe et sélectionné pour l'expression du gène de résistance à la néomycine. Durant toute cette procédure, l'expression de l'enveloppe est inhibée par la présence continue de tétracycline. Avant d'entreprendre la sélection de plusieurs clones exprimant l'enveloppe, nous avons vérifié si le plasmide pREP9-Env exprimait bien la protéine de l'enveloppe lors d'expériences d'expression transitoire. On a pu constater que la construction plasmidique était adéquate, puisqu'en présence de tétracycline aucune cellule transfectée n'était positive alors qu'en absence de tétracycline plusieurs cellules exprimaient l'enveloppe détectable par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la gp120 (résultats non-présentés). On a donc pu passer à la prochaine étape qui est de sélectionner des clones positifs pour l'expression de l'enveloppe du VIH. Suite à la sélection de plusieurs clones nous avons tenté de vérifier l'expression de la protéine au niveau intracellulaire. Malheureusement, aucune expression n'a pu être détectée par immunoprécipitation, et seule une expression extrêmement faible a pu être détectée par une technique de cytofluorométrie. Étant donné qu'il est nécessaire d'avoir une expression assez élevée pour faire plusieurs des études que nous avons planifiées, il fallait trouver des solutions. À peu près au même moment, deux articles furent publiés se rapportant au système inductible régulé par la tétracycline (Gossen and Bujard, 1995, Shockett, et al., 1995). Le premier article décrivait que l'expression du transactivateur était très toxique chez plusieurs lignées cellulaires, dont une lignée d'origine rénale; le contrôle de l'expression du gène d'intérêt devenait ainsi presque impossible.

Nous avons effectivement pu vérifier la toxicité du transactivateur dans la lignée

MDCK, puisque l'on peut remarquer un retard très prononcé de la croissance cellulaire après le 9 ième jour de croissance chez la lignée exprimant le transactivateur (résultats non présentés). Le deuxième article décrivait que ce phénomène de toxicité pouvait être évité en utilisant un promoteur inductible pour l'expression du transactivateur lui-même. Ce système prend avantage de l'expression légère du promoteur minimal même en présence de tétracycline, ce qui cause une boucle qui induit l'expression du gène d'intérêt lorsque la tétracycline est retirée du milieu. Nous avons donc construit un plasmide qui exprime le transactivateur de façon inductible et nous avons sélectionné plusieurs clones de cellules MDCK pour l'expression de ce transactivateur auto-régulable.

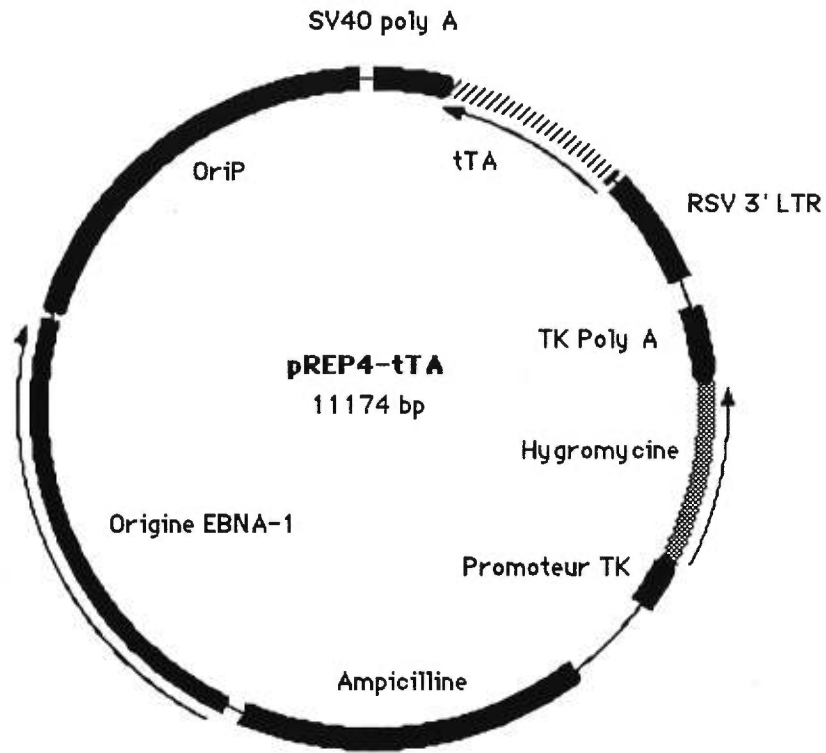
À ce jour, la dernière expérience que nous avons faite permet de vérifier le potentiel du système inductible par un test biologique d'infection. Pour ce faire, nous transfectons un plasmide proviral non-infectieux qui possède le gène rapporteur CAT au lieu du gène Nef. Le gène Nef est non-essentiel en culture cellulaire, nous permettant donc de le substituer par un gène rapporteur comme le gène CAT. Ce provirus CAT porte aussi une mutation ponctuelle et un changement de cadre de lecture qui nous assure que l'enveloppe virale portée par ce plasmide ne peut être exprimée. Ce provirus conserve quand même la capacité de produire toutes les autres protéines virales nécessaires à l'assemblage d'une particule virale. Donc, lorsque l'enveloppe virale est fournie par un autre plasmide en trans, ou incorporée au virus par transfection d'une lignée qui exprime déjà l'enveloppe virale, le virus produit possède la capacité de transférer le gène CAT à une cellule cible. Cette activité CAT peut, par la suite, être dosée très facilement, d'où l'avantage de ce système.

Dans cette dernière expérience nous avons vérifié si les faibles quantités d'enveloppe exprimées par nos lignées MDCK étaient suffisantes pour rétablir l'infectivité au provirus CAT. Suite à la transfection de ce provirus dans la lignée MDCK induite pour la production de l'enveloppe, on a pu détecter facilement la présence de virus capable de transférer l'activité CAT lors de l'infection de cellules Jurkat-TA. Cette expression de l'enveloppe est aussi inductible, puisqu'en présence de tétracycline seule

une très faible activité CAT a pu être détectée. Dans la même série d'expérience, on a pu aussi vérifier le nouveau clone cellulaire exprimant le transactivateur de façon auto-régulable. Cette lignée a été co-transfectée avec le plasmide possédant l'enveloppe sous contrôle du promoteur inductible, soit le pREP9- Env, et le provirus CAT. Comme le démontre la figure 10, l'expression de l'enveloppe peut aussi être régulé dans ce contexte de co-transfection. Même si ces dernière expériences nous donnent de l'espoir pour l'utilisation du système inductible à la tétracycline, il ne faut pas oublier de garder en tête les faiblesses de ce système pour l'expression d'un gène aussi toxique que l'enveloppe du VIH au sein de lignées épithéliales où la réponse ne semble pas non plus dans un contexte idéal.

FIG.8 Plasmides utilisés pour la création de lignées permanentes exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 dans les cellules épithéliales MDCK. A) plasmide exprimant le transactivateur (tTA), B) Plasmide exprimant l'enveloppe du VIH sous promoteur inductible à la tétracycline.

