

2m 11. 2667.7

Université de Montréal

*Étude du mécanisme d'incorporation de la protéine Vpr du Virus de
l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) à l'intérieur des particules
virales*

par

François Bachand

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 Biologie Moléculaire

Août 1998

© François Bachand, 1998



1999-05-17

QH

506

U54

1999

v.001



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce Mémoire intitulé:

*Étude du mécanisme d'incorporation de la protéine Vpr du Virus de
l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) à l'intérieur des particules
virales*

présenté par

François Bachand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Marc Drolet, président-rapporteur

Dr. Éric A. Cohen, directeur de recherche

Dr. Luc DesGroseillers, membre du jury

Mémoire accepté le :

03. 12. 1998

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un rétrovirus complexe qui en plus des gènes de structure *gag*, *pro*, *pol* et *env*, code aussi pour au moins six gènes auxiliaires (*tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vif* et *vpr*) qui modulent plusieurs aspects de la réplication virale. Vpr, une petite protéine de 96 acides aminés, est incorporée spécifiquement dans les particules virales du VIH-1. L'incorporation spécifique de cette protéine accessoire suggère qu'elle pourrait jouer un rôle précoce au début de l'infection du VIH-1. Comme Vpr ne fait pas partie du précurseur Gag p55, son incorporation nécessite donc une association avec des facteurs viraux durant l'assemblage. Plusieurs études antérieures ont suggéré que la partie C-terminale du précurseur Gag, connue sous le nom de domaine p6, semble être une région essentielle pour l'incorporation de Vpr dans les virions. Cependant, le mécanisme moléculaire de son incorporation reste encore mal défini. Afin de clarifier le mécanisme par lequel Vpr est incorporée *in trans* à l'intérieur des particules virales, nous avons testé la possibilité d'interactions entre la protéine Vpr et le précurseur Gag p55. Pour ce faire, nous avons utilisé des systèmes d'interactions protéine-protéine comme le système des deux-hybrides et un système *in vitro* en utilisant la protéine de fusion MBP.

Dans cet ouvrage, des évidences génétiques et biochimiques démontrent que la protéine Vpr est capable d'interagir directement avec le précurseur p55. De plus, des mutations ponctuelles affectant l'intégrité d'une région conservée du domaine p6 de Gag ont résulté en une perte complète de l'interaction entre Vpr et le Pr55^{gag} et, par conséquent, en l'incapacité de Vpr d'être incorporée dans les particules virales. Par contre, des mutations affectant les deux doigts de zinc situés dans la région de la nucléocapside (NC) du précurseur Gag, n'ont affecté ni l'interaction Vpr-Pr55^{gag}, ni l'incorporation virale de Vpr. En ce qui concerne Vpr, nos résultats ont démontré que l'intégrité de son hélice alpha située en N-terminale de la protéine semble être importante pour l'interaction avec le précurseur

Gag. L'interaction entre ces deux protéines semble forte car des concentrations de sel de 900 mM n'ont pu dissocier Vpr du précurseur Gag. Globalement, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent fortement que l'incorporation de la protéine Vpr du VIH-1 nécessite une interaction directe entre son hélice alpha à l'extrémité N-terminale et la région C-terminale du domaine p6 du Pr55^{gag}. Le développement d'un système afin d'étudier l'interaction de Vpr avec le Pr55^{gag} rendra possible le criblage de molécules pouvant bloquer cette interaction. Ceci, par conséquent, permettra de prévenir l'incorporation de Vpr dans les virions, empêchant ainsi les actions précoces causées par Vpr durant la réplication du VIH.

MOTS CLEFS: VIH-1; Vpr; précurseur Gag p55; domaine p6; interaction protéine-protéine; incorporation;

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	i
IDENTIFICATION DU JURYii
SOMMAIREiii
TABLE DES MATIÈRESv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONSx
DÉDICACE	xiv

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 Le VIH: Découverte d'un Nouveau Rétrovirus	2
1.1 Le SIDA: La Pathologie Reliée au VIH	2
1.2 La Réponse Immunitaire Dirigée contre le VIH	5
2.0 La Morphologie de la Particule Virale (VIH)	5
2.1 L'Organisation Génétique des Rétrovirus et du VIH	7
3.0 Le cycle de Réplication du VIH	8
3.0.1 Interaction entre le Virus et la Cellule Cible	8
3.0.2 Événements Pré-Intégrationnels	9
3.0.3 Événements Post-Intégrationnels	11
3.0.3.1 Protéines de Régulation Cellulaire	12
3.0.3.2 Mode d'Épissage complexe du VIH	12
3.0.3.3 Les Protéines de Régulation Virale: Tat et Rev	12
4.0 Protéines de Structure	15
4.0.1 Maturation des Précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol	15
4.0.2 Les Glycoprotéines de l'Enveloppe de VIH	18
5.0 Assemblage et Bourgeonnement des Particules Virales	19
6.0 Les Protéines Auxiliaires du VIH	21
6.0.1 Les Protéines Accessoires du VIH	21
6.0.2.1 La Protéine Nef	21
6.0.2.2 La Protéine Vpu	23
6.0.2.3 La Protéine Vif	24
7.0 Les Protéines Accessoires Vpr et Vpx	24

7.0.1 Incorporation de Vpr dans la Particule Virale	25
7.0.2 Activités Biologiques de Vpr.....	27
7.0.2.1 Import nucléaire du Complexe de pré-intégration.....	27
7.0.2.2 Induction d'un arrêt du cycle cellulaire par Vpr	28
7.0.3 Rôles fonctionnels de Vpr	28
7.0.3.1 Les Rôles Précoces de Vpr	29
7.0.3.2 Rôles de Vpr exprimée <i>de novo</i>	30
7.0.4 Partenaires Cellulaires de Vpr.....	31
Le projet de Recherche.....	37

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus type 1 requires a
direct interaction with the p6 domain of the p55 Gag precursor

TITLE.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUCTION.....	40
EXPERIMENTAL PROCEDURES	43
RESULTS.....	48
DISCUSSION	56
ACKNOWLEDGMENTS.....	60
REFERENCES	60
FOOTNOTES.....	65
FIGURE LEGENDS.....	66
FIGURES	69

CHAPITRE 3

DISCUSSION	76
------------------	----

CHAPITRE 4

CONCLUSION.....	86
-----------------	----

CHAPITRE 5

REMERCIEMENTS	88
---------------------	----

CHAPITRE 6

BIBLIOGRAPHIE	90
---------------------	----

LISTE DES FIGURES

À l'intérieur de la revue de la littérature (Chapitre 1)

1. Réponse immunitaire aux antigènes viraux et stades de la maladie	page 32
2. Morphologie de la particule virale	page 33
3. Organisation génétique des rétrovirus et du VIH	page 34
4. Cycle viral du VIH-1	page 35
5. Modèle hypothétique de la structure tertiaire de Vpr	page 36

À l'intérieur de l'article scientifique (Chapitre 2)

6. (1A dans l'article) Spécificité de l'interaction entre Vpr et le Pr55 ^{gag} dans le système des deux-hybrides	page 69
7. (1B dans l'article) Détection des protéines de fusion LexA-Vpr et B42-Pr55 ^{gag} dans les levures	page 69
8. (2A dans l'article) Constructions et mutants de la protéine Gag utilisés dans le système des deux-hybrides	page 70
9. (2B dans l'article) Région dans le Pr55 ^{gag} importante pour l'interaction avec Vpr	page 71
10. (3A dans l'article) Mutants de Vpr utilisés dans le système des deux-hybrides	page 72
11. (3B dans l'article) Région de Vpr importante pour l'interaction avec le Pr55 ^{gag}	page 72
12. (4A dans l'article) Vpr et le Pr55 ^{gag} interagissent <i>in vitro</i>	page 73
13. (4B dans l'article) Interaction <i>in vitro</i> entre Vpr et le Pr55 ^{gag} à différentes concentrations de sels	page 74
14. (4C dans l'article) Compétition de l'interaction <i>in vitro</i> entre Vpr et le Pr55 ^{gag} en utilisant différents anticorps	page 74
15. (5A dans l'article) Incorporation virale de Vpr dans les virions générés par le mutant p6 LF-PS	page 75
16. (5B dans l'article) Incorporation virale de Vpr dans les virions générés par les mutants de la NCp7, H23C et ΔK14-T50	page 75

17. (5C dans l'article) Quantification de l'incorporation virale de Vpr dans des virions de types sauvages et dans les mutants p6 LF-PS et p7 H23C **page 75**

À l'intérieur de la discussion (Chapitre 3)

18. Diversité du domaine p6 chez le VIH-1, VIH-2 et le VIS **page 84**
19. Diversité de Vpr chez le VIH-1, VIH-2 et le VIS **page 85**

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN, ARNm, ARNt	Acide ribonucléique (messager, de transfert)
ATP	Adénosine tri-phosphate
B42	Transactivateur bactérien utilisé dans le système des deux-hybrides (acid blob)
CA	Capside (p24)
CAT	Chloroamphenicol Acetyl Transferase, transférase d'acétyle chloroamphénicole
CD4	Protéine membranaire des cellules T auxiliaires liant la gp120 du VIH
CD8	Protéine membranaire des cellules T cytotoxiques
CDC	Center for Disease Control, centre de contrôle de la santé
cDNA	ADN complémentaire
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CPZ	Chimpanzé
CTD	C-terminal domain of RNA polymerase II, domaine C-terminale de l'ARN polymérase II
D1 à D4	Domaines Immunoglobulaires extracellulaires de la molécule CD4
EBV	Epstein-Barr virus, le virus de Epstein-Barr
Env	Enveloppe (d'où les gènes et protéines virales)
Gag	Group antigen (d'où les gènes et protéines responsables de la structure virale)
gp120	Glycoprotéine 120 de l'enveloppe (surface)
gp41	Glycoprotéine 41 de l'enveloppe (transmembranaire)

gp160	Glycoprotéine 160 de l'enveloppe (précurseur de la gp120 et de la gp41)
HA	Hémagglutinine
HHV-8	Human Herpes Virus type 8, virus de l'herpès humaine de type 8
HTLV-I, -II, -III	Human T-cell leukemia virus type 1, type 2, and type 3, Virus de la leucémie humaine
IL-1	Interleukin type 1, interleukine de type 1
IN	Intégrase virale
kDa	kiloDalton
LAV	Lymphadenopathy-associated virus
LexA	Protéine bactérienne se liant à une séquence d'ADN spécifique (opérateur <i>lexA</i>)
LTR	Long Terminal Repeats, Longues répétitions terminales
MA	Matrice (p17)
MAC	Macaque
MBP	Maltose Binding Protein, protéine d'attachement au maltose
MHR	Major Homology Region, Région majeure d'homologie
MLV	Murine Leukemia Virus, Virus de la leucémie murine
MT-4	Lignée de cellules lymphocytaires
NC	Nucléocapside (p7)
Nef	Negative factor, facteur négatif
NES	Nuclear Export Signal, signal d'export nucléaire
NLS	Nuclear Localization signal, signal de localisation nucléaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

p17, p24, p7, p6	Protéines de Gag matures du VIH-1; <i>p17</i> (matrice), <i>p24</i> (Capside), <i>p7</i> (nucléocapside), <i>p6</i>
p51, p66	Sous-unités de l'intégrase virale
PBS	Primer Binding Site, site de liaison des amorces
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérase à la chaîne
PIC	Pre-integration complex, complexe de pré-intégration
pol	Gène des rétrovirus codant, entre autres, pour l'intégrase et la transcriptase inverse
Pr55^{gag}, p55	Précurseur Gag p55 générant les protéines de structures; <i>p17</i> , <i>p24</i> , <i>p7</i> , et <i>p6</i>
Pr160^{gag-pol}	Précurseur Gag-Pol p160 générant les protéines de structures ainsi que les enzymes virales
PR	Protéase virale
pro	Gène des rétrovirus codant pour la protéase virale
R	Repeat Regions of LTR, régions répétées du LTR
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	Protéine de régulation de l'expression des protéines virales
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RRE	Rev-Responsive Element, élément de réponse à Rev
RSV	Rous Sarcoma Virus, virus du sarcome de Rous
RT	Reverse Transcriptase, transcriptase inverse
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise

S U	Domaine extracytoplasmique (par extension, la protéine de surface, telle la gp120)
TAR	Tat-Responsive Region; région répondant à Tat
Tat	Transactivating protein, protéine de transactivation
TAK	Tat-Associated Kinase, kinase associée à Tat
TFIIB	Transcription Factor IIB, facteur de transcription IIB
TM	Domaine transmembranaire (par extension, la protéine transmembranaire, telle la gp41)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor type α , facteur de nécrose tumorale de type α
U 3	3' Unique region, région unique en 3'
U 5	5' Unique region, région unique en 5'
UDG	Uracyl DNA glycosylase
V 3	Région variable 3
Vif	Viral infectivity factor, facteur d'infectivité virale
VIH-1, -2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1, de type 2
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
Vpr	Viral protein R, protéine virale R
Vpu	Viral protein U, protéine virale U
Vpx	Viral protein X, protéine virale X

Ad augusta per angusta
(On n'arrive au triomphe qu'en surmontant maintes difficultés)

Victor Hugo

**À Audrey qui a dû subir
plusieurs crises expérimentales,
et à mes parents qui ont souffert
de mon humeur pendant toutes
mes études...merci!**

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION

Malgré les progrès extraordinaires qu'a accompli la science au cours des dix dernières années, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) continue de faire de nombreuses victimes. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 1,5 million de cas de Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) ont été rapportés en janvier 1997 (Coffin *et al.*, 1997). Cependant, dû aux méthodes diagnostiques relativement inadéquates dans les pays en voie de développement, l'OMS estime qu'il y avait cumulativement 8,4 million de cas de SIDA dans le monde en janvier 1997 (Coffin *et al.*, 1997). Encore plus alarmant, l'OMS estime qu'en janvier 1997 plus de 29,4 million de gens auraient été infectés par le VIH dans le monde, dont près de la moitié (~14 million) proviendraient d'Afrique, ce continent étant le foyer de l'épidémie.

Au cours des dernières années, des études ont clairement démontré que le VIH se réplique à des niveaux très élevés dans le système lymphatique, particulièrement dans les ganglions lymphatiques, du début de l'infection jusqu'à la mort de l'individu (Ho, 1995). Donc, il a été suggéré qu'une intervention thérapeutique puissante et précoce pourrait possiblement diminuer la charge virale à des niveaux presque indécélables (Ho, 1995; Wei, 1995). Cependant, dû à l'efficacité du VIH à muter en des souches qui sont résistantes aux molécules médicamenteuses, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques demeure un objectif important de la recherche sur le SIDA durant les prochaines années. De plus, ces nouvelles approches thérapeutiques devront également tenir compte des cellules réservoirs du VIH, comme les macrophages et les monocytes, qui servent de sanctuaires à ce virus (Cavert et Haase, 1998).

L'importance des protéines accessoires du VIH au cours de l'infection reste encore obscure. Cependant, de plus en plus d'études suggèrent que ces protéines jouent un rôle important au cours du cycle de répllication du VIH, entre autres dans l'établissement de l'infection de cellules quiescentes comme les macrophages et les monocytes, qui servent de cellules réservoirs et de sanctuaires durant l'infection du VIH (Cullen, 1998; Emerman et Malim, 1998; Miller et Sarver, 1997; Trono, 1995). En effet, des résultats obtenus dans le modèle de singe tendent à démontrer le caractère essentiel des protéines auxiliaires dans la progression de la maladie causée par le VIH et les rétrovirus similaires (Gibbs *et al.*, 1995; Kuwata *et al.*, 1995; Michael *et al.*, 1995). Une étude approfondie des mécanismes d'action de ces protéines accessoires permettra une compréhension plus détaillée de leur rôle dans la répllication, l'infectivité, la persistance, la transmission et dans la pathogenèse du VIH, et possiblement, le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre ce virus.

1.0 LE VIH: Découverte d'un nouveau rétrovirus

Au début des années 1980, une nouvelle maladie se répétait dans les communautés homosexuelles américaines. En effet, de jeunes homosexuels mouraient d'une grave maladie de la peau qui frappait habituellement (9 fois sur 10) des personnes âgées d'origine juive ou méditerranéenne. Ce cancer porte le nom de Sarcome de Kaposi. Au début de l'année 1982, on dénombre plus de 200 cas de cette maladie (Grmek, 1995). Cependant, ce qui surprenait encore plus les médecins américains, était l'observation que les patients souffrant du Sarcome de Kaposi étaient aussi atteints de pneumocystis et de toxoplasmose, deux maladies bénignes chez les adultes.

C'est à l'été 1982 que le Center for Disease Control (CDC) donne un nom officiel à cette maladie: le Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis ou SIDA. Or, à ce même moment, la maladie ne frappe plus que les homosexuels, mais aussi les femmes et les enfants. À la fin de l'année 1982, les scientifiques sont à la recherche de la cause de cette terrible maladie. Il semblait de plus en plus clair que l'agent étiologique était un virus. Cependant, avions-nous affaire à un virus complètement nouveau, ou bien, l'agent infectieux était-il un virus connu qui avait muté sous une forme beaucoup plus virulente?

C'est en janvier 1983 que l'agent étiologique du SIDA fut isolé. Le groupe des Drs. Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi et Jean-Claude Chermann isola un nouveau rétrovirus qu'ils nommèrent *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV) (Barré-Sinoussi, 1983). Cependant, au National Institute of Health (NIH), à Washington, le groupe du Dr. Robert Gallo, qui avait précédemment découvert les deux premiers rétrovirus humains, *Human T-Cell lymphoma Virus type 1 et 2* (HTLV-I et -II), avait aussi découvert un nouveau rétrovirus chez un patient atteint du SIDA. Ce virus fut nommé HTLV-III (Gallo, 1984). Une controverse franco-américaine s'établit entre ces deux groupes scientifiques, pour enfin savoir quelques années plus tard que le virus isolé et publié par le groupe de Robert Gallo était exactement le même au niveau des séquences d'acides nucléiques que celui isolé en 1983 par le groupe français. Ce n'est qu'en mai 1986 que le virus du SIDA reçut le nom de Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) par une Commission de nomenclature virologique.

1.1 Le SIDA: La pathologie reliée au VIH (Figure 1)

Une détérioration lente et progressive du système immunitaire ainsi que du système nerveux central sont les principales conséquences de l'infection par le VIH. *In vitro*, une multitude de cellules semblent être permissives à l'infection au VIH (Levy, 1998). Cependant, étant donné que la grande majorité des cellules infectées retrouvées *in vivo* représentent des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que des cellules dérivées de macrophages,

l'importance d'une réplication virale *in vitro* dans d'autres types cellulaires reste encore à démontrer. De plus, les mécanismes précis de la transmission du VIH sont encore incertains. Il est clair que la transmission peut se faire soit par le virus libre, ou bien par des cellules déjà infectées. Par surcroît, les conséquences à long terme d'une entrée mucosale ou d'une entrée par inoculation directe dans le système sanguin sont encore méconnues. Cependant, il semble que certaines souches du VIH se sont adaptées aux moyens d'entrées qui prédominent dans différents endroits géographiques. Ceci semble être le cas pour les souches de clade-E du VIH qui prédominent en Thaïlande où la transmission est principalement d'ordre sexuelle (Gao *et al.*, 1996). L'infection par le VIH se divise donc en 3 différentes étapes: la primo-infection, l'étape de latence clinique, et finalement, la dégénérescence immunitaire qui mène au SIDA (Figure 1).

La primo-infection chez les individus infectés par le VIH amène des symptômes similaires à ceux d'une grippe ou d'une mononucléose. Ces symptômes, souvent non indicatifs de l'importance de la maladie, durent généralement de 3 à 6 semaines. Comme le montre la Figure 1, une réplication virale intense se déroule dans le sang seulement 6 semaines post-infection. Les symptômes associés à la primo-infection sont dus à cette réplication intense où 10^6 à 10^7 virions/ml peuvent être retrouvés dans le plasma sanguin ainsi que dans le fluide cérébro-spinal (Clark *et al.*, 1991; Tindall et Cooper, 1991). Conséquemment, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans l'organisme décline de façon radicale (Figure 1). Par contre, approximativement 6 à 9 semaines après l'infection, une réponse immunitaire principalement cytotoxique contre le VIH peut être détectée (Ho *et al.*, 1985). Cette réponse immunitaire efficace est immédiatement associée à une baisse précipitée de la charge virale sanguine ainsi qu'à une stabilisation du nombre de lymphocytes portant la molécule CD4. Cependant, il est important de noter que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ ne reviendra jamais à son niveau initial (Figure 1). L'autre conséquence du déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique est la disparition des symptômes cliniques, d'où l'arrivée de la deuxième phase de l'infection au VIH, la latence clinique.

Cette phase asymptomatique a longtemps représenté un casse-tête pour la communauté scientifique. En effet, on observait qu'après 6 à 9 semaines de primo-infection, les individus infectés se rétablissaient progressivement et aucun symptôme ne subvenait pour une période pouvant s'échelonner sur quelques années. Par surcroît, la présence d'antigènes viraux dans le sang d'individus infectés étaient indétectables. Que faisait le virus durant toutes ces années? On sait aujourd'hui que la phase de latence clinique n'est aucunement une phase de latence virale. En fait, on pourrait définir la phase asymptomatique comme un état d'équilibre entre une réplication virale intense et une réponse

immunitaire relativement efficace. Relativement, parce que cette réponse immunitaire ne pourra jamais prendre le dessus sur l'intense réplication du VIH, et par conséquent, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ déclinera constamment (Figure 1).

Présentement, la durée moyenne de la phase asymptomatique varie de 8 à 12 ans (Moss et Bacchetti, 1989). La première évidence montrant que, durant la période de latence clinique, il y avait une réplication virale continue fut la démonstration d'ARNs, par hybridation *in situ*, du VIS dans les ganglions lymphatiques de singes infectés (Wyet *et al.*, 1989). Des méthodes beaucoup plus sophistiquées, comme le Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitatif, permettent maintenant de détecter des particules virales dans le plasma sanguin d'individus infectés à tous les stades de la maladie (Piatak *et al.*, 1993). Un équilibre dynamique s'établit donc entre le système immunitaire et la réplication intense du VIH, où l'organisme génère environ 2×10^9 lymphocytes T CD4⁺ à chaque jour (Ho, 1995). Des analyses utilisant différents modèles mathématiques ont estimé que le temps de demi-vie du virus libre dans le sang était d'environ 6 heures, tandis que celui d'une cellule infectée (lymphocyte T CD4⁺) est de 1,5 jour (Perelson *et al.*, 1996). Dans la grande majorité des individus infectés, la capacité de régénération cellulaire du système immunitaire s'estompe inexorablement. Ceci mène donc progressivement à des niveaux faibles de lymphocytes T CD4⁺, et finalement, à un état physiologique favorable à une panoplie de micro-organismes opportunistes (Heeney, 1995). De plus, pendant la phase de latence clinique, un grand nombre de macrophages, monocytes, ainsi que des cellules nerveuses seront infectées par le VIH. Ces cellules, qui, contrairement aux lymphocytes CD4⁺ ne produiront pas activement de particules virales, servent de cellules réservoirs/sanctuaires au VIH (Cavert et Haase, 1998). En effet, parce que ces cellules ne sont pas productrices d'un grand nombre de particules virales, elles sont conséquemment moins sujettes à une reconnaissance immunitaire cytotoxique.

Le système immunitaire d'individus infectés étant incapable de générer une protection adéquate, des micro-organismes opportunistes comme les protozoaires *Pneumocystis carinii* et *Toxoplasma gondi* ou bien des organismes fongiques tel *Candida albicans* peuvent établir des infections qui sont difficilement contrôlables et risquent donc d'engendrer la mort des personnes atteintes (Nelson, 1990). Généralement, on observe l'apparition de ces maladies opportunistes lorsque le taux sanguin de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200/ μ l. Par ailleurs, plusieurs autres maladies peuvent survenir durant le stade du SIDA, par exemple, des symptômes neurologiques sévères, des lymphômes (causés par des virus tel EBV), le sarcome de Kaposi (HHV-8) et une panoplie d'infections bactériennes.

1.2 La Réponse Immunitaire Dirigée Contre le VIH.

Deux types de réponses immunitaires sont dirigées contre l'infection au VIH; la réponse humorale et la réponse cellulaire. Tout d'abord, la réponse immunitaire humorale a comme rôle principal la génération d'anticorps neutralisants. Un anticorps neutralisant a, par définition, la capacité de bloquer ou neutraliser l'infectivité d'un virus. Les cibles des anticorps neutralisants contre le VIH ont été excessivement étudiées. En fait, la première cible à être identifiée consiste en la région variable 3 (V3) de la glycoprotéine de surface, la gp120 (Javaherian *et al.*, 1989). Le mécanisme d'action des anticorps dirigés contre la boucle V3 semble être l'inhibition de la fusion de cellules infectées avec des cellules CD4⁺ non infectées (Javaherian *et al.*, 1990). L'autre classe d'anticorps neutralisants bloque l'attachement de la gp120 aux molécules CD4. Ces deux classes d'anticorps neutralisants sont très efficaces contre les souches de laboratoire du VIH. Cependant, nous savons aujourd'hui que dû à la forte pression sélective qu'exerce le système immunitaire sur le VIH, les anticorps neutralisants sont très peu efficaces contre des isolats cliniques de ce virus (Burns et Desrosiers, 1994). En fait, c'est la grande variabilité de la glycoprotéine de surface (gp120) qui permet au VIH cette évasion de la réponse immunitaire humorale, et conséquemment, est responsable de la difficulté du développement d'un vaccin efficace (Gottlieb, 1998).

Le deuxième volet de l'activité immunitaire contre le VIH, la réponse cellulaire, consiste principalement en l'élimination de cellules infectées. Les lymphocytes T CD8⁺ sont les principaux instigateurs de la réponse immunitaire cellulaire. Ces cellules lysent spécifiquement les cellules infectées car ces dernières expriment à leur surface des antigènes viraux (du VIH) qui sont reconnus comme étrangers. La qualité et l'étendue de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ contre le VIH semblent avoir une importance cruciale au niveau de la rapidité de la progression du SIDA. En effet, des études suggèrent qu'une réponse immunitaire cellulaire importante résulte en la réduction de la réplication virale, et par conséquent, en la prolongation de la période asymptomatique (Pantaleo *et al.*, 1996).

2.0 La Morphologie de la Particule Virale (VIH) (Figure 2)

Le VIH est un membre de la famille des *retroviridae* et de la sous-famille des *lentiviridae*. Les virus appartenant à ce groupe ont généralement de 80 à 120 nm de diamètre. De plus, leur génome viral consiste en deux molécules d'ARNs monocaténares qui ont approximativement 10,000 pb. Les composantes majeures de la plupart des particules rétrovirales sont les protéines (65%), suivies par les lipides (environ 35%), et finalement, par les molécules d'ARNs (1-2%). Parce que l'assemblage et le bourgeonnement du VIH se font à la membrane plasmique, les particules virales formées par

le VIH sont classifiées de type-C. Les rétrovirus de type-A sont non-enveloppés, tandis que les virus de type-B et type-D se distinguent par l'assemblage de leur capsidie dans le cytoplasme.

Le modèle de la structure du virus de l'immunodéficience humaine est représenté en Figure 2. Globalement, le virion sous sa forme mature consiste en différentes couches protéiques dérivées du précurseur Gag. La couche la plus externe consiste en la matrice (MA ou p17^{gag}) qui est située directement en dessous de la couche lipidique virale. Le domaine N-terminal de la MA est chargé positivement et est associé à une molécule d'acide myristilique qui permet à la matrice d'interagir avec la membrane plasmique. Traversant la bi-couche lipidique externe du virus, le domaine transmembranaire (TM ou gp41) de la glycoprotéine de l'enveloppe est en contact avec la MA à l'intérieur du virion. Le domaine externe de la gp41, quant à lui, est associé avec le domaine de surface (SU ou gp120) de la glycoprotéine de l'enveloppe. Comme le montre la Figure 2, les domaines de la glycoprotéine de l'enveloppe (gp41 et gp120) forment possiblement un trimère à la surface des particules virales.

Plus à l'intérieur de la couche de la matrice, se trouve la couche de la capsidie (CA ou p24^{gag}) qui constitue la partie centrale du virion. Chez le VIH, la structure de la capsidie est en forme de cône, et c'est à l'intérieur de la capsidie que l'on retrouve le complexe ribonucléoprotéique qui contient le matériel génétique de ce rétrovirus. Les molécules de nucléocapsides (NC ou p7^{gag}) recouvrent les deux molécules d'ARNs monocaténares dans les virions, ces molécules d'ARNs possédant à leur extrémité 5' une structure coiffe et à leur extrémité 3' une queue poly-A. Associées à ce complexe ribonucléoprotéique, l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT), sont présumées être à l'intérieur de la capsidie dû au fait qu'elles peuvent s'associer aux acides nucléiques. Cependant, l'interaction directe de l'intégrase et de la transcriptase inverse avec le complexe NC-ARN dans les virions reste encore à démontrer. La troisième enzyme du VIH à l'intérieur des virions, la protéase (PR), est représentée sous forme de dimère (Figure 2) car c'est sous cette forme que l'enzyme est fonctionnelle. Finalement, la localisation de la partie C-terminale de Gag, le domaine p6, qui est unique aux *lentiviridae*, est encore incertaine.

Les particules virales du VIH-1 contiennent aussi certaines protéines cellulaires, par exemple la molécule du complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH I), ainsi que la cyclophilin A. Finalement, la protéine Vpr, une protéine accessoire du VIH, est aussi retrouvée en quantité abondante dans les particules virales Cohen *et al.*, 1990a).

2.1 L'Organisation Génétique des Rétrovirus et du VIH (Figure 3)

Tous les rétrovirus incorporent leur matériel génétique sous la forme d'ARN. Cependant, afin de simplifier la description de l'organisation génétique de ces virus, il est préférable de décrire le génome des rétrovirus sous sa forme intégrée dans l'ADN cellulaire, c'est-à-dire, sous sa forme provirale.

Les rétrovirus possèdent généralement quatre gènes couvrant la majeure partie de l'ADN proviral. Ces gènes, *gag*, *pro*, *pol*, et *env*, sont communs à tous les rétrovirus. Le gène *gag* code pour les protéines de structure du virus. Tel que mentionné dans la partie 2.0, le gène *gag* du VIH génère une polyprotéine de 55 kDa (Pr55^{gag}) qui, après clivage, donne les protéines matures de la MA (matrice), CA (capside), NC (nucléocapside), et du domaine p6^{gag}. Le gène *pro* code pour la protéase virale qui est essentielle à l'assemblage et à la maturation des particules virales bourgeonnantes. *pol* génère la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN), deux enzymes nécessaires pour la transformation de l'ARN viral en ADN, et pour l'intégration de cet ADN dans le génome cellulaire, respectivement. Finalement, le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe, gp41 et gp120 chez le VIH, qui sont requises pour l'interaction avec le récepteur et co-récepteurs cellulaires. Ces interactions mènent ultimement à la fusion de la couche lipidique virale avec la membrane plasmique cellulaire.

Délimitant en 5' et en 3' les gènes *gag*, *pro*, *pol*, et *env*, le provirus contient deux régions identiques connues sous le nom de Long Terminal Repeats ou LTR (Figure 3). Les LTRs peuvent être divisés en trois éléments, U3, R, et U5. La région U3 du LTR en 5' contient la majorité des éléments de contrôle transcriptionnel comme le promoteur et les activateurs, tandis que la région U5 du LTR en 3' contient la séquence de reconnaissance permettant la formation de la queue poly-A des ARNm.

Contrairement aux rétrovirus simples qui ne codent que pour les gènes *gag*, *pro*, *pol*, et *env*, le VIH-1 code aussi pour au moins six gènes auxiliaires. Ces gènes, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, et *nef*, génèrent des petites protéines qui semblent favoriser la réplication et/ou l'infectivité virale (Cullen, 1998; Emerman et Malim, 1998; Miller et Sarver, 1997). Le VIH-2, qui a 40% de similitude au niveau des séquences d'acides nucléiques avec le VIH-1, ne code pas pour la protéine Vpu, mais génère une protéine, Vpx, hautement similaire à la protéine Vpr du VIH-1. Les deux types de VIH, type 1 et 2, en plus d'être différents au niveau génétique, diffèrent aussi au niveau de l'endroit géographique où ils sont retrouvés. En effet, le VIH-1 se retrouve principalement dans le monde occidental et en Afrique Centrale, tandis que le VIH-2 se localise surtout en Afrique de l'Ouest (Clavel, 1986). Finalement, il est à noter que le VIH-2 s'apparente davantage au Virus d'Immunodéficience Simienne (VIS) qu'au VIH-1 (Tomasselli, 1991).

3.0 Le Cycle de Réplication du VIH-1 (Figure 4)

Le cycle de réplication du VIH-1 peut être divisé en trois parties distinctes. La première consiste en l'attachement de la particule virale à la cellule cible suivie du relargage de la capsid dans le cytoplasme de la cellule infectée. La seconde partie, qui est contrôlée principalement par des protéines virales, comprend toutes les étapes commençant par le transport du complexe de pré-intégration jusqu'aux événements d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire. Finalement, la troisième partie comprend toutes les étapes post-intégrationnelles incluant l'expression des gènes viraux, l'assemblage et le relargage des particules virales dans le milieu extracellulaire.

3.0.1 Interaction entre le Virus et la Cellule Cible

L'infection d'une cellule par le VIH nécessite l'attachement d'une particule virale à cette cellule cible. Après l'isolation du VIH comme agent étiologique du SIDA, les chercheurs ont découvert qu'une molécule de 60 kDa, CD4, était le principal récepteur cellulaire du virus. La molécule CD4 fait partie de la superfamille des immunoglobulines, et donc, possède quatre domaines immunoglobulaires qui sont extracellulaires (D1 à D4). Elle possède aussi une région transmembranaire et une courte queue C-terminale intracytoplasmique. Les premières évidences que l'infection de cellules cibles par le VIH était dépendante de la molécule cellulaire CD4 ont été démontrées lorsque certains anticorps dirigés contre la molécule CD4 pouvaient bloquer l'infectivité du virus *in vitro* (Dagleish *et al.*, 1984). Quelques années plus tard, le groupe de Maddon *et al.* fournit la preuve ultime que cette molécule est le principal récepteur du VIH en démontrant que des cellules normalement non-permissives au virus (cellules HeLa) peuvent devenir permissives à l'infection après expression de la molécule CD4 à leur surface (Maddon *et al.*, 1986).

