

Université de Montréal

Identification du déterminant moléculaire
responsable du bourgeonnement polarisé du VIH
dans les cellules épithéliales MDCK

par

Robert Lodge, M.Sc.

Département de Microbiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures en
vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Microbiologie et immunologie

Mai, 1998

© Robert Lodge, 1998



W
4
U58
1998
U.053

Université de Montréal

Identification du déterminant moléculaire
responsable du bourgeonnement polarisé du VIH
dans les cellules épithéliales MDCK

par
Robert Ladner, M.Sc.

Département de Microbiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études supérieures en
vue de l'obtention du grade de philosophe (Doctor (Ph.D.))
en Microbiologie et immunologie

Mai 1998

© Robert Ladner 1998



Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures

Cette thèse intitulée:

Identification du déterminant moléculaire
responsable du bourgeonnement polarisé du VIH
dans les cellules épithéliales MDCK

présentée par
Robert Lodge, M.Sc.

a été évaluée par un jury composé
des personnes suivantes:

Dr Yves Langelier, président

Dr Guy Lemay, directeur

Dr Eric A Cohen, co-directeur

Dr Daniel Martineau, membre

Dr Gordon Shore, exam. externe

Dr Ted Bradley, rep. du doyen

Thèse acceptée le 15.05.1998

SOMMAIRE

Les cellules épithéliales possèdent deux domaines membranaires distincts: le domaine apical, qui fait face à la lumière de l'organe, et le domaine basolatéral, qui interagit avec les cellules adjacentes et la matrice sous-jacente. Ces deux régions membranaires sont formées, entre autres, par la distribution particulière des protéines et des lipides membranaires. Les protéines membranaires sont transportées vers un domaine précis par l'intermédiaire de vésicules. Ce transport vésiculaire est contrôlé par des protéines spécialisées responsables d'étapes spécifiques de ce tri moléculaire. Parmi ces protéines spécialisées, les protéines "adaptrices" reconnaissent des structures ou des séquences d'acides aminés retrouvées sur les protéines membranaires. Ces signaux de transport servent d'adresses qui permettent à la machinerie cellulaire de reconnaître les protéines et de les transporter à destination.

Les virus enveloppés utilisent ce processus de transport pour bourgeonner à des régions spécifiques de la cellule; notamment, à l'un ou à l'autre des domaines membranaires des cellules épithéliales. Il a précédemment été démontré que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) bourgeonne à la surface basolatérale des cellules épithéliales, et que le signal responsable de ce phénomène se trouve dans la partie cytoplasmique des glycoprotéines. Cependant, les structures ou acides aminés impliqués dans le signal n'étaient pas identifiés.

Cette étude décrit le processus par lequel le signal de transport basolatéral des glycoprotéines du VIH a été identifié. Un système d'expression transitoire prenant avantage de cellules épithéliales MDCK directement cultivées sur membranes semi-perméables est utilisé. Une analyse de mutagénèse dirigée a démontré que la tyrosine amino-terminale de la région cytoplasmique est une composante essentielle du signal de transport. Cette étude suggère aussi qu'une structure locale en tours β contribue à la reconnaissance du signal. Enfin, les glycoprotéines mutantes ne démontrent aucune perte de fonction (infection, cinétiques de réplication virales), mais sont distribuées de façon non-polarisée à la surface cellulaire.

Des observations préliminaires sur les glycoprotéines des virus de la leucémie T-lymphotropique humaine (HTLV) et de la leucémie murine (MuLV) suggéraient qu'elles possèdent des signaux de transport basolatéral. L'effet des glycoprotéines mutantes de ces deux virus sur le bourgeonnement polarisé du VIH a donc été étudié. Les signaux de transport de ces glycoprotéines ont été identifiés; ils se retrouvent dans la région cytoplasmique de ces glycoprotéines et une tyrosine est essentielle à chacun. La conservation d'un tel signal dans plusieurs rétrovirus suggère que le bourgeonnement polarisé est un phénomène important dans la biologie de ce groupe de virus.

Enfin, étant donné que l'incorporation des glycoprotéines dans la particule virale est essentielle au bourgeonnement polarisé du VIH, les mécanismes gouvernant ce phénomène ont été étudiés. Il a été démontré que la délétion de la partie cytoplasmique des glycoprotéines du VIH permettait leur incorporation à l'intérieur de particules rétrovirales hétérologues. Ces observations sont ici reproduites en tenant compte de l'utilité de ces vecteurs en thérapie génique. Les vecteurs rétroviraux ayant incorporé les glycoprotéines tronquées transduisent spécifiquement un gène dans les cellules CD4+ d'une population mixte de lymphocytes.

L'ensemble de ces études permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'assemblage des rétrovirus et le transport intracellulaire de leurs protéines.

MOTS CLEFS: VIH; Rétrovirus; Cellules épithéliales; Glycoprotéines; Assemblage et Bourgeonnement viraux.

TABLE DES MATIERES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xi
DEDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE.....	1
1. Introduction.....	2
2. Les cellules polarisées.....	3
<u>2.1 Les types de cellules polarisées.....</u>	<u>3</u>
2.1.1 Les levures.....	3
2.1.2 Les oocytes.....	4
2.1.3 Les neutrophiles et les macrophages.....	4
2.1.4 Les neurones.....	5
2.1.5 Les cellules épithéliales.....	6
<u>2.2 Structure des cellules épithéliales.....</u>	<u>7</u>
2.2.1 Les jonctions cellulaires.....	7
2.2.2 La membrane apicale.....	7
2.2.3 La membrane basolatérale.....	12
2.2.4 La lamina basale.....	12
<u>2.3 Les modèles des cellules épithéliales <i>in vitro</i>.....</u>	<u>12</u>
2.3.1 Caco-2.....	13
2.3.2 MDCK.....	16
2.3.3 Autres lignées épithéliales.....	16
<u>2.4 Le transport des protéines membranaires épithéliales.....</u>	<u>17</u>
2.4.1 Modèle de transport direct.....	17
2.4.2 Modèle de transport par défaut.....	17
2.4.3 Transcytose.....	20
<u>2.5 Maturation et signaux de transport des protéines.....</u>	<u>20</u>
2.5.1 Maturation des protéines membranaires.....	20
2.5.1.1 <i>Topologie</i>	21

2.5.1.2	<i>Peptide signal</i>	21
2.5.1.3	<i>Modifications post-traductionnelles</i>	25
2.5.1.4	<i>Transport vésiculaire</i>	26
2.5.2	Les signaux de transport en général.....	34
2.5.3	Quelques signaux de transport classiques.....	34
2.5.3.1	<i>Le transport et la phosphorylation: récepteur mannose-6-phosphate</i>	34
2.5.3.2	<i>Vers les mitochondries</i>	34
2.5.3.3	<i>Vers le noyau</i>	35
2.5.3.4	<i>Vers le réticulum endoplasmique</i>	36
2.5.3.5	<i>Vers l'appareil de Golgi</i>	36
2.5.3.6	<i>Vers les lysosomes et les endosomes</i>	37
2.5.4	Les signaux de transport des membranes apicale et basolatérale.	38
2.6	<u>Signaux apicaux</u>	39
2.6.1	Les ectodomains.....	39
2.6.2	Le glycosylphosphatidylinositol.....	40
2.6.3	Les radeaux apicaux et le rôle des lipides; les <i>caveolae</i> .41	
2.6.4	Des glycosylations?.....	42
2.7	<u>Signaux basolatéraux: nécessités structurales et de séquence</u>	43
2.8	<u>Liens entre cytosquelette, lipides et protéines G</u>	44
2.8.1	Cytosquelette.....	44
2.8.1.1	<i>Le réseau microtubules/ protéines motrices</i>	44
2.8.1.2	<i>Actine et myosine</i>	46
2.8.1.3	<i>Contacts entre les cellules et matrice extracellulaire</i> ..	47
2.8.2	Contribution des voies de transduction et des protéines G.	49
2.8.2.1	<i>Petites protéines G (rabs)</i>	49
2.8.2.2	<i>Protéines G hétérotrimériques</i>	52
2.8.3	Les phospholipides.....	53
3.	Utilisation des virus pour l'étude du transport polarisé des protéines	54
3.1	<u>Les virus non-enveloppés</u>	54
3.2	<u>Les virus enveloppés</u>	55