A



B

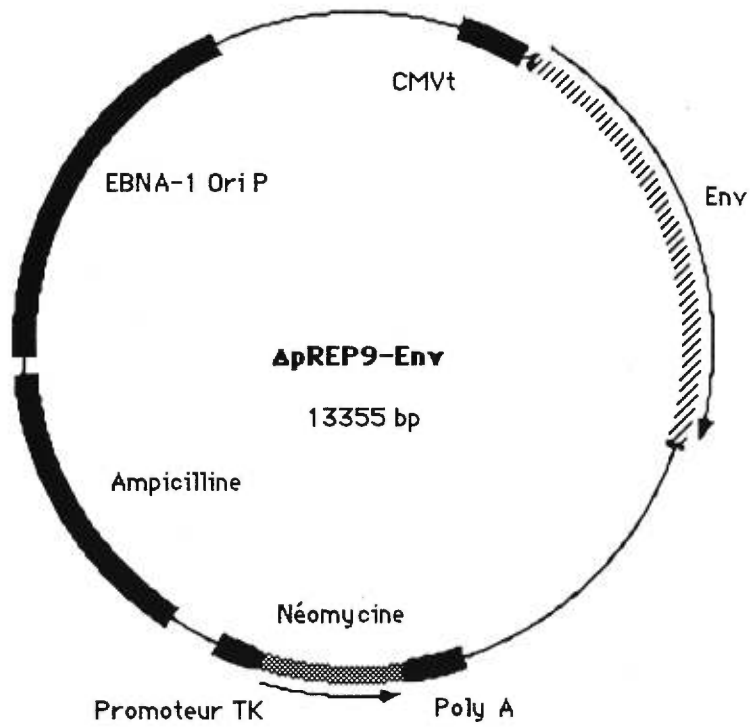


FIG.9 Représentation schématique de la sélection des lignées permanentes exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1.

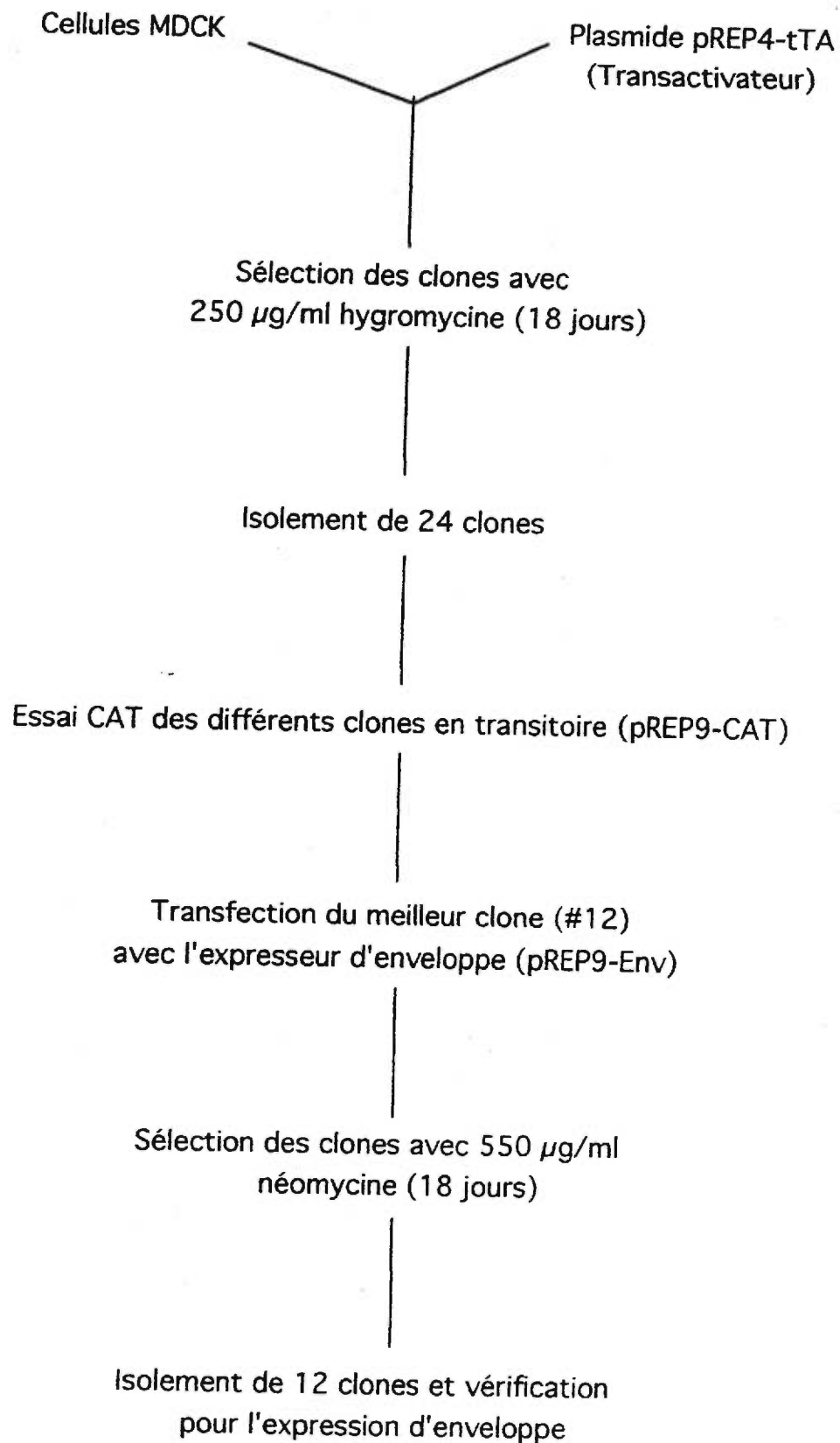
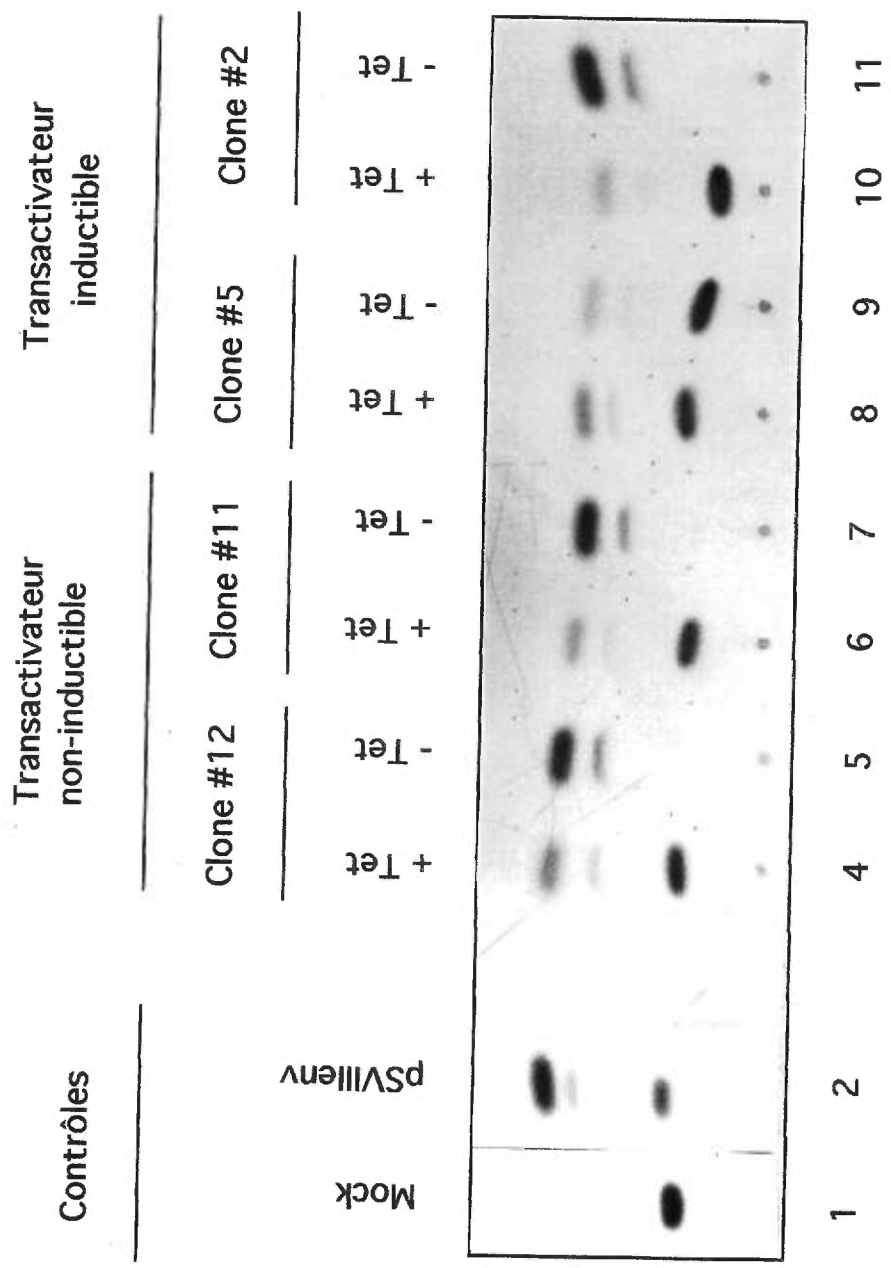