Une analyse moléculaire approfondie a montré que le premier domaine immunoglobulaire (D1) de CD4 était responsable de l'interaction avec la glycoprotéine de surface du VIH, la gp120 (Clayton *et al.*, 1988; Letau *et al.*, 1988). De plus, le domaine transmembranaire ainsi que la queue intracytoplasmique de CD4 sont clairement indispensables pour l'attachement du virus, suggérant que l'internalisation du VIH dans les cellules ne se fait pas par endocytose (Bedinger *et al.*, 1988; Maddon *et al.*, 1988). Cependant, certaines évidences semblaient indiquées que la molécule CD4 n'était pas le seul récepteur du VIH. En effet, quoique la molécule CD4 était nécessaire pour l'attachement des particules virales aux cellules cibles, l'unique présence de cette molécule dans certaines lignées cellulaires humaines n'était pas suffisante pour conférer une susceptibilité à l'infection au VIH (Chesebro *et al.*, 1990; Clapham *et al.*, 1993). Donc, il semblait évident que la molécule CD4 était nécessaire à l'attachement des particules virales aux cellules

cibles, mais que d'autres molécules, encore inconnues, étaient essentielles pour qu'il y ait une entrée complète du virus dans la cellule, et par conséquent infection.

C'est en 1996 que le groupe de Deng *et al.* a identifié une molécule, qu'ils appelèrent Fusin, qui était capable de rendre des cellules de souris exprimant déjà la molécule CD4 permissives au VIH (Deng *et al.*, 1996). Aujourd'hui nous savons que le VIH utilise deux co-récepteurs principaux, et que ces derniers déterminent le tropisme du virus vers les lymphocytes CD4⁺ (virus T-tropique) ou les cellules dérivées de macrophages (M-tropique). En fait, la Fusin, aujourd'hui appelé CXCR4, est le co-récepteur utilisé par les virus T-tropiques, tandis que les virus M-tropiques utilisent la molécule CCR5 (Alkhatib *et al.*, 1996). CXCR4 et CCR5 font toutes deux partie de la famille des récepteurs des chémokines. Les chémokines sont des substances chimiotactiques qui attirent différentes cellules immunitaires vers un foyer infectieux. L'importance de ces co-récepteurs dans la pathogenèse de virus *in vivo* est primordiale car certains individus ayant une délétion de 32 pb dans le gène *ccr5*, causant l'incapacité d'exprimer cette protéine à la surface de leurs cellules, n'ont jamais été infectés même après plusieurs exposition au VIH (Dean *et al.*, 1996; Paxton *et al.*, 1996).

Globalement, il semble que l'interaction du VIH avec la cellule cible commence d'abord par l'association de la gp120 avec le domaine D1 de la molécule CD4, induisant ainsi un changement conformationnel qui permettrait à une autre région de la gp120 d'interagir soit avec la molécule CXCR4 sur les lymphocytes T CD4⁺ ou bien avec la molécule CCR5 sur les macrophages et monocytes. Ces dernières associations seraient responsables de la fusion de la couche lipidique virale avec la membrane plasmique cellulaire. Cependant, le rôle de la partie transmembranaire de la glycoprotéine de l'enveloppe, la gp41, durant cette fusion semble aussi être important (Kowalski *et al.*, 1991).

3.0.2 Événements Pré-Intégrationnels

Une fois que la couche lipidique virale a fusionné avec la membrane plasmique cellulaire, le nucléoïde interne est subséquentement relâché dans le cytoplasme de la cellule hôte. Donc, afin de poursuivre son cycle viral, le VIH nécessite encore trois étapes: (1) que son génome d'ARN soit transformé en ADN bicaténaire grâce à la transcriptase inverse virale; (2) que cet ADNc soit transporté au noyau, et finalement; (3) que cet ADNc soit intégré dans le génome de la cellule cible. Ce qui suit consiste en un bref survol de ce qui est présentement connu sur ces trois étapes.

La transcription inverse des molécules d'ARN virales commence généralement dans le cytoplasme de la cellule cible. Cependant, quelques études ont démontré qu'un certain

niveau de synthèse d'ADN pouvait être observé à l'intérieur des particules virales avant l'entrée du virus dans la cellule (Trono, 1992). Cette transformation de l'ARN viral en ADNc est un processus complexe qui est médié par une enzyme codée par le gène *pol*, la transcriptase inverse (RT). Cet hétérodimère composé de deux sous-unités, p51 et p66, possède trois activités enzymatiques: une activité ADN polymérase ARN-dépendante, une activité ADN polymérase ADN-dépendante, et finalement, une activité nucléase, appelée ribonucléase H, qui est spécifique au fragment ARN d'un hybride ARN:ADN. Cette dernière activité est présente dans la sous-unité p66 de la RT.

Malgré la complexité de la transcription inverse, il semble que la génération d'ADN viral se produise assez rapidement au cours de l'infection. En effet, de l'ADN viral peut être détecté 4 heures après l'entrée du virus (Kim *et al.*, 1989). Le mécanisme de transcription inverse comporte deux particularités qui sont importantes de mentionner. Premièrement, afin que la RT puisse initier la synthèse de l'ADN viral, un ARNt^{Lys} sert d'amorce en s'hybridant à une région conservée sur l'ARN du VIH (Barat *et al.*, 1989). De plus, il a été démontré *in vitro*, que la nucléocapside (NCp7) est importante pour l'hybridation efficace de cet ARNt^{Lys} sur l'ARN viral (Barat *et al.*, 1989). Afin de pouvoir initier la transcription inverse, cet ARNt^{Lys} est sélectivement incorporé dans les particules virales grâce à une association avec le précurseur Gag-Pro-Pol, Pr160^{gag-pol} (Mak *et al.*, 1994; Mak *et al.*, 1997). La deuxième particularité de la RT est sa pauvre fiabilité, entraînant ainsi des erreurs durant la polymérisation. Du fait que la RT ne contienne aucune activité "proof-reading", le niveau élevé de mutations permet au virus de sélectionner les variants qui se répliquent plus efficacement. De plus, cette propriété lui permet, dans un laps de temps extrêmement court, de pouvoir générer des souches qui sont résistantes à plusieurs agents antiviraux.

Une fois le produit final de la transcription inverse terminé, cet ADN bicaténaire, qui est en complexe avec une multitude de protéines virales et cellulaires (Miller et Sarver, 1997), doit se rendre au noyau de la cellule cible où il sera intégré dans le génome de la cellule infectée. Cette agglomération de protéines et d'acides nucléiques (80-320S), connue sous le nom de complexe de pré-intégration (PIC), doit donc traverser la membrane nucléaire. Afin de contourner cette exigence, les onco-rétrovirus ne sont capables de s'intégrer que dans le génome de cellules qui sont en division, et qui conséquemment, n'offrent aucune barrière entre le génome cellulaire et le cytoplasme (Lewis et Emerman, 1994).

Une particularité des lentivirus, comme le VIH, est leur capacité de pouvoir s'intégrer dans le génome de cellules quiescentes, comme les monocytes et les macrophages. En effet, ces cellules constituent probablement une partie importante de la population cellulaire infectée par les lentivirus (Meltzer et Gendelman, 1992).

Conséquemment, ces virus ont développé un mécanisme afin de pouvoir transporter leur complexe de pré-intégration jusqu'au noyau et de lui faire traverser la membrane nucléaire.

Quelle(s) composante(s) du complexe de pré-intégration est(ont) importante(s) pour son import nucléaire? Tout d'abord, le transport du complexe de pré-intégration n'est pas simplement dû à une diffusion passive du cytoplasme au noyau, car des études ont démontré que cette étape requiert de l'énergie, sous forme d'ATP (Bukrinsky *et al.*, 1992). La grande majorité des études qui ont tenté d'identifier les composantes nécessaires pour l'import nucléaire du complexe de pré-intégration se sont arrêtées sur deux protéines virales, la MAp17 et Vpr, ces dernières protéines faisant partie du complexe (Bukrinsky *et al.*, 1993; Heinzinger *et al.*, 1994). Cependant, un travail récent a démontré que l'intégrase, l'enzyme responsable de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire, pouvait aussi être impliquée dans le ciblage nucléaire du complexe de pré-intégration du VIH-1 (Gallay *et al.*, 1997). Cependant, la composition exacte ainsi que la structure moléculaire du complexe de pré-intégration restent encore obscures.

Une fois l'ADN proviral dans le noyau, l'intégration dans le génome cellulaire est accomplie par l'intégrase, une protéine de 31 kDa (Buchow *et al.*, 1989). Cette protéine est incorporée dans les particules virales, comme la transcriptase inverse, grâce aux précurseurs Gag-Pro-Pol qui sont présents dans les virions immatures (Figure 2). Comme la nucléocapside (NCp7), l'intégrase possède aussi un doigt de zinc lui permettant de se lier à l'ADN (Cai *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a récemment été démontré qu'une protéine cellulaire impliquée dans le contrôle transcriptionnel ainsi que dans la structure chromosomale, HMG 1(Y), était nécessaire afin que des complexes de pré-intégration partiellement purifiés provenant de cellules infectées puissent intégrer de l'ADN cellulaire *in vitro* (Farnet et Bushman, 1997). Finalement, malgré les observations que le VIH ne semble favoriser aucun site d'intégration dans le génome cellulaire, certaines études semblent suggérer que le choix du site d'intégration ne soit pas complètement aléatoire (Bor *et al.*, 1996).

3.0.3 Événements Post-Intégrationnels

Une fois le génome intégré de façon stable dans un chromosome cellulaire, ce provirus est maintenant prêt à servir de matrice à la machinerie cellulaire afin de générer des particules virales. Cependant, la production de virions est un processus hautement contrôlé qui nécessite l'action de plusieurs facteurs viraux ainsi que d'une multitude de protéines cellulaires. Les prochaines sections présenteront un bref survol des mécanismes concernant la régulation de l'expression génique du VIH, ainsi que des facteurs cellulaires et viraux qui y sont impliqués.

3.0.3.1 *Protéines de Régulation Cellulaire*

Deux types de régulation contrôlent l'expression génique du VIH; une régulation transcriptionnelle ainsi qu'une régulation post-transcriptionnelle. La transcription de l'ADN proviral est médiée par l'ARN polymérase II qui est responsable de la synthèse des ARN messagers (ARNm) cellulaires. L'initiation de la transcription est un processus impliquant l'addition successive de plusieurs facteurs de transcription et est donc hautement régulé. De plus, l'état physiologique de la cellule immunitaire infectée, activée ou quiescente, est aussi important dans le niveau d'expression basale du provirus. Le LTR du VIH-1 renferme une multitude de sites d'attachement pour des facteurs de transcription cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve le facteur SP1 qui compte trois à quatre sites d'interaction dans la région de forte activation de transcription en amont du site "TATA". En amont des sites SP1, on retrouve 2 sites NF- κ B. L'interaction du facteur NF- κ B avec ces sites semble être essentielle dans l'activation de la transcription à partir du LTR du VIH-1 (Roulston *et al.*, 1995). Le facteur NF- κ B se trouve normalement dans le cytoplasme sous forme inactive. Suite à l'activation d'une cellule T par des stimuli extracellulaires (cytokines), ce facteur subit une translocation au noyau où il peut médier ses effets au niveau de plusieurs promoteurs cellulaires ainsi qu'au niveau du LTR du VIH. (Roulston *et al.*, 1995).

3.0.3.2 *Mode d'Épissage Complexe du VIH*

En plus de l'utilisation de facteurs de transcription cellulaire pour l'expression de ses protéines, le VIH utilise à son avantage la machinerie d'épissage de la cellule infectée afin d'exprimer ses protéines (Olsen *et al.*, 1992). En effet, le VIH, voulant tirer le maximum de sa séquence codante, a développé un mécanisme très élaboré d'épissage alternatif. Or, on retrouve quatre sites donneurs d'épissage et six sites accepteurs d'épissage qui génèrent plus d'une vingtaine de transcrits différents qui codent pour les différentes protéines virales. Ces ARNms viraux peuvent être séparés en trois grandes classes: (1) les messagers non-épissés codant pour les protéines Gag, Gag-Pro-Pol, ainsi que les ARN génomiques qui seront sélectivement incorporés dans les particules bourgeonnantes; (2) les ARNm épissés une seule fois codant pour les protéines Vpu, Env, Vpr et Vif; et finalement, (3) les messagers doublement épissés qui codent pour les protéines précoces Tat, Rev, et Nef.

3.0.3.3 *Les Protéines de Régulation Virale: Tat et Rev*

Tat et Rev sont toutes deux des protéines nucléaires en plus d'être des protéines précoces durant le cycle de réplication du VIH-1. Le mode d'action de ces deux protéines est similaire du fait que la fonction de Tat et de Rev requiert des interactions avec des structures secondaires présentes sur les ARNms viraux (Karn *et al.*, 1991).

Le gène *tat* du VIH-1 code pour un ARN doublement épissé qui, après traduction, générera une petite protéine de 86 acides aminés (Arya *et al.*, 1987; Sodroski *et al.*, 1985). Tat est capable d'augmenter l'expression du LTR du VIH par des facteurs de 100 à 1000. Or, lorsque des mutations inactivant la protéine Tat sont insérées dans un provirus, la production virale est abolie (Dayton *et al.*, 1986). Donc, Tat est essentielle à la réplication du VIH *in vitro*.

Le mécanisme de transactivation de Tat est unique aux lentivirus du fait que Tat ne semble pas se lier à l'ADN, mais à une structure secondaire située à l'extrémité 5' des transcrits viraux nouvellement initiés par l'ARN polymérase II. Cette séquence en structure d'épingle à cheveux est connue sous le nom de TAR (*Tat-responsive element*) (Rosen *et al.*, 1985). Des études récentes suggèrent que la liaison de Tat à TAR engendrerait des changements conformationnels dans la structure de TAR (Aboul-ela *et al.*, 1995). De plus, certains groupes ont identifié une série de protéines cellulaires capables également de se lier à TAR (Marciniak *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991). Mais comment Tat est-il capable d'augmenter l'expression des ARNm viraux jusqu'à 1000 fois?

Quoique les premières études sur Tat ne pouvaient différencier si cette protéine agissait au niveau de l'initiation ou bien de l'élongation de la transcription, il semble aujourd'hui clair que l'action principale de Tat se concentre sur la processivité de l'ARN polymérase II, donc au niveau de l'élongation transcriptionnelle (Cullen, 1993; Garcia-Martinez *et al.*, 1995; Keen *et al.*, 1997). En fait, la transcription des ARNs du VIH en l'absence de Tat résulte en des messagers tronqués, suggérant une terminaison prématurée (Kato *et al.*, 1992). La processivité de l'ARN polymérase II est régulée par le niveau de phosphorylation de son domaine C-terminal (CTD) (Dahmus, 1995). De façon intéressante, le groupe de Herrmann et Rice (1995) a démontré qu'une kinase (TAK) pouvant s'associer avec le domaine d'activation de Tat influençait le niveau de phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II. De plus, il a été montré que l'action de Tat nécessite un CTD intact (Yang *et al.*, 1996). Récemment, le domaine catalytique du complexe TAK a été identifié en la protéine cycline T (Wei *et al.*, 1998). Donc, le mécanisme de transactivation de Tat semble impliquer une association avec le complexe TAK, ce dernier, grâce à son domaine catalytique procuré par la kinase cycline T, cause une augmentation de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II, permettant ainsi une élongation accrue des ARNm du VIH.

Une fois que la protéine Tat a agit sur le LTR du VIH, on note une importante augmentation d'ARNm viraux dans le noyau. Trois différents types d'ARNm viraux sont observés dans le noyau de la cellule infectée: l'ARN pleine longueur (9,7 kb), l'ARN simplement épissé (~4 Kb), et les ARNs doublement épissés (~2 Kb). Cependant, seulement le dernier type d'ARNm viral est efficacement transporté au cytoplasme et traduit,

produisant ainsi les protéines Tat, Rev et Nef (Robert-Guroff *et al.*, 1990). En fait, c'est l'action de la protéine Rev, essentielle à la réplication du VIH, qui permet le transport des messagers viraux mono- et non-épissés dans le cytoplasme (Malim et Cullen, 1993). La traduction de ces messagers est essentielle car ils sont responsables de la production des protéines de structure et des enzymes, ainsi que de l'ARN génomique.

Le gène *rev* du VIH-1 code pour une protéine de 116 acides aminés se localisant principalement dans le nucléole, mais qui est aussi capable de transiter entre le noyau et le cytoplasme (Meyer et Malim, 1994). Cette protéine, comme le fait Tat, se lie spécifiquement à une région sur les ARNms du VIH qui forme une structure secondaire complexe. Cette région, connue sous le nom de *Rev-responsive element* (RRE), est la séquence spécifique sur laquelle se lie Rev. Cette séquence est seulement présente dans les ARNms non-épissés ou mono-épissés (Malim *et al.*, 1990; Rosen *et al.*, 1988). Donc, cette séquence, lorsque reconnue par Rev, cause le transport nucléo-cytoplasmique des messagers viraux qui sont non-épissés ou mono-épissés (Malim *et al.*, 1989). En fait, Rev se lie au RRE sous la forme de multimère grâce à une région riche en arginines dans la moitié N-terminale de la protéine (Olsen *et al.*, 1990). Récemment, un signal d'export nucléaire (NES) riche en leucines a été identifié dans Rev (Fischer *et al.*, 1995). De plus, des interactions entre ce signal de Rev et certaines protéines faisant partie des pores nucléaires ont aussi été démontrées (Bogerd *et al.*, 1995; Fritz *et al.*, 1995). Ces études suggèrent que la protéine Rev module l'export des messagers viraux en se liant directement à une protéine, l'Exportine 1 (antérieurement appelée CRM1). Cette dernière protéine fait partie de la super-famille des karyophérines- β . Le mode d'action de Rev a récemment été revu par Emerman et Malim (1998): Lors de son entrée dans le noyau, Rev se lie et multimérise sur la structure RRE des ARNms viraux non- et mono-épissés. Ensuite, la liaison du complexe Exportine 1/Ran-GTP au NES de Rev permet l'export nucléaire des complexes ARNm-Rev. Une fois dans le cytoplasme, une GTPase hydrolyse la molécule de GTP associée à Ran en GDP permettant ainsi la dissociation du complexe Exportine 1/Ran-GDP de Rev. Finalement, grâce au signal NLS de Rev, cette dernière protéine peut ensuite retourner au noyau afin de recommencer un nouveau cycle d'exportation nucléaire des ARNm viraux non- et mono-épissés. Quant aux ARNm viraux, ils seront traduits dans le cytoplasme ou, dans le cas de certains ARNm viraux non-épissés, ils seront incorporés dans les particules virales.

4.0 Protéines de Structure

Grâce à son pouvoir d'activation transcriptionnelle (LTR et Tat), le VIH générera durant son cycle de réplication un grand nombre de molécules de la protéine Gag qui

serviront de précurseurs aux protéines de structure du virion (MA, CA, et NC et p6). Cependant, les enzymes traduites par le messenger Gag-Pro-Pol (Protéase, Transcriptase Inverse et Intégrase) sont nécessaires en moins grande quantité à l'intérieur des particules virales afin de réaliser leur fonction catalytique. Alors, comment le VIH régule-t-il l'expression des précurseurs Gag (Pr55^{gag}) et Gag-Pro-Pol (Pr160^{gag})?

Chez tous les rétrovirus, le gène *gag* est situé à l'extrémité 5' du génome viral, en amont des gènes *pro* et *pol* (voir Figure 3). De plus, chez la plupart des rétrovirus, 10 à 20 molécules de la protéine Gag sont synthétisées pour chaque précurseur Gag-Pro-Pol. Le mécanisme utilisé par le VIH afin de générer le précurseur Gag-Pro-Pol consiste en un glissement ribosomal. En effet, environ 1 fois sur 20 durant la traduction du précurseur Gag, des ribosomes glissent en arrière de 1 nucléotide provoquant un chagement de cadre de lecture (cadre de lecture -1). Ainsi, ces ribosomes ne rencontreront pas le codon stop du gène *gag* et glisseront dans le cadre de lecture des gènes *pro* et *pol*, et conséquemment synthétiseront le précurseur Gag-Pro-Pol. Donc, les rétrovirus, comme le VIH, ont développé un mécanisme afin de réguler la production du précurseur Gag-Pro-Pol tout en utilisant le même codon d'initiation que pour le précurseur Gag. Dans la partie qui suit nous discuterons brièvement du rôle de chaque composante des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol.

4.0.1 *Maturation des Précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol*

Le précurseur Gag est une polyprotéine de 55 kDa, qui après clivage par la protéase virale, générera les trois protéines de structure de la particule virale; la matrice (MA pour *membrane-associated protein*), la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC). À elle seule, la protéine Gag permet la formation de simili particules virales lorsqu'exprimée dans des cellules eucaryotes ou même dans des bactéries (Gross *et al.*, 1998). Quant au précurseur Gag-Pro-Pol, il est aussi responsable de la génération des protéines de la MA, CA et de la NC, mais en plus, il permet la synthèse des différentes enzymes virales requises à des étapes particulières du cycle de réplication.

Chez tous les rétrovirus, la partie N-terminale du précurseur Gag correspond à la matrice, une protéine de 17 kDa (p17) chez le VIH-1. Les recherches sur cette protéine ont permis d'identifier trois fonctions à la matrice. Tout d'abord, la matrice aurait un rôle crucial durant l'assemblage des particules virales. En effet, cette protéine subit une modification post-traductionnelle où un acide myristilique lui est ajouté sur une glycine en N-terminal (Henderson *et al.*, 1983). L'acide myristilique est un acide gras de 14 carbones ajouté à plusieurs protéines cellulaires afin qu'elles puissent s'associer avec les membranes de façon non-intégrale. Donc, la matrice est une protéine membranaire périphérique. Des études de mutagenèse ont démontré que cette myristilation est essentielle pour l'assemblage

des particules virales (Göttlinger *et al.*, 1989). De plus, certains groupes ont suggéré qu'une région basique quelque peu en aval du N-terminal serait aussi importante pour l'association de cette protéine avec les membranes (Zhou *et al.*, 1994). Par conséquent, le rôle principal de la matrice serait d'ancrer les précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol aux sites d'assemblage membranaire. Par ailleurs, il a été suggéré que la matrice pourrait interagir avec la queue intracytoplasmique (gp41) de la glycoprotéine de l'enveloppe. En effet, des études ont démontré que certaines délétions dans la matrice bloquaient l'incorporation de l'enveloppe à l'intérieur des particules virales (Facke *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1992).

Finalement, le rôle de la p17 dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration reste encore controversé. En effet, le travail de Gallay *et al.* suggère que seulement une petite quantité de la p17 serait associée au complexe de pré-intégration (Gallay *et al.*, 1995a). En effet, la p17 étant en association avec la membrane plasmique à l'intérieur des particules virales, il a été suggéré que sa phosphorylation pendant l'entrée du virus dans la cellule hôte induirait dans la p17 un changement conformationnel. Ce dernier changement lui permettrait de s'associer avec le complexe de pré-intégration (Gallay *et al.*, 1995a). Une fois ancrée au complexe, les signaux de localisation nucléaire (NLS) de la p17 permettraient au complexe de pré-intégration d'interagir avec la karyophérine- α , permettant ainsi son import nucléaire (Gallay *et al.*, 1996). L'import nucléaire de protéines cellulaires est présentement un champ de recherche très intense. Afin de bien comprendre les mécanismes impliqués dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration, il serait important de décrire brièvement le système classique d'import nucléaire par les karyophérines. Ce sujet a récemment été revu par Izaurralde et Adam (1998): tout d'abord, la karyophérine- α se lie directement à une protéine contenant des régions riches en acides aminés basiques, ces dernières constituant le signal de localisation nucléaire classique (NLS). Ensuite, une interaction directe entre la karyophérine- α et la karyophérine- β permet la formation d'un complexe trimérique qui est transporté jusqu'aux pores nucléaires grâce à la karyophérine- β . Finalement, la translocation du complexe NLS/ α / β à l'intérieur du noyau nécessite la protéine Ran. Cependant, le travail de Reil *et al.* a récemment démontré que des virus dans lesquels la p17 avait été complètement déléetée étaient toujours capables d'infecter des macrophages, suggérant ainsi que la p17 n'est pas absolument nécessaire pour l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (Reil *et al.*, 1998). Finalement, la structure cristallographique de la matrice a récemment été résolue. Ces études semblent suggérées que la matrice est associée aux membranes sous la forme de trimère (Hill *et al.*, 1996).

La protéine de la capsid (p24) est celle qui suit en C-terminal de la matrice. C'est cette protéine de 24 kDa, qui après clivage par la protéase virale, formera le noyau dense que l'on peut observer au centre des particules virales par microscopie électronique

(Gelderblom, 1987). Cette structure dense est connue sous le nom de “capside”. Cependant, la capsidie en plus des composantes qu’elle contient (génomme viral et autres protéines) constitue le nucléoïde du virus. En analysant la séquence primaire en acides aminés de la p24 de la plupart de rétrovirus, on peut y observer une région très conservée d’une vingtaine d’acides aminés connue sous le nom de MHR, pour *major homology region*. Cette région étant demeurée très conservée tout au cours de l’évolution des rétrovirus, ceci laisse supposer que le domaine MHR pourrait jouer un rôle important dans la fonction de la capsidie. Cependant, les analyses par mutagenèses de la région MHR n’ont pu identifier de rôle à ce domaine, même si plusieurs de ces mutations démontrent des problèmes d’assemblage (Craven *et al.*, 1995; Mammano *et al.*, 1994). Une autre particularité de la capsidie du VIH-1 est son interaction avec une protéine cellulaire, la cyclophiline A, qui est incorporée dans les virions (Luban *et al.*, 1993). En fait, il a été démontré que lorsque des cellules infectées par le VIH-1 sont traitées avec de la cyclosporine, une drogue empêchant l’incorporation de la cyclophiline A à l’intérieur des particules virales, les virus générés par ces cellules n’étaient plus infectieux (Braaten *et al.*, 1996). Certains groupes suggèrent que l’interaction entre la p24 et la cyclophiline A aurait pour but de déstabiliser la structure de la capsidie, facilitant ainsi le désassemblage des virions au début de l’infection (Gamble *et al.*, 1996). Cependant, il est intéressant de noter que l’incorporation de la cyclophiline dans le VIH-2 et dans le VIS n’a pas été observée. Finalement, la structure cristallographique de la capsidie suggère que cette dernière est présente sous la forme de dimère (Momany *et al.*, 1996).

La nucléocapsidie (NC) est la dernière protéine de structure générée par le précurseur Gag du VIH-1. Le rôle principal de cette petite protéine basique de 72 acides aminés est dans l’encapsidation de l’ARN génomique (Gorelick *et al.*, 1990). De plus, certaines études laissent suggérer que la NC aurait aussi un rôle à jouer durant l’assemblage des particules virales (Wills et Craven, 1991). Son action sur l’encapsidation du génomme viral réside dans sa capacité d’interagir directement avec l’ARN. Donc, comme plusieurs protéines pouvant s’associer aux acides nucléiques, la nucléocapsidie du VIH-1 possède deux doigts de zinc riches en cystéines et histidines. Par conséquent, ce motif interagit probablement avec la séquence d’encapsidation située près de l’extrémité 5’ du génomme viral, résultant ainsi en l’incorporation spécifique des ARNs du VIH. Il est important de rappeler que toutes ces étapes se produisent dans le contexte du précurseur Gag (p55). Par ailleurs, certaines activités ont été associées à la NC purifiée *in vitro*. En effet, il semble que cette protéine sous sa forme mature (NCp7) soit capable de faciliter la transcription inverse en favorisant l’hybridation de l’ARNt^{lys} à la séquence PBS (*primer binding site*) du génomme viral (Barat *et al.*, 1989). Finalement, on retrouve la p6^{gag}, une protéine unique au VIH. Ce domaine

semble avoir un rôle dans le relâchement des particules virales dans les étapes finales du bourgeonnement (Göttlinger *et al.*, 1991) ainsi que dans l'incorporation des protéines accessoires Vpr et Vpx (Paxton *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994).

Le précurseur Gag-Pro-Pol est aussi responsable de la génération des protéines de structure mentionnées ci-dessus. Cependant, il contient en plus les enzymes nécessaires au VIH pour sa réplication. Les enzymes contenues dans le Pr160^{gag-pol} sont les suivantes; la protéase, l'enzyme responsable de la maturation des polyprotéines du Pr55^{gag} et du Pr160^{gag-pol}; la transcriptase inverse, l'enzyme responsable de la synthèse de l'ADNc des rétrovirus; et finalement, l'intégrase, l'enzyme responsable de l'intégration de l'ADNc du VIH dans le génome cellulaire.

4.0.2 Les Glycoprotéines de l'Enveloppe du VIH

La surface externe d'un rétrovirus joue un rôle critique lors de l'attachement du virus à la cellule cible, ainsi que pendant la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. La protéine de l'enveloppe est d'abord synthétisée sous la forme d'une polyprotéine provenant d'un ARN génomique épissé où la séquence des gènes *gag*, *pro*, et *pol* a été enlevée. Cette polyprotéine est synthétisée comme toutes les protéines de surface cellulaires. Par conséquent, la traduction sera initiée sur des ribosomes libres pour ensuite continuer à la surface du réticulum endoplasmique (RE) rugueux, où la protéine Env (gp160) y sera internalisée.

À l'intérieur de RE rugueux, deux modifications co-translationnelles se produiront. Premièrement, le peptide leader, la séquence qui cible les ribosomes traduisant des protéines membranaires au RE rugueux, sera clivé par une protéase cellulaire. Deuxièmement, la gp160 sera glycosylée sur des asparagines faisant partie de la séquence canonique Asn-X-Ser/Thr, où X représente n'importe lequel des acides aminés à l'exception de la proline. Chez le VIH-1, la gp160 comptera approximativement une trentaine d'asparagines glycosylées (Coffin *et al.*, 1997). Finalement, comme les ribosomes approchent de la fin de l'ARNm du gène *env*, une longue région hydrophobique émergera afin d'ancrer la protéine Env dans la membrane du RE rugueux de façon intégrale. Ces dernières modifications se produisent durant le transport de la protéine du RE à l'appareil de Golgi.

C'est dans ce dernier compartiment que la gp160 glycosylée sera clivée par la furine (protéase cellulaire) donnant ainsi deux sous-unités: la gp120 (glycoprotéine de surface-SU) et la gp41 (unité transmembranaire-TM) (Hallenberger *et al.*, 1992). Ces deux sous-unités demeureront associées par des liens non-covalents. De plus, il est intéressant de noter que seulement un faible pourcentage (de 5-10%) de ces complexes arrivent à la surface

alors que le reste est dégradé à l'intérieur de la cellule par différents mécanismes (Willey *et al.*, 1988).

Enfin, avant que la protéine Env se dirige à la surface cellulaire, il est nécessaire qu'elle ait acquise une conformation correcte et qu'elle se soit assemblée en une structure oligomérique. Il semble de plus en plus certain que la structure oligomérique de la protéine Env soit sous la forme d'un trimère (Chan *et al.*, 1997). Afin de prévenir des interactions indésirables avec d'autres protéines du RE rugueux ou bien un assemblage dans une conformation inadéquate, des protéines chaperonnes comme la calnexine et la calréticuline (Bergeron *et al.*, 1994) semblent interagir avec la protéine Env (Otteken *et al.*, 1996). Ces interactions préviendraient le transport à la surface cellulaire de protéines assemblées de façon incomplète. Récemment, la structure cristallographique de la gp120 en complexe avec la molécule CD4 et un anticorps neutralisant a été résolue (Kwong *et al.*, 1998). Ceci permettra une meilleure compréhension du mécanisme d'entrée du VIH dans une cellule hôte.

5.0 Assemblage et Bourgeoisement des Particules Virales

Le transfert de l'ARN génomique d'un rétrovirus d'une cellule à une autre nécessite un assemblage en des structures créant un virus infectieux. Cet assemblage reste encore un processus mal compris par les scientifiques. D'une façon simpliste, l'assemblage d'une particule virale du VIH-1 pourrait se décrire comme suit: une fois que les polyprotéines Gag, Gag-Pro-Pol et Env sont synthétisées, elles se rassemblent (avec deux molécules d'ARN génomique et les amorces d'ARNt) à un site commun à la surface de la membrane plasmique. Ce sont ensuite les protéines Gag, en groupes d'environ 2000 molécules, qui, à elles seules, dirigeront l'assemblage et le relargage de nouvelles particules virales. Mais quelles régions de Gag sont importantes pour cet assemblage?

Trois domaines distincts permettant différents types d'interactions ont été identifiés dans le Pr55^{gag}. Ils ont été nommés les domaines M (*membrane binding*), I (*interaction*), et L (*late*). Le domaine M cible le précurseur Gag à la région d'assemblage de la membrane plasmique et permet son ancrage dans celle-ci; le domaine I représente les régions importantes pour les interactions Gag-Gag; et le domaine L est important dans des étapes tardives du bourgeoisement, plus précisément au moment de la séparation du virus et de la cellule.