3.2.1 Les virus nucléaires: les <i>herpesviridae</i>	55
3.2.2 Les virus du RE et de l'appareil de Golgi: <i>coronaviridae</i> et <i>bunyaviridae</i> , <i>togaviridae</i> (<i>rubivirus</i>).....	56
3.2.3 Les virus des surfaces apicales: <i>orthomyxoviridae</i> et <i>paramyxoviridae</i>	57
3.2.4 Les virus des surfaces basolatérales.....	58
3.2.4.1 <i>Rhabdoviridae</i>	58
3.2.4.2 <i>Togaviridae</i> (<i>alphavirus</i> Sindbis et SVF).....	59
3.2.4.3 <i>Rétroviridae</i>	59
4. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	64
<u>4.1 Le Syndrome d'immunodéficience acquise.....</u>	<u>64</u>
4.1.1 Découverte de l'agent étiologique du SIDA.....	64
4.1.2 La pathogénèse du SIDA.....	65
4.1.3 Le VIH, un rétrovirus.....	68
4.1.3.1 <i>Structure du virus</i>	68
4.1.3.2 <i>Organisation génétique du VIH</i>	72
<u>4.2 Cycle de réplication du VIH.....</u>	<u>76</u>
4.2.1 Reconnaissance des récepteurs cellulaires.....	76
4.2.2 Transport actif, transcription inverse et intégration génomique.	77
4.2.3 Expression génique: le LTR interagit avec des facteurs cellulaires et viraux.....	78
4.2.4 Rev et la régulation post-transcriptionnelle.....	78
4.2.5 Les principales protéines de structure Gag, GagPol et Env.	79
<u>4.3 Les protéines Gag et GagPol.....</u>	<u>79</u>
4.3.1 Synthèse des protéines Gag et GagPol.....	79
4.3.2 Les enzymes virales.....	79
4.3.3 Maturation des protéines Gag.....	80
4.3.3.1 <i>Protéine de la matrice, p17</i>	80
4.3.3.2 <i>Protéine majeure de la capside, p24</i>	81
4.3.3.3 <i>Protéine de la nucléocapside, p9/p7</i>	81
4.3.3.4 <i>La petite protéine p6</i>	81
<u>4.4 Les glycoprotéines Env.....</u>	<u>82</u>
4.4.1 Traduction, maturation et glycosylation des glycoprotéines Env:	

1a gp160.....	82
4.4.2 Structure et fonctions des glycoprotéines matures: la gp120.	83
4.4.3 Structure et fonctions des glycoprotéines matures: la gp41.	87
<u>4.5 Assemblage du VIH.....</u>	89
5. Les virus HTLV et MuLV.....	89
<u>5.1 Indices apportées par l'étude de glycoprotéines de rétrovirus autres que le VIH.....</u>	89
<u>5.2 Le virus de la leucémie T-lymphocytaire humaine.....</u>	89
<u>5.3 Le virus de la leucémie murine.....</u>	90
6. Le projet de recherche: buts, hypothèses et développement de la problématique.....	96
<u>6.1 Cellules épithéliales et le VIH: interactions.....</u>	96
<u>6.2 Problématique du projet.....</u>	98
 CHAPITRE 2 (ARTICLE 1): The membrane proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells.....	100
 CHAPITRE 3 (ARTICLE 2): Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein.....	112
 CHAPITRE 4 (ARTICLE 3): MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4+ peripheral blood lymphocytes.....	120
 CHAPITRE 5: DISCUSSION.....	131
 CHAPITRE 6: CONCLUSIONS ET CONTRIBUTIONS.....	145
 CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	148

CHAPITRE 8 (ANNEXE 1): ARTICLE DE MAITRISE - The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells..... 201

CHAPITRE 9 (ANNEXE 2): ARTICLE DE SYNTHÈSE - L'infection par le VIH: rôle des facteurs viraux..... 207

LISTE DES FIGURES

- PAGE 9: (1) Représentation schématique d'une cellule épithéliale: distribution des organites.
- PAGE 10: (2) Représentations schématiques de cellules épithéliales: filaments intermédiaires et trame terminale.
- PAGE 15: (3) Cellules épithéliales sur membranes semi-perméables.
- PAGE 19: (4) Le modèle de transport direct dans les cellules MDCK.
- PAGE 23: (5) Topologie des protéines membranaires.
- PAGE 26: (6) Reconnaissance des vésicules par les t-SNARES et les v-SNARES.
- PAGE 32: (7) Vue d'ensemble du transport vésiculaire.
- PAGE 51: (8) Les protéines Rabs et les cellules épithéliales.
- PAGE 62: (9) Cycle général de réplication des rétrovirus.
- PAGE 63: (10) Morphogénèse des particules des rétrovirus de type A,B,C et D.
- PAGE 67: (11) Phases de la pathogénèse du VIH.
- PAGE 70: (12) Structure génétique et morphologique du VIH.
- PAGE 71: (13) Structure moléculaire de la particule virale (VIH).
- PAGE 74: (14) Récepteurs cellulaires du VIH.
- PAGE 75: (15) Cycle de réplication du VIH (Tat et Rev).
- PAGE 85: (16) Structure de la gp120.
- PAGE 86: (17) Structure de la gp41.
- PAGE 92: (18) Structure du rétrovirus de type C classique (MuLV).
- PAGE 93: (19) Comparaison de l'organisation génétique des rétrovirus.
- PAGE 94: (20) Les glycoprotéines de rétrovirus I.
- PAGE 95: (21) Les glycoprotéines de rétrovirus II.
- PAGE 136: (22) Bourgeonnement polarisé du VIH: Contact entre cellules et chez les lymphocytes.
- PAGE 144: (23) Modèles d'incorporation des glycoprotéines.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALV	"Avian Leukosis Virus"
AP (1 à 3)	"Adaptor protein"
ARF	"ADP-ribosylation factor"
ARN	Acide ribonucléique
ASGP (-R)	Récepteur de l'asialoglycoprotéine
ATP, GTP	Adénosine (Guanosine) tri-phosphate
(R-) β 2AR	Récepteur β 2-adrénergique
BIV, BLV	Virus de l'immunodéficience bovine/ leucémie bovine
CMH	Classe majeure d'histocompatibilité
COM	Centre d'organisation microtubulaire
COP	"Coatomer protein"
CY	Partie cytoplasmique
DAF	"Decay Accelerating Factor"
DIG	"Detergent insoluble glycolipid enriched domains"
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbant assay"
Env	Enveloppe
EX	Partie extracytoplasmique
(R-) Fc (des Ig)	Récepteur du fragment Fc des immunoglobulines
FRT	"Fisher Rat Thyroid"
Gag	"Group antigen"
gp	glycoprotéine
GPI	glycosyl phosphatidylinositol
GAP43	"Growth associated protein 43"
HA, HN	Hémagglutinine, Hémagglutinine-Neuraminidase
HSV	Virus herpès simplex
HTLV	Virus de la leucémie (lymphotropique) T humaine
LAP	Phosphatase acide lysosomiale
(R-) LDL	Récepteur du "Low density lipoprotein"

LISTE DES ABREVIATIONS (SUIITE)

Lgps	Glycoprotéines lysosomiales
LTR	"Long Terminal Repeat"
M6P (-R)	Récepteur mannose-6-phosphate
MAP2	"Microtubule associated protein 2"
MDCK, MDBK	"Madin Darby Canine (Bovine) Kidney"
MHV	Virus de l'hépatite murine
MMTV	Virus murin des tumeurs mammaires
MPMV	"Mason-Pfizer Monkey Virus"
MuLV	Virus de la leucémie murine
(R-) NGF	Récepteur du "Nerve Growth Factor"
NSF	"N-ethylmaleimide sensitive factor"
PDGF	"Platelet derived growth factor"
PIg (-R)	Récepteur polymérique de l'immunoglobuline
PtdIns	Phosphatidylinositol
SFV	Virus de la Forêt de Semliki
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLN	Signal de localisation nucléaire
SNARE	"SNAP-Receptor (v-vesicule;t-target)"
SNAP	"Soluble NSF Attachment Protein"
SRP	"Signal recognition protein"
SSR	"Signal sequence receptor"
SU	Glycoprotéine de surface
SV40	Virus simien 40
RE	Réticulum endoplasmique
RT	transcriptase inverse
TM	Glycoprotéine (partie) transmembranaire
TRAM	"Translocating-chain associating membrane-protein"
TR (-R)	Récepteur de la transferrine humaine
V1 à V5	Région variable 1 à 5
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VSV (VSV-G)	Virus de la stomatite vésiculaire (Glycoprotéine G)

**A mes parents,
mon frère, mon oncle, et
A la mémoire de mes grands-parents**

All ignorant that soul that sees thee without wonder
W. SHAKESPEARE, *The Passionate Pilgrim* V

*In the field of observation, chance favors
only the prepared mind*
L. PASTEUR, 1854

(Cité dans Nathanson, N., ed. (1997). **Viral pathogenesis**, Lippincott-Raven, 940 p.)

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance au **Dr Guy Lemay** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (il y a déjà 6 ans de cela!) et pour son excellente direction. Je tiens à souligner son intérêt soutenu, son encouragement dans les moments difficiles et ses précieux conseils tout au long de mes études graduées. J'aimerais aussi sincèrement remercier le **Dr Eric A. Cohen**, pour m'avoir reçu dans son équipe, pour son dynamisme, sa motivation et son appui soutenu dès les débuts de ce projet. Les conseils scientifiques judicieux des Drs Lemay et Cohen ont été d'une aide inestimable. Je suis reconnaissant envers le Dr Cohen pour m'avoir permis de participer à la rédaction d'une synthèse dans M/S, expérience qui s'est avérée être des plus enrichissantes. Je remercie mes directeurs aussi pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès, nationaux et internationaux, et pour m'avoir encouragé à poursuivre ma formation au National Institutes of Health, avec le Dr Juan Bonifacino.