FIG.10 Vérification de l'incorporation d'enveloppe en trans (par transfection) dans des lignées induites (- Tet) et non-induites (+ Tet) pour l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe (gp160). Ces lignées expriment le transactivateur de manière non-inductible (clones #11 et #12) et inductibles (clones #2 et #5). Le pSVIIIEnv est un contrôle positif de l'expression d'enveloppe et le Mock sont des cellules MDCK infectées par le virus CAT seul. Pour toutes ces lignées cellulaires l'efficacité d'incorporation de l'enveloppe est vérifié en utilisant le surnageant 48h post-transfection pour infecter des cellules Jurkat-TA. L'efficacité d'infection est proportionnel à l'activité CAT détectée dans les cellules Jurkat-TA, donc à l'incorporation d'enveloppe.



CONCLUSION

L'importance des cellules lymphocytaires dans la dissémination et la pathogénèse du VIH a été démontrée par de nombreux auteurs. La polarisation de la relâche du virus au niveau des lymphocytes contribue sans doute à maximiser la propagation du virus et à favoriser la transmission intercellulaire. De plus, cette polarisation du VIH dans les lymphocytes est d'autant plus importante lors de la transmission du virus à partir de cellules infectées par le VIH, cellules qui se retrouvent dans les sécrétions, vers les cellules épithéliales des muqueuses uro-génitales. Donc, notre observation que le signal de polarisation implique le même motif reconnu dans les cellules épithéliales peut avoir une importance dans la compréhension du mécanisme de transmission sexuelle et pour l'utilisation de nouvelles thérapies.

Les travaux de ce mémoire ont permis d'établir la nature du signal de polarisation dans des cellules idéales comme modèle de cellules lymphoïdes, les lymphocytes. Ces observations peuvent très probablement être étendues aux cellules mononucléaires et macrophages, beaucoup plus abondantes dans les sécrétions uro-génitales. Une interaction directe ou indirecte entre la glycoprotéine d'enveloppe et un élément du cytosquelette semble être responsable de cette polarisation, et cette interaction est dépendante du signal de polarisation présent dans la tyrosine proximale de la glycoprotéine d'enveloppe de VIH-1.

Des études plus approfondies permettant de mieux comprendre le mécanisme de la transmission sexuelle, plus précisément le rôle de cette polarisation pour permettre au VIH de pénétrer la surface des muqueuses, demeurent très importantes pour la compréhension de la pathogénèse du VIH et le développement de vaccins efficaces.

CHAPITRE 4

BIBLIOGRAPHIE ET REMERCIEMENTS

BIBLIOGRAPHIE

- Acevedo, A., M. A. del Pozo, A. G. Arroyo, P. Sanchez-Mateos, R. Gonzalez-Amaro, and F. Sanchez-Madrid.** 1993. Distribution of ICAM-3-bearing cells in normal human tissues. Expression of a novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. *American Journal of Pathology*. **143**:774-83.
- Aiken, C., J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, and D. Trono.** 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. **76**:853-64.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson.** 1990. *Biologie moléculaire de la cellule*, 2ième Édition ed. Flammarion-Médecine/Sciences, Paris.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. **272**:1955-8.
- Arroyo, A. G., M. R. Campanero, P. Sanchez-Mateos, J. M. Zapata, M. A. Ursa, M. A. del Pozo, and F. Sanchez-Madrid.** 1994. Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *Journal of Cell Biology*. **126**:1277-86.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. d. Sowder, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines [see comments]. *Science*. **258**:1935-8.
- Arya, S. K., C. Guo, S. F. Josephs, and F. Wong-Staal.** 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science*. **229**:69-73.
- Bahraoui, E., B. Clerget-Raslain, C. Granier, J. Van Rietschoten, J. M. Sabatier, C. Labbe-Julie, B. Ceard, H. Rochat, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1989. Accessibility of the highly conserved amino- and carboxy-terminal regions from HIV-1 external envelope glycoproteins. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **5**:451-63.
- Balotta, C., P. Lusso, R. Crowley, R. C. Gallo, and G. Franchini.** 1993. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides targeted to the vpr gene inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *Journal of Virology*. **67**:4409-14.
- Bandeira, A., T. Mota-Santos, S. Itohara, S. Degermann, C. Heusser, S. Tonegawa, and A. Coutinho.** 1990. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *Journal of Experimental Medicine*. **172**:239-44.
- Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. T. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. F. LeGrice, and J. L. Darlix.** 1989. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO Journal*. **8**:3279-85.

Barré-Sinoussi, F., J.C., Chermann, F., Rey, M.T., Nugeyre, S., Chamaret, J., Gruest, C., Dautet, C., Axler-Blin, F., Brun-Vezinet, C., Rouzioux, W., Rosenbaum and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. **225**:868-71.

Bhat, S., S. L. Spitalnik, F. Gonzalez-Scarano, and D. H. Silberberg. 1991. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**:7131-4.

Bourinbaiar, A. S., and D. M. Phillips. 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. **4**:56-63.

Bray, M., S. Prasad, J. W. Dubay, E. Hunter, K. T. Jeang, D. Rekosh, and M. L. Hammarskjold. 1994. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**:1256-60.

Brewer, C. B., and M. G. Roth. 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Cell Biology*. **114**:413-421.

Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**:6580-4.

Callebaut, C., B. Krust, E. Jacotot, and A. G. Hovanessian. 1993. T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells [see comments]. *Science*. **262**:2045-50.

Cameron, P. U., P. S. Freudenthal, J. M. Barker, S. Gezelter, K. Inaba, and R. M. Steinman. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells [published erratum appears in *Science* 1992 Sep;257(5078):1848]. *Science*. **257**:383-7.

Campanero, M. R., M. A. del Pozo, A. G. Arroyo, P. Sanchez-Mateos, T. Hernandez-Caselles, A. Craig, R. Pulido, and F. Sanchez-Madrid. 1993. ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *Journal of Cell Biology*. **123**:1007-16.