Donc, une fois que les Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} sont synthétisés, ils seront transportés du site de synthèse jusqu'à la membrane plasmique par des voies de transport encore méconnues. C'est ensuite, grâce au domaine M localisé dans la région N-terminale de la matrice (p17), que ces précurseurs seront ancrés dans la membrane plasmique à l'aide d'un

résidu glycine myristilé. Cependant, il est intéressant de noter que cette association avec la membrane n'est pas nécessaire aux précurseurs Gag afin d'interagir avec d'autres Pr55^{gag}. En effet, des expériences utilisant des mutants de Gag incapables de s'associer aux membranes ont démontré que ces molécules de Gag peuvent être recrutées dans des virions lorsqu'elles sont co-exprimées en présence de précurseurs Gag de type sauvage (Parent *et al.*, 1996). Ceci suggère fortement que des interactions Gag-Gag se produisent avant l'arrivée de ces protéines à la surface cellulaire. En fait, cette suggestion est aujourd'hui confirmée par l'observation que des précurseurs Gag, purifiés à partir d'un système d'expression bactérien, peuvent s'assembler en des structures tubulaires complexes *in vitro* en l'absence de membranes (Campbell et Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1998). De plus, ces résultats suggèrent que des molécules d'ARN (virales ou d'autres origines) sont absolument nécessaires pour cet assemblage *in vitro*.

Quelles régions de Gag sont importantes pour les interactions Gag-Gag? Une région majeure d'interaction Gag-Gag (le domaine I) se concentre essentiellement aux séquences de la NC (Burniston *et al.*, 1998; Carriere *et al.*, 1995). En effet, lorsqu'un provirus subit une délétion de la NC, deux phénotypes peuvent être observés. Tout d'abord, comme la NC est essentielle pour l'encapsidation de l'ARN génomique, les particules virales ayant été générées par ces provirus seront exemptes de molécules d'ARNs (Gorelick *et al.*, 1990). De plus, ces provirus sont affectés au niveau du bourgeonnement, ce dernier étant grandement diminué (Weldon et Wills, 1993). Certaines hypothèses suggèrent que les interactions Gag-Gag auraient lieu après ou pendant l'attachement à l'ARN génomique (Linial et Miller, 1990; Méric et Goff, 1989). Dans ce modèle, l'ARN génomique viral agirait comme une structure où les précurseurs Gag se condenseraient et interagiraient.

Subséquentement, l'association des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol engendrera une courbature dans la membrane plasmique correspondant ainsi au début du bourgeonnement. Ainsi, les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) ancrées dans la membrane plasmique se concentreront à la surface des particules virales en formation. L'ARN génomique viral sera, comme mentionné ci-dessus, encapsidé grâce à la portion p7^{gag} (NC) du précurseur p55. L'assemblage des virions se termine par le relâchement des particules immatures. Comment les 2000 molécules de la protéine Gag causent ce bourgeonnement n'est pas encore clairement compris. Cependant, certains mutants de Gag sont incapables de produire des particules virales malgré l'accumulation de précurseurs Gag à la membrane plasmique (Göttlinger *et al.*, 1991). Cette région dans le Pr55^{gag} permettant la séparation physique des membranes de la cellule et du virus a été désignée domaine L pour son rôle tardif (*late*) durant le bourgeonnement. Chez le VIH-1, la région L se situe dans l'extrémité N-terminale du domaine p6^{gag} du précurseur p55.

Suite au bourgeonnement, la particule virale immature est maintenant recouverte d'une bi-couche de phospholipides provenant de la cellule hôte, c'est à ce moment que la maturation virale débute. Cette dernière étape est effectuée par la protéase virale qui se trouve à l'intérieur de la polyprotéine Gag-Pro-Pol. Donc, c'est à l'intérieur des particules virales immatures que l'homo-dimérisation de la protéase rendra active cette enzyme permettant ainsi le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol. La protéase du VIH agit spécifiquement sur les polyprotéines pour créer les protéines de structure (MA (p17); CA (p24); NC (p7); p6^{gag}). De plus, la protéolyse des polyprotéines Gag-Pro-Pol générera aussi les enzymes virales (protéase, transcriptase inverse et intégrase). C'est suite à cette étape de maturation, durant laquelle le noyau dense du nucléoïde devient visible au microscope électronique, que la particule virale devient infectieuse (Haseltine, 1991).

6.0 Les Protéines Auxiliaires du VIH

Les rétrovirus simples contiennent trois longs cadres de lecture codant pour les gènes *gag*, *pol*, et *env*, qui constituent les protéines de structure et les enzymes nécessaires pour la réplication virale. Cependant, le VIH-1 possède aussi au moins six autres cadres de lecture codant pour les protéines auxiliaires Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu et Vpr. Nous avons abordé les protéines Tat et Rev dans la section discutant des mécanismes de régulation de l'expression génique du VIH. Dans les prochaines sections nous décrirons brièvement les protéines accessoires du VIH; Nef, Vif et Vpu, ensuite, nous analyserons en plus grand détail la protéine Vpr.

6.0.1 Les Protéines Accessoires du VIH

De plus en plus d'études indiquent que les autres protéines auxiliaires, connues sous le nom de protéines "accessoires" parce que non-essentiels à la réplication *in vitro*, jouent un rôle important *in vivo*. En fait, des évidences récentes démontrent que la présence de ces protéines serait importante pour une réplication optimale, spécialement dans les cellules primaires (Emerman et Malim, 1998; Miller et Sarver, 1997). La partie qui suit présentera un survol des protéines accessoires Nef, Vif et Vpu.

6.0.2.1 La Protéine Nef

Le gène *nef* (*numerous effet factor*), codant pour une protéine de 25 à 27 kDa, est exprimé de façon rev-indépendante très tôt durant l'infection du VIH (Robert-Guroff *et al.*, 1990). Cette protéine subit deux types de modifications post-traductionnelles; la phosphorylation et la myristilation (Betres et Ratner, 1994; Harris et Neil, 1994). Il est aujourd'hui clair que Nef agit de façon positive au niveau de l'infection du VIH (deRonde *et*

al., 1992; Sinclair *et al.*, 1997; Zazopoulos et Haseltine, 1993). Quoique cette protéine ne soit pas requise à la réplication virale en culture cellulaire, les études chez les modèles animaux ont permis de montrer l'importance de cette protéine dans la pathogenèse associée au SIDA. En effet, l'infection de singes par un virus où le gène *nef* a été délété a démontré une faible charge virale sanguine ainsi que l'absence de symptômes relatifs au SIDA (Kestler *et al.*, 1991). Les travaux récents suggèrent que Nef exerce au moins trois activités distinctes dans les cellules infectées.

Le rôle de Nef dans la modulation négative des molécules CD4 à la surface des cellules infectées fut la première activité biologique identifiée à cette protéine (Garcia et Miller, 1991). L'effet de Nef sur la régulation négative de CD4 à la membrane cellulaire est médié par une endocytose accrue de cette dernière molécule qui serait subséquentement dégradée dans les lysosomes (Emerman et Malim, 1998; Cullen, 1998). Cet effet de Nef ne semble pas être exclusif à CD4 puisqu'un effet similaire a été démontré pour les molécules du CMH de classe I (Schwartz *et al.*, 1996). Cette action sur les molécules du CMH de classe I correspond à la deuxième activité biologique de la protéine Nef dans les cellules infectées. Des évidences récentes suggèrent que des interactions entre Nef et le complexe d'adaptines AP-2 seraient à l'origine du recrutement des molécules transmembranaires CD4 et CMH I à l'intérieur de vésicules tapissées de clathrine (Le Gall *et al.*, 1998; Piguet *et al.*, 1998).

En plus de la contribution probable que joue la modulation négative des molécules CD4 dans l'effet positif de Nef sur l'infectivité virale, il semble que Nef puisse aussi augmenter l'infectivité virale de manière CD4-indépendante (Spina *et al.*, 1994). Les virions produits en présence ou en absence de Nef ne démontrent aucune différence en terme d'activité reverse transcriptase, d'attachement, et d'entrée dans les cellules infectées. Par ailleurs, cet effet sur l'infectivité virale ne peut être complété par l'expression de Nef dans les cellules cibles. Ces observations suggèrent donc que l'action de Nef se produit durant l'assemblage virale (Cullen, 1998). Certaines observations récentes démontrant la présence de Nef dans les particules virales suggèrent de nouvelles voies sur l'action de Nef dans le cycle viral (Bukovsky *et al.*, 1997; Welker *et al.*, 1996). Par ailleurs, une étude démontrant une interaction entre Nef et une kinase cellulaire suggère que Nef pourrait recruter certaines kinases aux sites d'assemblage viral, ce qui pourrait aussi affecter l'infectivité virale (Swingler *et al.*, 1997).

6.0.2.2 La Protéine Vpu

Le gène *vpu* est retrouvé chez le VIH-1 et chez le VIS_{cpz}, mais chez aucun autre rétrovirus (Cohen *et al.*, 1988; Myers *et al.*, 1994). Il code pour une petite protéine membranaire de 81 acides aminés qui peut former des complexes oligomériques (Cohen *et*

al., 1988; Maldarelli *et al.*, 1993) . L'expression de la protéine Vpu se fait à partir d'un ARN bicistronique codant aussi pour la protéine Env (Schwartz *et al.*, 1990). Les études initiales sur Vpu ont démontré que les provirus délétés de ce gène étaient inefficaces dans leur relâchement de particules virales (Strebel *et al.*, 1988; Terwilliger *et al.*, 1989).

L'expression du gène *vpu* a permis d'identifier deux activités biologiques à cette protéine. Premièrement, Vpu permet un relargage efficace des protéines Gag de la surface des cellules (Geraghty et Panganiban, 1993; Yao *et al.*, 1992). De façon intéressante, cette activité de Vpu agit sur le VIH-1, mais aussi sur d'autres rétrovirus, suggérant ainsi que Vpu module le relâchement virale en modifiant des facteurs cellulaires (Göttlinger *et al.*, 1993). De plus, certaines études suggèrent que chez le VIH-2, une famille du VIH qui ne code pas pour le gène *vpu*, le domaine transmembranaire de la protéine Env (gp41) remplacerait cette dernière fonction de Vpu (Bour *et al.*, 1996).

La deuxième activité associée à Vpu est sa capacité d'induire la dégradation des molécules CD4. Contrairement à l'effet de Nef sur les molécules CD4 ayant déjà atteint la surface cellulaire, Vpu module négativement les molécules CD4 qui sont en route vers la membrane plasmique. En fait, la protéine Vpu se lie aux molécules CD4 dans le RE et cible ces dernières aux voies de dégradation par le système d'ubiquitine-protéasome cytosolique (Schubert *et al.*, 1998). De plus, les études récentes du groupe de Margottin *et al.* ont permis l'identification d'une protéine cellulaire, β -TrCP, interagissant avec Vpu, qui agirait comme connecteur entre le complexe Vpu/CD4 et le facteur de dégradation Skp1p Margottin *et al.*, 1998) . Donc, il semble que le VIH ait développé des mécanismes afin de réduire les interactions Env-CD4 au niveau du RE (Vpu) et à la surface cellulaire (Nef). Ceux-ci permettraient possiblement un meilleur transport de la glycoprotéine de l'enveloppe à la surface cellulaire (grâce à l'effet de Vpu) et préviendraient les interactions Env-CD4 à la membrane plasmique cellulaire (grâce à l'effet de Nef), interactions qui pourraient empêcher l'incorporation de la protéine Env à la surface des virions. Cette fonction redondante des protéines Vpu et Nef permet probablement une augmentation de la production et de l'infectivité virale, de plus, pourrait contribuer à la dérégulation de la surveillance immunitaire.

Finalement, Vpu étant une protéine membranaire, certains groupes ont suggéré qu'elle pourrait former des canaux ioniques dans les cellules infectées (Ewart *et al.*, 1996) . Cependant, ces études restent encore contestées (Coady *et al.*, 1998).

6.0.2.3 La Protéine Vif

Le gène *vif* (viral infectivity factor) code pour une protéine de 23 kDa (Sodroski *et al.*, 1986). L'accumulation de cette protéine est observée tardivement au cours du cycle de

réplication et coïncide donc avec la production virale (Arrigo et Chen, 1991). Les études initiales sur la fonction de cette protéine en utilisant des provirus *vif*⁻ ont mis en évidence un rôle pour Vif dans les étapes d'assemblage et de la morphogénèse du virus (Höglund *et al.*, 1994). En effet, les virions produits en absence de cette protéine sont 1000 fois moins infectieux que ceux produits en présence de Vif, même si la production virale est similaire (Fischer *et al.*, 1987; Sodroski *et al.*, 1986). Par contre, seulement l'infection par les virus libres est affectée tandis que la transmission cellule-cellule se produit efficacement en absence de Vif (Fan et Peden, 1992).

Certains groupes ont rapporté l'implication de Vif dans le processus d'infection et de propagation du virus dans des cultures primaires de lymphocytes et de macrophages (Gabuzda *et al.*, 1992; Gabuzda *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994). En revanche, il est maintenant clair que certaines cellules en culture établie se sont avérées dépendantes de l'expression de la protéine Vif pour la réplication virale. Cette dépendance pourrait être due à la présence d'un facteur cellulaire dans les cellules permissives (facteur dépendant de la présence de Vif afin de produire des particules virales infectieuses) pouvant compléter la fonction de Vif; ou bien, pourrait être due à un effet de Vif sur un facteur qui inhibe la réplication virale dans les cellules non-permissives (Sakai *et al.*, 1993). En résumé, la protéine Vif du VIH-1 doit être présente dans les cellules productrices de virions. L'effet de cette protéine s'exerce au début de l'infection d'une cellule hôte, car l'absence de cette protéine dans les cellules productrices de particules virales résulte en un blocage de l'infection subséquente quelque peu après l'entrée virale dans la cellule hôte. En fait, la protéine Vif se localise principalement aux sites d'assemblage près de la membrane plasmique dans les cellules productrices. Ceci suggère que Vif module l'assemblage des virions afin de faciliter l'entrée du virus lors des infections subséquentes (Simon et Malim, 1996; Simon *et al.*, 1997).

7.0 Les Protéines Accessoires Vpr et Vpx (Figure 5)

Le gène *vpr* (viral protein R), le sujet du présent travail, code pour une petite protéine de 96 acides aminés (~15 kDa) qui est exprimée tardivement de façon Rev-dépendante au cours du cycle viral (Arrigo et Chen, 1991; Cohen *et al.*, 1990b). Tous les rétrovirus de primates possèdent ce cadre de lecture ouvert, qui est d'ailleurs bien conservé chez la plupart des isolats du VIH-1, VIH-2 et du VIS (Chakrabarti *et al.*, 1987; Fukasawa *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1989). Ceci suggère l'importance de cette protéine dans le cycle de réplication des lentivirus. Les génomes du VIH-2 et du VIS, quant à eux, codent pour une autre protéine, Vpx, qui possède des homologies structurales et fonctionnelles avec la protéine Vpr. Selon certaines hypothèses, une duplication du gène *vpr* dans un rétrovirus

ancestral du groupe VIH-2/SIV_{mac} pourrait avoir été à l'origine de l'apparition du gène *vpx* (Tristem *et al.*, 1992; Tristem *et al.*, 1990). Cependant, il a récemment été suggéré qu'une acquisition de gène (recombinaison) plutôt qu'une duplication serait à l'origine du gène *vpx* (Sharp *et al.*, 1996). Dans cette dernière partie de la revue de littérature nous nous concentrerons sur la protéine Vpr du VIH-1, cependant, nous ferons aussi quelques comparaisons entre les protéines Vpr et Vpx du VIH-2 et du VIS.

Afin de pouvoir décrire Vpr et comprendre ses modes d'actions, il est important d'aborder la structure de cette protéine. Quoiqu'aucune structure cristallographique n'aie encore été définie, plusieurs analyses par mutagenèse et à l'aide d'ordinateurs ont été réalisées. La Figure 5 résume bien les résultats ayant été obtenus par plusieurs groupes sur la structure de la protéine Vpr. Les analyses faites par plusieurs laboratoires suggèrent la présence d'au moins deux régions en hélice alpha dans cette protéine: une première située en N-terminal et la deuxième dans le centre de Vpr (Roques *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1995). L'hélice alpha située en N-terminal de la protéine couvre approximativement les acides aminés 16 à 30, tandis que l'hélice centrale est constituée des acides aminés 53 à 74 (Mahalingam *et al.*, 1997; Mahalingam *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1995). La structure secondaire de la région située entre les deux hélices (aa 30 à 52) n'est pas encore bien définie. Cependant, une analyse récente utilisant la technique RMN suggère que cette région formerait un tour- β (Luo *et al.*, 1998). Finalement, les deux extrémités de Vpr (aa 1-15 et 74-96) ne semblent pas avoir de structures très ordonnées (Yao *et al.*, 1995).

7.0.1 Incorporation de Vpr dans la Particule Virale

Une propriété importante de la protéine Vpr du VIH-1 est son incorporation spécifique à l'intérieur des particules virales lors de l'assemblage (Cohen *et al.*, 1990a). De plus, il est aujourd'hui clair que ni la glycoprotéine de l'enveloppe, ni l'ARN génomique viral sont impliqués dans l'incorporation virale de Vpr (Lavallée *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1993; Paxton *et al.*, 1993). Puisque la protéine Vpr ne fait pas partie des polyprotéines précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol}, elle doit utiliser un mécanisme indépendant afin de pouvoir s'associer aux particules virales en voie d'assemblage. Lavallée *et al.* a démontré que la protéine Vpr pouvait être incorporée en *trans* à l'intérieur de simili particules virales provenant de l'expression du Pr55^{gag} seul, suggérant que le domaine d'incorporation de Vpr faisait partie du précurseur Gag (Lavallée *et al.*, 1994). Subséquemment, plusieurs groupes ont démontré que le domaine p6 situé à l'extrémité C-terminale du Pr55^{gag} était essentiel pour l'incorporation de Vpr à l'intérieur des particules virales (Checroune *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1995; Paxton *et al.*, 1993). De plus, le transfert du domaine p6 du

VIH-1 à d'autres rétrovirus comme le virus leucémique murin de Moloney (MLV) ou le virus du Sarcome de Rous (RSV), qui ne possède pas de domaine p6, permet l'incorporation efficace de Vpr à l'intérieur de ces virus (Kondo *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995). Ces études génétiques suggèrent donc que le domaine p6 est nécessaire et suffisant pour l'incorporation de Vpr dans les particules virales. Une analyse plus approfondie de la région nécessaire à l'incorporation de Vpr dans le Pr55^{gag} a permis d'identifier un motif très conservé dans l'extrémité C-terminale du domaine p6, L-X-S-L-F-G, essentiel pour l'encapsidation de Vpr dans les virions (Checroune *et al.*, 1995; Kondo et Göttlinger, 1996; Lu *et al.*, 1995). Donc, en se basant sur les évidences mentionnées ci-dessus, le mécanisme d'incorporation de la protéine Vpr dans les particules virales suggère une interaction entre Vpr et le domaine p6 du Pr55^{gag}.

Cependant, malgré plusieurs tentatives, aucune évidence d'interaction directe entre Vpr et la forme mature du domaine p6 n'a pu être démontrée (De Rocquigny *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1996). Par contre, des interactions entre Vpr et d'autres régions du Pr55^{gag} ont été décrites. Particulièrement, des évidences *in vitro* suggèrent que la nucléocapside (NCp7) du précurseur Gag interagit directement avec la protéine Vpr et que ces interactions pourraient jouer un rôle dans l'incorporation virale de Vpr (De Rocquigny *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1996). De plus, certaines interactions entre Vpr et la matrice (p17) ont été observées en utilisant le système des deux-hybrides (Sato *et al.*, 1996).

En ce qui concerne Vpr, plusieurs études ont permis l'identification de la région de Vpr nécessaire pour son incorporation dans les particules virales. La principale conclusion de ces différentes études est que l'intégrité de l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale de Vpr est importante pour son encapsidation. En fait, des mutations ponctuelles perturbant cette structure en hélice alpha ou bien modifiant sa surface hydrophobique ou hydrophilique, amène une perte presque totale de l'incorporation de Vpr dans les virions (Di Marzio *et al.*, 1995; Mahalingam *et al.*, 1997; Mahalingam *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1995). La localisation de Vpr à l'intérieur des particules virales reste encore incertaine. Un certain travail fait par microscopie électronique et immunomarquage a suggéré que la protéine Vpr du VIH-1 se localisait sous l'enveloppe virale, en co-localisation avec la protéine p24^{gag} de la capsid (Wang *et al.*, 1994). Cependant, une étude plus récente faite avec la protéine Vpx du VIH-2 suggère que cette dernière est présente en quantité abondante à l'intérieur du nucléoïde du virion (Kewalramani et Emerman, 1996). Cette localisation dans le nucléoïde du virus serait plus en accord avec la fonction de Vpr du VIH-1 et Vpx du VIH-2 dans le transport du complexe de pré-intégration au noyau des cellules infectées.

7.0.2 Activités Biologiques de Vpr

7.0.2.1 Import nucléaire du Complexe de pré-intégration

Tel que mentionné dans la section 3.0.2, le pouvoir nucléophile du complexe de pré-intégration est dû à trois protéines associées aux virions; Vpr, la matrice (p17) et l'intégrase. Contrairement à la matrice et à l'intégrase, où un signal de localisation nucléaire classique (NLS) a clairement été démontré (Gallay *et al.*, 1997; Gallay *et al.*, 1995b), Vpr ne semble pas avoir de NLS typique. En effet, il semble que l'action de Vpr dans le transport du complexe de pré-intégration ne soit pas médiée par les systèmes classiques d'import nucléaire des protéines, ce qui fût observé pour la matrice et l'intégrase qui interagissent avec la karyophérine- α (Gallay *et al.*, 1997; Gallay *et al.*, 1995a). En fait, des travaux récents démontrent aussi une interaction entre Vpr et la karyophérine- α ainsi qu'avec la nucléoporine Nsp1 (Fouchier *et al.*, 1998; Popov *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998). Cependant, cette interaction entre Vpr et la karyophérine- α aurait pour but d'augmenter la sensibilité de cette dernière à reconnaître le NLS de la p17, qui serait un NLS faible (Popov *et al.*, 1998). Or, ces interactions seraient cruciales pour la localisation nucléaire de Vpr ainsi que pour son action favorisant l'infection de macrophages (Vodicka *et al.*, 1998). Donc, il semble que la protéine Vpr agit comme une karyophérine- β permettant le positionnement du complexe de pré-intégration aux pores nucléaires (Fouchier *et al.*, 1998; Popov *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998). Malgré tout, le mécanisme par lequel le VIH cible son complexe de pré-intégration aux noyaux des cellules infectées est encore mal défini et reste encore à éclaircir.

Quant au domaine de Vpr nécessaire pour son action dans le transport du complexe de pré-intégration, les données sont contradictoires. Certains groupes suggèrent que l'hélice centrale de Vpr est nécessaire pour l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et pour sa localisation nucléaire (Nie *et al.*, 1998; Subbramanian *et al.*, 1998a). D'autres évidences suggèrent que Vpr possède deux signaux de localisation nucléaire non-classiques, un en N-terminal et l'autre au C-terminal, permettant l'import nucléaire de protéines hétérologues (Jenkins *et al.*, 1998). Finalement, un travail récent suggère que seulement la partie N-terminale de Vpr possède un NLS (Karni *et al.*, 1998).

7.0.2.2 Induction d'un Arrêt du Cycle Cellulaire par Vpr

L'observation que Vpr, en absence de tout autres protéines virales, pouvait induire la différenciation ainsi qu'un arrêt de croissance dans des cellules de rhabdomyosarcome démontrait pour la première fois que cette protéine avait la capacité de modifier des processus de base dans la cellule (Levy *et al.*, 1993). Présentement, nous savons que Vpr est capable de causer un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂ dans la plupart des types

cellulaires (Levy, 1998; Di Marzio *et al.*, 1995; He *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995; Ayyavoo *et al.*, 1997). Cet effet est aussi observé chez les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, ainsi que chez *E. coli*, où l'expression de Vpr induit un arrêt de la croissance ainsi que le gonflement de ces cellules (Bodéus *et al.*, 1997; Macreadie *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1996). L'étude des protéines cellulaires impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence une hyper-phosphorylation de la protéine p34cdc2 (He *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Comme Vpr ne semble pas interagir directement avec cette dernière protéine, il est donc probable que l'hyper-phosphorylation de cdc2 soit le résultat d'événements en amont (Re *et al.*, 1995). En fait, quelques évidences suggèrent que Vpr pourrait activer la protéine phosphatase 2A (PP2A) avec l'aide de la NCp7 (Lim *et al.*, 1997). Cependant, le mécanisme par lequel Vpr semble augmenter l'activité de PP2A n'est pas encore très clair.

Par ailleurs, des interactions entre des protéines impliquées dans la réparation de dommages à l'ADN, comme l'Uracil DNA glycosylase (UDG) et HHR23A, et Vpr ont été démontrées (Bouhamdan *et al.*, 1996; Withers-Ward *et al.*, 1997). L'importance de ces interactions dans le développement de l'arrêt en G₂ reste encore à déterminer. Finalement, certains travaux ont clairement démontré que l'arrêt du cycle cellulaire médié par Vpr mène éventuellement à la mort en apoptose de ces cellules (Poon *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998).

7.0.3 Rôles fonctionnels de Vpr

Plusieurs études suggèrent que la présence du gène *vpr* dans un provirus confère plusieurs avantages au niveau de la production virale, tout particulièrement dans les cellules quiescentes comme les macrophages et les monocytes (Connor *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1990; Westervelt *et al.*, 1992). À ce jour, deux activités biologiques de Vpr semblent être responsables de ces effets sur la réplication *in vitro* du VIH-1; premièrement, Vpr, dans les cellules en division (comme les lymphocytes CD4⁺) cause un arrêt dans la phase G₂ du cycle cellulaire. A l'opposé, dans les cellules quiescentes (macrophages et monocytes), la protéine Vpr est associée au transport actif du complexe de pré-intégration du cytoplasme au noyau des cellules infectées. L'importance de ces activités de Vpr dans l'infection du VIH-1 sera discutée dans les sections suivantes.

7.0.3.1 Le Rôles Précoces de Vpr

Comme décrits en détails dans la section 7.0.1, la protéine Vpr est sélectivement incorporée dans les particules virales. Donc, comme elle est présente dans les virions, elle est disponible au tout début de l'infection d'une cellule. En fait, les études initiales sur

l'incorporation de cette protéine accessoire suggéraient la possibilité que cette protéine ait une fonction très précoce immédiatement après l'entrée virale (Cohen *et al.*, 1990b). Cette hypothèse fut formellement démontrée lorsqu'un certain groupe observa que la présence de Vpr lors de l'infection de cellules quiescentes facilitait la localisation nucléaire de l'ADN proviral (Heinzinger *et al.*, 1994). Cet avantage qui caractérise le VIH lui permet d'infecter une plus grande variété de cellules, notamment des cellules quiescentes. Ces cellules, comme les macrophages, monocytes ainsi que les cellules neuronales, servent de sanctuaires au virus lui permettant de rester à l'abri de la surveillance immunitaire. De plus, chez les patients infectés par le VIH qui sont en traitement, la présence de cellules chroniquement infectées qui ont une demi-vie assez longue (> 6 mois à 1 an) limite l'éradication de l'infection suite aux thérapies anti-virales actuelles.

Par ailleurs, la capacité de VIH à transporter son complexe de pré-intégration de façon active aux noyaux des lymphocytes CD4⁺, cellules qui représentent près de 99% des cellules productrices de virions chez un individu infecté, est aussi importante. En effet, les lymphocytes CD4⁺ infectés ayant une demi-vie extrêmement courte (1,5 jour), il est important pour le provirus d'accéder rapidement au noyau afin d'optimiser la production de particules virales infectieuses et ceci sans prérequis de division cellulaire. Donc, l'implication de Vpr dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration semble avoir un rôle fonctionnel important dans la pathogenèse de l'infection du VIH.

Récemment, une autre fonction a été démontrée pour la protéine Vpr encapsidée dans les virions. Nous savons que son action dans l'import du complexe de pré-intégration est particulièrement importante dans les cellules qui ne sont pas en division. Cependant, la présence de Vpr à l'intérieur des virions est-elle importante au début de l'infection des cellules en division. Des travaux récents ont démontré que les protéines Vpr incorporées dans les virions engendrent l'arrêt du cycle cellulaire de cellules en division en absence d'expression de toute autres protéines virales (Hrimech *et al.*, 1998; Poon *et al.*, 1998). De plus, les molécules de Vpr associées aux virions semblent démontrer un effet transcriptionnel positif sur le LTR du VIH dans les cellules en division (Hrimech *et al.*, 1998). Le pouvoir trans-activateur de Vpr avait été démontré auparavant (Cohen *et al.*, 1990b). De plus, certaines études suggèrent que Vpr collabore avec plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'activation de la transcription basale du VIH (Sawaya *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995; Agostini *et al.*, 1996; Felzien *et al.*, 1998).

Donc, il semble que l'incorporation virale de Vpr soit plus importante que prédite auparavant, et que cette incorporation virale aurait deux fonctions différentes dans deux types cellulaires différents. Plus précisément, les molécules de Vpr associées aux virions aident la translocation du complexe de pré-intégration dans les cellules quiescentes, tandis

que dans les cellules en division, elles permettraient une période de production virale allongée en entraînant un arrêt du cycle cellulaire en G₂. Ceci serait d'ailleurs en accord avec d'autres travaux récents suggérant que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂ causé par Vpr procure un environnement où la transcription des LTR du VIH est la plus active (Goh *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998). Il semble donc que la protéine Vpr associée au virions fonctionne comme une protéine "immediate early" afin de favoriser l'infection et la réplication virale (Hrimech *et al.*, 1998).

7.0.3.2. Rôles de Vpr exprimée de novo

Les études initiales sur les fonctions de Vpr ont déterminé que cette protéine avait un faible pouvoir de trans-activateur sur le LTR du VIH, ainsi que sur certains promoteurs hétérologues (Cohen *et al.*, 1990b). Cependant, comme mentionné ci-dessus, les études récentes semblent suggérer que la trans-activation causée par Vpr soit importante tôt dans l'infection du VIH lorsque le puissant trans-activateur Tat n'est pas encore présent (Hrimech *et al.*, 1998). Alors quelle est la fonction tardive de Vpr durant le cycle de réplication? Afin de répondre à cette question, il est important d'aborder une propriété particulière de Vpr. Tout d'abord, il est clair que la localisation de Vpr, lorsqu'exprimée en absence d'autres protéines du VIH, est principalement nucléaire (Lu *et al.*, 1993). Cependant, lorsque Vpr est exprimée en présence de la protéine Gag (Pr55^{gag}), la localisation cellulaire de Vpr est aussitôt re-dirigée vers la membrane plasmique (Wang *et al.*, 1994). Cette redistribution cellulaire de Vpr serait importante afin de diminuer la cytotoxicité qu'engendre l'effet d'apoptose de Vpr (Stewart *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'expression *de novo* de Vpr se fait approximativement en même temps que celle de la protéine Gag. En se basant sur les études suggérant l'importance de l'incorporation virale de Vpr dans l'infection de cellules quiescentes ainsi que les cellules en division, il est tentant de spéculer que la fonction principale de Vpr exprimée *de novo* soit d'être encapsidée dans les virions pour le prochain cycle d'infection viral. Des études récentes suggèrent aussi que les molécules de Vpr exprimées *de novo* seraient importantes pour le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte (Hrimech *et al.*, 1998). D'autres études seront nécessaires afin de définir les rôles de l'expression de Vpr *de novo*.

7.0.4. Partenaires Cellulaires de Vpr

Afin de clarifier les mécanismes d'action de Vpr, plusieurs approches ont été utilisées pour identifier les partenaires cellulaires de cette protéine. Ces différentes approches ont permis l'identification de plusieurs protéines qui interagissent directement ou indirectement avec Vpr. En fait, Vpr semble interagir avec des facteurs cellulaires impliqués

dans trois différentes fonctions. Tout d'abord, Vpr interagit avec des protéines impliquées de la voie de transport cyto-nucléaire, karyophérine- α et nucléoporines, tel que décrit précédemment. De plus, certaines études avaient démontré une interaction entre Vpr et une protéine de 180 kDa appelée RIP (*Vpr interacting protein*). Cette protéine qui s'accumule dans le noyau des cellules pourrait être responsable de la localisation nucléaire de Vpr (Zhao *et al.*, 1994). Une autre protéine qui interagit avec Vpr et qui pourrait jouer ce même rôle est une protéine de 41 kDa qui est complexée au récepteur des glucocorticoïdes (Refaeli *et al.*, 1995) .

Deuxièmement, Vpr interagit avec des protéines impliquées dans les voies de réparation de l'ADN. Les protéines Uracil DNA Glycosylase (UDG) (Bouhamdan *et al.*, 1996) et HH23A (Withers-Ward *et al.*, 1997) faisant partie de ce groupe. De plus, un travail récent du groupe de Bouhamdan *et al.* a permis de déterminer un motif d'acides aminés capable d'interaction avec la protéine Vpr. Un criblage fait par "phage-display" a identifié le motif WxxF comme interagissant avec la protéine Vpr (BouHamdan *et al.*, 1998). En effet, un peptide contenant deux de ces motifs fusionnés à la protéine chloroamphénicol acétyl transférase (CAT) a permis l'incorporation virale de cette dernière fusion grâce à l'interaction directe entre Vpr et ce peptide contenant les motifs WxxF. De plus, il a été suggéré que les interactions entre Vpr et les protéines UDG et TFIIB seraient dues à un motif WxxF dans ces dernières protéines.

Finalement, Vpr interagit et collabore avec des facteurs régulant la transcription basale du LTR du VIH (p300, NF- κ B, p53) ou faisant partie du complexe de transcription (TFIIB, Sp1). En effet, des études biochimiques de retardement de bandes sur gel ont démontré une association entre Vpr et le facteur de transcription Sp1 (Wang *et al.*, 1995). Ce facteur possède des sites de liaison dans le LTR du VIH-1 et il a été postulé que Vpr pourrait agir comme un stabilisateur des complexes d'initiation de la transcription au niveau de LTR. Cette interaction entre Vpr et ce facteur de transcription pourrait être impliquée dans le pouvoir trans-activateur de Vpr. En effet, un autre facteur de transcription, TFIIB, semble s'associer directement avec Vpr (Agostini *et al.*, 1996).