Mais tellement de collègues, que dis-je, d'ami(e)s de l'aile U-600... qui sont partis depuis plusieurs années déjà... ou qui ne font que débiter leurs travaux...je les remercie toutes et tous pour cette camaraderie, cette amitié omniprésente dans les meilleurs moments ou les temps difficiles. **Merci** à Claude, Azim, Marc, Jacques, Nash, Gary, Serge, Florent, Nie, Pierre, Béatrice, Zhao, François, Martin, Isabelle, Sonia, Andrew, Karine, Mohammed, Luc,...

à Taoufik, Qiong, Mathias, Josée, Martin...et Hélène, Linda, Johanne et Stéphane...

Aussi un **gros merci** et bravo! à l'experte assistance technique de Nesrine, Angelos, Nicole...aux talents de gestion de Murielle et aux conseils scientifiques de Dominique.

J'aimerais **particulièrement** témoigner ma reconnaissance envers Ramu Subbramanian, Serge Sénéchal (au FACS), Nathalie Thessier (IRCM), et Janique Forget pour leur aide spéciale sur le papier de *Gene Therapy*, ainsi que celle de XiaoJian Yao, Sylvie Beaulieu, Françoise Boisvert, Johanne Mercier et Carole Danis pour des éléments techniques importants sans lesquels je n'aurais pu mener ce projet à terme.

Je dois souligner particulièrement la contribution de mes joyeux "**acolytes du projet polarisation**": Jean-Philippe Lalonde, Julie Deschambeault et Guillermo Cervantes. Je souhaite à J.D. et G.C., qui prennent le relais, de gros papiers sur le projet! Je suis infiniment reconnaissant aux Drs Heinrich G. Gottlinger, Dana H. Gabuzda (du DFCI, Boston, Mass.), David A. Sanders (Purdue Univ., West LaFayette, Ind.) et Marie-Christine Dokh lar (Institut Cochin [ICGM], Paris) pour leur collaboration au projet, ainsi qu'à tous les autres chercheurs qui ont contribué des constructions plasmidiques pour le projet. Particulièrement, j'aimerais souligner les nombreuses discussions scientifiques et les contributions d'Arielle Rosenberg, de l'ICGM, au projet.

Mes études graduées auraient été difficiles sans le soutien financier d'organismes subventionnaires... A la maîtrise, le FCAR-Groupe de Recherche en Transport Membranaire; au doctorat, la Faculté des Etudes Supérieures mais surtout le **Programme National de Recherche et de Développement en matière de Santé**, Santé/Bien-être social, Canada.

Enfin, j'aimerais aussi remercier les chercheurs, le personnel et les étudiant(e)s gradué(e)s du **Département de microbiologie et d'immunologie** de l'Université de Montréal. Tout particulièrement, les membres du jury de MSc, de celui de mon examen pré-doctoral, mais surtout les membres de mon **jury de thèse** pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

CHAPITRE 1:
REVUE DE LA
LITTERATURE

1. Introduction.

Les membranes contribuent de façon importante à la structure et à l'identité des cellules. Elles délimitent la forme de la cellule et des organelles du cytoplasme tout en étant responsables de la communication de la cellule avec l'espace extérieur. Les membranes sont constituées de deux unités de base, les lipides et les protéines, qui déterminent leur diversité fonctionnelle et structurale. Si les phospholipides demeurent la principale charpente membranaire, les autres lipides et les protéines influencent profondément la rigidité et la fonction de la membrane qu'ils composent. En effet, les protéines membranaires sont les composantes actives d'une membrane cellulaire⁹⁹.

Le transport des protéines membranaires vers des régions spécifiques de la cellule est un mécanisme essentiel pour le bon fonctionnement et le maintien des processus cellulaires essentiels. Les protéines membranaires peuvent être destinées au noyau, aux organelles cytoplasmiques ou à des régions particulières de la membrane plasmique, ou alors retenues lors de leur maturation dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi^{446, 447}. Un complexe mécanisme de tri des protéines implique d'abord des éléments du cytosquelette, puis des protéines spécialisées qui servent de pont entre la molécule transportée (cargo) et la structure cellulaire¹³². Plusieurs de ces processus de transport se basent sur la reconnaissance d'éléments structuraux ou de séquences d'acides aminés sur les protéines membranaires. Ces structures ou séquences constituent donc des signaux de transport, en quelque sorte les adresses postales des protéines^{260, 458}.

Les virus sont des parasites cellulaires qui prennent avantage des cellules, en utilisant leurs processus de production et en puisant dans leurs ressources énergétiques¹⁷⁶. Les voies de transport intracellulaires n'échappent pas à l'action virale, l'assemblage des virus pouvant alors être ciblé vers des régions particulières de la cellule^{431, 436}. Cette section, tout en n'étant pas une revue complète de la littérature sur les mécanismes de transport des protéines membranaires, ni des connaissances sur le virus de l'immunodéficience humaine, se veut plutôt une mise-à-jour des notions actuelles sur la façon par laquelle ce virus utilise les voies de transport de la cellule pour cibler son bourgeonnement à une région spécifique de la membrane cellulaire.

2. Les cellules polarisées.

Les cellules eucaryotes se distinguent par la variété de formes qu'elles adoptent et par la multitude de fonctions qu'elles exercent chez l'individu. Cette grande diversité est intimement liée à leur capacité de maintenir une structure particulière par le positionnement d'éléments de leur cytosquelette et par un tri judicieux de leurs macromolécules biologiques¹¹⁸. Souvent, ces phénomènes sont induits et sont l'effet d'une réaction de la cellule à un stimulus externe. Il est essentiel de souligner que la forme de la cellule évolue avec ses états d'activation, de différenciation ou de développement^{118, 196, 338}. L'observation de la cellule dans sa forme polarisée, c'est-à-dire possédant des régions clairement distinctes morphologiquement, doit donc tenir compte de cette dynamique d'évolution cellulaire. La polarisation cellulaire se reflète entre autres par une composition protéique et lipidique variable selon les régions de la membrane cellulaire⁴⁷⁰. C'est en tenant compte de ces éléments essentiels de la polarisation que seront abordés dans cette section quelques exemples représentatifs de ce phénomène.

2.1 Les types de cellules polarisées.

2.1.1 Les levures.

Un des modèles les plus simples de polarisation cellulaire demeure celle observée lors du bourgeonnement des levures⁶⁷. Les mécanismes de division cellulaire, l'attraction par chimiotropisme et la ségrégation de la cellule-fille par rapport à la cellule-mère lors du bourgeonnement sont tous asymétriques chez la levure; ils se produisent principalement d'un côté, ou pôle, de la cellule. L'exemple du bourgeonnement polaire axial (cellules a ou α) ou bipolaire (a/α) est aujourd'hui bien caractérisé; de nombreuses protéines associées à l'orientation des axes du cytosquelette ou à la formation de cet axe ont été identifiées. Parmi elles, il faut souligner Cdc42, une GTPase qui se rapproche du groupe des protéines Rho et qui possède des fonctions conservées chez les levures et les mammifères^{3, 365, 490}. L'action des protéines G hétérotrimériques lors des cascades moléculaires causées par les phéromones rappelle aussi le rôle central des protéines G dans la polarité cellulaire tout au long de l'évolution²¹⁸. Le phénomène de la polarité cellulaire

n'est donc pas exclusif aux cellules eucaryotes complexes; c'est un mécanisme important dans le cycle cellulaire des levures.

2.1.2 Les oocytes.

L'asymétrie dans l'établissement des diverses étapes ou stades embryonnaires chez les eucaryotes est essentielle pour leur développement normal. Cette polarisation morphologique du cytoplasme a été observée chez l'oocyte dès le début du siècle¹⁷⁵. Les régions distinctes par leur pigmentation donnent lieu à des constituantes tissulaires spécifiques. Une grande partie de la caractérisation moléculaire de ce phénomène a été faite chez l'embryon de la drosophile⁴⁸⁴ et l'oeuf de la grenouille *Xenopus laevis*⁵⁵³. Beaucoup de ces études ont porté non seulement sur la distribution des protéines cytoplasmiques, mais aussi sur la répartition des ARNm codant pour ces protéines. Parmi les ARNm polarisés les mieux connus chez la drosophile, citons ceux des gènes *bicoid*, localisé au pôle antérieur¹¹⁷, et *nanos*, du pôle postérieur²⁸². Le gradient créé par la diffusion des protéines codées à chaque pôle de l'embryon de la drosophile aboutit ultimement à la formation de structures spécialisées^{116, 368}. Il est à noter que la distribution polarisée des ARNm, comme celui de *bicoid*, est liée à leur rétention au pôle où ils sont transcrits⁴⁸³. Par contre, tel ne semble pas être le cas de l'ARNm du gène *vg1* chez *Xenopus laevis*, qui semble transporté activement lors du développement de l'oeuf vers le pôle végétatif. Ce mouvement d'ARNm est inhibé par le nocodazole, agent perturbateur du réseau microtubulaire du cytosquelette^{553, 554}.