Campanero, M. R., P. Sanchez-Mateos, M. A. del Pozo, and F. Sanchez-Madrid. 1994. ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *Journal of Cell Biology*. **127**:867-78.

Capon, D. J., and R. H. Ward. 1991. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annual Review of Immunology*. **9**:649-78.

Carlier, M. F. 1991. Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. **3**:12-7.

- Carne, C. A., R. S. Tedder, A. Smith, S. Sutherland, S. G. Elkington, H. M. Daly, F. E. Preston, and J. Craske.** 1985. Acute encephalopathy coincident with seroconversion for anti-HTLV-III. *Lancet*. **2**:1206-8.
- Carpén, O., I. Virtanen, V. P. Lehto, and E. Saksela.** 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *Journal of Immunology*. **131**:2695.
- Cepek, K. L., C. M. Parker, J. L. Madara, and M. B. Brenner.** 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *Journal of Immunology*. **150**:3459-70.
- Cerf-Bensussan, N., A. Jarry, N. Brousse, B. Lisowska-Groszpiere, D. Guy-Grand, and C. Griscelli.** 1987. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *European Journal of Immunology*. **17**:1279-85.
- Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, P. Tiollais, and P. Sonigo.** 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature*. **328**:543-7.
- Chesebro, B., R. Buller, J. Portis, and K. Wehrly.** 1990. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *Journal of Virology*. **64**:215-21.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. **85**:1135-48.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. **233**:343-6.
- Cochrane, A. W., K. S. Jones, S. Beidas, P. J. Dillon, A. M. Skalka, and C. A. Rosen.** 1991. Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *Journal of Virology*. **65**:5305-13.
- Coffin, J. M.** 1992. Structure and classification of retroviruses, p. 19-50. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *Journal of Virology*. **64**:3097-9.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. **334**:532-4.
- Collawn, J. F., M. Stangel, L. A. Kuhn, V. Esekogwu, S. Q. Jing, I. S. Trowbridge, and J. A. Tainer.** 1990. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*. **63**:1061-72.

Compans, R. W., and R. V. Srinivas. 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. **170**:141-81.

Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau. 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*. **206**:935-44.

Cooper, D. A., J. Gold, P. Maclean, B. Donovan, R. Finlayson, T. G. Barnes, H. M. Michelmore, P. Brooke, and R. Penny. 1985. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*. **1**:537-40.

Cullen, B. R. 1991. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB Journal*. **5**:2361-68.

Daeffler, S., M. E. Klotman, and F. Wong-Staal. 1990. Trans-Activating Rev Protein of Human Immunodeficiency Virus 1 Interacts Directly and Specifically with its Target RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**:4571-75.

Dagermont, C., A. Le Bivic, S. Rothemberger, B. Iacopetta, and L. C. Kuhn. 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO Journal*. **12**:1713-21.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. **312**:763-7.

Damsky, C. H., J. B. Sheffield, G. P. Tuszynski, and L. Warren. 1977. Is there a role for actin in virus budding? *Journal of Cell Biology*. **75**:593-605.

de Fougerolles, A. R., X. Qin, and T. A. Springer. 1994. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *Journal of Experimental Medicine*. **179**:619-29.

del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *Journal of Cell Biology*. **131**:495-508.

Deminie, C. A., and M. Emerman. 1993. Incorporation of human immunodeficiency virus type 1 gag proteins into murine leukemia virus virions. *Journal of Virology*. **67**:6499-6506.

Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature*. **381**:661-6.

Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms. 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**:1149-58.

- Dotti, C. G., J. Kartenbeck, and K. Simons.** 1993. Polarized distribution of the viral glycoproteins of vesicular stomatitis, fowl plague and Semliki Forest viruses in hippocampal neurons in culture: a light and electron microscopy study. *Brain Research.* **610**:141-7.
- Dotti, C. G., and K. Simons.** 1990. Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell.* **62**:63-72.
- Dougherty, G. J., S. Murdoch, and N. Hogg.** 1988. The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *European Journal of Immunology.* **18**:35-9.
- Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature.* **381**:667-73.
- Dustin, M. L., O. Carpen, and T. A. Springer.** 1992. Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *Journal of Immunology.* **148**:2654-63.
- Dustin, M. L., and T. A. Springer.** 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annual Review of Immunology.* **9**:27-66.
- Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Journal of Virology.* **65**:2047-55.
- Ehrnst, A., and K. G. Sundqvist.** 1976. The mechanisms of appearance of viral glycoproteins at the cell surface membrane. *Experimental Cell Biology.* **44**:198-225.
- Ehrnst, A., and K. G. Sundqvist.** 1975. Polar appearance and nonligand induced spreading of measles virus hemagglutinin at the surface of chronically infected cells. *Cell.* **5**:351-9.
- Eilers, U., J. Klumperman, and H. P. Hauri.** 1989. Nocodazole, a microtubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2). *Journal of Cell Biology.* **108**:13-22.
- Ekblom, P., D. Vestweber, and R. Kemler.** 1986. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annual Review of Cell Biology.* **2**:27-47.
- Ellerbrok, H., L. D'Auriol, C. Vaquero, and M. Sitbon.** 1992. Functional tolerance of the human immunodeficiency virus type 1 envelope signal peptide to mutations in the amino-terminal and hydrophobic regions. *Journal of Virology.* **66**:5114-8.
- Evans, L. A., T. M. McHugh, D. P. Stites, and J. A. Levy.** 1987. Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells. *Journal of Immunology.* **138**:3415-8.
- Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. C. Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani.** 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *Aids.* **9**:329-35.

- Fan, L., and K. Peden.** 1992. Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1. *Virology*. **190**:19-29.
- Farquhar, M. G., and G. E. Plade.** 1963. Junctional complexes in various epithelia. *Journal of Cell Biology*. **17**:375-412.
- Faure, E., N. Yahi, A. Zider, C. Cavard, S. Champion, and J. Fantini.** 1994. Physical contact with lymphocytes is required for reactivation of dormant HIV-1 in colonic epithelial cells: involvement of the HIV-1 LTR. *Virus Research*. **34**:1-13.
- Fawcett, J., C. L. Holness, L. A. Needham, H. Turley, K. C. Gatter, D. Y. Mason, and D. L. Simmons.** 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature*. **360**:481-4.
- Feinberg, M. B., R. F. Jarrett, A. Aldovini, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*. **46**:807-17.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science*. **272**:872-7.
- Fennie, C., and L. A. Lasky.** 1989. Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of Virology*. **63**:639-46.
- Fisher, A. G., B. Ensoli, L. Ivanoff, M. Chamberlain, S. Petteway, L. Ratner, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1987. The *src* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science*. **237**:888-93.
- 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. *Journal of Virology*. **69**:1984-9.
- Fukasawa, M., T. Miura, A. Hasegawa, S. Morikawa, H. Tsujimoto, K. Miki, T. Kitamura, and M. Hayami.** 1988. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature*. **333**:457-61.
- Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, and J. Sodroski.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *Journal of Virology*. **66**:6489-95.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of Virology*. **66**:3306-15.
- Gallo, R. C., S.Z., Salahuddin, M., Popovic, G., Shearer, M., Kaplan, Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, and Markham, P.D.** 1984. Frequent detection and isolation of a subgroup of human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) in the serum of Patients with AIDS. *Science*. **224**:500-3.
- Garrett, E. D., L. S. Tiley, and B. R. Cullen.** 1991. Rev activates expression

of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *Journal of Virology*. **65**:1653-7.