Figure 1. **Réponse immunitaire aux antigènes viraux et stades de la maladie** (Abbas *et al.*, 1995, W.B. Saunders Company, Philadelphia)

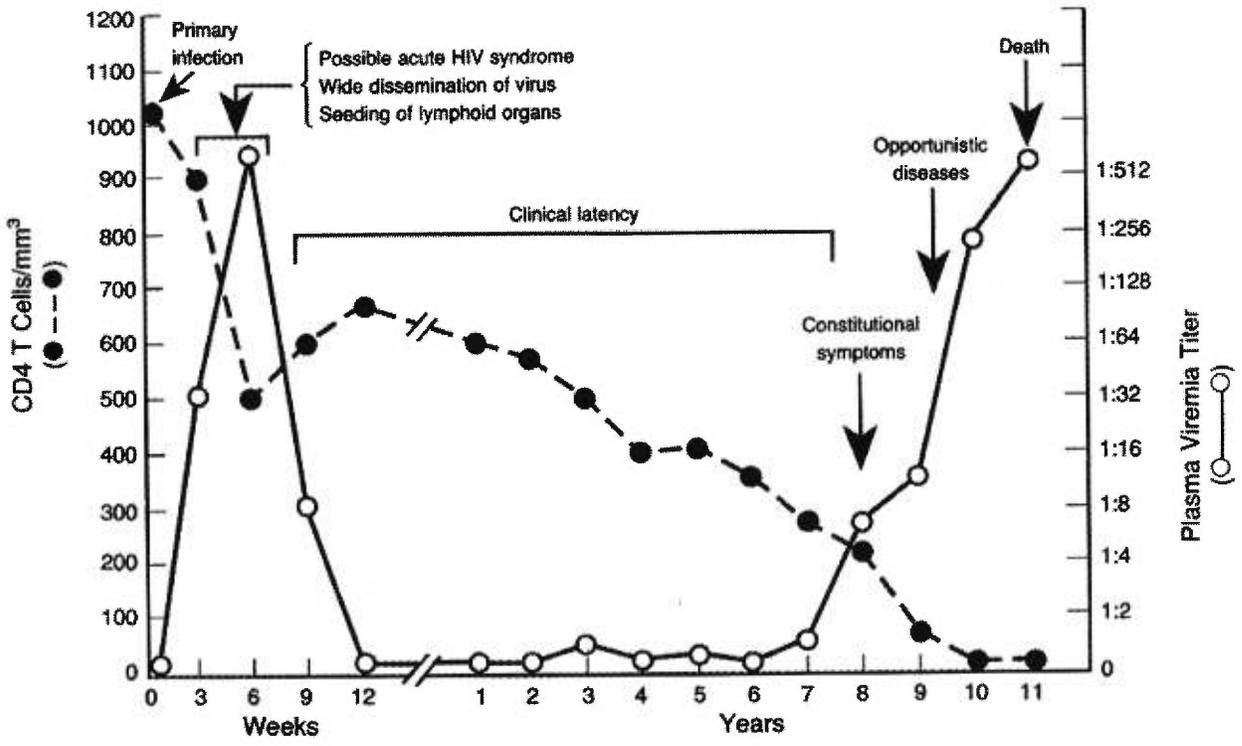
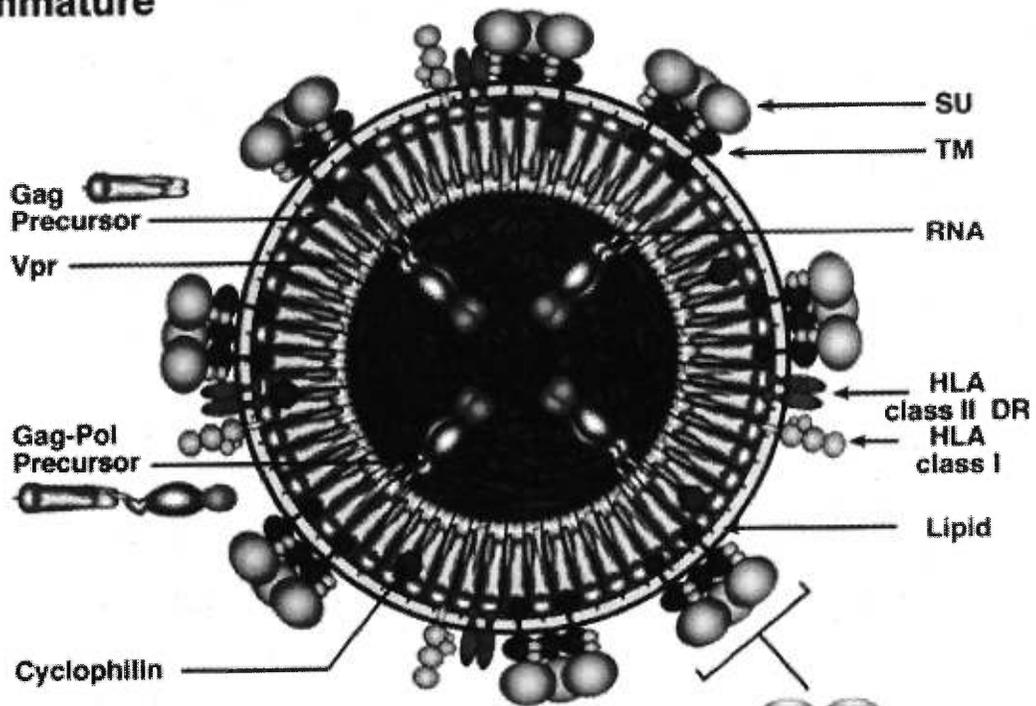


Figure 2. **Morphologie de la particule virale** (Coffin *et al.*, 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)

Immature



Mature

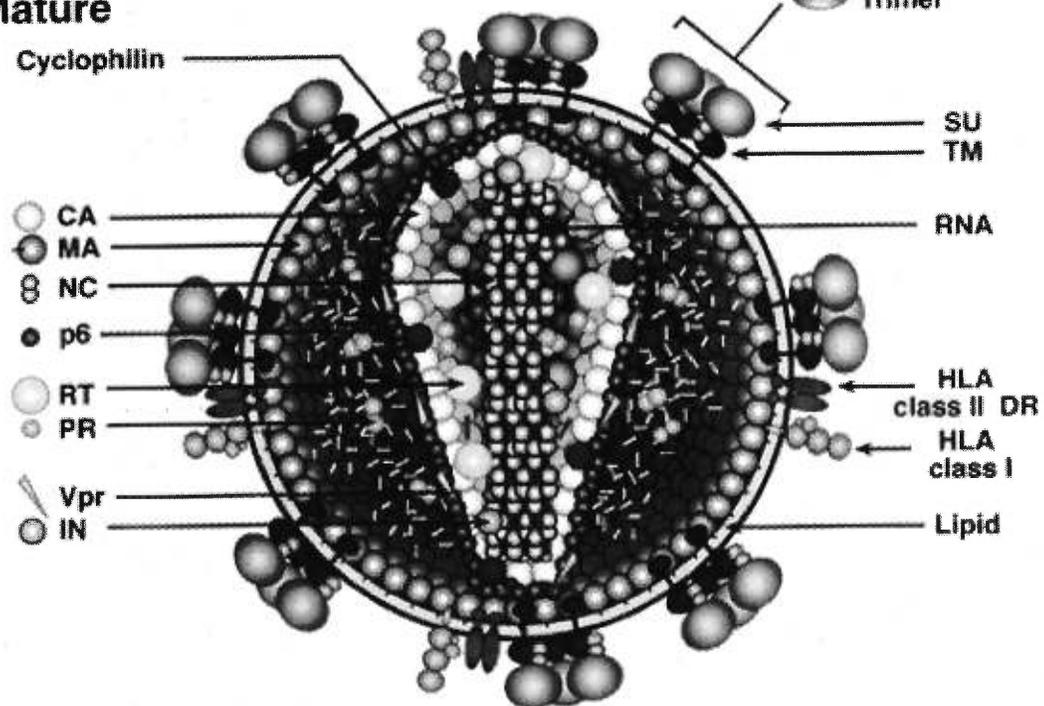


Figure 3. **Organisation génétique des rétrovirus et du VIH** (Coffin *et al.*, 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)

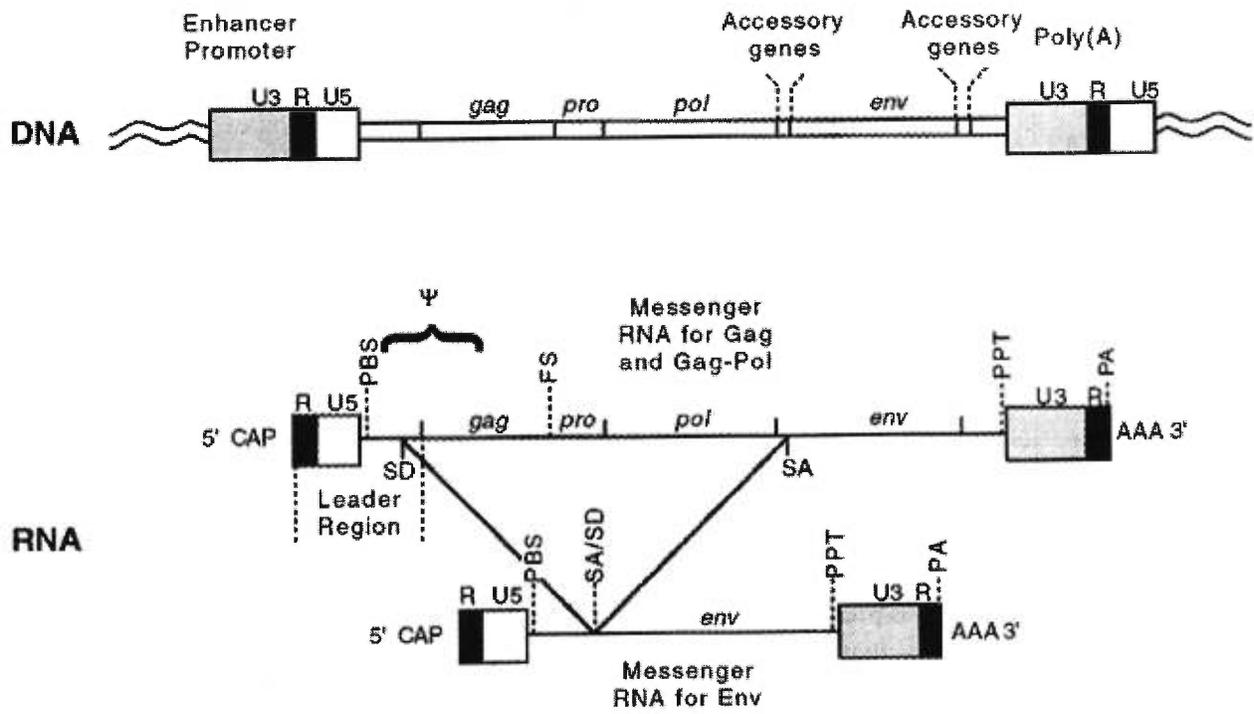


Figure 4. **Cycle viral du VIH-1** (Coffin *et al.*, 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)

Adsorption to specific receptor

Fusion of membranes and entry of the core

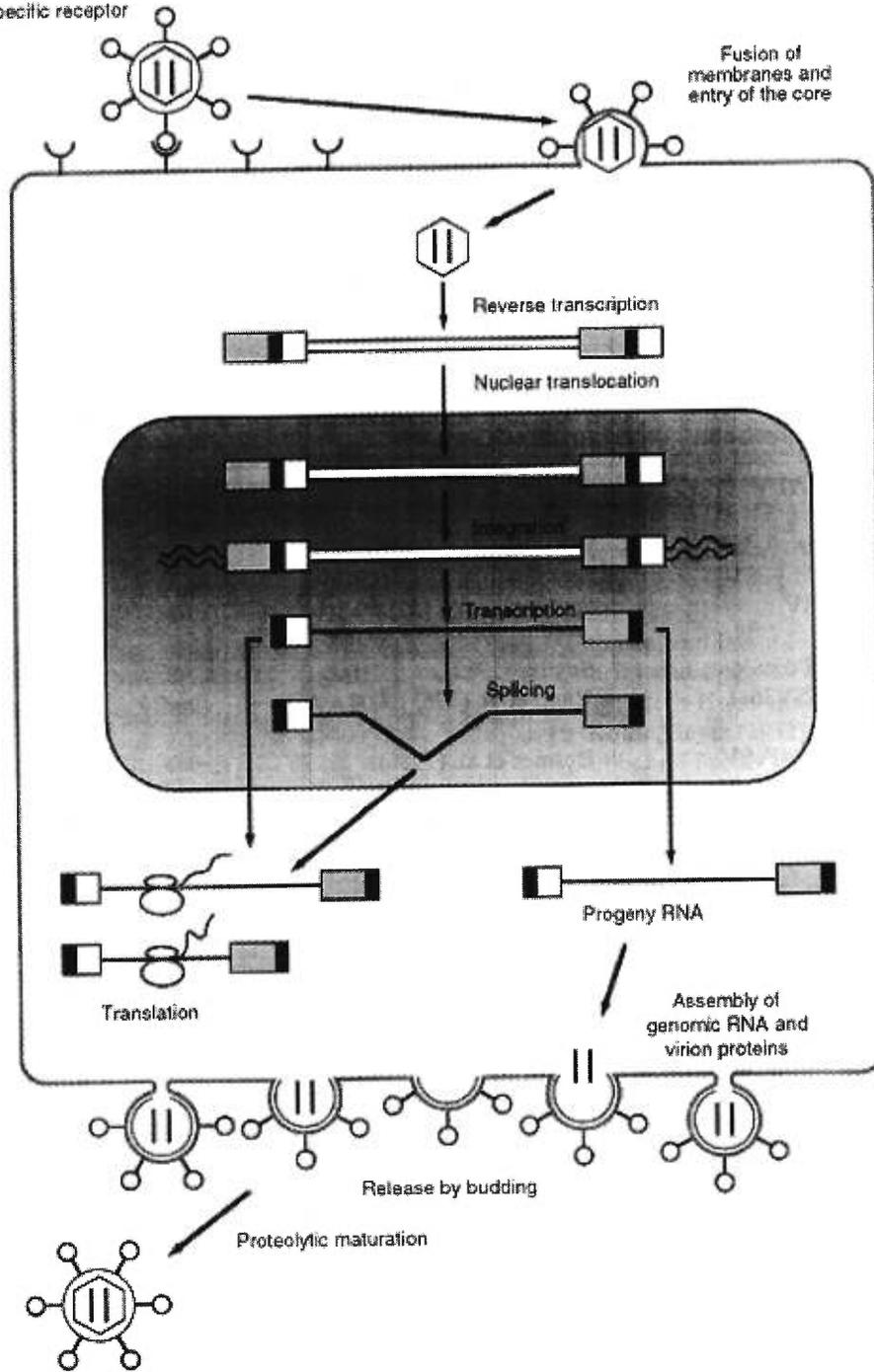
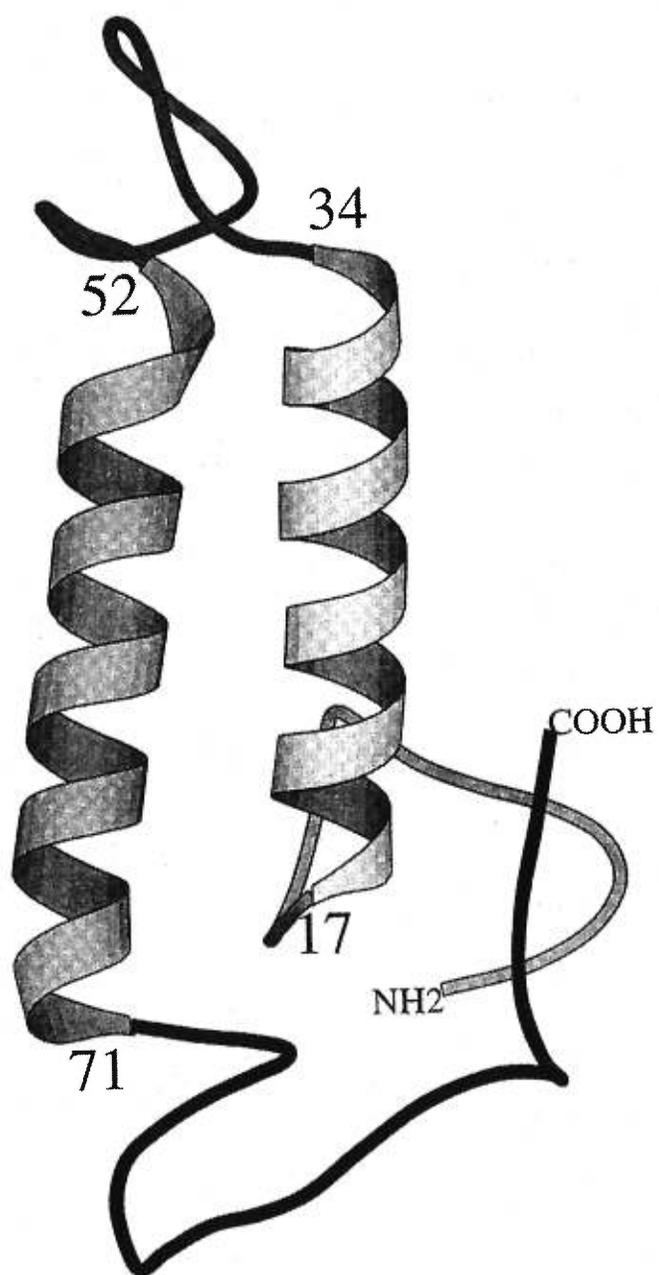


Figure 5. Modèle hypothétique de la structure tertiaire de Vpr (Luo *et al.*, 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 244, p. 734)



PROJET DE RECHERCHE

LE PROJET DE RECHERCHE

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des protéines accessoires dans la réplication du VIH-1 ainsi que dans la pathogenèse associée à l'infection par ce virus. Vpr, une des protéines accessoires du VIH-1 est incorporée sélectivement à l'intérieur des particules virales. Ainsi, cette protéine semble modifier ou altérer le fonctionnement normal des cellules afin de permettre une meilleure réplication virale. Ces effets observés *in vitro* pourraient aussi intervenir *in vivo* afin de permettre une meilleure réplication et/ou propagation du virus. De plus, il semble de plus en plus évident que ces effets sur la cellule hôte soient médiés par les molécules de Vpr incorporées dans les virions.

Plusieurs études se sont intéressées à l'incorporation virale de la protéine accessoire Vpr. Ces travaux ont clairement démontré que le précurseur Gag p55 est essentiel pour l'incorporation virale de Vpr. De plus, des études de mutagenèse ont démontré que la région C-terminale du précurseur Gag p55, connue sous le nom de domaine p6, était importante pour l'encapsidation de cette protéine accessoire. Cependant, aucune interaction directe entre Vpr et le domaine p6 ou avec le précurseur Gag n'a été démontrée jusqu'ici. Par contre, des interactions entre Vpr et d'autres régions de Gag sous leur forme mature, plus précisément, la nucléocapside (NC) et la matrice (MA), ont déjà été observées.

Le but du travail présenté dans ce mémoire est de clarifier le mécanisme moléculaire de l'incorporation *en trans* de la protéine Vpr à l'intérieur des particules virales. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques pouvant détecter des interactions protéine-protéine. Plus précisément, le système des deux-hybrides chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi qu'un système d'interactions *in vitro* nous ont permis de démontrer une interaction directe entre la protéine Vpr du VIH-1 et le précurseur Gag p55. Le développement de systèmes afin d'étudier l'interaction entre Vpr et le précurseur Gag p55 pourra permettre ultérieurement le criblage de molécules pouvant bloquer cette interaction. Ces molécules pourront possiblement permettre de prévenir l'incorporation de Vpr dans les virions, empêchant ainsi ses effets précoces durant la réplication du VIH.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Pour la réalisation de cet article, j'ai effectué la totalité des expériences. Le Dr. Xian-Jian Yao m'a encadré afin de réaliser les expériences effectuées dans le laboratoire de confinement biologique (Figure 5). De plus, le Dr. Xian-Jian Yao, Mohammed Hrimch et Nicole Rougeau ont construit certains des plasmides utilisés dans ce travail. Finalement, le Dr. Éric A. Cohen, mon directeur de recherche, a supervisé les expériences et a également contribué à la rédaction de l'article.

October 20, 1998

**INCORPORATION OF VPR INTO HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
TYPE 1 REQUIRES A DIRECT INTERACTION WITH THE p6 DOMAIN
OF THE p55 GAG PRECURSOR**

François Bachand, Xian-Jian Yao, Mohammed Hrimech, Nicole Rougeau,
and Éric A. Cohen*

Laboratoire de rétrovirologie humaine,
Département de Microbiologie et Immunologie,
Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7

*To whom correspondance should be addressed:

Tel: (514) 343-5967 Fax: (514) 343-5995

E-mail: cohenea@ere.umontreal.ca

Running Title: Vpr Virion Incorporation Requires a Direct Interaction with p6^{gag}

ABSTRACT

The 96-amino-acid Vpr protein is the major virion-associated accessory protein of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1). As Vpr is not part of the p55 Gag polyprotein precursor (Pr55^{gag}), its incorporation requires an anchor to associate with the assembling viral particles. Though the molecular mechanism is presently unclear, the C-terminal region of the Pr55^{gag} corresponding to the p6 domain appears to constitute such an anchor essential for the incorporation of the Vpr protein. In order to clarify the mechanism by which the Vpr accessory protein is *trans*-incorporated into progeny virion particles, we tested whether HIV-1 Vpr interacted with the Pr55^{gag} using the yeast two-hybrid system and the Maltose Binding Protein pull-down assay. The present study provides genetic and biochemical evidence indicating that the Pr55^{gag} can physically interact with the Vpr protein. Furthermore, point mutations affecting the integrity of the conserved L-X-S-L-F-G motif of p6^{gag} completely abolishes the interaction between Vpr and the Pr55^{gag}, and as a consequence prevent Vpr virion incorporation. In contrast to other studies, mutations affecting the integrity of the NCp7 zinc fingers impaired neither Vpr virion incorporation nor the binding between Vpr and the Pr55^{gag}. Conversely, amino-acid substitutions in Vpr demonstrates that an intact N-terminal alpha-helical structure is essential for the Vpr-Pr55^{gag} interaction. Vpr and the Pr55^{gag} demonstrate a strong interaction *in vitro* as salt concentrations as high as 900 mM could not disrupt the interaction. Finally, the interaction is efficiently competed using anti-Vpr sera. Together, these results strongly suggest that Vpr *trans*-incorporation into HIV-1 particles requires a direct interaction between its N-terminal and the C-terminal region of p6^{gag}. The development of Pr55^{gag}-Vpr interaction assays may allow the screening of molecules which can prevent the incorporation of the Vpr accessory protein into HIV-1 virions, and thus inhibit its early functions.

INTRODUCTION

Unlike simple retroviruses, HIV-1¹ encodes for regulatory (*tat* and *rev*) as well as for accessory (*vpr*, *vpu*, *vif*, and *nef*) genes, together referred to as the auxiliary genes. The *tat* and *rev* regulatory genes have been shown to be absolutely essential for viral replication *in vitro* (1). Recently, an increasing number of studies demonstrate that mutations affecting the other auxiliary genes, called the accessory proteins, cause significant phenotypic defects in HIV-1 replication, suggesting that these accessory genes may play pivotal roles during *in vivo* infection and pathogenesis (2).

The Vpr accessory gene product encodes a 14-kDa, 96 amino-acid nuclear protein that is expressed late during viral replication in a Rev-dependent manner (3). This protein is highly conserved between HIV-1, HIV-2, and Simian Immunodeficiency Virus (SIV). In addition, HIV-2 and SIVs encode for a protein, Vpx, that has been shown to possess many structural as well as functional similarities with the Vpr protein (4). Functionally, the HIV-1 Vpr protein harbors two main biological activities. First, early during infection of nondividing cells, Vpr is implicated in the nuclear translocation of the preintegration complex (5, 6). The mechanism by which Vpr influences the transport of the preintegration complex remains unclear. Although no classical nuclear localization signal have been clearly demonstrated in Vpr, it is likely that Vpr acts through interactions with cellular proteins involved in the nuclear import of macromolecules. In fact, it was recently demonstrated that Vpr could associate with importin- α and the nucleoporin Nsp1, and thus possibly play the role of an importin- β like protein (7-9). Consistent with its involvement in the nuclear targeting of the preintegration complex, Vpr was shown to be required for efficient replication in nondividing cells such as monocytes and macrophages (6, 10, 11). The ability of Vpr to arrest the cell cycle constitute the second biological activity associated with this protein (12, 13). The cytostatic effect of Vpr was shown to result in a specific block in

the G₂ phase of the cell cycle, which was correlated with the inactivation of the Cdc2 kinase (14, 15). The functional role of Vpr-mediated cell cycle arrest in proliferating and nondividing HIV target cells is still unclear. However, Stewart *et al.* (16) recently demonstrated that Vpr could also induce apoptosis following cell cycle arrest, suggesting a contribution to CD4 cell depletion during HIV-1 disease. As well, the cell cycle arrest action of Vpr was shown to increase viral expression in dividing T cells as well as in macrophages (11, 17, 18).

An important feature of the HIV-1 Vpr and the HIV-2/SIV Vpx proteins is that they are selectively incorporated into the virus particles which indeed suggest an early function for these two proteins during the viral life cycle (19, 20). The localization of Vpr and Vpx within virions is still unclear. Immunoelectron microscopic studies suggested that the HIV-1 Vpr protein localized beneath the viral envelope, co-localizing with the Gag p24 core structures (21). However, a more recent analysis by Kewalramani and Emerman (22) placed the Vpx protein within HIV-2 cores. As Vpr and Vpx are not synthesized as part of the Gag or Gag-Pol polyprotein precursors, they must utilize a distinct mechanism in order to be incorporated into virion particles. Lavallée *et al.* (23) reported that Vpr could be specifically incorporated *in trans* within virus-like particles originating only from the expression of the Pr55^{gag}. The C-terminal p6 domain of the Pr55^{gag} was subsequently demonstrated to be essential for the incorporation of Vpr into virus particles (24, 25). Furthermore, the integrity of a very conserved motif in the C-terminal region of the p6 domain, L-X-S-L-F-G, was shown to be critical for Vpr virion incorporation (26, 27). Previous studies clearly established that the predicted amphipatic alpha-helical structure located within the N-terminal region of Vpr was important for its packaging into virions (28-30). Based on the data accumulated so far, the mechanism of Vpr incorporation into virion particles suggests a direct interaction between the p6 domain of the p55 Gag precursor and Vpr. Nonetheless, Vpr was also shown to associate with other domains from the Pr55^{gag}. The zinc fingers of NCp7 have recently been suggested to be important for the virion

incorporation of Vpr (31, 32). In addition, evidence suggesting an association between Vpr and the MAp17 have also been obtained (33).

In order to clarify the mechanism by which the HIV-1 Vpr protein is *trans*-incorporated into virion particles, we used protein-to-protein interaction assays to investigate Vpr-Gag interactions. The present work provides genetic (yeast two-hybrid) and biochemical evidence indicating that the incorporation of Vpr into HIV-1 particles involves a direct association between Vpr and the p55 Gag polyprotein precursor. We demonstrate that the p6 domain is necessary and sufficient for this interaction. The direct binding of Vpr to the p55 precursor may constitute a target for the development of molecules that could prevent Vpr virion incorporation, and thus, Vpr early functions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial and Yeast strains-Manipulations of bacterial strains and of DNAs were performed by standard methods (34) unless otherwise noted. *Escherichia coli* AG1 competent cells were used for routine DNA manipulations. Yeast strain EGY48 (MATa, *trp1*, *ura3*, *his3*, *leu2::plexAop6-leu2*) was used as a host strain for all two-hybrid experiments and was obtained from the laboratory of Dr. Roger Brent (Massachusetts General Hospital, Boston).

Construction of Plasmids-To construct the bait plasmids LexA-Vpr, LexA-Vpu, and LexA-Pr55^{gag}, the *vpr* and *gag* genes from the HxBRU provirus plasmid (35) and the *vpu* gene from the HxBH10 (36) provirus plasmid were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the 5' primer 5'-GGCCTAAGGACTGGGTACGATCAA-3' and the 3' primer 5'-GACTTTCAGATAACGAATACTA-3' for Vpr, the 5' primer 5'-GAAGGAGAGGCATCCGTGCGAGAG-3' and 3' primer 5'-GAAGGAGAGGCATCCGTGCGAGAG-3' for Gag, the 5' primer 5'-GTAGTACATGGGATCCAACCTATACA-3' and 3' primer 5'-TCCTTCGGATCCAGTACCCCATAA-3' for Vpu, all containing *Bam* HI sites. The PCR fragments were then cloned in this latter restriction site in translational frame with the codons of the LexA DNA binding domain of the pEG202 vector (37). These latter bait fusion proteins were produced constitutively from pEG202, a 2- μ m *HIS3*⁺ plasmid under the control of the *ADHI* promoter and encoding the LexA carboxyl-terminal oligomerization region, which contributes to the operator occupancy by LexA derivatives (37). To construct LexA-Vpr mutants, such as LexA-VprE25K, LexA-VprA30F, LexA-VprQ65E, LexA-VprSR79-80ID, and LexA-VprR80A, the similar Vpr PCR fragments amplified from HxBRU harboring the different Vpr mutants, E25K, A30F, Q65E, SR79-80ID, and R80A, were fused in frame with the LexA DNA binding domain of the pEG202 vector. The design and construction of these mutants were described elsewhere (18, 29). The Gag *Bam* HI

fragment was also cloned in the pET-21c expression vector (Novagen) which was used to produce *in vitro*-labeled Pr55^{gag}.

The prey plasmids B42-Vpr, B42-Pr55^{gag}, and B42-Vpu were constructed by digesting the Vpr, Pr55^{gag}, and Vpu cDNAs from pEG202 with *Eco* RI and *Xho* I. These *Eco* RI-*Xho* I fragments were placed in pJG4-5, a 2- μ m *TRP1* plasmid (38), in translational frame with the codons for the simian virus 40 large T nuclear localization signal, the B42 transactivation domain, and the hemagglutinin (HA) epitope tag. Because the pJG4-5 vector is under the control of the *GALI* promoter, the expression of the prey fusion proteins was inducible in yeast grown on minimal medium (MM) containing 2% galactose and 1% raffinose (Gal/Raff) but not in yeast grown on 2% glucose (Glc).

Construction of the Moloney murine leukemia virus (MLV) Gag/HIV-1 p6 chimeric construct and the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) p6 double mutant were described previously (25, 39). As well, the design and construction of the NCp7 mutants were described elsewhere; H23C (31), C28S/C49S (23), and Δ K14-T50 (40). The MLVGag, MLVGag/HIV-1 p6, HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) p6 double mutant, HIV-1 Pr55^{gag} (p7 H23C), HIV-1 Pr55^{gag} (p7 C28S/C49S), and HIV-1 Pr55^{gag} (p7 Δ K14-T50) were amplified by PCR using the following primer sets: MLV gag: 5' primer 5'-GCCGCGGATCCGCCAGACTGTTACCACTCCC-3'; 3' primer 5'-GCAAGGATCCTAGTCATCTAGGGTCAGGAG-3'. MLVGag/HIV-1-p6: 5' primer 5'-GCCGCGGATCCGCCAGACTGTTACCACTCCC-3'; 3' primer 5'-GCGCGCCTAGGTCTTTATTGAGTAGCGGG-3'. HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutant, and the HIV-1 Pr55^{gag} (p7 H23C), (p7 C28S/C49S), (p7 Δ K14-T50) mutants: 5' primer GCCGCGGATCCGTGCGAGAGCGTCAGTATTA-3'; 3' primer CGGCGGGATTCTCTTTATTGTGACGAGGG-3'. The PCR fragments were digested with *Bam* HI and cloned in the pEG202 vector. These fragments were then taken out of pEG202 by digesting with *Eco* RI and *Sal* I, and subcloned in the *Eco* RI-*Xho* I restriction sites of the pJG4-5 vector.

To generate Vpr and Vpu expression plasmids, the *vpr* and *vpu* genes from the HIV-1 ELI isolate were amplified by PCR using the 5' primer 5'-AGAGTCGACGAACAAGCCCCAGCAGAC'-3 and the 3' primer 5'-GGCCTGCAGTTAGGATCTACTGGATCC'-3 for Vpr and the 5' primer 5'-CATGTGACCAACCTTTAGGGATAATA-'3 and the 3' primer 5'-TCTCTGCAGCTACAGGTCATCAATATC-'3 for Vpu. The PCR products were then directly cloned into the *Eco* RV restriction site of the pBluescript KS+ vector (Stratagene). Digestion of pBKS+/Vpr and pBKS+/Vpu with *Sal* I, yielded Vpr and Vpu fragments lacking their initial methionine codon and were placed into the *Sal* I restriction site of the pMAL-c2 vector (New England Biolabs). This placed amino acids 2-96 of Vpr and amino acids 2-81 of Vpu into translational phase with Maltose Binding Protein (MBP) sequences of the pMAL-c2 vector.

Transformation of Strain with Reporter, Bait, and Prey Plasmids-The selection strain were made by transforming the EGY48 yeast strain with a *URA3 lacZ* (β -Galactosidase) reporter plasmid and the different *HIS3* bait plasmids by the lithium acetate method (34). The yeast selection strain harboring the bait and reporter plasmids were transformed with different prey plasmid DNAs, and tryptophan utilization phenotype was used (in addition to His and Ura markers for bait and *LacZ* reporter plasmids, respectively) for selection of transformants with the prey plasmids.