2.1.3 Les neutrophiles et les macrophages.

La capacité de certaines cellules à passer, d'une structure essentiellement sans forme précise en une cellule clairement polarisée, est remarquable. Ce phénomène peut être observé chez plusieurs types de cellules lors de la réponse immunitaire, dont les neutrophiles et les macrophages. Ces changements morphologiques sont la conséquence d'une stimulation cellulaire par des cytokines spécifiques, ou d'une interaction plus directe entre les cellules, induisant une réorganisation du cytosquelette et d'autres constituants cytosoliques⁷⁹. La migration d'un neutrophile ou d'un macrophage vers le site d'infection nécessite un mouvement amiboïde, impliquant la formation de régions spécialisées dans la locomotion cellulaire et la phagocytose des corps

étrangers. Une importante réorganisation du réseau d'actine G en actine F, ainsi que la distribution de la myosine, est associée aux lamellipodes antérieurs⁵²⁵ alors que la fodrine est retrouvée principalement dans l'uropode postérieur¹⁶⁰.

2.1.4 Les neurones.

La morphologie de la cellule neuronale est clairement asymétrique: la structure des neurites, c'est-à-dire de l'axone et des dendrites, est clairement différente et est liée à leurs compositions moléculaires et leurs fonctions distinctes⁴³⁰. Le rôle premier de l'axone est le transport de l'information, tandis que les dendrites reçoivent le signal décodé par l'entremise du corps cellulaire et sont responsables d'acheminer le message au point effecteur. Il n'est donc pas surprenant de trouver dans ces cellules aussi clairement différenciées une distribution polarisée de leur cytosquelette¹⁰⁴. Trois constituants majeurs constituent le réseau du cytosquelette chez le neurone: les microtubules, les microfilaments (type actine/myosine) et les neurofilaments (classe de filament intermédiaire). Les microtubules sont constitués de tubuline α et β qui s'associent plus rapidement à l'extrémité (+) qu'au pôle (-) du tubule. L'extrémité de croissance rapide tubulaire se trouve toujours distale au corps cellulaire dans l'axone alors que les deux orientations se retrouvent au niveau des dendrites²¹³. L'appareil de Golgi et la machinerie traductionnelle (ribosomes) sont associés aux extrémités (-) des tubules et sont localisés dans le corps cellulaire et les dendrites; cette distribution rappelle la nécessité d'une réponse rapide au niveau des dendrites suite à une stimulation quelconque⁴³³.

Une caractéristique à souligner de la polarité neuronale est la plasticité; en effet, il a été démontré qu'un dendrite peut se développer en nouvelle extrémité axonale suite à la perte de l'axone¹⁸⁸. Cette propriété est due à une réorganisation du cytosquelette, mais aussi à la redistribution remarquable des biomolécules qui s'ensuit¹⁸⁹. Les cas les plus connus de protéines polarisées sont celles de MAP2 (microtubule-associated protein 2)¹⁰³, des sous-unités α et β de la kinase Ca/CAM II responsables de la transduction du signal⁵⁴, toutes retrouvées essentiellement dans le corps cellulaire et les dendrites ainsi que de Tau et GAP43 (growth associated-protein de 43 kDa), essentielles au développement axonal^{34, 189}.

Comme pour les cellules qui se polarisent de façon transitoire (le cas précédent des neutrophiles), les neurones demeurent sensibles à leur environnement et réagissent aux changements externes. La présence de laminine dans la matrice extracellulaire ou de calcium influence grandement la polarité axonale, à un point tel que plusieurs auteurs suggèrent que l'environnement orienterait le développement du pôle axonal⁶⁶. Ce phénomène nous rappelle l'influence de la matrice extracellulaire dans l'établissement de la polarité épithéliale.

2.1.5 Les cellules épithéliales.

L'épithélium (*epi*, sur; *thélé*, mamelon) désignait originellement la pellicule qui recouvrait le mamelon. Aujourd'hui, la signification du mot s'est étendue à tous les tissus de recouvrement. Les cellules épithéliales se retrouvent en une multitude de sites anatomiques, acquièrent des formes très diverses et possèdent de nombreuses fonctions spécialisées⁴⁷⁰. Le simple fait que le tissu épithélial contrôle les échanges entre les milieux externes et internes indique la présence d'une asymétrie morphologique et fonctionnelle. L'activité épithéliale est ainsi séparée entre une zone apicale, face au milieu extérieur, et un domaine basolatéral, interagissant avec les cellules adjacentes et une couche matricielle extracellulaire, la lamina basale^{60, 351}. L'organisation intracellulaire elle-même est caractéristique: le noyau se situe généralement vers le pôle basal et est chapeauté de l'appareil de Golgi; le réticulum endoplasmique est à proximité de la masse nucléaire; les mitochondries et les lysosomes sont dispersés dans le cytoplasme (figure 1)⁶⁰. Le rôle des cellules épithéliales dans la sécrétion (par exemple, dans le poumon), l'absorption et l'excrétion (dans l'intestin), ou la transformation (dans le foie ou le rein), de divers composés implique aussi un contrôle important des voies de transport des protéines et de leur distribution cellulaire^{203, 470}.

L'établissement et le maintien de la forme épithéliale de la cellule nécessitent donc la formation de jonctions et de contacts entre cellules, une formation polarisée du cytosquelette, une distribution particulière des protéines et lipides membranaires ainsi que l'attachement de la cellule à un substrat basal⁴⁷³. Cet ensemble d'éléments permettent d'établir les cellules épithéliales comme très bons modèles de cellules polarisées, et comme des outils idéaux pour l'étude du phénomène de polarisation cellulaire, particulièrement au

niveau biomoléculaire. Ces cellules, faisant l'objet du présent travail, seront donc décrites plus en détail.

2.2 Structure des cellules épithéliales.

2.2.1 Les jonctions cellulaires.

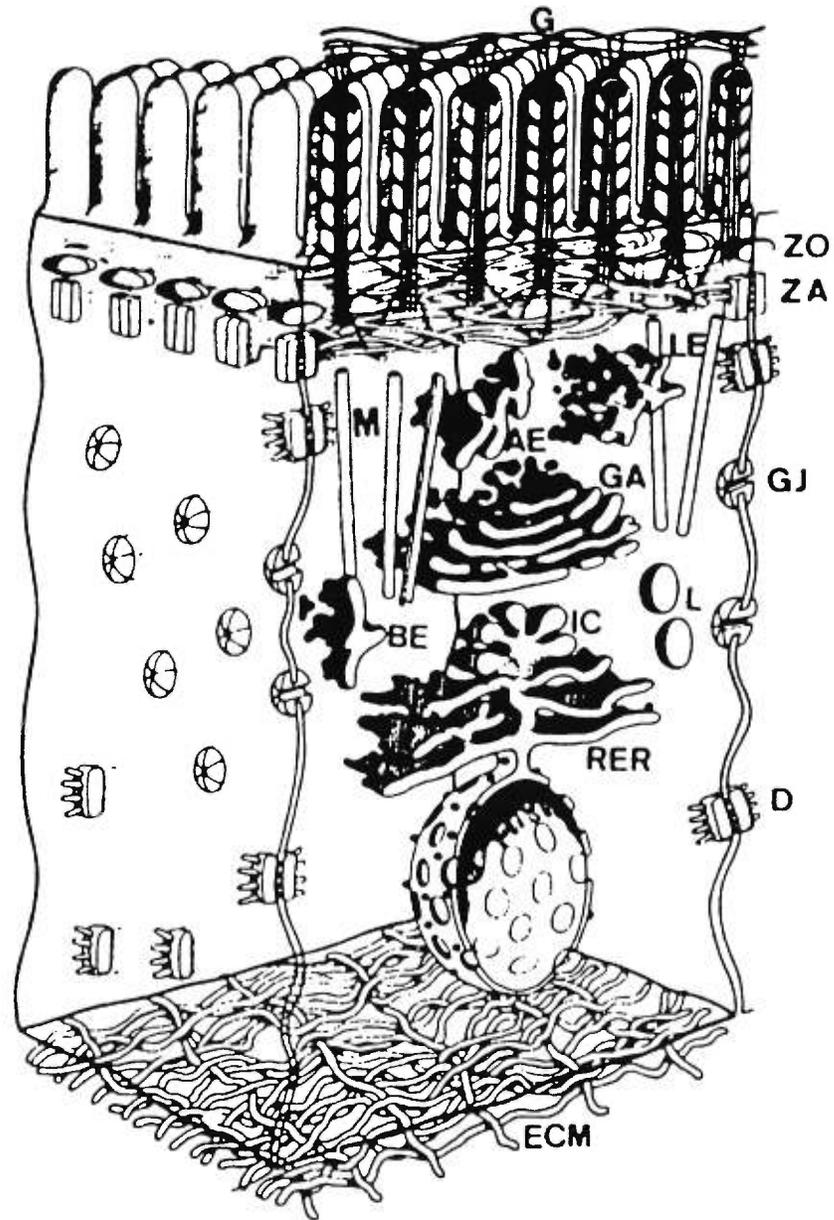
Mis-à-part les différences morphologiques facilement identifiables chez la cellule épithéliale, la présence de jonctions cellulaires facilite grandement la délimitation des domaines membranaires à la surface de la cellule. Outre le rôle fondamental des jonctions dans la communication intercellulaire, elles assurent la contiguïté de la monocouche et empêchent les particules du lumen de se faufiler dans l'espace intercellulaire⁶⁴.