Gelderblom, H. R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function [editorial]. *Aids*. **5**:617-37.

Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. **59**:103-112.

Giuffre, R. M., D. R. Tovell, C. M. Kay, and D. L. Tyrrell. 1982. Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *Journal of Virology*. **42**:963-8.

Goncalves, J., P. Jallepalli, and D. H. Gabuzda. 1994. Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. **68**:704-12.

Gorelick, R. J., S. M. Nigida, Jr., J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur, L. E. Henderson, and A. Rein. 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *Journal of Virology*. **64**:3207-11.

Gossen, M., and H. Bujard. 1995. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques*. **19**:213-6; discussion 216-7.

Gossen, M., and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**:5547-51.

Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*. **305**:1425-31.

Gottlinger, H., J. Sodroski, and W. Haseltine. 1989. Role of Capsid Precursor Processing and Myristoylation in Morphogenesis and Infectivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**:5781-5785.

Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine. 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**:7381-5.

Griffin, J. A., and R. W. Compans. 1979. Effect of cytochalasin B on the maturation of enveloped viruses. *Journal of Experimental Medicine*. **150**:379-91.

Gumbiner, B., and K. Simons. 1987. The role of uvomorulin in the formation of epithelial occluding junctions. *Ciba Foundation Symposium*. **125**:168-86.

Gyorkey, F., J. G. Sinkovics, J. L. Melnick, and P. Gyorkey. 1984. Retroviruses in Kaposi-sarcoma cells in AIDS [letter]. *New England Journal of Medicine*. **311**:1183-4.

Haase, A. T. 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*. **322**:130-6.

- Harouse, J. M., S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, and F. Gonzalez-Scarano.** 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*. **253**:320-3.
- Harris, M., and K. Coates.** 1993. Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 nef gene product in vitro: a role for myristylation. *Journal of General Virology*. **74**:1581-9.
- Haseltine, W. A.** 1989. Development of antiviral drugs for the treatment of AIDS: strategies and prospects. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. **2**:311-34.
- Haseltine, W. A.** 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB Journal*. **5**:2349-60.
- Haston, W. S., J. M. Shields, and P. C. Wilkinson.** 1982. Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices. *Journal of Cell Biology*. **92**:747-52.
- Hattori, N., F. Michaels, K. Fargnoli, L. Marcon, R. C. Gallo, and G. Franchini.** 1990. The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**:8080-4.
- Heaphy, S., C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, and M. A. Skinner.** 1990. HIV regulator of virion expression (Rev) protein binds to a stem-loop structure located within the Env Response Element region. *Cell*. **60**:685-93.
- Heinlein, M., B. L. Epel, H. S. Padgett, and R. N. Beachy.** 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton [see comments]. *Science*. **270**:1983-5.
- Heise, C., S. Dandekar, P. Kumar, R. Duplantier, R. M. Donovan, and C. H. Halsted.** 1991. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology*. **100**:1521-7.
- Henderson, L. E., R. Sowder, T. D. Copeland, S. Oroszlan, L. O. Arthur, W. G. Robey, and P. J. Fischinger.** 1987. Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *Journal of Virology*. **61**:629-32.
- Hernandez-Caselles, T., G. Rubio, M. R. Campanero, M. A. del Pozo, M. Muro, F. Sanchez-Madrid, and P. Aparicio.** 1993. ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. **23**:2799-806.
- Hildreth, J. E., and R. J. Orentas.** 1989. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science*. **244**:1075-8.
- Hiller, G., C. Jungwirth, and K. Weber.** 1981. Fluorescence microscopical analysis of the life cycle of vaccinia virus in chick embryo fibroblasts. Virus-cytoskeleton interactions. *Experimental Cell Research*. **132**:81-7.
- Ho, D. D.** 1996. Viral counts count in HIV infection [see comments]. *Science*. **272**:1124-5.

- Ho, D. D., T. Moudgil, and M. Alam.** 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons [see comments]. *New England Journal of Medicine*. **321**:1621-5.
- Honing, S., and W. Hunziker.** 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-I) in MDCK cells. *Journal of Cell Biology*. **128**:321-32.
- Hopkins, C. R.** 1992. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter [see comments]. *Trends in Biochemical Sciences*. **17**:27-32.
- Howard, T. H., and C. O. Oresajo.** 1985. The kinetics of chemotactic peptide-induced change in F-actin content, F-actin distribution, and the shape of neutrophils. *Journal of Cell Biology*. **101**:1078-85.
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman.** 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell*. **66**:907-20.
- Huxley, H. E.** 1973. Muscular contraction and cell motility. *Nature*. **243**:445-9.
- Ilaria, G., J. L. Jacobs, B. Polsky, B. Koll, P. Baron, C. MacLow, D. Armstrong, and P. N. Schlegel.** 1992. Detection of HIV-1 DNA sequences in pre-ejaculatory fluid [letter] [see comments]. *Lancet*. **340**:1469.
- Jakobovitz, A., D. H. Smith, E. B. Jakobovitz, and D. J. Capon.** 1988. A discrete element 3' of Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) and HIV-1 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV trans-activator. *Molecular and Cellular Biology*. **8**:2555-61.
- Jasny, R. R.** 1993. Unanswered Questions, Editorial. *Science*. **260**:1219.
- Jones, K., J. Kadonaga, P. Luciw, and R. Tijan.** 1986. Activation of the AIDS Retrovirus Promoter by the Cellular Transcription factor SP-1. *Science*. **232**:755-9.
- Jowett, J. B., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen, and I. S. Chen.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of Virology*. **69**:6304-13.
- Juan, M., O. Vinas, M. R. Pino-Otin, L. Places, E. Martinez-Caceres, J. J. Barcelo, A. Miralles, R. Vilella, M. A. de la Fuente, J. Vives, et al.** 1994. CD50 (intercellular adhesion molecule 3) stimulation induces calcium mobilization and tyrosine phosphorylation through p59fyn and p56lck in Jurkat T cell line. *Journal of Experimental Medicine*. **179**:1747-56.
- Kao, S.-Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin.** 1987. Anti-Termination of Transcription Within the Long Terminal Repeat of HIV-1 by Tat Gene Product. *Nature*. **330**:489-93.
- Kasamatsu, H., W. Lin, J. Edens, and J. P. Revel.** 1983. Visualization of antigens attached to cytoskeletal framework in animal cells: colocalization of simian virus 40 Vp1 polypeptide and actin in TC7 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **80**:4339-43.

- Kato, H., M. Horikoshi, and R. G. Roeder.** 1991. Repression of HIV-1 transcription by a cellular protein. *Science*. **251**:1476-9.
- Kestler, H. W. d., D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers.** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*. **65**:651-62.
- Kieny, M. P.** 1990. Structure and regulation of the human AIDS virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. **3**:395-402.
- Kikukawa, R., Y. Koyanagi, S. Harada, N. Kobayashi, M. Hatanaka, and N. Yamamoto.** 1986. Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4. *Journal of Virology*. **57**:1159-62.
- Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. **312**:767-8.
- Klein, G., M. Langegger, R. Timpl, and P. Ekblom.** 1988. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell*. **55**:331-41.
- Kotler, D. P., S. Reka, A. Borcich, and W. J. Cronin.** 1991. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *American Journal of Pathology*. **139**:823-30.
- Kowalski, M., L. Bergeron, T. Dorfman, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1991. Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *Journal of Virology*. **65**:281-91.
- Kowalski, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W. C. Goh, E. Terwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. **237**:1351-5.
- Kucik, D. F., E. L. Elson, and M. P. Sheetz.** 1989. Forward transport of glycoproteins on leading lamellipodia in locomoting cells [see comments]. *Nature*. **340**:315-7.
- Landau, N. R., K. A. Page, and D. R. Littman.** 1991. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *Journal of Virology*. **65**:162-9.
- Langedijk, J. P., J. J. Schalken, M. Tersmette, J. G. Huisman, and R. H. Meloen.** 1990. Location of epitopes on the major core protein p24 of human immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*. **71**:2609-14.
- Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon.** 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. **50**:975-85.
- Laughlin, M. A., and R. J. Pomerantz.** 1994. Cellular latency in HIV-1 infection. *Clinical Laboratory Medicine*. **14**:239-55.