Determination of Bait-Prey Interaction-Five independent transformants containing the appropriate bait and prey plasmids were streaked on Glc Ura⁻ His⁻ Trp⁻ medium for amplification. Two days later, transformants were restreaked on plates containing Glc Ura⁻ His⁻ Trp⁻ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) medium or Gal/Raff Ura⁻ His⁻ Trp⁻ X-Gal medium to assess transcriptional activation of the *lacZ* reporter gene.

β -Galactosidase Activity in Liquid Cultures of Yeast-Cells were assayed for β -Galactosidase activity by the *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) method (34).

In Vitro Binding Studies-To produce MBP, MBP-Vpu, and MBP-Vpr proteins, *E. coli* XL1-BLUE cells (New England Biolabs) transformed with either pMAL-c2, pMAL-c2/Vpu or pMAL-c2/Vpr plasmids were cultured in M9 medium (0.2 M NaCl, 10 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.5% casamino Acids, 0.5% glucose, 0.2 mM thiamine and 0.1 mg/ml of ampicillin). Protein expression was then induced by adding IPTG (1 mM) for 3 hr at 37°C. Then, bacteria were harvested, resuspended in 35 ml of ice-cold PBS and broken by sonication (five 30s pulses at 100W, Sonics & Materials, inc.). The resulting lysates were centrifuged for 30 min at 4000 X g and used for binding to amylose resin (New England Biolabs).

To investigate Vpr-Gag interaction, we first prepared MBP, MBP-Vpu, and MBP-Vpr-bound amylose resin by incubating equivalent levels of MBP, MBP-Vpu, and MBP-Vpr proteins with amylose resin (50% v/v) for 60 min at 4°C. Then, equal amounts of *in vitro* synthesized ³⁵S-methionine-labeled Pr55^{gag} (TNT Coupled Reticulocyte lysates system-Promega) diluted in a Column Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) were incubated with either MBP, MBP-Vpu or MBP-Vpr-bound amylose resin for 2 hours at 4°C. These complexes were then washed several times with Column Buffer and bound proteins were eluted with 10 mM maltose, loaded onto a 12.5% SDS-PAGE for autoradiography or western blot analysis

Immunoprecipitation and Western Blot-Yeast EGY48 cells expressing B42-Pr55^{gag} and LexA-Vpr, which was used in yeast two-hybrid assay, were lysed in 500 µl of RIPA lysis buffer (41) by beating with glass beads five times for 2 min each. After being removed from beads and cell debris by centrifugation (10,000 X g) at 4°C, the specific proteins in the cell lysates were immunoprecipitated with either a rabbit anti-Vpr serum (23) or a mouse anti-p24 antibody (ATCC HB-9725). Immunoprecipitated proteins were then subjected to SDS-PAGE and subsequently blotted on nitrocellulose (0.45mm; Schleicher & Schuell). LexA-Vpr and B42-Pr55^{gag} fusion proteins were identified by the rabbit anti-Vpr serum, or

a rabbit anti-p24 antibody (NIH No. 384), respectively, with highly sensitive ECL chemiluminescence detection system as recommended by the manufacturer (Amersham).

Radioimmunoprecipitation and virion incorporation assay-Virion incorporation assay was performed as previously described with slight modifications (29). Briefly, for the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutant, MT-4 cells (5×10^6) were transfected using the DEAE-dextran method with either 10 μ g of wild-type provirus constructs (pNL4.3) or provirus harboring the Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutation. 48 hours post-transfection, cells were metabolically labeled with 200 μ Ci of [³⁵S]methionine for 12 hours. Radiolabeled cells and 20% sucrose cushion-pelleted virions were lysed in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (v/v) Triton, 0.2% (w/v) phenylmethylsulfonyl fluoride) and immunoprecipitated with a mix of rabbit anti-Vpr and HIV-1 seropositive human serum, as previously described (29). The immunoprecipitated complexes were loaded on a 12.5% (w/v) SDS gel and analyzed by autoradiography. To test virion incorporation of Vpr for the HIV-1 p7 H23C and HIV-1 p7 Δ K14-T50 mutants, COS-7 cells (1×10^6) were transfected with either 10 μ g of wild-type pNL4.3 constructs or provirus harboring the p7 H23C or p7 Δ K14-T50 mutations using a standard calcium-phosphate method. 36 hours post-transfection, COS-7 cells were labeled with 200 μ Ci of [³⁵S]methionine for 12 hours. Immunoprecipitation procedure was exactly the same as described above for the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutant. A ratio system previously used to assess levels of Vpr virion incorporation relative to the levels found in the cell using other virion proteins as standards (p66RT) was used (29). Densitometric analysis of autoradiograms was performed with a Molecular Dynamics Personal densitometer using an ImageQuantTM software version 3.22.

RESULTS

Genetic evidence that Vpr and the Pr55^{gag} physically interact—The experimental system described by Golemis *et al.* (37) was used to investigate the interaction between Vpr and the Pr55^{gag} of HIV-1. In order to do so, the Vpr and p55 proteins were fused at the C-terminal of the LexA DNA binding domain (bait) and the B42 bacterial transactivator (prey). To monitor the specificity of interactions, the native plasmids containing only the LexA DNA binding domain or the B42 bacterial transactivator domain, or fused with another HIV-1 accessory protein, Vpu, which is unlikely to interact with HIV-1 Gag protein (42), were used as controls of specificity. The host strain (EGY48) contains the *LEU2* and the *lacZ* reporter genes, both carrying LexA operators instead of native upstream regulatory sequences. A EGY48 yeast cell containing a bait (LexA-fusion) plasmid and reporters (*LEU2* and *lacZ*) remains inert for the expression of leucine utilization or β -galactosidase activity unless it also contains a prey vector that expresses an interacting protein as a fusion molecule to the B42 acid blob transactivation domain (43). In the above described system (37), the expression of the B42-fusion proteins is conditional on the presence of galactose (Gal/Raff) in the culture medium since the expression is directed by the *GAL1* promoter.

Essentially, the yeast strain EGY48 was transformed with different combinations of bait and prey plasmid constructions and selected on Glc Ura⁻ His⁻ Trp⁻ medium. Five independent transformants were then selected and streaked on either (1) Glc Ura⁻ His⁻ Trp⁻ X-Gal medium or (2) Gal/Raff Ura⁻ His⁻ Trp⁻ X-Gal medium. The yeast streaked on Glc Ura⁻ His⁻ Trp⁻ X-Gal medium showed no indication of β -galactosidase activity (by the observation of blue colonies) indicating that no protein interaction occurs in the absence of induction of the B42-fusions (data not shown). Figure 1A shows the results from the different transformation combinations when grown on Gal/Raff Ura⁻ His⁻ Trp⁻ X-Gal medium. As previously shown by other groups (44, 45), our result confirmed that the Pr55^{gag} is capable of homo-oligomerization (lane 3). Because Vpr has been shown to act as

a weak transactivator of some cellular promoters as well as the HIV-1 LTR (46), it was important to verify if Vpr could by itself induce β -galactosidase expression when fused to the LexA DNA binding domain. Lane 6 shows that in our yeast two-hybrid system, Vpr does not seem to cause promoter transactivation to levels appreciable for observation. However, when the B42-Pr55^{gag} fusion was introduced into the yeast strain containing the LexA-Vpr fusion, strong β -galactosidase expression was detected by the observation of blue colonies (lane 7). This suggests that Vpr and the p55 Gag precursor are directly interacting *in vivo* in the yeast cell nucleus. Interestingly, the interaction between Vpr and Pr55^{gag} is observed only in one direction, that is, when Vpr is fused to LexA sequences and the Pr55^{gag} to the B42 transactivation domain. When the two fusions are switched, the interaction is not observed (lane 4). In addition, evidence of Vpr homo-oligomerization were observed using the yeast two-hybrid system (lane 8), as previously shown by others (44). When B42-Vpu (lanes 2 and 9), LexA (lanes 5 and 10) or B42 (lanes 1 and 6) protein alone were used, growth on X-Gal medium in the presence of galactose did not result in the appearance of blue colonies. As well, controls in which LexA-Vpu was introduced in yeast containing either B42-Vpr or B42-Pr55^{gag} did not show any sign of β -galactosidase expression (data not shown). These interaction experiments were also confirmed using the ONPG colorimetric assay (Fig. 2B). The results presented in Fig. 1A suggest direct and specific binding of Vpr to the Pr55^{gag}.

Finally, Western blot analysis was performed to confirm that the LexA-Vpr bait and the B42-Pr55^{gag} prey expressed the expected fusion proteins (Fig. 1B). A 36 kDa LexA-Vpr fusion protein was detected using a rabbit polyclonal anti-Vpr serum, while the B42-Pr55^{gag} fusion corresponded to a 68 kDa protein using a rabbit anti-p24 serum. Since the B42-Pr55^{gag} is a large fusion protein, the other bands detected by Western blot analysis are likely to be degradation products generated during yeast protein extraction.

Regions within the Pr55^{gag} and Vpr important for the interaction-Previous reports clearly established that the p6 domain of the Pr55^{gag} was necessary and sufficient for Vpr virion incorporation (24, 25, 27). In order to determine the domains of importance for the Vpr-Pr55^{gag} direct interaction, we first tested different Gag constructs in the two-hybrid system (Fig. 2A). Kondo *et al.* (25) showed that the addition of the p6 domain to the C-terminus of the Moloney murine leukemia virus (MLV) p65 Gag precursor was sufficient to mediate Vpr incorporation, while the wild-type MLV Gag precursor was incapable of incorporating Vpr (Fig. 2A). In order to determine if this specific incorporation of Vpr into MLV/HIV p6 chimeric virus was based on a direct interaction between the chimeric Gag gene product and Vpr, we quantitatively measured β -galactosidase expression in the yeast two-hybrid system using the ONPG colorimetric assay. As shown in Fig. 2B, the β -galactosidase activity detected for the Pr55^{gag}-Pr55^{gag} interaction is roughly two times the one detected for the association between Vpr and the Pr55^{gag}. The β -galactosidase activity detected for the Vpr-MLV/HIVp6 interaction is similar to the one observed for the Vpr-Pr55^{gag} interaction (Fig. 2B). As expected, no interaction was observed with the wild-type p65 MLV Gag precursor. Since the only difference between these two constructs is the addition of the p6 domain, this result suggests that Vpr can specifically associate with the p6 domain of HIV-1, and that p6^{gag} is necessary and sufficient for the association with Vpr. In order to pinpoint the region of the p6 domain which may act as a potential Vpr binding site, 2 out of the 52 amino acids from the p6 domain were mutated in the Pr55^{gag}. Leu⁴⁴ was changed for a Pro and Phe⁴⁵ for a Ser (Fig. 2A). These two substitutions altered the conserved L-X-S-L-F-G motif of the p6 domain shown to be important for Vpr incorporation (26, 27, 39). As demonstrated in Fig. 2B, this mutation rendered the HIV-1 Pr55^{gag} completely incapable of associating with Vpr. Interestingly, this mutation in the context of a proviral construct failed to incorporate Vpr (Fig. 5A). In order to confirm that the lack of β -galactosidase activity detected with the B42-MLVp65 and the B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p6

L44P/F45S) fusions was not due to stability problems or the absence of protein expression, we performed Western blot analysis to detect these fusion proteins. Western blot clearly demonstrated that the B42-MLVp65, B42-MLV/HIVp6, and the B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) fusion proteins were expressed to similar levels in the yeast EGY48 as determined by immunoprecipitation followed by Western Blot (data not shown). Together, these results suggest that the mechanism by which Vpr is *trans*-incorporated into HIV-1 particles involves a direct physical interaction with the p6 domain of the Pr55^{gag}.

de Rocquigny *et al.* (31) recently reported that the integrity of the zinc finger structures in the NCp7 was important for Vpr virion incorporation. Consequently, we investigated the effect of NCp7 mutants on the Vpr-Pr55^{gag} interaction. Figure 2A demonstrates the structure of the NCp7 zinc fingers. Different mutants affecting the zinc binding domains (H23C is a substitution of His²³ for Cys; C28S/C49S contains substitutions of Cys²⁸ and Cys⁴⁹ for Ser; Δ K14-T50 is a deletion of both zinc fingers) were fused in translational frame with the B42 transactivator and assayed for β -galactosidase activity using the ONPG colorimetric assay in the presence of LexA-Vpr (Fig. 2B). The results demonstrated that neither the HIV-1 Pr55^{gag} (p7 H23C), the HIV-1 Pr55^{gag} (p7 C28S/C49S), nor the complete deletion of the NCp7 zinc fingers (HIV-1 Pr55^{gag} (p7 Δ K14-T50)) affected the binding between Vpr and the Pr55^{gag}. This result suggests that the integrity of the NCp7 zinc fingers in the context of the Pr55^{gag} is not essential for the Vpr-Pr55^{gag} interaction.

We next wanted to investigate the region of Vpr which is important for its association with the Pr55^{gag}. In order to address this question, five Vpr point mutants affecting different structural regions of the protein were fused to LexA sequences (Fig. 3A) and used for interaction experiments using the yeast two-hybrid system. The E25K and A30F mutants affect the predicted N-terminal alpha-helix of Vpr and were shown to be incapable of incorporation into virion particles (29). The Q65E point mutation is located within the second helix of Vpr and affects its intranuclear localization (47). Finally, the

SR79-80ID and the R80A mutants do not lead to cell cycle arrest (11). Yeast containing either wild-type LexA-Vpr or LexA-Vpr mutants were then transformed with the following B42 fusions; the HIV-1 Pr55^{gag}, the p65 MLV Gag precursor, the MLVGag/HIV p6 fusion, and the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) double mutant and assayed for interaction using the ONPG colorimetric method. As shown on Fig. 3B, the E25K and the A30F mutants were unable to interact with both the HIV-1 Pr55^{gag} and the MLVGag/HIV p6 fusion, while the other Vpr mutants were not affected. Similar expression of all LexA-Vpr mutants was confirmed by Western blot analysis (data not shown). Together, this observation suggests that the integrity of the predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr is essential for the physical association with the Pr55^{gag}. As well, this result confirms the relevance of the binding assay used in this study since the two mutants shown not to interact with the Pr55^{gag} were shown not to incorporate virion particles (29).

Direct in vitro interaction between Vpr and the p55 Gag precursor-In order to confirm whether the association between Vpr and the Pr55^{gag} observed in yeast could be reproduced using another approach, we took advantage of an *in vitro* binding assay using recombinant fusion proteins. First, the *vpr* gene was introduced into the pMAL-c2 vector in fusion with the Maltose Binding Protein (MBP). MBP, MBP-Vpu, and MBP-Vpr fusion proteins were then produced in bacteria and purified as described in the *Experimental Procedures* section. Then, the entire Gag open reading frame was used to generate *in vitro*-labeled protein. The *in vitro*-translated Pr55^{gag} was incubated with either MBP, MBP-Vpu or MBP-Vpr fusion proteins, that were previously immobilized on amylose resin. Following a two hour incubation, the complexes were washed several times, eluted, and then analyzed on a 12.5% SDS-PAGE. As shown in Fig. 4A, the Pr55^{gag} was able to specifically interact with MBP-Vpr, and not with MBP-Vpu nor with MBP alone. To insure that the 55-kDa band associating with MBP-Vpr was really the p55 Gag precursor, we electrotransferred the SDS gel onto a nitrocellulose filter and performed a Western blot using an anti-p24 antibody.

The immunoblot confirmed that the 55-kDa protein was effectively the Pr55^{gag} (data not shown). An additional 32-kDa band also specifically associated with the MBP-Vpr fusion protein (Fig. 4A; lane 1). This fragment was confirmed to be a Gag-related product by Western blot analysis (data not shown). The smaller proteins in the input loading (lane 4) probably represent nonspecific cleavage products, products from initiation at downstream AUG, or premature translation termination.

We next attempted to analyze the strength of the Vpr-Gag interaction by studying the effect of increasing salt concentration on the recovery of the Pr55^{gag} by the MBP-Vpr proteins. This technique was previously used to determine the strength of the interaction between the cyclophilins A and B and the Gag protein (48). As demonstrated in Fig. 4B, the Vpr-Pr55^{gag} interaction could sustain 900 mM NaCl. Coomassie blue staining of the gel demonstrated that equal amounts of MBP-Vpr were still present after washing with these different salt concentrations (data not shown). Together, these results demonstrate biochemical evidence for a direct binding between the Vpr protein and the Pr55^{gag}, and confirm the data demonstrated genetically using the yeast two-hybrid system (Fig. 1). Furthermore, we conclude that the association between the Pr55^{gag} and Vpr is a strong interaction *in vitro*, sustaining salt concentrations of 900 mM NaCl.

We next wanted to determine if we could interfere with the interaction by specifically blocking the accessibility of the Pr55^{gag} to the MBP-Vpr fusion protein. In order to address this question, we used two different anti-Vpr antibodies: a polyclonal rabbit antiserum generated against recombinant Vpr protein (23) and a rabbit polyclonal anti-peptide serum which recognizes the first 19 amino acids of Vpr (46). As controls, anti-Vpu and anti-Myc antibodies were used for the experiments. These different antibodies were incubated for 3h in the presence of immobilized MBP-Vpr, washed several times to remove unbound and non-specifically attached antibodies, and then presented to equal amounts of [³⁵S]methionine-labeled Pr55^{gag}. Although the anti-Vpu and anti-Myc antibodies demonstrated slight non-specific competition with the MBP-Vpr-Pr55^{gag} interaction, this

non-specific effect never reached the levels observed with the anti-Vpr antibodies in several experiments. Interestingly, the anti-Vpr antibody directed against the first 19 amino acids of Vpr (lane 3) interfered more efficiently with the MBP-Vpr-Pr55^{gag} interaction than the polyclonal anti-Vpr (lane 2). The result presented in Fig. 4C suggests that the binding between Vpr and p55 can be affected and that the potential use of other molecules could be used to affect the Vpr-Pr55^{gag} interaction and consequently prevent Vpr virion incorporation.

Mutations that affect the binding between Vpr and the Pr55^{gag} also affect Vpr virion incorporation-In order to confirm our hypothesis that direct binding between Vpr and the Pr55^{gag} is required for Vpr virion incorporation, we investigated whether our mutants in the Pr55^{gag} were still capable of incorporating the Vpr accessory protein into virions. To analyze the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutant for Vpr virion incorporation, MT-4 cells were transfected with an infectious proviral clone of HIV-1 (pNL4.3) expressing in *cis* either the wild-type or the Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) protein. Following transfection, the cells were radiolabeled and the ability of Vpr to be incorporated into virion was monitored by immunoprecipitating both cell and virion-associated viral proteins. We have previously described a ratio system to assess the amount of Vpr found in the virions as a proportion of the total amount found in the cell using other virion proteins as standards (RT) (29). Essentially, the virion-associated Vpr value is calculated based on the level of internal control p66 (RT) present in the virions as well as the proportion of the total Vpr found in the cell as determined by densitometric scanning of autoradiograms. This value is then compared to wild-type virion-associated Vpr value which is set at a 100%. As can be observed in Fig. 5A, substantial amounts of Vpr could be detected when proteins from wild-type virions were immunoprecipitated (lane 8). However, no detectable amount of Vpr protein was observed in virions generated from the proviral construct harboring the p6 L44P/F45S mutation (Fig. 5A; lane 7) even though Vpr was expressed in transfected MT-4 cells (Fig. 5A; lane 3). This observation is consistent with our result (Fig. 2B) that this

mutant in the context of the Pr55^{gag} is incapable of binding Vpr, thus suggesting that a direct interaction between Vpr and the p6 domain of the Pr55^{gag} is required for Vpr virion incorporation.

We previously demonstrated that proviral constructs harboring the HIV-1 p7 C28S/C49S mutations in the nucleocapsid region of Gag did not extensively affect Vpr virion incorporation (23). This is consistent with our binding analysis (Fig. 2B), suggesting that the integrity of the zinc binding motifs of the NCp7 is not critical for the interaction between Vpr and the Pr55^{gag}. In order to further confirm this, we decided to analyze the ability of Vpr to incorporate in viruses harboring either the HIV-1 p7 H23C or the HIV-1 p7 Δ K14-T50 mutations. Because these viruses have been shown to be highly affected in their ability to package HIV-1 RNA (40), these viruses are not replication-competent. Consequently, we decided to use COS-7 cells for viral particles production as previously described (23). Using the same anti-sera as for the HIV-1 p6 L44P/F45S mutations, viral proteins from lysed cells and sucrose cushion-pelleted virions were immunoprecipitated for both the HIV-1 p7 H23C and the HIV-1 p7 Δ K14-T50 proviral constructs. Figure 5B shows the virion-associated proteins from one of two independent experiments. As can be seen, both virion particles generated from the HIV-1 p7 Δ K14-T50 and the HIV-1 p7 H23C proviral constructs were still competent in incorporating Vpr (Fig. 5B; lanes 11 and 12, respectively). Moreover, quantification (Fig. 5C) using densitometric analysis revealed that Vpr is *trans*-incorporated to levels similar to wild-type virus into the HIV-1 p7 H23C mutant virions. Because the HIV-1 p7 Δ K14-T50 virion particles are highly affected in their Gag processing (no detectable p66RT band, very low p24/p25 Gag, Fig. 5B; lane 11), we did not quantify Vpr virion incorporation (Fig. 5C). Nonetheless, Fig. 5B (lane 11) shows that Vpr is still incorporated in substantial amounts in the HIV-1 p7 Δ K14-T50 virion particles.

DISCUSSION

HIV-1 Vpr is the major virion-associated accessory protein. As Vpr is not synthesized as part of the Gag polyprotein precursor, it must utilize a distinct mechanism in order to be incorporated into virion particles. It has been clearly demonstrated through Gag-deletion analysis that the virion incorporation of the Vpr protein requires the p6 domain from the p55 precursor (24, 25, 27). However, the association between Vpr virion incorporation and Vpr-Pr55^{gag} binding was still missing. Several groups (26, 27) demonstrated that single amino-acid substitutions or deletions of either Leu⁴⁴ or Phe⁴⁵ in the p6 domain abolished the ability of Vpr to be incorporated in the context of MLV/HIV p6 or RSV/HIV p6 chimeric viruses. In addition, the inability of our HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) double mutant to incorporate Vpr was confirmed in the context of an infectious proviral clone of HIV (Fig. 5A). Consequently, the inability of Vpr to interact with the HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) double mutant (Fig. 2B) brings a direct correlation between the lack of direct binding to the Pr55^{gag} and the incapacity of Vpr to be incorporated into virion particles.

Evidence of direct interaction between Vpr and other Gag domains has been recently reported. de Rocquigny *et al.* (31) reported that the zinc fingers of the nucleocapsid protein (NC) were important for Vpr virion association. Moreover, using chemically synthesized peptides, they demonstrated that Vpr could directly interact with NCp7, but not with p6 *in vitro*. However, our result demonstrated that only mutants in the p6 domain (LF-PS) resulted in the loss of binding between Vpr and the Pr55^{gag}, while mutations or the complete deletion of the p7 zinc fingers did not affect the interaction (Fig. 2B) and Vpr incorporation (Fig. 5B). It is possible that the zinc fingers of the NCp7 are important for Vpr binding in the context of the mature NC. However, our results indicate that in the context of the Pr55^{gag}, the zinc finger motifs are less critical for the Vpr-Pr55^{gag} interaction. Moreover, in contrast to de Rocquigny *et al.* (31), who demonstrated significant defects in Vpr virion incorporation using NC mutants, in particular with the HIV-1 p7 H23C mutant,

our result did not reveal extensive impairment of Vpr virion-incorporating ability (Fig. 5B and 5C). It is possible that this discrepancy results from experimental differences. Indeed, the basis for quantification of Vpr encapsidation are different, de Rocquigny's group used Western blot while we used radioimmunoprecipitation. Consequently, the importance of NCp7 in HIV-1 Vpr incorporation still needs to be demonstrated. In fact, Wu *et al.* (49) deleted the complete NCp8 sequence in HIV-2 and did not affect the ability of Vpx to be incorporated into virions, while removal of p6 sequences resulted in loss of Vpx incorporation.

The structural domains within Vpr important for incorporation have also been studied. The extensive mutagenic analysis of several groups agrees that the amphipatic alpha-helical region located between amino-acids 18-34 in the N-terminal of Vpr is important for the incorporation of this accessory protein (28-30, 50, 51). Our binding studies using five Vpr mutants, E25K, A30F, Q65E, SR79-80ID, and R80A showed that the two mutants which were unable to interact with the Pr55^{gag} were the mutants which lost their ability to be incorporated (29). This result also correlates the loss of incorporation of Vpr to its incapacity to directly interact with the Pr55^{gag}. The observation that Vpr could only interact with the Pr55^{gag} when fused to the C-terminal of the LexA DNA binding domain (Fig. 1A; lane 7) but not when fused to the B42 transactivator (Fig. 1A; lane 4) suggests that this interaction requires proper conformation. It is likely that either the B42-Vpr or the LexA-Pr55^{gag} fusion, or both, are not presented in the proper structure to expose their respective binding domain. Interestingly, we suspect that the p6-binding motif of Vpr requires more than just the predicted N-terminal alpha-helical domain since attempts to compete the *in vitro* Vpr-Pr55^{gag} association with a series of Vpr peptides were unsuccessful. Peptides harboring Vpr amino-acids 1-19, 19-35, or 23-37 could not compete the interaction between Vpr and the Pr55^{gag}. Moreover, Yao *et al.* (52) demonstrated that fusion proteins containing amino-acids 1-62 which harbors the predicted N-terminal alpha-helical moiety of Vpr are incapable of incorporating virion particles, while

polypeptides fused to amino-acids 1-80 of Vpr are efficiently incorporated. These results suggest that the presence of the Leucine/Isoleucine rich domain of Vpr (aa 60-80) might be important for correct folding or exposition of the predicted N-terminal alpha-helical region. Similar results have also been observed by Sato *et al.* (53). It is noteworthy that our anti-Vpr peptide serum directed against the N-terminal region of Vpr (aa 1-19) was more effective in affecting the interaction with the Pr55^{gag} than the antibody directed against the recombinant Vpr (Fig. 4C) which principally recognizes epitopes lying between amino acids 19 and 72². This suggests that even though the Leucine/Isoleucine rich region of Vpr might be important, the critical region for the Vpr-Pr55^{gag} interaction is the predicted N-terminal alpha-helical structure of Vpr.

From our and other group's results, we present a model for the molecular mechanism by which the Vpr protein is *trans*-incorporated into progeny virions. We suggest that HIV-1 Vpr can only associate with p6 in the context of the Pr55^{gag}. In this context, p6 would have a proper conformation to directly associate with Vpr, and subsequently pull-it within forming virions. Then, upon activation of the viral protease, the Pr55^{gag} would be processed and mature p6 would be release from the Pr55^{gag}. This release of p6 would result in its dissociation from Vpr. Subsequently, Vpr could associate with other virion proteins such as NC in the viral core in order to fulfill its functional role in the context of the preintegration complex early in infection.

In summary, the results presented here demonstrate for the first time direct interaction between Vpr and Gag in the context of the p55 precursor. Furthermore, our results suggest that Vpr *trans*-incorporation requires a direct binding to the p6 domain of the Pr55^{gag}. The development of an assay that demonstrates this critical interaction may allow the screening of molecules that prevent Vpr virion association and thus, Vpr early function, which could ultimately impair HIV-1 infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Roger Brent for the generous gift of plasmids and yeast strains used in the two-hybrid system. Also, we thank Dr. Erica Golemis for helpful advice that enabled this work to be done; Nash Daniel, Drs Béatrice Allain and Andrew J. Mouland for fruitful discussion. F.B. is a recipient of a studentship from the Medical Research Council (MRC) of Canada. E.A.C. is the recipient of a MRC Scientist career award. This work was supported by grants from the MRC and Theratechnologies Inc. to E.A.C..

REFERENCES

1. Cullen, B. R. (1992) *Microbiol. Rev.* **56**, 375-394
2. Miller, R. H., and Sarver, N. (1997) *Nat. Med.* **3**, 389-394
3. Garrett, E. D., Tiley, L. S., and Cullen, B. R. (1991) *J. Virol.* **65**, 1653-1657
4. Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., and Hill, F. (1992) *EMBO J.* **11**, 3405-3412
5. Heinzinger, N. K., Bukrinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M.-A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7311-7315
6. Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R., Yao, XJ., Checroune, F., Rougeau, N., and Cohen, E. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 4104-15
7. Vodicka, M. A., Koepp, D. M., Silver, P. A., and Emerman, M. (1998) *Genes Dev.* **12**, 175-185
8. Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.-A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998) *EMBO J.* **17**, 909-917

9. Fouchier, R., Meyer, B., Simon, J., Fischer, U., Albright, A., Gonzalez-Scarano, F., and Malim, M. (1998) *J. Virol.*, **72**, 6004-6013
10. Connor, R. I., Chen, B.K., Choe, S., and Landau, N.R. (1995) *Virology* **206**, 935-944
11. Subbramanian, R. A., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J., Yao, X.-J., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1103-1111
12. Jowett, J. B. M., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M.-L., and Chen, I. S. Y. (1995) *J. Virol* **69**, 6304-6313
13. Rogel, M. E., Wu, L. I., and Emerman, M. (1995) *J. Virol.* **69**, 882-888
14. Re, F., Braaten, D., Franke, E. K., and Luban, J. (1995) *J. Virol* **69**, 6859-6864
15. He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., and Landau, N. R. (1995) *J. Virol.* **69**, 6705-6711.
16. Stewart, S.A., Poon, B., Jowett, J. B. M., and Chen, I. S. Y. (1997) *J. Virol.* **71**, 5579-5592
17. Goh, WC., Rogel, M. E., Kinsey, M., Micheal, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and Emerman, M. (1998) *Nat. Med.* **4**, 65-71
18. Yao, X.-J., Mouland, A., Subbramanian, R., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 4686-93
19. Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990) *J. Virol.* **64**, 3097-3099
20. Yu, X.-F., Ito, S., Essex, M., and Lee, T. H. (1988) *Nature (London)* **335**, 262-265
21. Wang, J. J., Lu, Y.-L., and Ratner, L. (1994) *J. Gen. Virol.* **75**, 2607-2614
22. Kewalramani, V. N., and Emerman, M. (1996) *Virology* **218**, 159-168
23. Lavallée, C., Yao, XJ., Ladha, A., Göttlinger, H., Haseltine, W. A., and Cohen, E. A. (1994) *J. Virol.* **68**, 1926-34
24. Paxton, W., Connor, R. I., and Landau, N. R. (1993) *J. Virol.* **67**, 7229-7237

25. Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A., and Göttinger, H. G. (1995) *J. Virol.* **69**, 2759-2764
26. Kondo, E., and Göttinger, H. G. (1996) *J. Virol.* **70**, 159-164
27. Lu, Y.-L., Bennett, R. P., Wills, J. W., Gorelick, R., and Ratner, L. (1995) *J. Virol.* **69**, 6873-6879
28. Mahalingam, S., Khan, S. A., Murali, R., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G., and Srinivasan, A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3794-3798
29. Yao, X.-J., Subramanian, R. A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1995) *J. Virol.* **69**, 7032-7044
30. Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Mamata, P., Kieber-Emmons, T., and Weiner, D.B. (1997) *J. Virol.* **71**, 6339-6347
31. de Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J.-L., and Rocque, B. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30753-30759
32. Li, M.-S., Garcia-Asua, G., Bhattacharyya, U., Mascagni, P., Austen, B. M., and Roberts, M. M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **218**, 352-355
33. Sato, A., Yoshimoto, J., Isaka, Y., Miki, S., Suyama, A., Asachi, A., Hayami, M., Fujuwara, T., and Yoshie, O. (1996) *Virology* **220**, 208-212
34. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith J.A., and Sruhl, K., eds. (1994) *Current protocols in Molecular Biology*, (Wiley, New York)
35. Lavallée, C., and Cohen, E. A. (1993) *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **6**, 529-530
36. Yao, X. J., Göttinger, H., Haseltine, W. A., and Cohen, E. A. (1992) *J. Virol.* **66**, 5119-5126
37. Golemis, E. A., and Brent, R. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3006-3014
38. Ma, J., and Ptashne, M. (1987) *Cell* **51**, 113-119

39. Kobinger, G. P., Borsetti, A., Nie, Z., Mercier, J., Daniel, N., Göttinger, H., and Cohen, E. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 5441-5448
40. Huang, Y., Khorchid, A., Wang, J., Parniak, M. A., Darlix, J.-L., Wainberg, M. A., and Kleiman, L. (1997) *J. Virol.* **71**, 4378-4384
41. Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, J., Komoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 253-265
42. Göttinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. A., and Haseltine, W. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7381-7385
43. Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) *Cell* **75**, 791-803
44. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Blair, W. S., and Cullen, B. R. (1993) *J. Virol.* **67**, 5030-5034
45. Li, X., Yuan, B., and Goff, S. P. (1997) *J. Virol.* **71**, 5624-5630
46. Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990) *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **3**, 11-18
47. Subbramanian, R. A., Yao, X.-J., Dilhuydy, H., Rougeau, N., Bergeron, D., Robitaille, Y., and Cohen, E. A. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 13-30
48. Luban, J., Bossolt, K. A., Franke, E. K., Kalpana, G. V., and Goff, S. P. (1993) *Cell* **73**, 1067-1078
49. Wu, X., Conway, J. A., Kim, J., and Kappes, J. C. (1994) *J. Virol.* **68**, 6161-6169
50. Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R., and Landau, N. R. (1995) *J. Virol.* **69**, 7909-7916
51. Mahalingam, S., Khan, S. A., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G., and Srinivasan, A. (1995) *Virology* **207**, 297-302
52. Yao, X., Kobinger, G., Dandache, S., Rougeau, N., and Cohen, E. (1998) *J. Virol. Submitted*

53. Sato, A., Isaka, Y., Kodama, M., Yoshimoto, J., Kawauchi, S., Kuwata, T., Adachi, A., Hayami, M., Yoshie, O., and Fujiwara, T. (1995) *Microbiol. Immunol.* **39**, 1015-1019

FOOTNOTES

¹ The abbreviations used are: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HIV-2, human immunodeficiency virus type 2; SIV, simian immunodeficiency virus; MLV, Moloney murine leukemia virus; ONPG, *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; MBP, maltose binding protein; Glc, glucose; Gal/Raff, galactose and raffinose; LTR, long terminal repeat; RT, reverse transcriptase; RSV, rous sarcoma virus

² C. Lavallée and E. A. Cohen, unpublished observations

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Specificity of interaction between Vpr and the p55 Gag precursor in the yeast two-hybrid system. *A*, the EGY48 reporter strain containing either LexA, LexA-Vpr or LexA-Pr55^{gag} was transformed with either B42, B42-Vpu, B42-Vpr or B42-Pr55^{gag}. The yeast cells (five independent transformants) were then incubated on selective galactose media containing X-Gal and assessed for their ability to interact together. *B*, a clone shown to be positive for Vpr-Gag interaction was grown in galactose selective media. Yeast cells were lysed, immunoprecipitated with either rabbit anti-Vpr or mouse anti-p24 sera. Samples were then electrophoresed on either a 8.5% (for B42-Pr55^{gag}) or 12.5% (for LexA-Vpr) SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose and immunoblotted with either anti-Vpr or anti-p24 antibodies.