Les jonctions cellulaires sont elles-mêmes très variées et cette multitude de structures est justifiée par la variété de fonctions qu'elles exercent. D'abord, les zonula occludens (jonctions étanches) scellent l'épithélium. Elles sont constituées de la fusion des lamelles externes des cellules adjacentes, créant l'apparence d'une membrane continue. Il est à noter que plusieurs résultats expérimentaux tendent plutôt à associer les jonctions étanches à des ponts protéiques^{312, 530}. En effet, plusieurs protéines sont localisées spécifiquement dans les jonctions étanches¹¹. Les zonula adherens sont situées au dessous des jonctions étanches et interagissent avec le réseau cytoplasmique subapical d'actine; elles sont formées par le rapprochement des membranes voisines, rapprochement facilité par certaines molécules d'adhésion (E-cadhérine ou uvomoruline)³⁵⁹. Les desmosomes, ou macula adherens, renforcent l'adhésion entre cellules et interagissent avec les filaments intermédiaires tandis que les jonctions de type "gap" (jonctions lacunaires) sont responsables des communications intercellulaires, particulièrement par les échanges ioniques. Enfin, les hémi-desmosomes ancrent la membrane basolatérale de certaines cellules épithéliales à la lamina basale⁸⁶. Il est à noter que la présence de toutes ces structures intercellulaires permet l'établissement d'une certaine étanchéité de la monocouche épithéliale. En culture cellulaire, cette étanchéité se matérialise par le développement d'une résistance au passage ionique entre les deux pôles de l'épithélium; cette résistance est mesurée habituellement en Ωcm^2 de surface cellulaire (figure 2)⁶⁵.

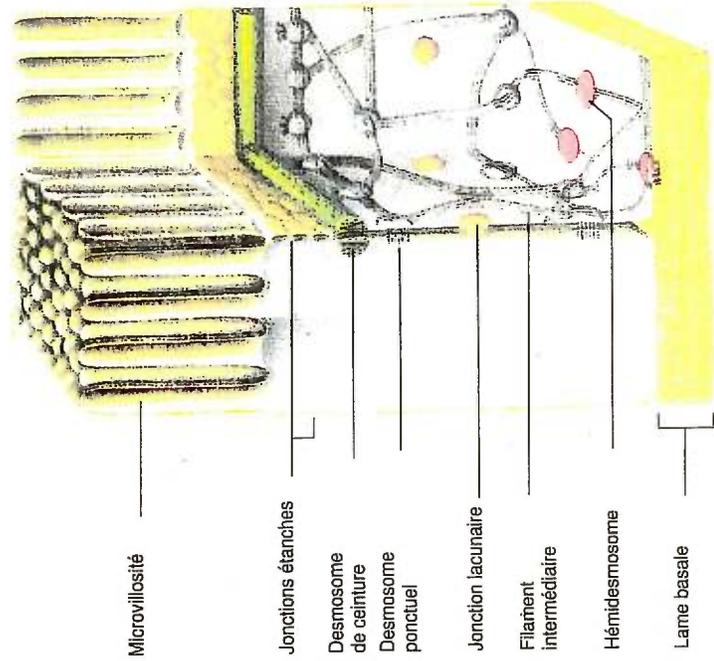
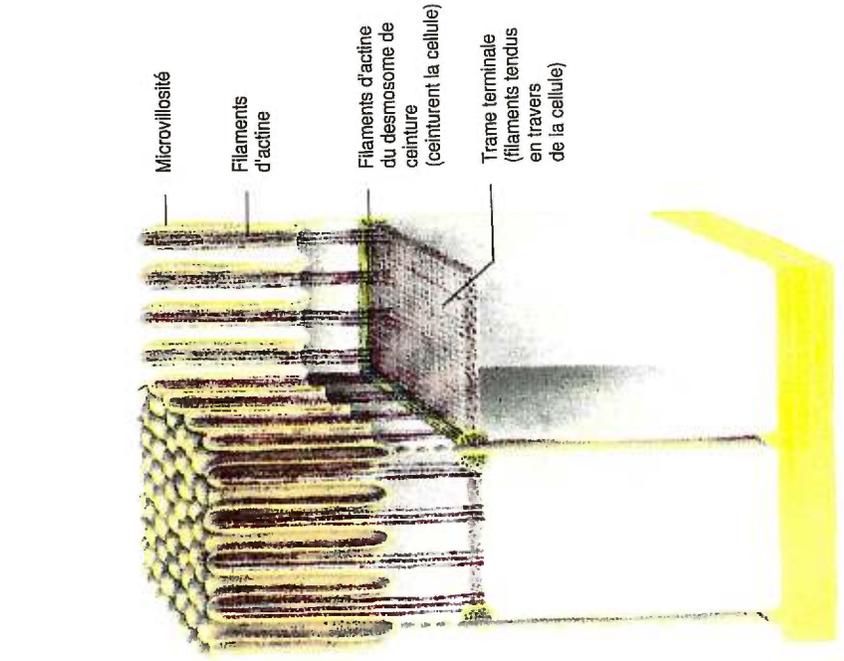
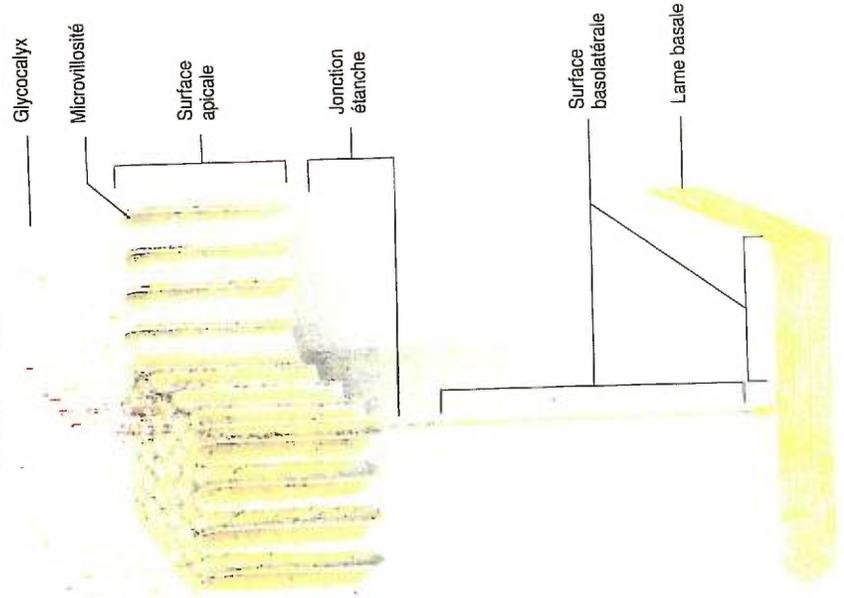
FIGURES 1 et 2

Pages 9 et 10

Représentations de cellules épithéliales: la figure 1 (page 9) illustre la distribution des organites et des microtubules dans la cellule (figure tirée de Louvard *et al.*, *Annu Rev. Cell. Biol.* **8**:157), tandis que les schémas de la figure 2 (page 10) mettent en évidence certaines structures particulières, dont les filaments intermédiaires et la trame terminale (figure tirée de Darnell *et al.*).