- Le, S. Y., M. H. Malim, B. R. Cullen, and J. V. Maizel.** 1990. A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency viruses. *Nucleic Acids Research*. **18**:1613-23.
- Lefrancois, L.** 1991. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa: curiouser and curiouser. *Seminars in Immunology*. **3**:99-108.
- Leibowitz, T., and P. Cupkie.** 1975. Salary survey results. *Dental Assistant*. **44**:29-39.
- 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. *Journal of Virology*. **67**:7238-45.
- Letourneur, F., and R. D. Klausner.** 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*. **69**:1143-57.
- Levy, J. A.** 1986. The multifaceted retrovirus. *Cancer Research*. **46**:5457-68.
- Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological Reviews*. **57**:183-289.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. **225**:840-2.
- Levy, J. A., W. Margaretten, and J. Nelson.** 1989. Detection of HIV in enterochromaffin cells in the rectal mucosa of an AIDS patient. *American Journal of Gastroenterology*. **84**:787-9.
- Li, Y., L. Luo, D. Y. Thomas, and C. Y. Kang.** 1994. Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology*. **204**:266-78.
- Li, Z., M. Glibowicka, C. Joensson, and C. M. Deber.** 1993. Conformational states of mutant M13 coat proteins are regulated by transmembrane residues. *Journal of Biological Chemistry*. **268**:4584-7.
- Liebowitz, D., and E. Kieff.** 1989. Epstein-Barr virus latent membrane protein: induction of B-cell activation antigens and membrane patch formation does not require vimentin. *Journal of Virology*. **63**:4051-4.
- Liebowitz, D., R. Kopan, E. Fuchs, J. Sample, and E. Kieff.** 1987. An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Molecular & Cellular Biology*. **7**:2299-308.
- Lodge, R., H. Göttlinger, D. Gabuzda, É. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *Journal of Virology*. **68**:4857-61.
- Lodge, R., J.-P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1996. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO Journal*. **16**:695-705.

- Lu, Y. C., N. Touzjian, M. Stenzel, T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Identification of Cis-Acting Repressive Sequences Within the Negative Regulatory Element of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*. **64**:5226-9.
- Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *Journal of Virology*. **67**:6542-50.
- Lusso, P., F. M. Veronese, B. Ensoli, G. Franchini, C. Jemma, S. E. DeRocco, V. S. Klyanaraman, and R. C. Gallo.** 1990. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science*. **247**:848-52.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. **47**:333-48.
- Maldarelli, F., H. Sato, E. Berthold, J. Orenstein, and M. A. Martin.** 1995. Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. **69**:6457-65.
- Mammano, F., E. Kondo, J. Sodroski, A. Bukovsky, and H. G. Gottlinger.** 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *Journal of Virology*. **69**:3824-30.
- Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New England Journal of Medicine*. **305**:1431-8.
- Mathijs, J. M., M. Hing, J. Grierson, D. E. Dwyer, C. Goldschmidt, D. A. Cooper, and A. L. Cunningham.** 1988. HIV infection of rectal mucosa [letter]. *Lancet*. **1**:1111.
- Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman.** 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*. **71**:741-53.
- Matter, K., and I. Mellman.** 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Current Opinion in Cell Biology*. **6**:545-54.
- McMillan, A., P. E. Bishop, D. Aw, and J. F. Peutherer.** 1989. Immunohistology of the skin rash associated with acute HIV infection. *Aids*. **3**:309-12.
- McNeill, H., M. Ozawa, R. Kemler, and W. J. Nelson.** 1990. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell*. **62**:309-16.
- Meerloo, T., H. K. Parmentier, A. D. Osterhaus, J. Goudsmit, and H. J. Schuurman.** 1992. Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells. An immunoelectron microscopic study. *Aids*. **6**:1105-16.
- Melki, R., Y. Gaudin, and D. Blondel.** 1994. Interaction between tubulin and the

viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology*. **202**:339-47.

Mellman, I., E. Yamamoto, J. A. Whitney, M. Kim, W. Hunziker, and K. Matter. 1993. Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *Journal of Cell Science - Supplement*. **17**:1-7.

Mermin, J. H., M. Holodniy, D. A. Katzenstein, and T. C. Merigan. 1991. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*. **164**:769-72.

Michaels, F. H., N. Hattori, R. C. Gallo, and G. Franchini. 1993. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vif protein is located in the cytoplasm of infected cells and its effect on viral replication is equivalent in HIV-2. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **9**:1025-30.

Miller, M. A., R. F. Garry, J. M. Jaynes, and R. C. Montelaro. 1991. A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **7**:511-9.

Miller, M. A., T. A. Mietzner, M. W. Cloyd, W. G. Robey, and R. C. Montelaro. 1993. Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **9**:1057-66.

Montagnier, L., J. Gruest, S. Chamaret, C. Dauguet, C. Axler, D. Guetard, M. T. Nugeyre, F. Barre-Sinoussi, J. C. Chermann, J. B. Brunet, et al. 1984. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science*. **225**:63-6.

Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti, and C. Okamoto. 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology*. **116**:577-83.

Moyer, M. P., R. I. Huot, A. Ramirez, Jr., S. Joe, M. S. Meltzer, and H. E. Gendelman. 1990. Infection of human gastrointestinal cells by HIV-1. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **6**:1409-15.

Moyer, S. A., S. C. Baker, and S. M. Horikami. 1990. Host cell proteins required for measles virus reproduction. *Journal of General Virology*. **71**:775-83.

Murti, K. G., M. Chen, and R. Goorha. 1985. Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. III. Role of microfilaments in virus release. *Virology*. **142**:317-25.

Nabel, G., and D. Baltimore. 1987. An inducible transcription factor activates expression of Human Immunodeficiency Virus in T cells. *Nature*. **326**:711-3.

Naito, S., and S. Matsumoto. 1978. Identification of cellular actin within the rabies virus. *Virology*. **91**:151-63.

Nelson, J. A., C. A. Wiley, C. Reynolds-Kohler, C. E. Reese, W. Margaretten, and J. A. Levy. 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet*. **1**:259-62.

Niederman, T. M., W. R. Hastings, S. Luria, J. C. Bandres, and L. Ratner. 1993. HIV-1 Nef protein inhibits the recruitment of AP-1 DNA-binding activity

in human T-cells. *Virology*. **194**:338-44.

Ogawa, K., R. Shibata, T. Kiyomasu, I. Higuchi, Y. Kishida, A. Ishimoto, and A. Adachi. 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *Journal of Virology*. **63**:4110-4.

Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*. **269**:1872-5.

Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annual Review of Immunology*. **9**:617-48.

Owens, R. J., and R. W. Compans. 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*. **63**:978-82.

Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans. 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**:3987-91.

Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*. **328**:327-35.

Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci. 1993. The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Seminars in Immunology*. **5**:157-63.

Pearce-Pratt, R., D. Malamud, and D. M. Phillips. 1994. Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. **68**:2898-905.

Pearce-Pratt, R., and D. M. Phillips. 1993. Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Biology of Reproduction*. **48**:431-45.

Perotti, M.-E., X. Tan, and D. M. Phillips. 1996. Directional budding of Human Immunodeficiency Virus from monocytes. *Journal of Virology*. **70**:5916-21.

Peterlin, B. M., M. Adams, A. Alonso, A. Baur, S. Ghosh, X. Lu, and L. Luo. 1993. Tat trans-activator, p. 75-100. *In* B. R. Cullen (ed.), *Human retroviruses*. IRL Press, Orford.

Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaiar. 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology*. **186**:261-73.

Phillips, D. M., R. Pearce-Pratt, X. Tan, and V. R. Zacharopoulos. 1992. Association of mycoplasma with HIV-1 and HTLV-I in human T lymphocytes. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **8**:1863-8.

Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, X. Tan, and R. Pearce-Pratt. 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends in Microbiology*. **2**:454-8.

- Pignac-Kobinger, G., J. P. Lalonde, and E. A. Cohen.** 1996. Enhancement of retroviral production from an encapsidation cell line expressing the Human immunodeficiency type 1 Vpu gene. *Gene Therapy*, In press.
- Pollard, T. D., and R. R. Weihing.** 1974. Actin and myosin and cell movement. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. **2**:1-65.
- Prill, V., L. Lehmann, K. von Figura, and C. Peters.** 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO Journal*. **12**:2181-93.
- Pytowski, B., T. W. Judge, and T. E. McGraw.** 1995. An internalization motif is created in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor by substitution of a tyrosine at the first position of a predicted tight turn. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:9067-73.
- Ratner, L.** 1992. Glucosidase inhibitors for treatment of HIV-1 infection. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **8**:165-73.
- Rey, O., J. Canon, and P. Krogstad.** 1996. HIV-1 Gag associates with F-actin present in microfilaments. *Virology*. **220**:530-4.
- Rindler, M. J., I. E. Ivanov, and D. D. Sabatini.** 1987. Microtubule-acting drugs lead to the nonpolarized delivery of the influenza hemagglutinin to the cell surface of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cell Biology*. **104**:231-41.
- Rodriguez-Boulan, E.** 1983. Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Modern Cellular Biology*. **1**:119-70.
- Rodriguez-Boulan, E., and W. J. Nelson.** 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*. **245**: 718-25.
- Rodriguez-Boulan, E., and S. K. Powell.** 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annual Review of Cell Biology*. **8**:395-427.
- Rodriguez-Boulan, E., and D. D. Sabatini.** 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **75**:5071-75.
- Rodriguez-Boulan, E., and C. Zurzolo.** 1993. Polarity signals in epithelial cells. *Journal of Cell Science*. **Supp. 17**:9-12.
- Rogel, M. E., L. I. Wu, and M. Emerman.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of Virology*. **69**:882-8.
- Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell, and S. Kornfeld.** 1996. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *Journal of Cell Biology*. **132**:565-76.
- Rosen, C. A., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1985. The Location of Cis-Acting Regulatory Sequences in the Human T Cell Lymphotropic Virus Type III (HTLV/LAV) Long Terminal Repeat. *Cell*. **41**:813-23.

- Roth, M. G., and R. W. Compans.** 1981. Delayed appearance of pseudotypes between vesicular stomatitis virus influenza virus during mixed infection of MDCK cells. *Journal of Virology*. **40**:848-60.
- Roth, M. G., D. Gundersen, N. Patil, and E. Rodriguez-Boulan.** 1987. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *Journal of Cell Biology* **104**:769-82.
- Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano.** 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *Journal of Immunology*. **155**:473-88.
- Ruta, M., M. J. Murray, M. C. Webb, and D. Kabat.** 1979. A murine leukemia virus mutant with a temperature sensitive defect in membrane glycoprotein synthesis. *Cell*. **16**:77-88.
- Ryser, J. E., E. Rungger-Brandle, C. Chaponnier, G. Gabbiani, and P. Vassalli.** 1982. The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *Journal of Immunology*. **128**:1159-62.
- Salas, P. J., D. E. Misek, D. E. Vega-Salas, D. Gundersen, M. Cerejido, and E. Rodriguez-Boulan.** 1986. Microtubules and actin filaments are not critically involved in the biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Journal of Cell Biology*. **102**:1853-67.
- Sanchez-Pescador, R., M. D. Power, P. J. Barr, K. S. Steimer, M. M. Stempien, S. L. Brown-Shimer, W. W. Gee, A. Renard, A. Randolph, J. A. Levy, et al.** 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science*. **227**:484-92.
- Sanfridson, A., B. R. Cullen, and C. Doyle.** 1994. The simian immunodeficiency virus Nef protein promotes degradation of CD4 in human T cells. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:3917-20.
- Sasaki, H., M. Nakamura, T. Ohno, Y. Matsuda, Y. Yuda, and Y. Nonomura.** 1995. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**:2026-30.
- Sato, H., J. Orenstein, D. Dimitrov, and M. Martin.** 1992. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology*. **186**:712-24.
- Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Poignard.** 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *Journal of Virology*. **67**:7383-93.
- Sawai, E. T., A. Baur, H. Struble, B. M. Peterlin, J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**:1539-43.

- Schafer, W., A. Stroh, S. Berghofer, J. Seiler, M. Vey, M. L. Kruse, H. F. Kern, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1995. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO Journal*. **14**:2424-35.
- Schall, T. J., and K. B. Bacon.** 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current Opinion in Immunology*. **6**:865-73.
- Schor, S. L., T. D. Allen, and B. Winn.** 1983. Lymphocyte migration into three-dimensional collagen matrices: a quantitative study. *Journal of Cell Biology*. **96**:1089-96.
- Schultz, A. M., L. E. Henderson, and S. Oroszlan.** 1988. Fatty acylation of proteins. *Annual Review of Cell Biology*. **4**:611-47.
- Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of Virology*. **64**:5448-56.
- Shattock, R. J.** 1996. Increased viral production in monocyte following cell to cell contact. *Research in Virology*. **147**:171-6.
- Shields, A., O. N. Witte, E. Rothenberg, and D. Baltimore.** 1978. High frequency of aberrant expression of Moloney murine leukemia virus in clonal infections. *Cell*. **14**:601-9.
- Shockett, P., M. Difilippantonio, N. Hellman, and D. G. Schatz.** 1995. A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**:6522-6.
- Siegal, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg, et al.** 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *New England Journal of Medicine*. **305**:1439-44.
- Simon, K. O., P. A. Whitaker-Dowling, J. S. Youngner, and C. C. Widnell.** 1990. Sequential disassembly of the cytoskeleton in BHK21 cells infected with vesicular stomatitis virus. *Virology*. **177**:289-97.
- Simons, K., and S. D. Fuller.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annual Review of Cell Biology*. **1**:243-88.
- Simons, K., and A. Wandering-Ness.** 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell*. **62**:207-10.
- Smith, A. J., M.-I. Cho, M.-L. Hammarskjöld, and D. Rekosh.** 1990. Human immunodeficiency virus type 1 pr55gag and pr160gag-pol expressed from a simian virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into viruslike particles. *Journal of Virology*. **64**:2743-50.
- Sodroski, J. G., C. A. Rosen, and W. A. Haseltine.** 1984. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science*. **225**:381-5.