FIG. 2. The p6 domain from the Pr55^{gag} is necessary and sufficient for the Vpr-Pr55^{gag} interaction. *A*, shown are the different constructs used to assay binding in the two-hybrid system. MLVGag represents the full length p65 Gag precursor from the Moloney murine leukemia virus (MLV), MLVGag/HIV-p6 represents the HIV-1 p6 domain fused in frame to the C-terminus of the p65 Gag precursor from MLV. The sequence of the nucleocapsid protein (NCp7) containing two zinc fingers is shown. Amino acid substitutions were introduced in the NC domain by site-directed mutagenesis. HIV-1 p7 H23C is a substitution of His²³ to Cys; HIV-1 p7 C28S/C49S contains substitutions of Cys²⁸ and Cys⁴⁹ to Ser; HIV-1 p7 ΔK14-T50 is a deletion from Lys¹⁴ to Thr⁵⁰ removing the two zinc fingers. The amino acid sequence of p6 is shown. HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) mutant is a double point mutant in which Leu⁴⁴ and Phe⁴⁵ from the p6 domain were mutated to Pro and Ser, respectively. These mutations perturbed the highly conserved L-X-S-L-F-G motif located in the C-terminal region of the p6 domain. The L-X-S-L-F-G motif is underlined. Leu44/Pro and Phe45/Ser are indicated in bold. MA: Matrix (p17);

CA: Capsid (p24); NC: Nucleocapsid (p7). *B*, the interaction strength between LexA-Vpr and either B42-Pr55^{gag}, B42-MLVp65, B42-MLVp65/HIVp6, B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S), B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p7 H23C), B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p7 C28S/C49S), or B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p7 ΔK14-T50) was assessed using the liquid β-Gal assay. The histogram represents averaged data from at least three different experiments.

FIG. 3. The Vpr-Pr55^{gag} interaction requires an intact alpha-helical structure in Vpr. *A*, the amino-acid sequence of the wild-type (WT) Vpr is shown. The position of the predicted amphipathic alpha-helical structures, the Leucine-Isoleucine rich (LR) region, and the basic amino-acid (aa)-rich region in Vpr are also indicated. Design and construction of the E25K, A30F, Q65E, SR79-80ID, and R80A Vpr mutants were previously described (18,29). *B*, the interaction strength between B42-Pr55^{gag}, B42-MLVGag, B42-MLVGag/HIV-1 p6, and B42-HIV-1 Pr55^{gag} (p6 L44P/F45S) double mutant and either LexA-Vpr, LexA-VprE25K, LexA-VprA30F, LexA-VprQ65E, LexA-VprSR79-80ID or LexA-VprR80A was assessed using the liquid β-Gal assay. The histogram represents averaged data from at least three different experiments.

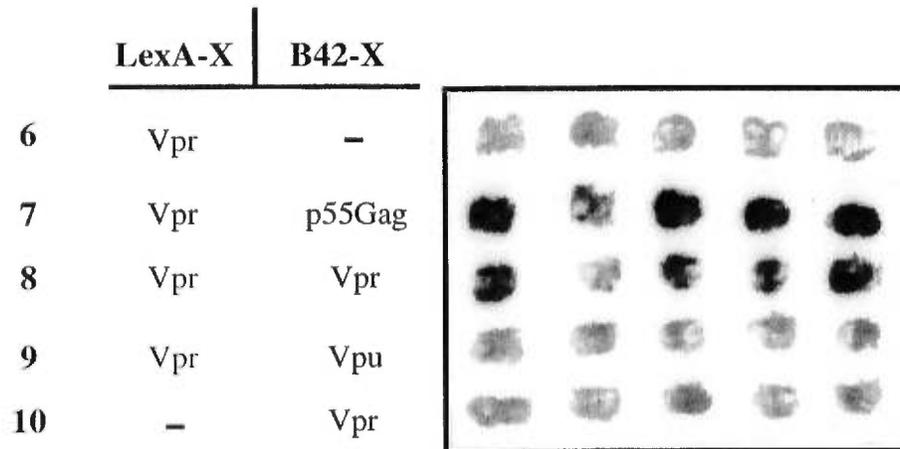
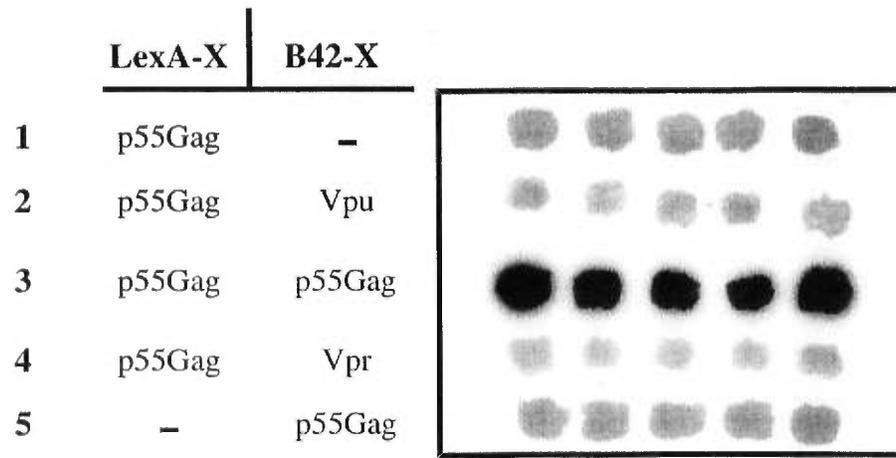
FIG. 4. *In vitro* interaction between Vpr and the Pr55^{gag}. *A*, equal amounts of MBP (lane 3), MBP-Vpu (lane 2), and MBP-Vpr (lane 1) were affinity purified on amylose resin and incubated with 5 μl of *in vitro* translated [³⁵S]methionine-labeled Pr55^{gag}. Following a 2 h incubation at 4°C, the samples were washed five times, eluted and loaded on a 12.5% SDS-PAGE and subjected to autoradiography. The input lane was loaded with one-fifth of the amount of Pr55^{gag} used in the binding reactions (lane 4). *B*, to test the strength of the Vpr-Gag interaction, MBP-Vpr-Pr55^{gag} bound complexes, were washed four times with Column buffer containing 200 mM NaCl, and subsequently washed with either 200, 300, 500 or 900 mM NaCl-containing buffer. After these different washes, the

different samples were submitted to 10 mM maltose for elution of MBP bound complexes and analyzed on a 10% SDS-PAGE and by autoradiography. C, equal quantity of MBP-Vpr fusion protein affinity purified by amylose resin were incubated for 3h (4°C) with 4 different antibodies; a polyclonal rabbit serum directed against recombinant Vpr (lane 2), a rabbit serum generated against a peptide corresponding to the first 19 amino acids of Vpr (lane 3), anti-Vpu (lane 4), anti-Myc (lane 5) and with no antibody (lane 6). After incubation, unbound and non-specifically attached antibodies were washed twice. Then, 5 μ l of [S^{35}]methionine-labeled *in vitro*-translated Pr55^{gag} were added to the different samples, followed by a 2h incubation at 4°C. Samples were then washed, eluted and submitted to electrophoresis on a 12.5% SDS-PAGE and to autoradiography.

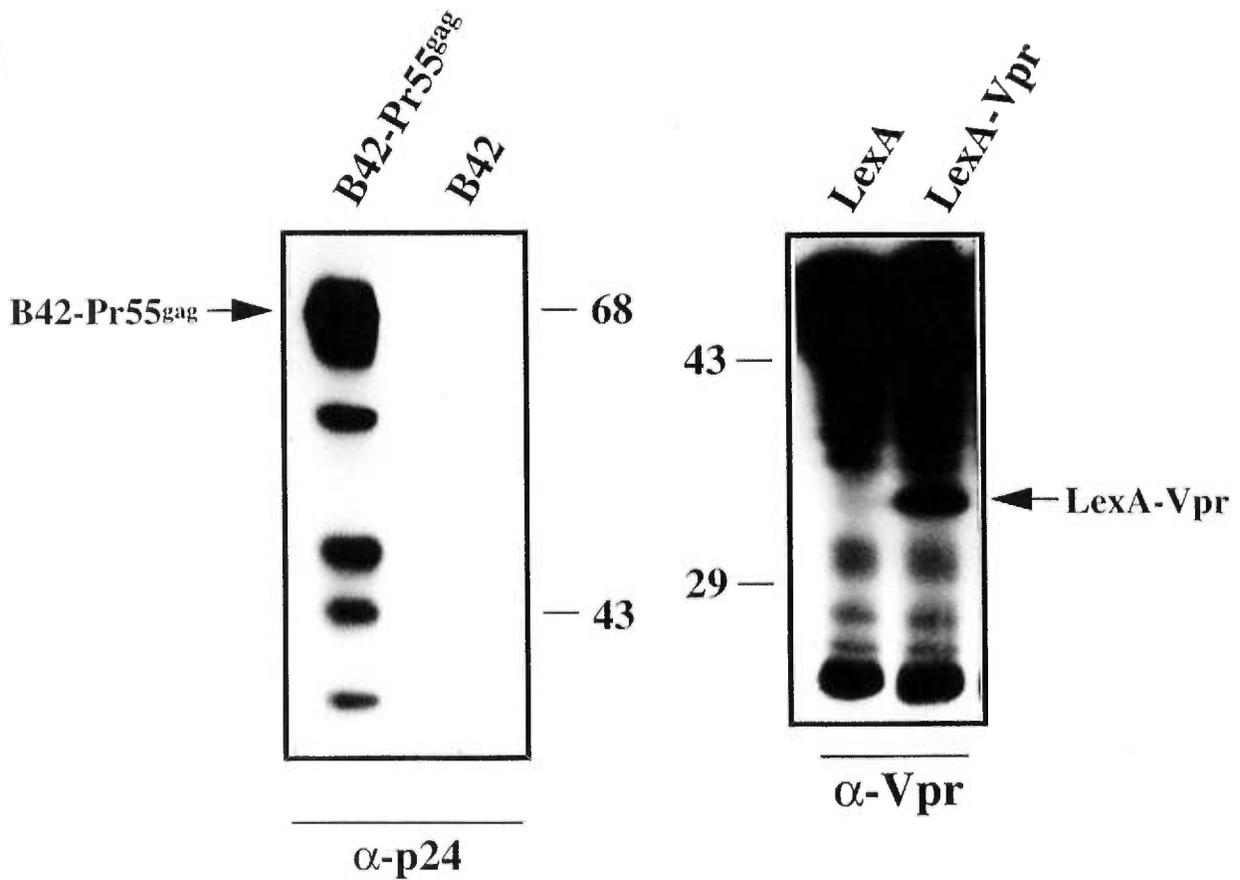
FIG. 5. Virion incorporation of Vpr in wild-type and mutant Gag HIV-1 proviruses. A, autoradiogram of a radioimmunoprecipitation used to analyze the ability of Vpr to incorporate into virion in wild-type and in HIV-1 (p6 L44P/F45S) mutant in MT-4 cells. p6 LF-PS corresponds to the HIV-1 (p6 L44P/F45S) mutant. Lanes 1 to 4 show the cell-associated proteins, while lanes 5 to 8 show the protein from virions. Mock (lanes 1 and 5) and HIV-1 proviral construct mutated in the Vpr initiation codon (R-) (lanes 2 and 6) transfected MT-4 cells were also included as controls. R- proviral construct does not express Vpr. B, autoradiogram of a radioimmunoprecipitation used to analyze the ability of Vpr to incorporate into virions in wild-type and in the HIV-1 p7 H23C and HIV-1 p7 Δ K14-T50 in COS-7 cells. Lanes 9 to 13 show virion-associated proteins. Mock (lane 9) and HIV-1 proviral construct mutated in the Vpr initiation codon (R-) (lane 10) transfected COS-7 cells were also included as controls. C, relative virion incorporation levels of Vpr in wild-type and Gag mutants based on autoradiography scanning is depicted in this graph (see *Experimental procedures*). This quantification represents averaged data from two independent experiments.

FIGURES

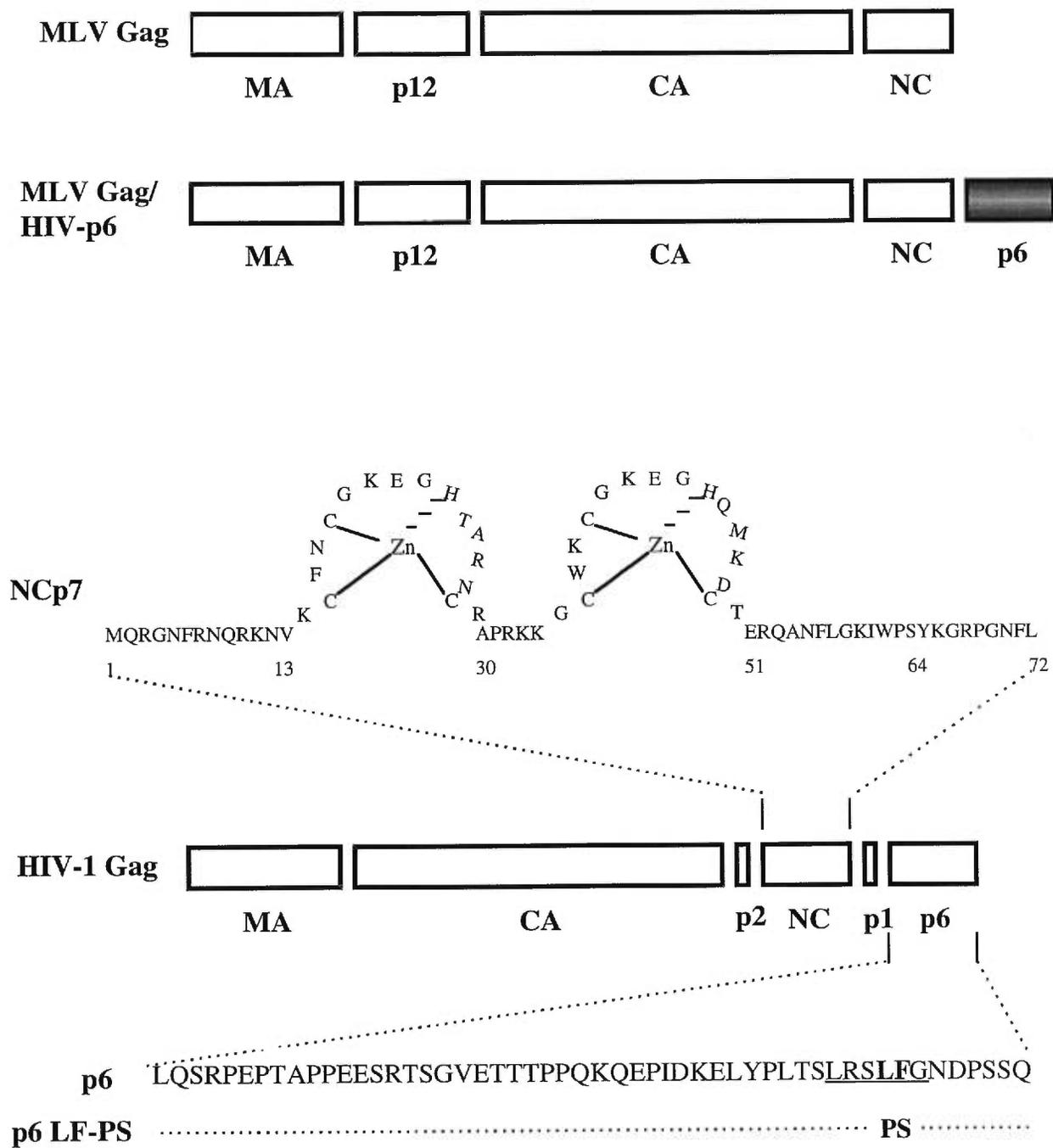
A)



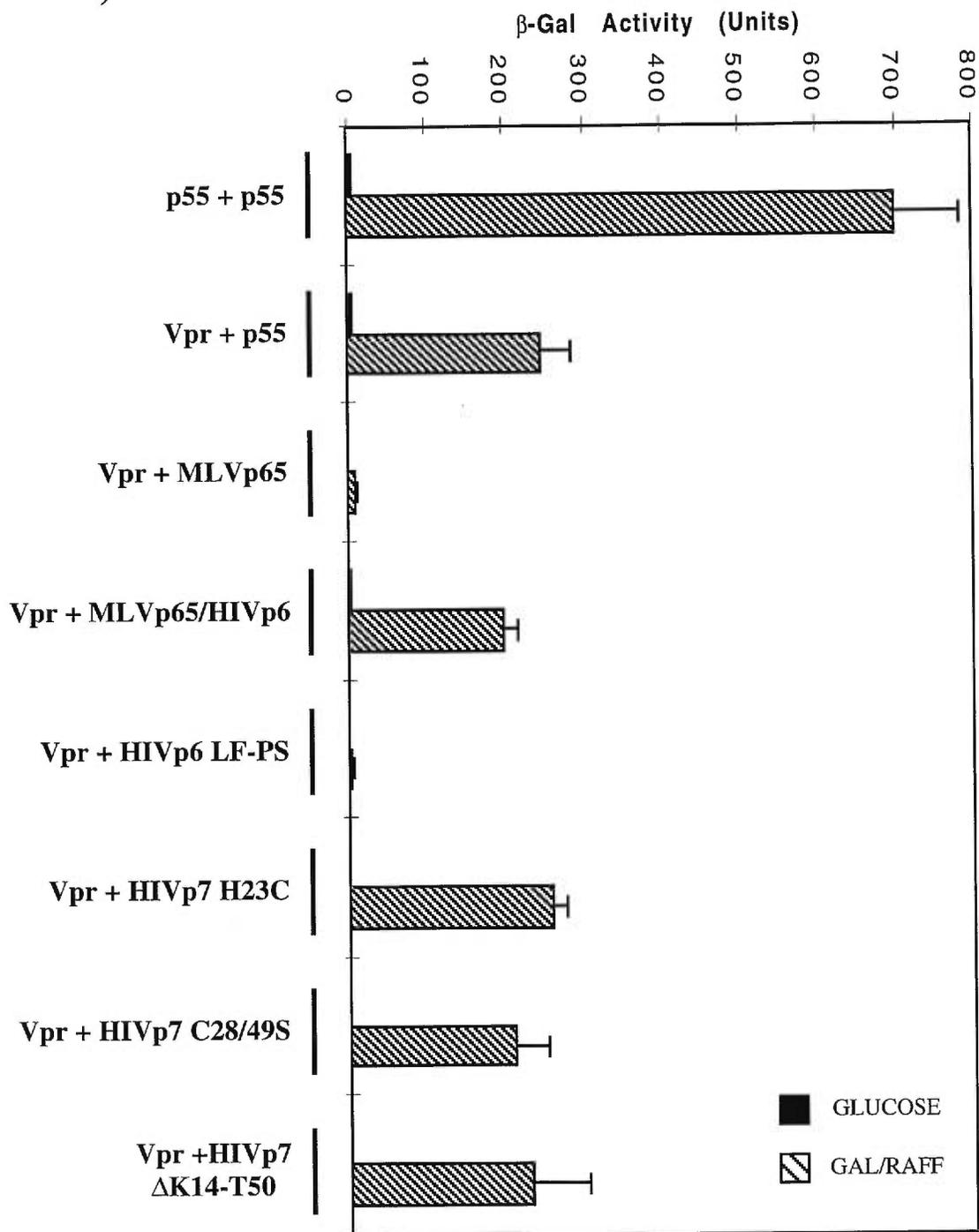
B)



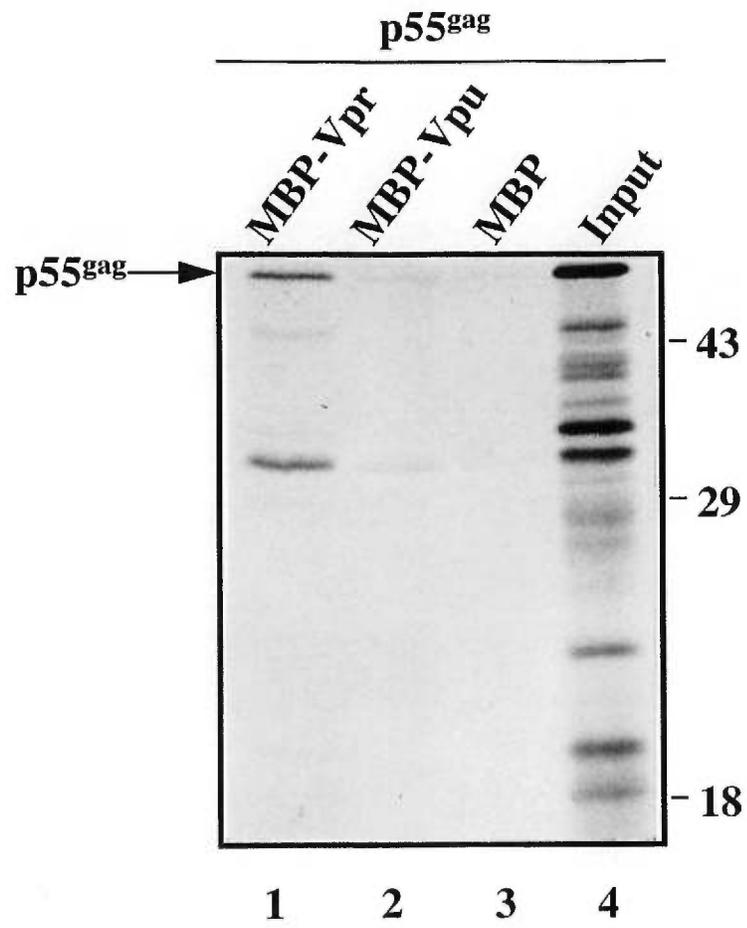
A)



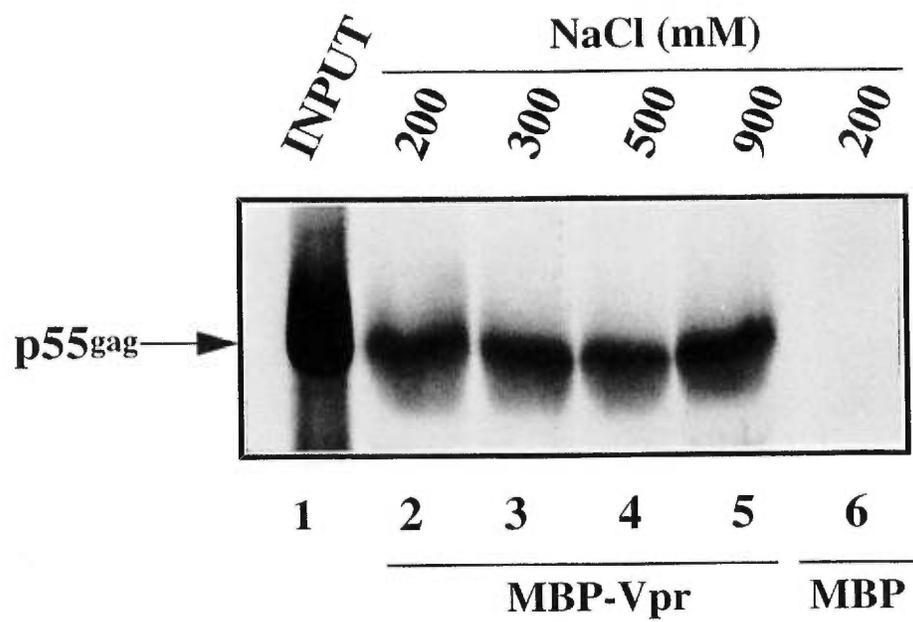
B)



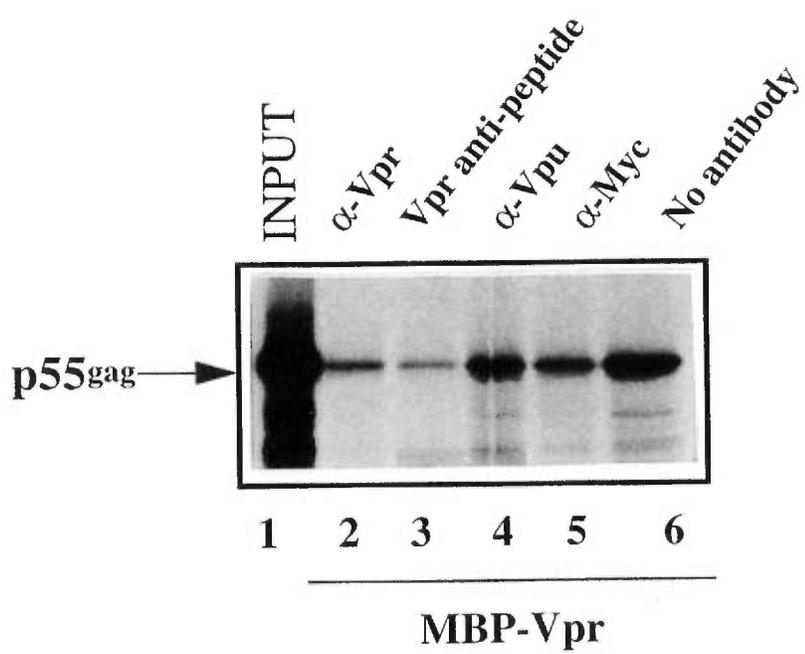
A)

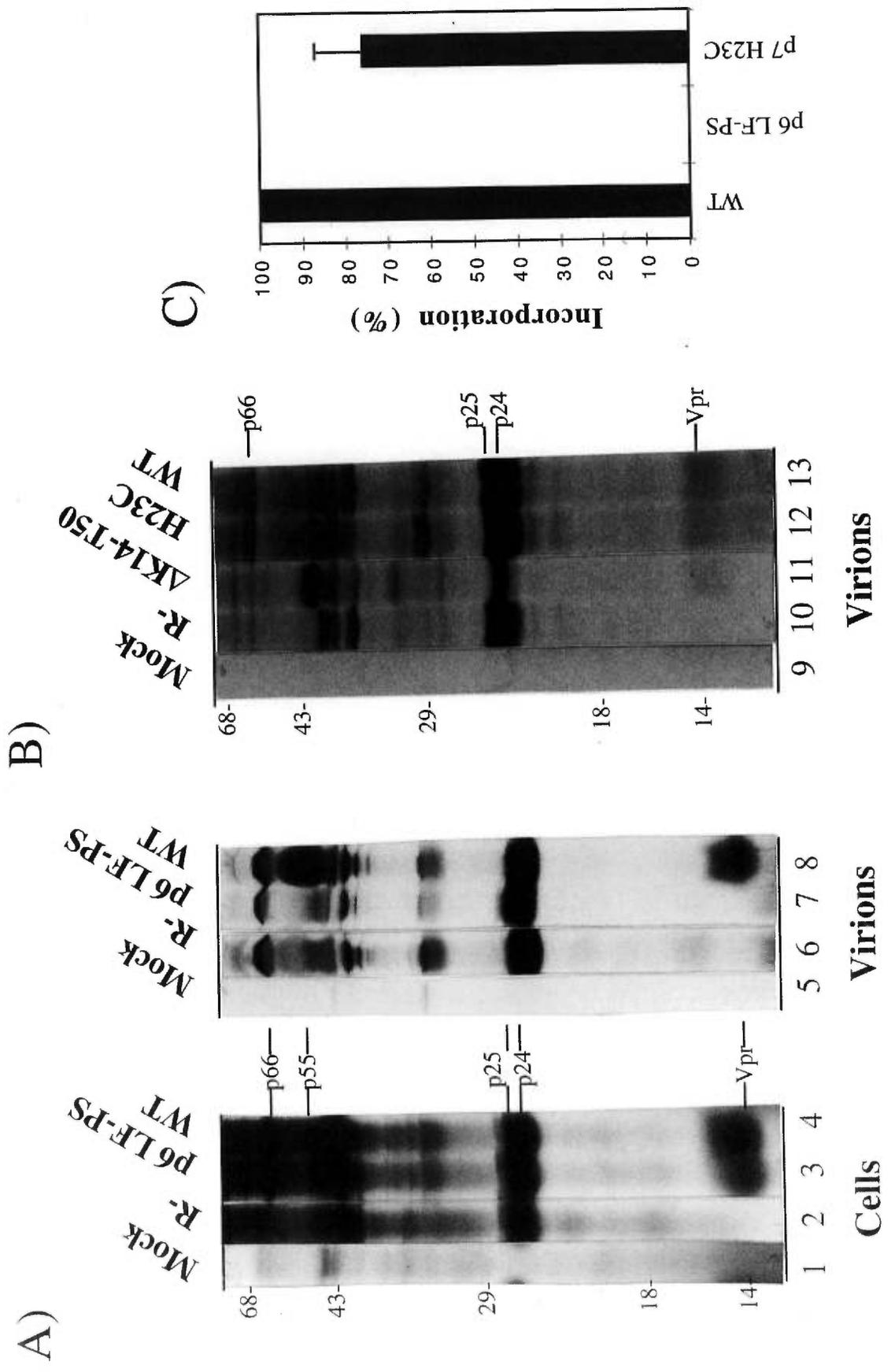


B)



C)





CHAPITRE 3

DISCUSSION

DISCUSSION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du SIDA. Ce virus de la famille des lentiviridae possède un génome complexe qui le différencie des rétrovirus simples. Ainsi, en plus des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*, le VIH renferme au moins six gènes additionnels (*tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* et *vpr*), appelés gènes auxiliaires (Emerman et Malim, 1998). Plusieurs études ont récemment confirmé la participation de ces gènes dans le contrôle de la réplication et de l'infectivité virale (Cullen, 1998; Miller et Sarver, 1997). Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires associés à l'expression de ces protéines lors de la réplication virale sera déterminante dans la lutte contre le SIDA. En effet, elle nous permettra d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à contrer certains mécanismes du cycle viral.

Le gène *vpr* code pour une petite protéine de 15 kDa (Cohen *et al.*, 1990). De façon intéressante, la protéine Vpr démontre une localisation nucléaire lorsqu'exprimée en absence de toutes autres protéines virales. Cependant, en présence du précurseur p55 Gag, Vpr se localise principalement près de la membrane cellulaire où elle sera subséquentement incorporée dans les particules virales bourgeonnantes durant le processus d'assemblage (Lu *et al.*, 1993). En effet, Vpr est la protéine accessoire incorporée dans les particules virales de façon la plus abondante, suggérant ainsi que cette protéine joue un rôle crucial dans les étapes précoces de l'infection. En effet, nous savons aujourd'hui que la protéine Vpr est importante pour le transport du complexe de pré-intégration durant l'infection de cellules quiescentes (Heinzinger *et al.*, 1994; Subbramanian *et al.*, 1998). De plus, il a récemment été démontré que les molécules de Vpr incorporées dans les particules virales sont capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules en division afin de générer un environnement plus propice à l'expression du LTR du VIH (Hrimech *et al.*, 1998; Poon *et*

al., 1998). Cependant, le mécanisme moléculaire permettant l'incorporation de Vpr à l'intérieur des virions n'est toujours pas clairement défini.

Ainsi, dans cette étude, nous avons tenté de clarifier le mécanisme par lequel la protéine accessoire Vpr est incorporée en *trans* dans les particules virales. Par conséquent, nous nous sommes concentrés sur la possibilité d'interactions entre la protéine Vpr et le précurseur Gag p55 du VIH-1. Dans cette étude, nous avons démontré par des approches génétiques, en utilisant le système des deux-hybrides, ainsi que de manière biochimique, en utilisant *in vitro* la protéine de fusion MBP-Vpr, que Vpr pouvait spécifiquement et directement interagir avec le Pr55^{gag} du VIH-1. De plus, nous avons montré que le domaine p6 du Pr55^{gag} du VIH-1 était nécessaire et suffisant pour permettre l'interaction avec Vpr. Des substitutions dans le motif LXSLFG de p6^{gag}, motif ayant été démontré comme important pour l'incorporation de Vpr du VIH-1, ont complètement éliminé l'interaction entre Vpr et le Pr55^{gag} ainsi que l'incorporation de cette protéine accessoire à l'intérieur des particules virales. Par contre, des mutations ou même la délétion complète des deux doigts de zinc de la nucléocapside (NC) n'ont affecté ni l'interaction entre Vpr et le Pr55^{gag}, ni l'incorporation de Vpr dans les virions. Du côté de Vpr, nos résultats ont démontré, en accord avec la majorité de la littérature sur le sujet, que l'intégrité de l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale de Vpr est essentielle pour l'interaction avec le Pr55^{gag}. En fait, nos résultats suggèrent fortement que le mécanisme par lequel la protéine Vpr est incorporée en *trans* dans les particules virales du VIH-1 nécessite une interaction directe entre la partie C-terminale du domaine p6 du Pr55^{gag} et l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale de Vpr.