Lumière intestinale



Microvillosité
 Filaments d'actine
 Filaments d'actine du desmosome de ceinture (ceinturent la cellule)
 Trame terminale (filaments tendus en travers de la cellule)

Glycocalyx
 Microvillosité
 Surface apicale
 Jonction étanche
 Surface basolatérale
 Lamne basale

Microvillosité
 Jonctions étanches
 Desmosome de ceinture
 Desmosome ponctuel
 Jonction lacunaire
 Filament intermédiaire
 Hémidésmosome
 Lamne basale

2.2.2 La membrane apicale.

La membrane apicale fait face au milieu extérieur de la monocouche et se situe au dessus des jonctions étanches; sa situation implique qu'elle doit être capable de s'acclimater aux différentes conditions environnantes. Par exemple, l'épithélium intestinal est recouvert d'une sécrétion protectrice, le glycocalyx³⁰⁴. C'est aussi par le domaine apical que la cellule exerce de nombreuses fonctions spécialisées: l'absorption des aliments nutritifs bruts (par les microvilli) et la sécrétion mucosale en sont les exemples les plus classiques³⁰⁴. En effet, ces fonctions ont une influence profonde sur la structure qu'adopte la région apicale: les microvillosités augmentent considérablement la surface d'absorption cellulaire, mais nécessitent la mise en place d'une structure locale hautement spécialisée³⁰⁴. Ces protubérances membranaires sont rigides et nécessitent la présence de filaments d'actine eux-mêmes ancrés dans le cytosquelette. La charpente des microvilli est stabilisée par la villine et la fimbrine; un complexe calmoduline-myosine I lie le réseau d'actine à la membrane¹⁴². Ces structures permettent à la fois une certaine solidité aux microvillosités tout en leur donnant la flexibilité nécessaire pour interagir convenablement avec l'environnement externe. Enfin, le réseau d'actine sortant des microvillosités est stabilisé par la tropomyosine et par un réseau perpendiculaire de protéine apparentée à la spectrine, la fodrine¹⁴². Sous-jacente aux microvillosités, la trame terminale ("terminal web") contribue à ancrer les structures apicales³⁰⁴. Un autre réseau d'actine, constituée en anneau horizontal et associé à la myosine II, sert de plate-forme pour cette structure sous-membranaire. Le réseau de fodrine y est associé, ainsi que les réseaux des filaments intermédiaires (particulièrement des cytokératines), qui s'attachent aux desmosomes (figure 2)^{99, 142}.

Le domaine apical est aussi enrichi en protéines et lipides nécessaires à sa structure et ses fonctions. Tout d'abord, il s'agit d'une région riche en enzymes peptidiques (endopeptidases, aminopeptidases), phosphatidiques (5'-nucléotidase, phosphatase alcaline, Mg⁺ATPase) et glycolytiques (sucrases, amylases) responsables de la dégradation des substrats en éléments absorbables par la cellule²⁵⁶. De nombreuses protéines responsables du transport actif d'éléments cytosoliques se retrouvent à la membrane apicale, dont le transporteur Na⁺-glucose^{9, 212}. Enfin, par rapport au domaine basolatéral, la région membranaire apicale affiche une forte teneur en

glycolipides (jusqu'à 30%), caractéristique des membranes peu fluides. Cette propriété des glycolipides à former des liens intermoléculaires rigides apporterait une protection supplémentaire à la cellule contre l'environnement extérieur^{472, 527, 529}.

2.2.3 La membrane basolatérale.

Ce domaine membranaire correspond aux côtés latéraux de la structure cylindrique cellulaire sous les jonctions étanches, ainsi qu'à la membrane basale. Ces deux sous-domaines se distinguent toutefois par les éléments avec lesquels ils interagissent, c'est-à-dire les cellules environnantes (latéral) ou la matrice sous-jacente (basal)⁴⁷⁰. Les zones d'interaction avec les cellules adjacentes sont particulièrement riches en E-cadhérine (aussi nommée uvomoruline ou L-CAM), tandis que la membrane basale comporte plusieurs récepteurs d'éléments de la matrice cellulaire⁴⁷⁰. De façon générale, le domaine basolatéral renferme des récepteurs d'hormones ou des autres facteurs sanguins ainsi que des régulateurs osmotiques, telle la pompe Na,K-ATPase⁴³⁰. Bien que cette région ne dispose pas d'une structure aussi élaborée par rapport à celle du domaine apical, elle assure l'alimentation de la cellule, le maintien de sa structure et de son intégrité ainsi que la communication avec le reste de l'organisme⁶⁰. Ces fonctions de base l'apparentent donc à la forme membranaire la moins différenciée de la cellule, proche de celle des cellules non-polarisées.

2.2.4 La lamina basale.

La lamina basale est la matrice qui soutient la couche de cellules épithéliales et supporte le tissu en ancrant les cellules à une base solide. Elle renferme surtout des éléments sécrétés par le tissu qui la recouvre: laminine, collagène IV, héparan sulfate et protéoglycans constitués en fibres dont certaines sont liées au cytosquelette, ceci par l'intermédiaire de protéines adaptatrices membranaires⁴⁷⁰. Sans être une constituante cellulaire proprement dite, la lamina basale contribue au maintien de la structure cellulaire.

2.3 Les modèles des cellules épithéliales *in vitro*.

La majorité des études sur la polarité des cellules épithéliales ont été faites sur des cultures de cellules *in vitro*. L'homogénéité des cellules en culture a permis l'analyse de la distribution des protéines membranaires

mutantes, des facteurs associés à l'établissement de la polarité cellulaire, ainsi que des conséquences de la distribution asymétrique des structures cellulaires^{60, 170, 432, 470}.

Habituellement, lorsque les cellules épithéliales en culture arrêtent de proliférer et forment une monocouche étanche, il y a établissement d'une certaine polarisation dans la distribution des structures cellulaires ainsi que dans la répartition des protéines membranaires. Par contre, la culture sur support solide ne permet pas aux éléments nutritifs d'atteindre le domaine basolatéral des cellules et la différenciation peut donc être incomplète. L'utilisation de filtres semi-perméables permet de remédier à cette situation en recréant *in vitro* l'état de l'épithélium natif^{56, 65, 345}. Pour ce faire, les cellules sont déposées sur un filtre poreux auquel les cellules s'attachent tout en ayant accès au milieu nutritif sous-jacent; la surface apicale sera aussi baignée par ce liquide. L'accès facile des milieux baignant le domaine basolatéral et apical ajoute une utilité pratique de ces supports-filtres aujourd'hui commercialement disponibles; les filtres peuvent aussi être recouverts de collagène ou d'autres éléments de la matrice extracellulaire (figure 3).

Il existent de nombreuses lignées épithéliales, toutes avec des caractéristiques particulières, provenant d'organes variés et possédant même des mécanismes distincts de ciblage de certaines protéines membranaires. Il est donc essentiel de tenir compte du type de cellules utilisé en parcourant la vaste littérature sur le ciblage membranaire. Voici des exemples de lignées cellulaires épithéliales bien connues.

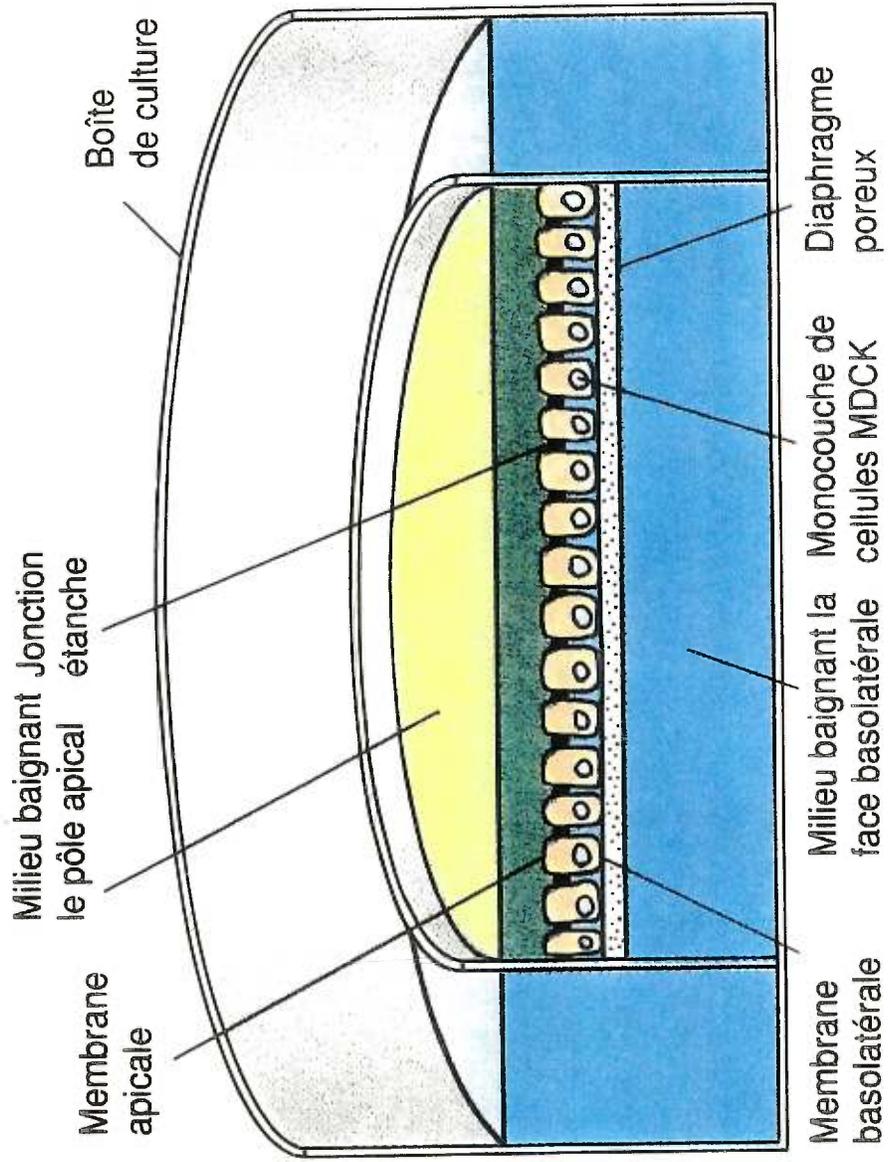
2.3.1 Caco-2

Les cellules Caco-2 sont d'origine humaine et proviennent d'une tumeur du colon⁴⁰⁶. Malgré leur origine cancéreuse, leur morphologie et biochimie se rapprochent de celles des cellules absorbatives de la bordure en brosse de l'intestin grêle. La monocouche que forme les Caco-2 est bien développée mais demeure très hétérogène au niveau cellulaire. Cette hétérogénéité n'est pas génétique, car elle persiste chez plusieurs clones de cette lignée⁵²⁴.