- Spector, D. H., E. Wade, D. A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish, and S. A. Spector.** 1990. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *Journal of Virology*. **64**:2298-308.
- Srinivas, S. K., R. V. Srinivas, G. M. Anantharamaiah, J. P. Segrest, and R. W. Compans.** 1992. Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. **267**:7121-7.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, 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**:637-48.
- Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engleman.** 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*. **49**:659-68.
- Stephens, E. B., and R. W. Compans.** 1986. Nonpolarized expression of a secreted murine leukemia virus glycoprotein in polarized epithelial cells. *Cell*. **47**:1053-9.
- Stevenson, M., T. L. Stanwick, M. P. Dempsey, and C. A. Lamonica.** 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO Journal*. **9**:1551-60.
- Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, and M. A. Martin.** 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *Journal of Virology*. **63**:3784-91.
- Strebel, K., T. Klimkait, and M. A. Martin.** 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science*. **241**:1221-3.
- Sullivan, N., M. Thali, C. Furman, D. D. Ho, and J. Sodroski.** 1993. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. *Journal of Virology*. **67**:3674-9.
- Tan, X., R. Pearce-Pratt, and D. M. Phillips.** 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *Journal of Virology*. **67**:6447-52.
- Tateno, M., F. Gonzalez-Scarano, and J. A. Levy.** 1989. Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**:4287-90.
- Tatsumi, M., F. Jean, V. Robert, J. C. Chermann, and C. Devaux.** 1990. Use of monoclonal antibodies for the detection and quantitation of HIV1 core protein p25: comparative evaluation of in vitro HIV1 infection by immunofluorescence, antigen capture ELISA and reverse transcriptase assays. *Research in Virology*. **141**:649-61.
- Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**:5163-7.

- Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *Journal of Biological Chemistry*. **268**:3313-20.
- Thomas, D. N. C., and M. G. Roth.** 1994. The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence but having diverse targeting activities. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:15732-9.
- Tindall, B., S. Barker, B. Donovan, T. Barnes, J. Roberts, C. Kronenberg, J. Gold, R. Penny, and D. Cooper.** 1988. Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Archives of Internal Medicine*. **148**:945-9.
- Tindall, B., A. Carr, D. Goldstein, R. Penny, and D. A. Cooper.** 1993. Administration of zidovudine during primary HIV-1 infection may be associated with a less vigorous immune response [letter]. *Aids*. **7**:127-8.
- Trowbridge, I. S., J. F. Collawn, and C. R. Hopkins.** 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annual Review of Cell Biology*. **9**:129-61.
- Tyrrell, D. L., and A. Ehrnst.** 1979. Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *Journal of Cell Biology*. **81**:396-402.
- Vaishnav, Y. N., and F. Wong-Staal.** 1991. The biochemistry of AIDS. *Annual Review of Biochemistry*. **60**:577-630.
- Varmus, H.** 1988. Retroviruses. *Science*. **240**:1427-35.
- Veronese, F. D., T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan.** 1988. Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *Journal of Virology*. **62**:795-801.
- 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**:639-49.
- Virelizier, J. L.** 1989. Cellular activation and human immunodeficiency virus infection. *Current Opinion in Immunology*. **2**:409-13.
- Wilk, T., T. Pfeiffer, and V. Bosch.** 1992. Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology*. **189**:167-77.
- Wilkinson, P. C.** 1987. Leucocyte locomotion: behavioural mechanisms for accumulation. *Journal of Cell Science - Supplement*. **8**:103-19.
- Wilkinson, P. C.** 1986. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology*. **57**:281-9.
- Wilkinson, P. C., and A. Higgins.** 1987. OKT3-activated locomotion of human blood lymphocytes: a phenomenon requiring contact of T cells with Fc receptor-bearing cells. *Immunology*. **60**:445-51.

- Wilkinson, P. C., and E. A. Watson.** 1990. FK506 and pertussis toxin distinguish growth-induced locomotor activation from attractant-stimulated locomotion in human blood lymphocytes. *Immunology*. **71**:417-22.
- Willey, R., J. Bonifacino, and B. Potts.** 1988. Biosynthesis, Cleavage and Degradation of The Human Immunodeficiency Virus 1 Envelope Glycoprotein gp160. *Proceedings of National Academy of Science USA*. **85**:9580-5.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology*. **66**:7193-200.
- Wills, J. W., and R. C. Craven.** 1991. Form, function, and use of retroviral gag proteins [editorial]. *Aids*. **5**:639-54.
- Wolinsky, S. M., C. M. Wike, B. T. Korber, C. Hutto, W. P. Parks, L. L. Rosenblum, K. J. Kunstman, M. R. Furtado, and J. L. Munoz.** 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants [see comments]. *Science*. **255**:1134-7.
- Yahi, N., S. Baghdiguan, H. Moreau, and J. Fantini.** 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *Journal of Virology*. **66**:4848-54.
- Yao, X. J., S. Garzon, F. Boisvert, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1993. The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. **6**:135-41.
- Yu, X., Q. C. Yu, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The C terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *Journal of Virology*. **66**:5667-70.
- Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *Journal of Virology*. **66**:4966-71.
- Yu, X. F., M. Matsuda, M. Essex, and T. H. Lee.** 1990. Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *Journal of Virology*. **64**:5688-93.
- Zacharopoulos, V. R., M. E. Perotti, and D. M. Phillips.** 1992. Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type I. *Journal of Virology*. **66**:4601-5.
- Zhu, T., H. Mo, N. Wang, D. S. Nam, Y. Cao, R. A. Koup, and D. D. Ho.** 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*. **261**:1179-81.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Guy Lemay, pour m'avoir permis de faire mes études de maîtrise dans son laboratoire et pour son support. Sa disponibilité et sa compréhension devraient être un exemple pour les autres directeurs de recherche. Je remercie aussi mon codirecteur, le Dr Éric Cohen, pour m'avoir mieux préparé aux réalités du monde de la science. Les professeurs Lemay et Cohen m'ont supporté énormément lors de mes nombreuses compétitions avec l'équipe olympique de water-polo.

Deux personnes du laboratoire doivent tout spécialement être remerciées. Carole Danis, pour ses nombreux conseils sur un peu tout, mais tout spécialement en culture cellulaire. Robert Lodge, pour sa participation à plusieurs aspects de mes projets et à ses nombreuses discussions, remarques et assistance durant ma maîtrise.

Un gros merci à Gary Pignac-Kobinger pour son aide sur les lignées d'encapsidation. Je dois aussi remercier Janique Forget, Taoufik Mabrouk, Jacques Friborg, Florent Checroune, Angelo Tiganos, Hélène Boucher et Nash Daniel pour avoir été de vrais copains à l'extérieur du laboratoire.

De nombreuses personnes m'ont aussi aidé avec plusieurs points techniques et discussions lors de ces études et ce sont des gens que je considère maintenant comme des amis : Johanne Mercier, Nicole Rougeau, Isabelle Courchène, Martin Bisailon, Josée Bergeron, Françoise Boisvert, Dominique Bergeron, Sylvie Beaulieu, Serge Dandache, Ramu Subbramanian et Xiaojian Yao.

Enfin, je remercie le Groupe de Recherche en Transport Membranaire (GRTM) de l'Université de Montréal qui m'a soutenu financièrement durant la dernière année de ces travaux.