Il a clairement été démontré, en générant des délétions dans le Pr55^{gag} du VIH-1, que le domaine p6 situé à l'extrémité C-terminale du Pr55^{gag}, était la région requise pour que Vpr puisse être incorporée dans les particules virales (Checroune *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1995; Paxton *et al.*, 1993). Cependant, une interaction directe entre Vpr et le Pr55^{gag} n'avait jamais été clairement démontrée. Dans la présente étude, nous avons démontré pour

la première fois la nécessité d'une l'interaction directe entre Vpr et le Pr55^{gag} pour l'incorporation de cette protéine accessoire à l'intérieur des virions. En effet, un mutant utilisé dans cette étude, le mutant LF-PS dans le domaine p6^{gag}, était incapable d'interagir avec Vpr et, de plus, dans le contexte d'un provirus infectieux, perdait l'incorporation virale de cette protéine accessoire, suggérant ainsi qu'une interaction entre ces deux protéines était nécessaire pour l'incorporation virale de Vpr. La mise en évidence de l'interaction à des concentrations de sel de 900 mM suggère une interaction de haute affinité. Ce résultat obtenu *in vitro* ne semble pas correspondre à la réalité *in vivo*, puisque toutes les tentatives afin de co-précipiter les protéines p55 et Vpr à partir de cellules infectées ou transfectées se sont avérées vaines. Ceci suggère une interaction transitoire ou de faible affinité *in vivo*. Nos résultats soutiennent l'interaction de Vpr avec le domaine p6 du Pr55^{gag}, mais n'explique pas ce paradoxe.

Cependant, des interactions entre Vpr et d'autres domaines de Gag ont été démontrées. Récemment, le groupe de de Rocquigny *et al.* a montré, en utilisant des peptides synthétisés chimiquement, que la NCp7^{gag} pouvait interagir directement avec Vpr *in vitro* alors qu'un peptide de p6^{gag} ne démontrait aucune interaction avec Vpr (De Rocquigny *et al.*, 1997). Des résultats similaires avaient été observés par un autre groupe (Li *et al.*, 1996). De plus, le travail de de Rocquigny *et al.* suggère que les doigts de zinc de la NC seraient importants pour l'incorporation de Vpr dans les particules virales. Cependant, nos études d'interactions entre Vpr et le Pr55^{gag}, ainsi que nos expériences d'incorporation *in vivo*, semblent suggérer que les doigts de zinc de la nucleocapside, dans le contexte d'une polyprotéine (Pr55^{gag}), ne soient pas essentiels pour l'interaction entre Vpr et le Pr55^{gag}. Il est possible que ces données contradictoires soient le résultat des différentes méthodes expérimentales utilisées. Cependant, plusieurs évidences expérimentales antérieures supportent nos données de nature génétique. Les groupes de Paxton *et al.* et de Lavallée *et al.*, ont inséré des mutations ponctuelles affectant l'intégrité des doigts de zinc de la NC du VIH-1, et n'ont observé aucun effet significatif sur

l'incorporation virale de la protéine Vpr (Lavallée *et al.*, 1994; Paxton *et al.*, 1993). De plus, chez le VIH-2, Vpx, une protéine très similaire à Vpr étant aussi incorporée spécifiquement dans les particules virales, n'est aucunement affectée par la délétion complète de la NC du VIH-2, alors que la délétion du domaine p6 engendre la perte de l'incorporation de la protéine Vpx (Wu *et al.*, 1994).

Donc, à la lumière de nos résultats et de plusieurs publications antérieures, nous voulons proposer un modèle pour le mécanisme d'incorporation virale de la protéine Vpr du VIH-1. Nous suggérons que la protéine Vpr ne peut interagir avec le domaine p6 que lorsque ce dernier fait partie de la polyprotéine p55^{gag}. Cette affirmation est basée sur différentes expérimentations effectuées dans notre propre laboratoire, ainsi que sur différents essais infructueux publiés dans la littérature (De Rocquigny *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1996; Pancio et Ratner, 1998). Donc, dans le contexte du Pr55^{gag}, le domaine p6 aurait une conformation propice afin d'interagir directement avec Vpr, et l'entraîner à l'intérieur de la particule virale bourgeonnante. Des évidences ont déjà suggéré que certains domaines du Pr55^{gag}, plus précisément la matrice (MAp17) et la capsid (CAp24), possèdent des structures différentes dans le contexte de la polyprotéine p55^{gag} que sous leurs formes matures, MA et CA, respectivement (Gitti *et al.*, 1996; Zhou et Resh, 1996). Ensuite, après l'activation de la protéase virale à l'intérieur du virion immature, le Pr55^{gag} subit une maturation qui générera les différentes protéines de structure; MAp17, CAp24, NCp7 et p6. Cette libération du domaine p6 sous sa forme mature résulterait en sa dissociation de Vpr. Par conséquent, Vpr pourrait subséquemment s'associer avec d'autres protéines dans le virion, comme par exemple avec la NC, afin de remplir son rôle au début de l'infection de cellules quiescentes (transport du complexe de pré-intégration) ainsi que dans les cellules en division (arrêt du cycle cellulaire en G₂).

Le domaine p6, comme le gène vpr, est unique aux lentivirus de primates. Donc, il est probable que le domaine p6 des lentivirus de primates autres que le VIH-1 soit impliqué dans l'incorporation de Vpr, et dans le cas du VIS et du VIH-2, de la protéine homologue à

Vpr qui est aussi incorporée dans la particule virale, Vpx. La Figure 18 nous donne un aperçu de la diversité du domaine p6 à travers les différentes familles des lentivirus de primates. Comme nous pouvons le constater, ce domaine démontre une variabilité considérable à travers les souches du VIH-1, VIH-2 et du VIS. Il est à noter que le VIS_{CPZ} (chimpanzé) est hautement similaire au VIH-1. En effet, cette souche du VIS ne code pas pour le gène *vpx* mais pour le gène *vpu*, un gène absent chez toutes les autres souches du VIH-2 et du VIS identifiées à présent (Cohen *et al.*, 1988; Myers *et al.*, 1994). Cependant, deux régions dans le domaine p6 semblent être conservées parmi les différents groupes de lentivirus de primates. Les motifs PTAPP et LXSLFG (encadrés de lignes pleines sur la Figure 18) sont très conservés parmi les différentes souches du VIH-1, VIH-2 et du VIS. Les quelques études de mutagenèse qui se sont concentrées sur le motif PTAPP ont suggéré que cette région est importante dans le bourgeonnement efficace des virions (Dettenhofer et Yu, 1998; Göttlinger *et al.*, 1991).

Comme nous l'avons montré dans cet ouvrage, la protéine Vpr du VIH-1 nécessite la partie C-terminale du domaine p6 (contenant le motif LXSLFG) pour interagir avec le Pr55^{gag}, et subséquemment être incorporée dans les virions du VIH-1. De plus, des études ont démontré que le domaine p6 du VIH-2 était aussi nécessaire pour l'incorporation de Vpx (Wu *et al.*, 1994). Cependant, il est intéressant de noter que la protéine Vpr du VIH-1 est incorporée avec très peu d'efficacité à l'intérieur des virions du VIH-2 (Kondo *et al.*, 1995). De même, la protéine Vpx du VIH-2 n'est pas incorporée dans les particules virales du VIH-1. Comme nous pouvons le constater en regardant la Figure 18, le motif LXSLFG est hautement conservé parmi les différents groupes des lentivirus de primates. Cependant, les études d'incorporation de la protéine Vpx du VIH-2 et du VIS ont clairement démontré que la partie N-terminale du domaine p6 était requise pour l'incorporation de cette protéine accessoire à l'intérieur des virions (Accola *et al.*, 1998; Pancio et Ratner, 1998; Wu *et al.*, 1994). En effet, une étude récente a identifié les acides aminés 15 à 40 du domaine p6 du VIH-2_{ROD} (460 à 485 sur la Figure 18) comme étant nécessaires pour l'incorporation de

Vpx dans les virions (Pancio et Ratner, 1998). En observant la Figure 18, il est intéressant de constater que la région située entre les acides aminés 460 et 485 du VIH-2 (encadré pointillé sur la Figure 18) correspond à une région de grande variabilité entre le VIH-1/VIS_{CPZ} et le VIH-2/VIS. Donc, malgré l'homologie structurelle et fonctionnelle de la protéine Vpr du VIH-1 avec la protéine Vpx du VIH-2/VIS, il semble que ces deux protéines nécessitent différentes séquences pour leur incorporation dans les particules virales. Cependant, dans les deux cas, l'encapsidation virale de ces protéines accessoires est dépendante du domaine p6 du Pr55^{gag}.

La situation est similaire en ce qui concerne les régions nécessaires dans Vpr et Vpx pour leur incorporation virale. En effet, comme nous l'avons démontré dans cet ouvrage, il est clair que l'intégrité de l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale de Vpr du VIH-1 est nécessaire pour l'incorporation de cette protéine dans les virions (encadré pour le VIH-1/VIS_{CPZ}-Figure 19). De plus, notre travail est en accord avec plusieurs publications antérieures (Di Marzio *et al.*, 1995; Mahalingam *et al.*, 1997; Mahalingam *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1995). Par contre, comme nous pouvons le constater en observant la Figure 19, les séquences de l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale de Vpr ne sont pas très conservées chez Vpx du VIH-2 et du VIS, malgré la prédiction par ordinateur d'une hélice alpha comprenant les acides aminés 20 à 40 de Vpx du VIH-2/VIS (Kappes *et al.*, 1993). Les études effectuées afin d'identifier la région importante dans Vpx pour son incorporation à l'intérieur des virions ont identifié une région entre les acides aminés 73 et 90 de cette protéine accessoire (encadré pour le VIH-2/VIS-Figure 19) (Pancio et Ratner, 1998; Park et Sodroski, 1995). Donc, comme pour le domaine p6 du VIH-1 et du VIH-2/VIS, les régions importantes dans Vpr et Vpx pour l'incorporation virale de ces protéines sont totalement différentes. Ceci explique probablement pourquoi l'incorporation de Vpr du VIH-1 dans le VIH-2, et de Vpx dans le VIH-1 n'est pas très efficace. Finalement, il sera intéressant d'étudier le mécanisme et les séquences importantes pour l'incorporation virale de la protéine Vpr du VIH-2 et du VIS, car très peu d'études ont été effectuées sur cette

protéine. Cependant, des études préliminaires ont suggéré que la partie N-terminale du domaine p6 du VIS était nécessaire pour l'incorporation de la protéine Vpr de ce rétrovirus (Accola *et al.*, 1998).

Quel est le rôle et l'importance de Vpr dans la pathogenèse du virus de l'immunodéficience humaine *in vivo*? Malgré l'absence d'un système animal pour étudier cette dernière question, des travaux récents ont présenté des observations intéressantes. Tout d'abord, de manière très élégante le groupe de Fletcher *et al.* a démontré que les fonctions d'arrêt du cycle cellulaire ainsi que d'import nucléaire du complexe de pré-intégration associé à la protéine Vpr du VIH-1 étaient accomplies séparément par deux protéines chez le VIH-2/VIS, Vpr et Vpx, respectivement (Fletcher *et al.*, 1996). De plus, des études chez les singes (macaques) où un virus du VIS dans lequel les gènes *vpr* et *vpx* ont été délétés ont démontré une virulence fortement atténuée de ce virus et, de plus, aucun signe de maladie ne fut observé (Gibbs *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent fortement que la présence de ces deux gènes est essentielle pour la pathogenèse du VIS chez les singes. Puisque le VIH-1 ne code que pour le gène *vpr*, qui semble remplir les fonctions à la fois du gène *vpr* et du gène *vpx* du VIH-2 et du VIS, il est tentant de spéculer, en se basant sur le travail et Gibbs *et al.* discuté ci-haut, que l'inactivation des deux fonctions du gène *vpr* du VIH-1 pourrait éliminée la pathogenèse du VIH-1 *in vivo*. En accord avec cette dernière hypothèse, il a été démontré que des délétions et/ou des mutations dans la région C-terminale de la protéine Vpr du VIH-1 semblent affecter la pathogenèse du virus *in vivo* (Wang *et al.*, 1996). De plus, il a récemment été observé que le gène *vpr* du VIH-1 démontre un haut degré de conservation dans les régions importantes de la protéine durant des transmissions de mères à enfants (Yedavalli *et al.*, 1998). Ceci suggère un rôle important pour Vpr dans l'infection du VIH-1. Finalement, comme nous l'avons mentionné dans la revue de la littérature, des travaux récents suggèrent que les molécules de Vpr incorporées dans les virions peuvent remplir les deux fonctions de Vpr; causer un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules en division (Poon *et al.*, 1998; Hrimech *et al.*, 1998) et, par

ailleurs, aider le transport du complexe de pré-intégration dans les cellules quiescentes. Encore plus intéressant, les travaux des groupes de Poon *et al.* et de Hrimech *et al.* ont démontré que les molécules de Vpr incorporées dans des virus où la réplication a été bloquée par des inhibiteurs de la transcriptase inverse et/ou de la protéase virale, sont encore capable d'induire un arrêt en G₂ (Poon *et al.*, 1998; Hrimech *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent donc que des virus non-infectieux, comme le sont beaucoup de virions *in vivo*, peuvent causer un arrêt du cycle cellulaire grâce aux molécules de Vpr incorporées dans leurs particules virales, et par conséquent, engendrer une suppression fonctionnelle des cellules immunitaires.

**Figure 18. Diversité du domaine p6
chez le VIH-1, VIH-2 et le VIS**

Début de p6

	p7	\ /	'p1'	\ /	Motif PTAPP		
->	p7	\ /	'p1'	\ /			
most-likely	DCT.....	ERQANFLGKIWPSH.	KGRPGNPL.....	QSRP.....	EPTAPPA.	459	
A_U455	-----	-----	N-----P.	-----	-----	454	
B_HXB2R	-----	-----	Y-----	-----	-----E.	460	
C_UG268	-----	-----	PN-----	-----	-----E	455	
D_ELI	-----	-----	R-----	-----	-----	461	
G_LBV217	-----	-----	-----	-----N--	-----S----	459	
H_VI557	-----	-----	SPN-----	-----	-----	460	
CPZGAB	-----	G--V---G--R.S---	V-----	-----N-T.	-----I.	470	
CPZANT	N-PAT.....	NTGKV----	PT-TWWGC----	V-----	QKEEVV.....	-----I.	488
A_ROD	N-P.....	D--G---LGPWG..	-K.-R--PVA.	-----	QVPQGL.....	T-----V.	461
B_EHOA	K-P.....	---G---FGPWG..	-K.-R--PVQAPQGI	VPSAPPMPAFGMT	PQGA.....	I-S-----	476
SD_MM251	K-P.....	D--G---LGPWG..	-K.-R--PMA.	-----	QVHQGL.....	T-----E.	463
STM_STM	K-P.....	---VG---FGPWG..	-K.-H--PMA.	-----	QIPQGL.....	T-----E.	464
VER_AGM3	--RG.....	-V---YGRWVG.AK.	-R--P.	-----	AATLGV.....	-----PP	473
GRI_AGM677	--K.....	NG-----YGHWGG.	AK.-R--V.	-----	-Y-GDTVGL	-----ME	465
TAN_AGM17	--R.....	.GG-----RRMPAPX.	GSK-R--	-----	E-GGA.....	V-----IA	472

most-likely	ESFGFGEE..	TTPSQKQ.EQKDK.	479
A_U455	-I--M--K..	M-SPA--L--R.	474
B_HXB2R	---RS-V-T.	---P---PI--	481
C_UG268	PTA.....	PPA---	R.-G.---PP--P--R.	480
D_ELI	I-----	481
G_LBV217	---L---	IA--P--P..	477
H_VI557	-----	M--PP--R--A.	480
CPZGAB	---Y-YQ--EKS--K-EG.	487
CPZANT	---TYQE..	-HKR-OKGL-G..E.	506
A_ROD	DPAVDLL-KYM	QQGKR-R--RER	PKYK	EVTEDLL	494
B_EHOA	DPAEEMLK	NYMQLGK--K-NR	RRPYK	502
SD_MM251	DPAVDLLK	NYMQLGKQ-R-SRE	-PYK	489
STM_STM	DPAADLLR	SYMQLGK--R-SR	KTPYK	490
VER_AGM3	S.....	PYDPAK	KLQYADK	GKQLR--R	PPAVN	504
GRI_AGM677	T.....	AYDPAK	KLQYAEKG-RLR	-ERE	QTRKQ	495
TAN_AGM17	AHGFP	TG.....	PPVAGAYDPAK	RLLGQYAKK	GDQLRR--E	509

	VpR	<-binding->	/ p6 terminus (80%)	
most-likely	E..LYPLASLNSL.....	KQ	492
A_U455QT--V--K--FGNDPLS-		493
B_HXB2R	---T--R--FGNDPSS-		500
C_UG268	---P-I--.....S		488
D_ELI	---T--K--FGNDPLS-		500
G_LBV217	---T--.....S		487
H_VI557S..P-T--.....S		489
CPZGAB	---SS---PT--K--FGSDPSS-		508
CPZANT	---P-SY--K--FGK...D		522
A_ROD	HLEQGETPYREPPT.	EDL-.K---FGK...D		522
B_EHOA	EVT..EDL-.K---FGE...D		519
SD_MM251	EVT..EDL-.K---FGG...D		506
STM_STM	EVT..EDL-.K---FGE...D		507
VER_AGM3	PDWT--G-S...---FGE...D		521
GRI_AGM677	KEK-V.EDV..-S--FGG...D		513
TAN_AGM17	-L.EDY...---SS		518

Motif LXSLFG

Figure 19. Diversité de Vpr chez le VIH-1, VIH-2 et le VIS

Hélice alpha

	most-likely	MEQA.....PRE..DQG.....PQREPY.NEWT..L.ELLEELKREAVRHF.PRELLFQ	42
VIH-1	A_U455	-----A-XA.....H-D-----QW-HG	41
	B_HXB2R	-----H.....N-----IW-HG	41
	D_ELI	-----A.....S-----IW-HS	41
	O_ANT70	-----N-----AK-F---A.....PW-HA	41
	O_MVP5180	-----L..N-----A-F.....E-----PW-QA	41
VIS _{CPZ}	CPZGAB	-----P-----Q-A...-T---N-----PW-H-	41
	CPZANT	-----Q.-E.....M---L...-T---I-N-----QPT-QH	41
VIH-2	A_ROD_VPR	-AE-PT.....EL-PV..-GT.....L---G.D--I..I.-I-R-I-E--LK--D---IA	46
	B_EHOA_VPR	-AE-VP.....EI-P...-KN.....-W.EQ-V..V.DV---I-Q--LK--D---TA	46
VIS	SD_MM251_VPR	-ER.....-P...NE-.....-W.D--V..V.-V---E--LK--D---TA	42
	STM_VPR	-THR.....-P...E.....-W.D--V..V.-V---I-Q--L---D---SA	42
VIH-2	A_ROD_VPX	-TD.....-TVPP.....NSG-ETIG-AFAW-NRTV-AIN---N-L,---I--	47
	B_EHOA_VPX	-D.....-RVPP.....NSG-ETVG-AFEW-ETT--H-N-V--N-L,---I--	46
VIS	SD_MM251_VPX	-SD.....-RIPP.....NSG-ETIG-AFEW-NRTV--IN---N-L,---I--	47
	STM_VPX	-SD.....-RIPP.....NSG-EAIE-AFEW-HRTV-DIN---N-L,---I--	47
	most-likely	LG...QHIYE...TYGDT..WEGV...EALIRIL.QQALFIH.FRIGCRHS.....RIGQ...	84
	A_U455	-----N.....I-----L-----Q-----I...	83
	B_HXB2R	-----A-----I-----L---X-----X	79
	D_ELI	-----V-----I-----L-----Q-----I...	83
	O_ANT70	-----Y-----V-----M-I-----L-T..Y---Q-----I...	83
	O_MVP5180	C...-Y-----M-I-----L-T..Y---Q-----ILPS	86
	CPZGAB	-----F--D.....-V-----I-----HL-----L-Q-----I...	83
	CPZANT	-EIGYMQ-T-...IH-EE..CRF	59
	A_ROD_VPR	---KY--T...RH---L--A...RE--KV--R---T---A-G-----	88
	B_EHOA_VPR	---NF--N...RH-N...L--A...GE--KL--R---L---G-Q-----	88
	SD_MM251_VPR	---N--N...RH---L--A...GE-----R--M---G-N-----	84
	STM_VPR	---NY--D...RH---L--A...GE--K---R---M---G-----	84
	A_ROD_VPX	VW...-RSWR...YWH-E..QGMSesyTKYRYLCII-K-VYM-.V-K--TCL.....GR-H...	94
	B_EHOA_VPX	VW...-KSWA...YWREE..QGMSISyTKYRYLC-M-K-M---AK--GCL.....-E-H...	93
	SD_MM251_VPX	VW...-RSW...YWH-E..QGMSQSYVKYRYLC-M-K---M..CKK---CL.....GE-H...	94
	STM_VPX	VW...RRSW...YWH-E..QGMPGSyVKYRYLC-I-K---M..SKR---CL.....GE-H...	94
	most-likely	.G.GG.RRGPPPRNPPSRS	100
	A_U455	.I.P-....G--GA---	96
	D_ELI	.I.RQ....A--GS---	96
	O_ANT70	.NPR-.G...R--GS---	97
	O_MVP5180	NT.R-.G...R--GS---	100
	CPZGAB	.L.PQ....RS-GSN--	96
	A_ROD_VPR	.T.R-.GN.-LSAI-TP-NMQ	105
	B_EHOA_VPR	.P--.GN.-LSAI---X	102
	SD_MM251_VPR	.P--.GN.-LSTI---	97
	STM_VPR	.P--.GN.-LATI--T-GVL	101
	A_ROD_VPX	.-P--W-P----PP--GLV	112
	B_EHOA_VPX	.-P--W-S----PP--GLA.X	112
	SD_MM251_VPX	.-A--W-P----PP--GLA	112
	STM_VPX	.-A--W-P----PP--GLA	112

CHAPITRE 4

CONCLUSION

CONCLUSION

De plus en plus d'évidences semblent suggérer que les protéines auxiliaires du VIH-1 ont une implication directe dans la pathogenèse associée à l'infection par ce virus. Ainsi, il semble que ces protéines agissent en modifiant différents mécanismes cellulaires de base afin que la propagation et/ou la réplication virale soient favorisées. Vpr, une protéine accessoire du VIH-1, est spécifiquement incorporée *en trans* à l'intérieur des particules virales. De plus, cette incorporation virale de Vpr semble être des plus importantes pour son rôle dans la réplication du VIH-1.

Les travaux décrits dans ce mémoire ont permis d'élaborer des systèmes permettant l'étude des interactions protéine-protéine entre Vpr et le précurseur Gag du VIH-1. En effet, en utilisant le système des deux-hybrides chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi qu'un système d'interaction *in vitro* en utilisant la protéine de fusion MBP, nous avons pu démontrer une interaction directe entre la protéine Vpr et le précurseur Gag p55 du VIH-1. De plus, nous avons démontré que le domaine p6 du précurseur Gag p55 était nécessaire et suffisant pour l'interaction avec Vpr, et que l'interaction entre cette dernière protéine et le Pr55^{gag} est nécessaire pour l'incorporation virale de Vpr. Finalement, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de proposer un modèle associé au mécanisme moléculaire de l'incorporation de la protéine Vpr dans les virions (voir Discussion). Ces études contribueront à éclaircir le mécanisme d'incorporation virale de la protéine Vpr du VIH-1 et permettront d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à contrer l'incorporation de cette protéine virale, inhibant ainsi ses effets précoces durant l'infection.

En plus du travail présenté dans cette thèse, je me suis intéressé lors de mon séjour dans le laboratoire du Dr. Éric Cohen, à un autre projet concernant l'implication de l'incorporation virale de Vpr dans les cellules en division. Ce travail a donné lieu à un article scientifique qui est présentement en soumission:

l-Hrimech, M., Yao, X-J., **Bachand, F.**, Rougeau, N., and E.A. Cohen. *HIV-1 Vpr functions as an immediate early protein during HIV-1 infection*, article soumis

CHAPITRE 5

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Éric A. Cohen, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'avoir été disponible pour répondre à mes questions (ainsi que d'avoir été parfois absent afin que j'y réponde moi-même!!!), pour ses précieux conseils lors de la rédaction de mon article et concernant la direction future de ma carrière.

Je me dois aussi de remercier le Dr. Xiao-Jian Yao pour ses nombreux conseils en biologie moléculaire ainsi que son aide pour la réalisation de la Figure 5 de mon article.

J'aimerais aussi remercier Nash et Nesrine Daniel, ainsi que Angelo Tiganos qui m'ont introduit aux techniques du système des deux-hybrides au début de ma maîtrise. Je remercie le Dr. Béatrice Allain pour sa patience et sa disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions concernant le système des deux-hybrides et les techniques d'interactions *in vitro*. Je voudrais aussi remercier le Dr. Andrew J. Mouland pour ses conseils sur la direction de mon article ainsi que pour la technique de Western blot.

J'aimerais aussi souligner la participation de nombreuses personnes qui ont aussi contribué, par leur discussion, remarques et assistance, aux projets:

Johanne Mercier et Nicole Rougeau pour leur support technique tout au long de mon séjour dans le laboratoire

Robert Lodge pour ses interminables discussions très tard dans la nuit...et aussi pour ses beignes!!!

Luc Bernier, pour son aide très appréciée en informatique...et aussi pour ses quelques lifts!!!

Ramu Subbramanian pour ses remarques et discussions sur mon projet

Martin Clément, avec qui j'ai bien aimé travailler en équipe...

Mohammed Hrimech, Gary-Pignac Kobinger, Sonia Tremblay, Nie Zilin, Zhao, Karine Levesque, Isabelle Courchesne, Julie Deschambeault, Janique Forget, Dominique

Bergeron, Sonia Broccoli, Éric Massé, Francis Deshaies, avec qui mes deux ans à la Maîtrise ont été des plus agréables.

Je voudrais aussi saluer et remercier mon ami Martin Richer, avec qui j'ai fait mon Baccalauréat, qui était mon voisin de labo durant mon "Honours" et qui fut mon collègue lors de ma Maîtrise...il y a des gens qui ne changeront jamais!!! Bonne chance dans ton voyage!!!

Je remercie aussi le Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) ainsi que le Conseil Médicale de Recherche (CRM) qui m'ont soutenu financièrement tout au long de ces travaux.

Enfin, je voudrais remercier le Destin, grâce à qui durant ma Maîtrise, j'ai rencontré la personne sans qui aujourd'hui la vie n'aurait vraiment pas le même couleur. C'est cette personne qui me fait sourire quand je m'éveille et qui me comprend sans avoir à parler. C'est aussi cette personne qui continue de me surprendre à tous les jours qui passent. Jamais je ne pourrai me passer de toi Audrey...

CHAPITRE 6

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Aboul-ela, F., Karn, J. and Varani, G. *The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein* . Journal of Molecular Biology, 253:313-32, 1995.

Accola, M., Bukovsky, A., Jones, M. and Göttlinger, H. (1998) *SIV_{mac} Vpr and Vpx incorporation is governed by a distinct region in the N-terminal half of P68^{ag}*, Cold Spring Harbor, New York.

Agostini, I., Navarro, J. M., Bouhamdan, M., Spire, B., Vigne, R. and Sire, J. *The human immunodeficiency virus type 1 vpr transactivator- cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIIB*. Journal of Molecular Biology, 261:599-606, 1996.

Aiken, C. and Trono, D. *Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis* . Journal of Virology, 69:5048-56, 1995.

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. *CC CKR5: A RANTES, MIP-1 , Mip-1 B Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1*. Science, 272:1955-1958, 1996.

Arrigo, S. J. and Chen, I. S. Y. *Rev is Necessary for Translation but not Cytoplasmic Accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu RNAs*. Genes & Development:808-819, 1991.

Arya, S. K., Beaver, B., Jagodzinski, L., Ensoli, B., Kanki, P. J., Albert, J., Fenyo, E. M., Biberfeld, G., Zagury, J. F., Laure, F. and et al. *New human and simian HIV-related retroviruses possess functional transactivator (tat) gene*. Nature, 328:548-50, 1987.

Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Kudchodkar, S., Chang, D., Nagashunmugam, T., Williams, W. V., Weiner, D. B. *HIV-1 viral protein R*

(Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cell and monocytoid cell in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 62:93-99, 1997.

Bandres, J. C. and Ratner, L. *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein down-regulates transcription factors NF-kappa B and AP-1 in human T cells in vitro after T-cell receptor stimulation*. *Journal of Virology*, 68:3243-9, 1994.

Barat, C., Lullien, V., Schatz, O., Keith, G., Nugeyre, M., Gruninger-Leitch, F., Barré-Sinoussi, F., Le Grice, S. and Darlix, J. L. *HIV-1 Reverse Transcriptase Specifically Interacts With the Anticodon Domain of its Cognate Primer tRNA*. *EMBO Journal*, 8:3279-3285, 1989.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W., Montagnier, L. *Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*. *Science*:868-871, 1983.

Bedinger, P., Moriarty, A., Von Bostel II, R., Donovan, K., Steimer, N. and Littman, D. *Internalization of human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4*. *Nature*, 334:162-165, 1988.

Bergeron, J., Brenner, M., DY., T. and Williams, D. *Calnexin: A membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Trends in Biochemical Science*, 19:124-128, 1994.

Bodéus, M., Margottin, F., Durand, H., Rouer, E. and Benarous, R. *Inhibition of prokaryotic cell growth by HIV-1 vpr*. *Research in Virology*, 148:207-213, 1997.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. and Cullen, B. R. *Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins*. *Cell*, 82:485-94, 1995.

Bor, Y. C., Miller, M. D., Bushman, F. D. and Orgel, L. E. *Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro*. *Virology*, 222:283-8, 1996.

- Bouhamdan, M., Benichou, S., Rey, F., Navarro, J. M., Agostini, I., Spire, B., Camonis, J., Slupphaug, G., Vigne, R., Benarous, R. and Sire, J.** *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Protein Binds to the Uracil DNA Glycosylase DNA Repair Enzyme.* Journal of Virology, 70:697-704, 1996.
- BouHamdan, M., Xue, Y., Baudat, Y., Hu, B., Sire, J., Pomerantz, R. J. and Duan, L.-X.** *Diversity of HIV-1 Vpr interactions involves usage of the WXXF motif of Host cell protein.* Journal of Biological Chemistry, 273:8009, 1998.
- Bour, S., Schubert, U., Peden, K. and Strebel, K.** *The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?* Journal of Virology, 70:820-9, 1996.
- Braaten, D., Franke, E. K. and Luban, J.** *Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses.* Journal of Virology, 70:4220-7, 1996.
- Buchow, H., Tschachler, E., Gallo, R. and Reitz, M. J.** *HIV-1 replication requires an intact integrase reading frame.* Hematology and Bloodtransfusion, 32:402-405, 1989.
- Bukovsky, A. A., Dorfman, T., Weimann, A. and Gottlinger, H. G.** *Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease.* Journal of Virology, 71:1013-8, 1997.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Shavora, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and Stevenson, M.** *A Nuclear Localisation Signal Within HIV-1 Matrix Protein that Governs Infection of Non-Dividing Cells.* Nature, 365:666-669, 1993.
- Bukrinsky, M. I., Shavora, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. and Stevenson, M.** *Active Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89:6580-6584, 1992.

Burniston, M., El-Helou, P. and Luban, J. (1998) *The nucleocapsid domain promotes interaction between HIV-1 Gag polyprotein monomers.* Cold Spring Harbor, New York.

Burns, D. and Desrosiers, R. *Envelope sequence variation, neutralizing antibodies, and primate lentivirus persistence.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 188:185-219, 1994.

Cai, M., Zheng, R., Caffrey, M., Craigie, R., Clore, G. and Gronenborn, A. *Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase.* Nature Structural Biology, 4:567-577, 1997.

Campbell, S. and Vogt, V. M. *Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology, 69:6487-97, 1995.

Carriere, C., Gay, B., Chazal, N., Morin, N. and Boulanger, P. *Sequence requirements for encapsidation of deletion mutants and chimeras of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor into retrovirus-like particles.* Journal of Virology, 69:2366-77, 1995.

Cavert, W. and Haase, A. *A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstruction.* Science, 208:1865-1866, 1998.

Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M. D., Desrosiers, P., Tiollais, P. and Sonigo, P. *Sequence of Simian Immunodeficiency Virus From Macaques and its Relationship to other Human and Simian Lentiviruses.* Nature, 328:543-547, 1987.

Chan, D., Fass, D., Berger, J. and Kim, P. *Core structure of gp41 form the HIV envelope glycoprotein.* Cell, 89:263-273, 1997.

Checroune, F., Yao, X.-J., Göttlinger, H. G., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Incorporation of Vpr into Human immunodeficiency virus type 1: Role of conserved*

regions within the P6 domain of the pr55^{gag}. Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome, 10:1-7, 1995.

Chesebro, B., Buller, R., Portis, J. and Wehrly, K. *Failure of Human Immunodeficiency Virus Entry and Infection in CD4-Positive Human Brain and Skin cells.* Journal of Virology, 64:215-219, 1990.

Clapham, P., McKnight, A., Simmons, G. and Weiss, R. *Is CD4 sufficient for HIV entry? Cell surface molecules involved in HIV infection .* Philosophical Transactions of the Royal Society of London-Series B: Biological Sciences, 342:67-73, 1993.

Clark, S., Saag, M., Decker, W., Capmbell-Hill, S., Roberson, J., Veldkamp, V., Kappes, J., Hahn, B. and Shaw, G. *High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection.* New England Journal of Medecine, 324:954-960, 1991.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Snatos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.M., Montagnier, L. *Isolation of a New Human Retrovirus from West Africa Patients with AIDS.* Science, 223:343-346, 1986.

Clayton, L., Hussey, R., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y. and Reinherz, E. *Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding.* Nature, 335:363-366, 1988.

Coady, M. J., Daniel, N. G., Tiganos, E., Allain, B., Friborg, J., Lapointe, J. Y. and Cohen, E. A. *Effects of Vpu expression on Xenopus oocyte membrane conductance.* Virology, 244:39-49, 1998.