FIGURE 3

Page 15

Représentations de cellules épithéliales cultivées sur membranes semi-perméables (figure tirée de Darnell *et al.*).



2.3.2 Les cellules MDCK

Les cellules Madin-Darby canine kidney (MDCK) sont les plus utilisées parmi les lignées de cellules épithéliales^{60, 470}. Cette lignée cellulaire est dérivée d'une tumeur de tubule distal rénal récupérée d'une épagneule femelle^{171, 314, 337}. Malgré leur origine tumorale, elles possèdent beaucoup de caractéristiques d'une lignée épithéliale polarisée²⁸³. Deux clones de cellules MDCK ont été isolés et caractérisés: les cellules MDCK I et II. Le clone de type I possède une résistance transépithéliale élevée (jusqu'à $5000 \Omega \cdot \text{cm}^2$), mais a perdu certains traits morphologiques épithéliaux. Les cellules de type II forment une monocouche cuboïde de faible résistance électrique (environ $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$)^{56, 419}. Les cellules épithéliales MDCK ont conservé des caractéristiques dérivées de leur fonction d'origine: par exemple, elles sont sensibles à la présence de certaines hormones⁴²⁰. La distribution cellulaire de nombreuses protéines membranaires a aussi été étudiée dans ces cellules⁴⁶⁹; les résultats obtenus permettent de conclure que les cellules MDCK sont un excellent modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes du ciblage des protéines puisque plusieurs protéines connues sont correctement ciblées dans ces cellules⁴⁷⁰.

2.3.3 Autres lignées épithéliales

Le nombre de lignées de cellules épithéliales polarisées disponibles reflète l'existence d'une grande variété d'épithélia dont elles sont dérivées. Il demeure que chaque épithélium possède un rôle particulier dans l'organe dont il est issu; par conséquent, certaines voies de transport protéique spécialisées se sont développées et ne doivent pas être confondues avec les voies de transport constitutives. Il suffit de citer l'exemple des cellules épithéliales thyroïdiennes; ces cellules sécrètent une partie de la thyroglobuline dans le milieu apical, mais nécessitent un signal extracellulaire pour libérer le reste de l'hormone emmagasinée dans des granules spécialisés¹⁵. Certaines cellules épithéliales ciblent des protéines de façon différente des lignées plus classiques; par exemple, les cellules épithéliales de l'utérus sécrètent les protéoglycans du côté *apical*, permettant l'ancrage de l'embryon⁶². Enfin, l'état de différenciation d'une monocouche épithéliale exerce un effet important sur les voies de transport utilisées par certaines protéines. L'exemple de lignée épithéliale la mieux connue pour étudier ce phénomène est FRT (Fisher Rat

Thyroid). Il a été observé que les voies utilisées par l'enzyme dipeptidyl-peptidase IV pour aboutir au domaine apical variaient au cours du développement de la monocouche, impliquant une certaine évolution des mécanismes de transport protéique cellulaire⁵⁶⁶.

Il existe beaucoup d'autres lignées épithéliales possédant des caractéristiques qui leur sont propres, et il serait difficile d'en faire ici une liste complète. Nous nous attarderons donc surtout sur les mécanismes de transport impliquant les lignées épithéliales modèles MDCK (rénales) et Caco-2 (intestinales).

2.4 Le transport des protéines membranaires épithéliales.

2.4.1 Modèle de transport direct.

Le modèle déduit par les observations du transport protéique dans les cellules MDCK implique deux routes directes vers les domaines membranaires apical et basolatéral^{297, 454}. Les saccules externes de l'appareil de Golgi sont apparemment le lieu de triage d'où partent les voies de ciblage (figure 4)^{195, 473}. D'autre part, les quelques protéines membranaires qui ne privilégient aucune de ces voies de ciblage suivent le transport membranaire "de masse" ("bulk flow") ou "par défaut"^{86, 427}.

2.4.2 Modèle de transport "par défaut".

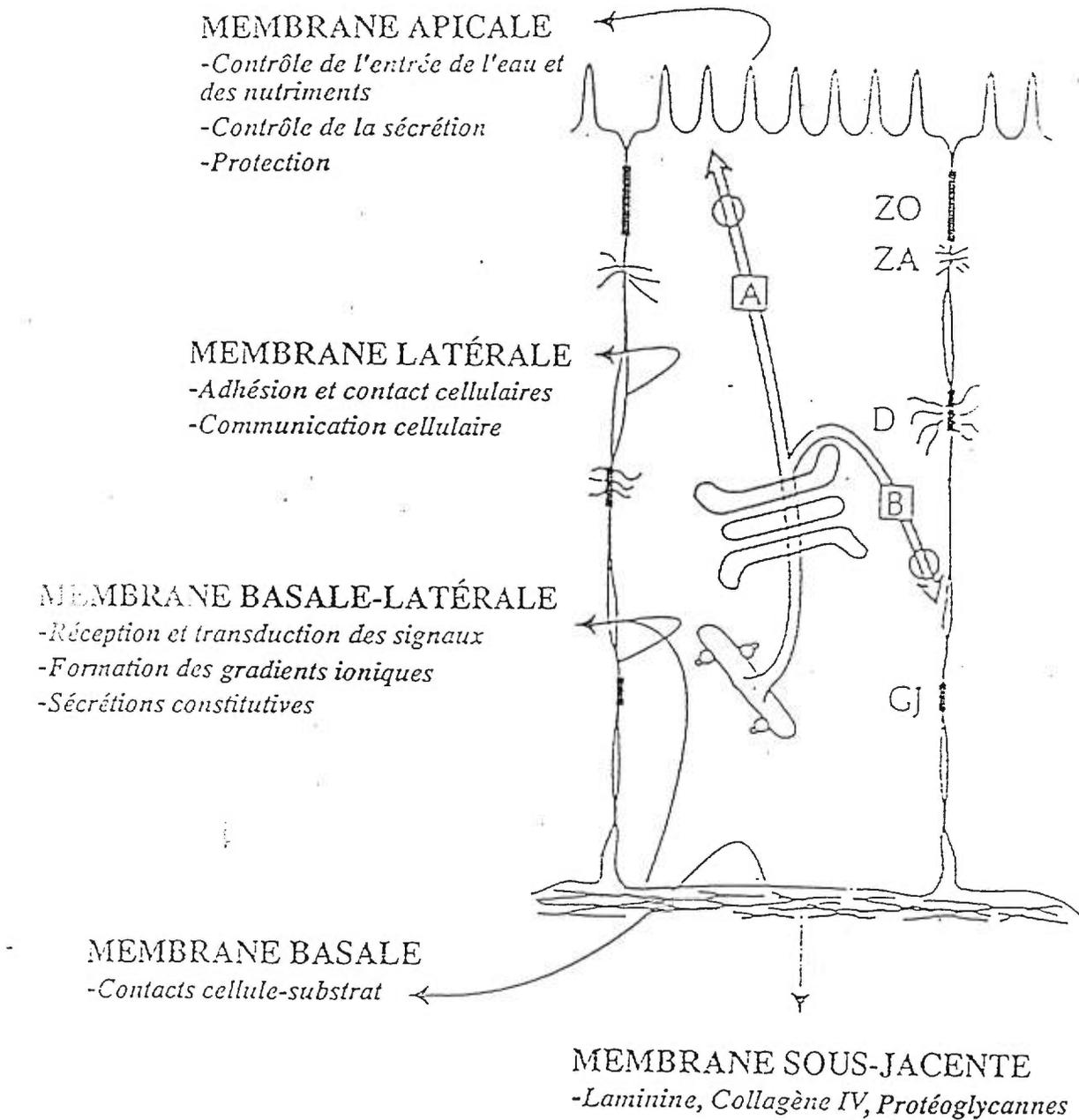
L'existence d'une voie de transport "par défaut" repose sur l'hypothèse que certaines protéines destinées à la surface de la cellule n'interagissent pas avec la machinerie de ciblage entraînant la répartition uniforme de telles protéines aux deux domaines membranaires³⁵¹.