Coffin, J., Hughes, S. and Varmus, H. (1997) *In Retroviruses*, Cold Spring Harbor, New York.

Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein.* Journal of Virology, 64:3097-3099, 1990a.

Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodrosky, J. G. and Haseltine, W. A. *Identification of HIV-1 vpr product and function.* Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome, 3:11-18, 1990b.

Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1.* Nature, 334:532-534, 1988.

Collette, Y., Dutartre, H., Benziane, A., Ramos, M., Benarous, R., Harris, M. and Olive, D. *Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects .* Journal of Biological Chemistry, 271:6333-41, 1996.

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

Craven, R., Leure-duPree, A., Weldon , R. and Wills, J. *Genetic analysis of the major homology region of the Rous Sarcoma virus Gag protein.* Journal of Virology, 69:4213-4227, 1995.

Cullen, B. R. *Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights?* Cell, 73:417-20, 1993.

Cullen, B. R. *HIV-1 auxiliary proteins/making connections in a dying cell.* Cell, 93:685-692, 1998

Dahmus, M. *Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II.* Biochemica & Biophysica Acta, 1261:171-182, 1995.

Dagleish, A. G., Beverly, P. C. and Clapham, P. R. *The CD4 (T4) Antigen is an Essential Component of The Receptor for The AIDS Retrovirus.* Nature, 763, 1984.

Dayton, A., Sodroski, J. and Rosen, C. *The trans-activator gene of the human T-cell lymphotropic virus type III is required for replication.* Cell, 50:941-947, 1986.

De Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J.-L. and Rocque, B. P. *The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr.* Journal of Biological Chemistry, 272:30753-30759, 1997.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Hutley, G., Smith, M., Allikmets, R., Goedert, J., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, E., Daslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., Study, H., Study, M., Study, M., Cohort, S. and O'Brien, S. *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.* Science, 273:1856-1862, 1996.

Deng, H., Liu, R., Ellemeir, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marnon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. and Landau, N. R. *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.* Nature, 381:661-666, 1996.

deRonde, A., Klaver, B., Keulin, W., Smit, L. and Goudsmit, J. *Natural HIV-1 Nef Accelerates Virus Replication in Primary Human Lymphocytes.* Virology, 188:391-395, 1992.

Dettenhofer, M. and Yu, X. (1998) *Proline mutations in HIV-1 p6^{gag} reveal a cell type-dependent defect in the retention of Pol proteins and membrane closure in virions.* Cold Spring Harbor, New York.

Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R. and Landau, N. R. *Mutational Analysis of Cell Cycle Arrest, nuclear localization, and Virion packaging of Human Immunodeficiency Virus type 1 vpr.* Journal of Virology, 69:7909-7916, 1995.

Emerman, M. and Malim, M. *HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology.* Science, 280:1880-1884, 1998.

Ewart, G., Sutherland, T., Gage, P. and Cox, G. *The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels.* Journal of Virology, 70:7108-7115, 1996.

- Facke, M., Janetzko, A., Shoeman, R. L. and Krausslich, H. G.** *A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum.* Journal of Virology, 67:4972-80, 1993.
- Fan, L. and Peden, K.** *Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1.* Virology, 190:19-29, 1992.
- Farnet, C. M. and Bushman, F. D.** *HIV-1 cDNA Integration: Requirement of HMG I(Y) Protein for Function of Preintegration Complexes In Vitro.* Cell, 88:483-492, 1997.
- Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottiger, M. O., Subbramanian, R. A., Cohen, E. A. and Nabel, G. J.** *HIV transcriptional activation by the accessory protein, Vpr, is mediated by the p300 co-activator.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95:5281-5286, 1998
- Fischer, A., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petteway, S., Ratner, L., Gallo, R. and Wong-Staal, F.** *The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro.* Science, 237:888-893, 1987.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. and Luhrmann, R.** *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs.* Cell, 82:475-83, 1995.
- Fletcher, T. M. r., Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M. A., Stivahtis, G., Sharp, P. M., Emerman, M., Hahn, B. H. and Stevenson, M.** *Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM).* EMBO Journal, 15:6155-65, 1996.
- Fouchier, R., Meyer, B., Simon, J., Fischer, U., Albright, A., Gonzalez-Scarano, F. and Malim, M.** *Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex.* Journal of Virology, 72:6004-6013, 1998.

Fritz, C. C., Zapp, M. L. and Green, M. R. *A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev.* Nature, 376:530-3, 1995.

Fukasawa, M., Miura, T., Hasewaga, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T. and Hayami, M. *Sequence of Simian Immunodeficiency Virus from African Green Monkeys, a New Member of the HIV/SIV Group.* Nature, 333:457-461, 1988.

Gabuzda, D. H., Lever, A., Terwilliger, E. and Sodroski, J. *Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins.* Journal of Virology, 66:3306-15, 1992.

Gabuzda, D. H., Li, H., Lawrence, K., Vasir, B. S., Crawford, K. and Langhoff, E. *Essential role of vif in establishing productive HIV-1 infection in peripheral blood T lymphocytes and monocyte/macrophages.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 7:908-15, 1994.

Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. *HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94:9825-30, 1997.

Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M. and Trono, D. *Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import.* Journal of Virology, 70:1027-32, 1996.

Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. and Trono, D. *HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator.* Cell, 80:379-388, 1995a.

Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. and Trono, D. *HIV Nuclear Import is Governed By the Phosphotyrosine-Mediated Binding of Matrix to the Core Domain of Integrase.* Cell, 83:569-576, 1995b.

Gallo, R. C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G.,

Foster, P., Markham, P.D. *Frequent Detection and Isolation of a Subgroup of Human T-Lymphotropic Retrovirus (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS.* Science, 224:500-503, 1984.

Gamble, T., Vajdos, F., Yoo, S., Worthylake, D., Houseweart, M., WI., S. and Hill, C. *Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid.* Cell, 87:1285-1294, 1996.

Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H. and Sharp, P. M. *The Heterosexual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Epidemic in Thailand Is Caused by an Intersubtype (A/E) Recombinant of African Origin.* Journal of Virology, 70:7013-7029, 1996.

Garcia, J. V. and Miller, A. D. *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef.* Nature, 350:508-11, 1991.

Garcia-Martinez, L. F., Mavankal, G., Peters, P., Wu-Baer, F. and Gaynor, R. B. *Tat functions to stimulate the elongation properties of transcription complexes paused by the duplicated TAR RNA element of human immunodeficiency virus 2.* Journal of Molecular Biology, 254:350-63, 1995.

Gelderblom, H. R., Hausmann, E.H.S., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A. *Fine structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Immunolocalization of Structural proteins.* Virology, 156:171-176, 1987.

Geraghty, R. J. and Panganiban, A. T. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu has a CD4- and an envelope glycoprotein-independent function.* Journal of Virology, 67:4190-4, 1993.

Gibbs, J. S., Lackner, A. A., Lang, S. B., Simon, S. A., Seghal, P. K., Daniel, M. D. and Desrosiers, R. C. *Progression to AIDS in the absence of gene for vpr or vpx.* Journal of Virology, 69:2378-2383, 1995.

Gitti, R. K., Lee, B. M., Walker, J., Summers, M. F., Yoo, S. and Sundquist, W. I. *Structure of the Amino-Terminal Core Domain of the HIV-1 Capsid Protein.* Science, 273:231-235, 1996.

Goh, W., Rogel, M. E., Kinsey, M., Micheal, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. A. and Emerman, M. *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the Cell cycle: A mechanism for selection of Vpr in vivo.* Nature Medecine, 4:65-71, 1998.

Gorelick, R. J., Nigida, S. J., Bess, J. J., Arthur, L. O., Henderson, L. E. and Rein, A. *Non-Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Deficient in Genomic RNA.* Journal of Virology, 64:3207-3211, 1990.

Gottlieb, S. *Where now for AIDS vaccines .* British Medical Journal, 317:163-166, 1998.

Göttlinger, H. G., Sodroski, J. and Haseltine, W. *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, 1989.

Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. A. and Haseltine, W. A. *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, 90:7381-7385, 1993.

Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88:3195-9, 1991.

Grmek, M. (1995) *Histoire du SIDA*, Saint-Germain, Paris.

Gross, I., Graettinger, M., Müller, B., Hohenberg, H. and Kräusslich, G. (1998) *Assembly of spherical and cylindrical HIV-1 like particles in vitro and in bacterial cells*. Cold Spring Harbor, New York.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D. and Garten, W. *Inhibition of Furin-Mediated Cleavage activation of HIV-1 Glycoprotein gp160*. *Nature*, 360:358-361, 1992.

Harris, M. P. and Neil, J. C. *Myristoylation-dependent binding of HIV-1 Nef to CD4*. *Journal of Molecular Biology*, 241:136-42, 1994.

Haseltine, W. A. *Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1*. *FASEB Journal*, 5:2349-60, 1991.

Hattori, N., Michaels, F., Fargnoli, K., Marcon, L., Gallo, R. C. and Franchini, G. *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*, 87:8080-8084, 1990.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O. and Landau, N. R. *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Protein R (Vpr) Arrests cells in the G2 Phase of the cell cycle by inhibiting p34-cdc2 Activity*. *Journal of Virology*, 69:6705-6711., 1995.

Heeney, J. L. *AIDS: A Disease of Impaired Th-Cell Renewal?* *Immunology Today*, 16:515-519, 1995.

Heinzinger, N. K., Bukrinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M.-A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. and Emerman, M. *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:7311-7315, 1994.

Henderson, L., Krutzch, H. and Oroszlan, S. *Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post-translational modification*. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 80:339-343, 1983.

- Herrmann, C. H., Rice, A. P.** *Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for the Tat cofactor.* Journal of Virology, 69:1612-1620, 1995
- Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M. and Sundquist, W. I.** *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93:3099-104, 1996.
- Ho, D., Sarngadharan, M., Resnick, L., diMarzo Veroneze, F., Rota, T. and Hirsch, M.** *Primary human T-lymphotropic virus type III infection.* Annual Review in Internal. Medicine, 103:880-883, 1985.
- Ho, D. D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M.** *Rapid Turnover of Plasma Virions and CD4 Lymphocytes in HIV-1 Infection.* Science, 373:123-126, 1995.
- Höglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. and Gabuzda, D.** *Role of vif during packing of the core of HIV-1.* Virology, 201:349-55, 1994.
- Hrimech, M., Yao, X., Bachand, F., Rougeau, N. and Cohen, E.** *HIV-1 Vpr fuctions as an immediate early protein durin HIV-1 infection.* Submitted, 1998.
- Izaurrealde, E., Adam, S.** *Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm.* RNA, 4:351-364, 1998
- Javaherian, K., Langlois, A., Larosa, G., Profy, A., Bolognesi, D., Herlihy, W., Putney, S. and Matthews, T.** *Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1.* Science, 250:1590-1593, 1990.
- Javaherian, K., Langlois, A., McDanal, C., Ross, K., Eckler, L., Jellis, C., Profy, A., Rusche, J., Bolognesi, D., Putney, S. and Matthews, T.** *Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope*

protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86:6768-6772, 1989.

Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K. and Greene, W. (1998) *Nuclear localization of HIV-1 Vpr: Characterization of two novel import pathways*. Cold Spring Harbor, New York.

Jowett, J. B. M., Planalles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M.-L. and Chen, I. S. Y. *The Human Immunodeficiency Virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M Phase of the cell cycle*. Journal of Virology, 69:6304-6313, 1995.

Kappes, J. C., Parkin, J. S., Conway, J. A., Kim, J., Brouillette, C. G., Shaw, G. M. and Hahn, B. H. *Intracellular transport and virion incorporation of vpx requires interaction with other virus type-specific components*. Virology, 193:222-33, 1993.

Karn, J., Dingwall, C., Finch, J. T., Heaphy, S. and Gait, M. J. *RNA binding by the tat and rev proteins of HIV-1*. Biochimie, 73:9-16, 1991.

Karni, O., Friedler, A., Zakai, N., Gilon, C. and Loyter, A. *A peptide derived from the N-terminal region of HIV-1 Vpr promotes nuclear import in permeabilized cells: elucidation of the NLS region of the Vpr*. FEBS letter, 429:421-425, 1998.

Kato, H., Sumimoto, H., Pognonec, P., Chen, C. H., Rosen, C. A. and Roeder, R. G. *HIV-1 Tat acts as a processivity factor in vitro in conjunction with cellular elongation factors*. Genes & Development, 6:655-66, 1992.

Keen, N. J., Churcher, M. J. and Karn, J. *Transfer of Tat and release of TAR RNA during the activation of the human immunodeficiency virus type-1 transcription elongation complex*. EMBO Journal, 16:5260-72, 1997.

Kestler, H., Ringler, D., Mori, K., Panicali, D., Sehgal, P., Daniel, M. and Desrosiers, R. *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads nad ofr the development of AIDS*. Cell, 65:651-662, 1991.

- Kewalramani, V. N. and Emerman, M.** *Vpx association with mature core structures of HIV-2.* Virology, 218:159-168, 1996.
- Kim, S., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D.** *Temporal Aspects of DNA and RNA Synthesis During Human Immunodeficiency Virus Infections: Evidence for Differential Gene Expression.* Journal of Virology, 3708, 1989.
- Kondo, E. and Göttlinger, H. G.** *A Conserved LXXLF Sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr.* Journal of Virology, 70:342-345, 1996.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A. and Göttlinger, H. G.** *The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles.* Journal of Virology, 69:2759-2764, 1995.
- Kowalski, M., Bergeron, L., Dorfman, T., Haseltine, W. and Sodroski, J.** *Attenuation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cytopathic Effect by a Mutation Affecting the Transmembrane Envelope Glycoprotein.* Journal of Virology, 65:281-291, 1991.
- Kuwata, T., Igarashi, T., Ido, E., Jin, M., Mizuno, A., Chen, J. and Hayami, M.** *Construction of human immunodeficiency virus 1/simian immunodeficiency virus strain mac chimeric viruses having vpr and/or nef of different parental origins and their in vitro and in vivo replication.* Journal of General Virology, 76:2181-91, 1995.
- Kwong, P., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R., Sodroski, J. and Hendrickson, W.** *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.* Nature, 393:648-659, 1998.
- Landau, N., Warton, M. and Littman, D.** *The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4.* Nature, 334:159-162, 1988.
- Lavallée, C., Xiao Jian Y., Ladha, A., Göttlinger, H., Haseltine, W. A. and Cohen, E. A.** *Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr*

product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. Journal of Virology, 68:1926-34, 1994.

Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J. M. and Schwartz, O. *Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules.* Immunity, 8:483-95, 1998.

Levy, D. N., Fernandes, L. S., Williams, W. V. and Weiner, D. B. *Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr.* Cell, 72:541-550, 1993.

Levy, J. A. (1998) In A. S. f. Microbiology (ed.) *The HIV virion*, ASM press, Washington, D.C., pp. 7-9.

Lewis, P. and Emerman, M. *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.* Journal of Virology, 68:510-516, 1994.

Li, M.-S., Garcia-Asua, G., Bhattacharyya, U., Mascagni, P., Austen, B. M. and Roberts, M. M. *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to nucleocapsid protein p7 in vitro.* Biochemical & Biophysical Research Communication, 218:352-355, 1996.

Lim, T., de Rocquigny, H., Zhao, L., Cayla, X., Roques, B. and Ozon, R. *Direct activation of protein phosphatase 2A by HIV-1 encoded protein complex.* FEBS letter, 401:197-201, 1997.

Linial, M. and Miller, A. *Retroviral RNA packaging: Sequence requirement and implications.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 157:125-152, 1990.

Lu, Y.-L., Bennett, R. P., Wills, J. W., Gorelick, R. and Ratner, L. *A Leucine triple Repeat Sequence (LXX)₄ in p6gag is important for Vpr incorporation into Human Immunodeficiency Virus type 1 particles.* Journal of Virology, 69:6873-6879, 1995.

- Lu, Y. L., Spearman, P. and Ratner, L.** *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions.* Journal of Virology, 67:6542-50, 1993.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. and Goff, S. P.** *Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B.* Cell, 73:1067-1078, 1993.
- Luo, T. and Garcia, J. V.** *The association of Nef with a cellular serine/threonine kinase and its enhancement of infectivity are viral isolate dependent.* Journal of Virology, 70:6493-6, 1996.
- Luo, Z., Butcher, D. J., Murali, R., Srinivasan, A. and Huang, Z.** *Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein.* Biochemical & Biophysical Research Communications, 244:732-6, 1998.
- Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Hewish, D. R., Kirkpatrick, A., Ward, A. C. and Azad, A. A.** *A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92:2770-2774, 1995.
- Maddon, P., McDougal, J., Clapham, P., Dalgleish, A., Jamal, S., Weiss, R. and Axel, R.** *HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4.* Cell, 54:865-874, 1988.
- Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDoudal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. and Axel, R.** *The T4 Gene Encodes the AIDS Virus Receptor and is Expressed in the Immune System and the Brain.* Cell, 47:333-348, 1986.
- Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Mamata, P., Kieber-Emmons, T. and Weiner, D. B.** *Nuclear import, Virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.* Journal of Virology, 71:6339-6347, 1997.

Mahalingam, S., Khan, S. A., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G. and Srinivasan, A. *Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation.* Virology, 207:297-302, 1995.

Mak, J., Jiang, M., Wainberg, M. A., Hammarskjold, M. L., Rekosh, D. and Kleiman, L. *Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles.* Journal of Virology, 68:2065-72, 1994.

Mak, J., Khorchid, A., Cao, Q., Huang, Y., Lowy, I., Parniak, M. A., Prasad, V. R., Wainberg, M. A. and Kleiman, L. *Effects of mutations in Pr160gag-pol upon tRNA(Lys3) and Pr160gag-plo incorporation into HIV-1.* Journal of Molecular Biology, 265:419-31, 1997.

Maldarelli, F., Chen, Y., Willer, R. and Strebel, K. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein.* Journal of Virology, 67:5056-5061, 1993.

Malim, M. H. and Cullen, B. R. *Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes.* Molecular & Cellular Biology, 13:6180-9, 1993.

Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. and Cullen, B. R. *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA.* Nature, 338:254-7, 1989.

Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J. and Cullen, B. R. *HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence.* Cell, 60:675-83, 1990.

Mammano, F., Ohagen, A., Höglund, S., Bukowsky, A. and Göttlinger, H. *Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis.* Journal of Virology, 68:4927-4936, 1994.

Marciniak, R. A., Calnan, B. J., Frankel, A. D. and Sharp, P. A. *HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro.* Cell, 63:791-802, 1990.

- Margottin, F., Bour, S., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. and Benarous, R.** *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif.* *Molecular Cell*, 1:565-574, 1998.
- Meltzer, M. S. and Gendelman, H. E.** *Mononuclear phagocytes as targets, tissue reservoirs, and immunoregulatory cells in human immunodeficiency virus disease.* *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 181:239-63, 1992.
- Méric, C. and Goff, S.** *Characterization of Moloney murine leukemia virus mutants with single-amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein.* *Journal of Virology*, 63:1558, 1989.
- Meyer, B. E. and Malim, M. H.** *The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm.* *Genes & Development*, 8:1538-47, 1994.
- Michael, N. L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Birx, D. L. and Schwartz, D. H.** *Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus.* *Journal of Virology*, 69:4228-36, 1995.
- Miller, R. H. and Sarver, N.** *HIV accessory proteins as therapeutic targets.* *Nature Medicine*, 3:389-394, 1997.
- Momany, C., Kovari, L., Prongay, A., Keller, W., Gitti, R., BM., L., Gorbalenya, A., Tong, L., McClure, J., Ehrlich, L., Summers, M., Carter, C. and Rossmann, M.** *Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein.* *Nature Structural Biology*, 3:763-770, 1996.
- Moss, A. and Bacchetti, P.** *Natural history of HIV infection.* *AIDS*, 3:55-61, 1989.
- Myers, G., Korber, B., Pavlakis, G., Jeang, K., Henderson, L. and Wain-Hobson, S.** (1994) *A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.

- Nelson, J. A., Ghazal, P., Wiley, C.A.** *Role of Opportunistic infection in AIDS.* AIDS, 4:1-10, 1990.
- Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R., Yao, X., Checroune, F., Rougeau, N. and Cohen, E. A.** *The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells.* Journal of Virology, 72:4104-15, 1998.
- Ogawa, K., Shibata, R., Kiyomasu, T., Higuchi, I., Kishida, Y., Ishimoto, A. and Adachi, A.** *Mutational Analysis of the Human Immunodeficiency Virus vpr Open Reading Frame.* Journal of Virology, 63:4110-4114, 1989.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M. and Rosen, C. A.** *Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids.* Genes & Development, 4:1357-64, 1990.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W. and Rosen, C.** *Interaction of Cellular Factors with Intragenic Cis-Acting Repressive Sequences Within the HIV Genome.* Virology, 191:709-715, 1992.
- Otteken, A., Earl, P. L. and Moss, B.** *Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates.* Journal of Virology, 70:3407-15, 1996.
- Pancio, H. A. and Ratner, L.** *Human immunodeficiency virus type 2 Vpx-Gag interaction.* Journal of Virology, 72:5271-5, 1998.
- Pandori, M., Fitch, N., Craig, H., Richman, D., Spina, C. and Guatelli, J.** *Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein.* Journal of Virology, 40:4283-4290, 1996.

Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccareza, M., Graziosi, C., Cohen, O., Demarest, J., Monteriori, D., Orenstein, J., Fox, C., Schragar, L., Margokick, J., Buchbinder, S., Giorgi, J. and Fauci, A. *Studies in subjects with long-term non progressive human immunodeficiency virus infection.* New England Journal of Medicine, 332:209-216, 1996.

Parent, L., Wilson, C., Resh, M. and Wills, J. *Evidence for a second function of the MA sequence in the Rous sarcoma virus Gag protein.* Journal of Virology, 70:1016-1026, 1996.

Park, I.W., Myrick, K. and Sodroski, J. *Effects of vif mutations on cell-free infectivity and replication of simian immunodeficiency virus.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 7:1228-36, 1994.

Park, I.W. and Sodroski, J. *Amino-acid sequence requirements for incorporation of the Vpx protein of simian Immunodeficiency virus into virion particles.* Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome, 10:506-510, 1995.

Paxton, W., Connor, R. I. and Landau, N. R. *Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement of the p6 region of gag and Mutational analysis.* Journal of Virology, 67:7229-7237, 1993.

Paxton, W., Martin, D., Tse, T., O'Brien, T., Skurnik, N., Van Dvanter, N., Padian, N., Braun, J., Kotler, D., Wolinsky, S. and Koup, R. *Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk exposures.* Nature Medicine, 2:412-417, 1996.

Perelson, A., Neumann, A., Markiwitz, M., Leonard, J. and Ho, D. *HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time.* Science, 271:1582-1586, 1996.

Piatak, M. J., Saag, M., Yang, L., Clark, S., Kappes, J., Luk, K., Hahn, B., Shaw, G. and Lifson, J. *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.* Science, 259:1749-1754, 1993.

- Piguet, V., Chen, Y. L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpentier, J. L. and Trono, D.** *Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes*. EMBO Journal, 17:2472-81, 1998.
- Poon, B., Grovit-Ferbas, K., Stewart, S. and Chen, I.** *Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents*. Science, 281:266-269, 1998.
- Poon, B., Jowett, J. B., Stewart, S. A., Armstrong, R. W., Rishton, G. M. and Chen, I. S.** *Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard*. Journal of Virology, 71:3961-71, 1997.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.-A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G. and Bukrinsky, M.** *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. EMBO Journal, 17:909-917, 1998.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E. K. and Luban, J.** *Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34-cdc2-CyclinB*. Journal of Virology, 69:6859-6864, 1995.
- Refaeli, Y., Levy, D. N. and Weiner, D. B.** *The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92:3621-5, 1995.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. and Gottlinger, H. G.** *Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein*. EMBO Journal, 17:2699-708, 1998.
- Robert-Guroff, M., Popovic, M., Gartner, S., Markham, P., Gallo, R. C. and Reitz, M. S.** *Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages*. Journal of Virology, 64:3391-8, 1990.

Roques, B. P., Morellet, N., de Rocquigny, H., Demene, H., Schueler, W. and Jullian, N. *Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and Ncp7.* Biochimie, 79:673-80, 1997.

Rosen, C., Sodroski, J. and Haseltine, W. *The location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat.* Cell, 41:813-823, 1985.

Rosen, C., Terwillinger, E., Sodroski, J. and Haseltine, W. *Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the junam immunodeficiency virus .* Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 85:2071-2075, 1988.

Roulston, A., Lin, R., Beauparlant, P., Wainberg, M. and Hiscott, J. *Regulation of human immunodeficiency virus type 1 and cytokine gene expression in myeloid cells by NF-kappa B/Rel transcription factors.* Microbiological Reviews, 59:481-505, 1995.

Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J.-I., Sakuragi, S., Kawamura, M. and Adachi, A. *Cell-dependent Requirement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein for Maturation of Virus Particles.* Journal of Virology, 67:1663-1666, 1993.

Sato, Z., Yoshimoto, J., Isaka, Y., Miki, S., Suyama, A., Asachi, A., Hayami, M., Fujuwara, T. and Yoshie, O. *Evidence for direct association of Vpr and Matrix protein p17 within the HIV-1 virion* Virology, 220:208-212, 1996.

Sawai, E. T., Baur, A., Struble, H., Peterlin, B. M., Levy, J. A. and Cheng-Mayer, C. *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, 1994.

Sawai, E. T., Khan, I. H., Montbriand, P. M., Peterlin, B. M., Cheng-Mayer, C. and Luciw, P. A. *Activation of PAK by HIV and SIV Nef: importance for AIDS in rhesus macaques .* Current Biology, 6:1519-27, 1996.

Sawaya , B., Khalili, D., Mercer , W., Denisova, L. and Amini, S. *Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription.* Journal of Biological Chemistry, 273:20052-20057, 1998.

Schorr, J., Kellner, R., Fackler, O., Freund, J., Konvalinka, J., Kienzle, N., Krausslich, H. G., Mueller-Lantzsch, N. and Kalbitzer, H. R. *Specific cleavage sites of Nef proteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 for the viral proteases.* Journal of Virology, 70:9051-4, 1996.

Schubert, U., Anton, L. C., Bacik, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orłowski, M., Strebel, K. and Yewdell, J. W. *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway.* Journal of Virology, 72:2280-8, 1998.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J. M. *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.* Nature Medicine, 2:338-42, 1996.

Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. and Pavlakis, G. N. *Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs.* Journal of Virology, 64:5448-56, 1990.

Sharp, P. M., Bailes, E., Stevenson, M., Emerman, M. and Hahn, B. H. *Gene acquisition in HIV and SIV.* Nature, 383:586-587, 1996.

Simon, J. and Malim, M. *The human immunodeficiency virus type 1 vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes.* Journal of Virology, 70:5297-5305, 1996.

Simon, J. H., Fouchier, R. A., Southerling, T. E., Guerra, C. B., Grant, C. K. and Malim, M. H. *The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells.* Journal of Virology, 71:5259-67, 1997.

Sinclair, E., Barbosa, P. and Feinberg, M. B. *The nef gene products of both simian and human immunodeficiency viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable.* Journal of Virology, 71:3641-51, 1997.

Sodroski, J., Goh, W., Rosen, C., Tartar, A., Portelle, D., Burny, A. and Haseltine, W. *Replicative and cytopathic potential role of HTLV-III/LAV with sor gene deletions.* Science, 231:1549-1553, 1986.

Sodroski, J., Patarca, R. and Rosen, C. *Location of the trans-activating region of the genome of the human T-cell lymphotropic virus type III.* Science, 229:74-77, 1985.

Stewart, S., Poon, B., Jowett, J. B. M. and Chen, I. S. Y. *Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest.* Journal of Virology, 71:5579-5592, 1997.

Strebel, K., Klimkait, T. and Martin, M. A. *A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-Kilodalton product.* Science, 241:1221-1223, 1988.

Subbramanian, R. A., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J., Yao, X.-J., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Human immunodeficiency virus type 1 is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages.* Journal of Experimental Medicine, 187:1103-1111, 1998a.

Subbramanian, R. A., Yao, X.-J., Dillhuydy, H., Rougeau, N., Bergeron, D., Robitaille, Y. and Cohen, E. A. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: Nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity.* Journal of Molecular Biology, 278:13-30, 1998b.

Terwilliger, E. F., Cohen, E. A., Lu, Y.-C., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Functional role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86:5163-5167, 1989.

Tindall, B. and Cooper, D. *Primary HIV infection: Host responses and intervention strategies.* AIDS, 5:1-14, 1991.

Tomasselli, A. G., Howe, W.J., Sawyer, T.K., Wlodawer, A., Heinrikson., R.L., Tomich, C.-S.C. *An Assesment of the HIV Protease as a Therapeutic Agent.* *Chemotherapy*, 11:6-27, 1991.

Tristem, M., Marshal, C., Karpas, A. and Hill, F. *Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpr and vpx.* *EMBO Journal*, 11:3405-3412, 1992.

Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., Petrik, J. and Hill, F. *origin of vpx in lentiviruses.* *Nature*, 347:341-342, 1990.

Trono, D. *Partial Reverse Transcripts in Virions From Human Immunodeficiency and Murine Leukemia Viruses.* *Journal of Virology*, 4893-4900, 1992.

Trono, D. *HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast.* *Cell*, 82:189-192, 1995.

Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. A. and Emerman, M. *HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection.* *Genes & Development*, 12:175-185, 1998.

Wang, B., Ge, Y. C., Palsanthiran, P., Xiang, S.-H., Ziegler, J., Dwyer, D., Randle, C., Dowton, D., Cunningham, A. and Saksena, N. K. *Gene defects clustered at the C-terminus of the vpr gene of HIV-1 in long-term progressing mother and child pair : in vivo evolution of vpr quasispecies in blood and plasma.* *Virology*, 223:224-232, 1996.

Wang, J. J., Lu, Y.-L. and Ratner, L. *Particle assembly and Vpr expression in human immunodeficiency virus type 1-infected cells demonstrated by immunoelectron microscopy.* *Journal of General Virology*, 75:2607-2614, 1994.

Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. and Zhao, L. J. *Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor*

Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. Journal of Biological Chemistry, 270:25564-9, 1995.

Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. and Jones, K. A. *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA.* Cell, 92:451-62, 1998.

Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsh, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Saag, M.S., Shaw, G.M. *Viral Dynamics in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.* Nature, 373:117-122, 1995.

Weldon, R. J. and Wills, J. *Characterization of a small (25 kDa) derivative of the Rous sarcoma virus Gag protein competent for particle release.* Journal of Virology, 67:5550-5561, 1993.

Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R. and Krausslich, H. G. *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase.* Virology, 219:228-36, 1996.

Westervelt, P., Trowbridge, D. B., Epstein, L. G., Blumberg, B. M., Li, Y., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Price, R. W. and Ratner, L. *Macrophage Tropism determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 In Vivo.* Journal of Virology, 66:2577-2582, 1992.

Willey, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A. and Klausner, R. D. *Biosynthesis, Cleavage, and Degradation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp160.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85:9580-9584, 1988.

Wills, J. W. and Craven, R. C. *Form, function and use of retroviral Gag proteins.* AIDS, 5:639-654, 1991.

Withers-Ward, E. S., Jowett, J. B., Stewart, S. A., Xie, Y. M., Garfinkel, A., Shibagaki, Y., Chow, S. A., Shah, N., Hanaoka, F., Sawitz, D. G., Armstrong, R. W., Souza, L. M. and Chen, I. S. *Human immunodeficiency*

virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. Journal of Virology, 71:9732-42, 1997.

Wu, F., Garcia, J., Sigman, D. and Gaynor, R. *tat regulates binding of the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA loop-binding protein TRP-185.* Genes & Development, 5:2128-40, 1991.

Wu, X., Conway, J. A., Kim, J. and Kappes, J. C. *Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 gag precursor protein.* Journal of Virology, 68:6161-6169, 1994.

Wyand, M., Ringler, D., Naidu, Y., Mattmuller, M., Chalifoux, L., Seghal, P., Daniel, M., Desrosiers, R. and King, N. *Cellular localization of simian immunodeficiency virus in lymphoid tissues.* American Journal of Pathology, 134:385-393, 1989.

Yang, X., Herrmann, C. and Rice, A. *The human immunodeficiency virus Tat protein specifically associate with TAK in vivo and requires the carboxil-terminal domain of RNA polymerase II for function.* Journal of Virology, 70:4576-4584, 1996.

Yao, X.-J., Mouland, A., Subbramanian, R., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells.* Journal of Virology, 72:4686-93, 1998.

Yao, X.-J., Subbramanian, R. A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Mutagenic analysis of Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: Role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation.* Journal of Virology, 69:7032-7044, 1995.

Yao, X. J., Göttlinger, H., Haseltine, W. A. and Cohen, E. A. *Envelope Glycoprotein and CD4 Independence on vpu Facilitated HIV-1 Capsid Export.* Journal of Virology, 66:5119-5126, 1992.

Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.-H. and Essex, M. *The Matrix Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 is Required for Incorporation of Viral Envelope Protein Into Mature Virions.* Journal of Virology, 66:4966-4971, 1992.

Zazopoulos, E. and Haseltine, W. A. *Effect of nef alleles on replication of human immunodeficiency virus type 1.* Virology, 194:20-7, 1993.

Zhang, C., Rasmussen, C. and Chang, L. J. *Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in the yeast Schizosaccharomyces pombe.* Virology, 230:103-12, 1997.

Zhao, L. J., Mukherjee, S. and Narayan, O. *Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Specific interaction with a cellular protein.* Journal of Biological Chemistry, 269:15577-82, 1994.

Zhao, Y., Cao, J., O'Gorman, M. R., Yu, M. and Yogev, R. *Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast Schizosaccharomyces pombe.* Journal of Virology, 70:5821-6, 1996.

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

Zhou, W. and Resh, M. *Differential membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein.* Journal of Virology, 70:8540-8548, 1996.