Une autre possibilité serait l'existence de transport "par défaut" vers une région membranaire spécifique (apical ou basolatéral). En effet, dans les cellules Caco-2, on a longtemps associé la voie de transport basolatéral comme privilégiée pour les protéines membranaires sans signal de ciblage^{280, 326}; ce fait n'excluant pas l'existence de mécanismes supplémentaires de transport basolatéral polarisé pour des protéines spécifiques. Ces conclusions étaient inspirées d'observations sur le transport basolatéral de protéines exogènes qui ne sont pas ciblées à un domaine particulier dans les cellules MDCK¹⁹¹. L'existence d'une voie "par défaut" participant au ciblage dans les cellules

FIGURE 4

Page 19

Représentation du modèle de transport direct dans les cellules MDCK (figure tirée et adaptée de Wick *et al.*, Cell **67**:651).



épithéliales reste donc à être certifiée.

2.4.3 Transcytose.

A l'opposé des cellules MDCK, les cellules Caco-2 ont élaboré un système complexe de transport de leurs protéines membranaires. Outre le mécanisme de transport "par défaut" discuté précédemment, les Caco-2 utilisent une voie de transport indirecte pour acheminer certaines des protéines apicales à destination. En effet, ces protéines séjournent d'abord un certain temps à la membrane basolatérale avant d'être transportées au domaine apical³²⁶; seulement un cas de transcytose bi-directionnelle a été identifié¹³¹. Ce mécanisme de transport, nommé transcytose, rappelle le transport du récepteur des immunoglobulines (R-Ig) vers la surface apicale, une fois associé à son cargo IgM du domaine basolatéral^{352, 353}. Les exemples les plus classiques de cellules utilisant la voie de transcytose sont les hépatocytes²³, et les cellules M de Peyer⁵⁴⁵. En conclusion, le transport par transcytose (ou "indirect") doit sûrement sa nature à l'existence de fonctions spécifiques nécessitant une telle voie dans les cellules intestinales ou hépatiques; en effet, il s'agit d'une combinaison entre les mécanismes de transport apical, basolatéral et endosomal des cellules épithéliales polarisées de ces organes.

2.5 Maturation et signaux de transport des protéines.

2.5.1 Maturation des protéines membranaires.

Les protéines cytoplasmiques proviennent de la traduction des ARNm par les ribosomes libres non-associés au réticulum endoplasmique (RE), tandis que les protéines membranaires nécessitent un signal permettant la traduction spécifique de leurs ARNm au niveau du RE^{380, 456}. Dans certains cas, ce peptide signal est l'ancre définitive de la protéine à la membrane; d'autres protéines possèdent des régions différentes qui leur servent de région transmembranaire. Enfin, beaucoup de protéines sécrétées sont libérées dans le RE après le clivage de leur peptide signal⁹⁹. Bien qu'ils soient des mécanismes bien définis, les processus de synthèse, de maturation et de transport des protéines membranaires sont indéniablement reliés l'un à l'autre^{140, 436, 445}. Les quelques sections qui suivent essaieront d'intégrer les systèmes de transport des protéines membranaires au processus global de maturation protéique.

2.5.1.1 Topologies des protéines membranaires

Il existe deux catégories de protéines membranaires. Premièrement, les protéines membranaires périphériques sont associées à la membrane par l'ajout de certains groupements par modification post-traductionnelle ou par leur interaction avec les têtes hydrophiles des phospholipides membranaires. Deuxièmement, les protéines intégrales qui, elles, interagissent directement avec la membrane par une région transmembranaire hydrophobe^{35, 475, 535, 536}.

Les protéines membranaires intégrales sont elles-mêmes regroupées en sous-catégories de par leur topologie. La première classe, la plus simple, est constituée des protéines qui traversent la membrane une seule fois. Elles sont donc constituées d'un ectodomaine, d'une région transmembranaire et d'une région intracytoplasmique³⁵. Les protéines "transmembranaires simples" dites de *type I* possèdent leur extrémité amino-terminale à l'extérieur du cytoplasme; les protéines matures qui traversent de façon opposée la membrane cellulaire sont dites de *type II*. Les protéines à régions transmembranaires multiples constituent à elles seules un groupe à part (*type IV*)^{475, 536}.

La classification plus poussée de ces protéines transmembranaires diffère légèrement d'une équipe à l'autre: les protéines de type I possédant une longue région cytoplasmique constituent une nouvelle classe (*type III* selon von Heijne)⁵³⁶ de protéines transmembranaires, équivalente aux protéines de *type Ib* (selon Singer)⁴⁷⁵. Nous utiliserons la nomenclature plus moderne de von Heijne (figure 5). Les différences entre les protéines transmembranaires de type I, II et III se définissent en fonction de leur mécanismes de synthèse, particulièrement au niveau du peptide signal.

2.5.1.2 Peptide signal

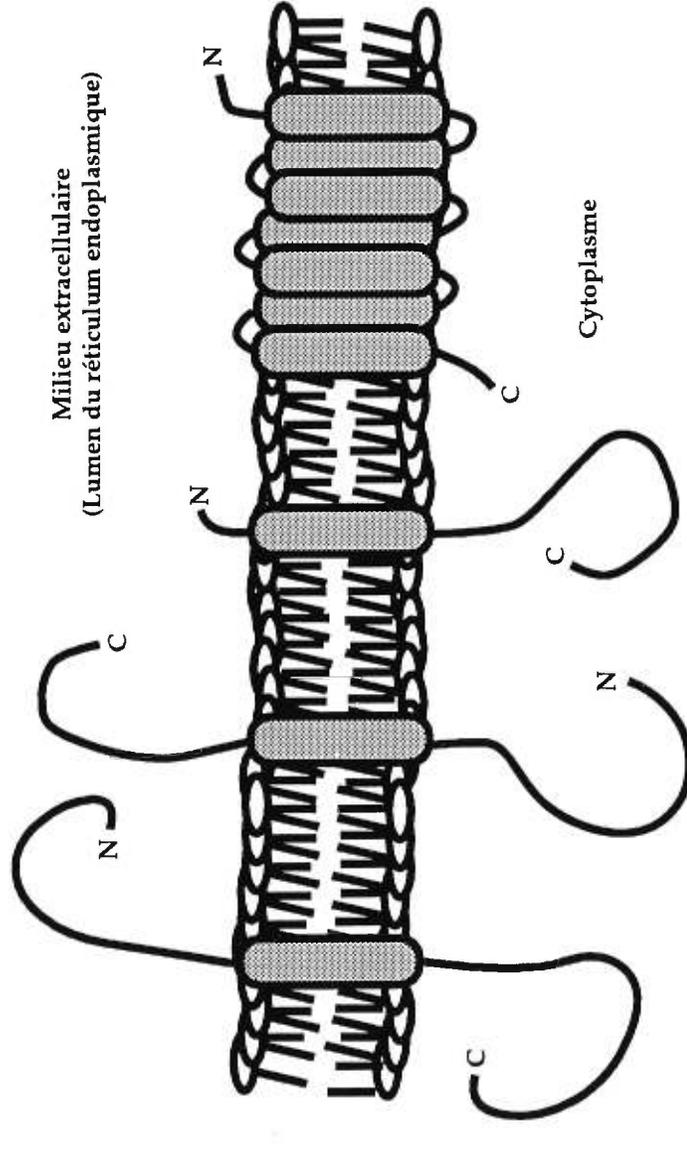
Les protéines transmembranaires possèdent une séquence d'environ une vingtaine d'acides aminés hydrophobes, constituant généralement une α -hélice ancrée dans la membrane. Cette séquence, retrouvée près de l'extrémité amino-terminale des protéines de type II, est appelée peptide signal⁵³⁵. Elle cible le polypeptide naissant vers la membrane du réticulum endoplasmique (RE)⁴¹⁵. La séquence ancre aussi la protéine de type II de telle façon que seule la région carboxy-terminale subit la translocation membranaire²⁴⁵. Différent de celui des protéines de type II, le peptide signal des protéines de type I n'ancr

FIGURE 5

Page 23

Représentation des quatre classes de protéines membranaires

TOPOLOGIE DES PROTEINES MEMBRANAIRES



- | | | | |
|--|--|---|---|
| TYPE I
(Par ex.: CD4,
gp160 du VIH) | TYPE II
(Par ex.: endopeptidase
neutre, neuraminidase du
virus de l'influenza) | TYPE III
(Par ex.: M2 du virus
de l'influenza) | TYPE IV
(Par ex.: récepteur des
chémoamines) |
|--|--|---|---|

pas de façon définitive le polypeptide; situé à la toute extrémité amino-terminale, il est clivé vraisemblablement peu après sa reconnaissance par un récepteur de la membrane du RE, comme c'est le cas des protéines sécrétées²⁴⁵. La région transmembranaire des protéines de type I provient plutôt d'une séquence hydrophobique interne qui cause l'arrêt du transfert polypeptidique et l'ancrage de la protéine⁴⁷⁵. Les protéines transmembranaires de type III possèderaient à la fois des caractéristiques des protéines de type I et II: leur extrémité carboxy-terminale ne subit pas la translocation membranaire (comme les protéines de type I), mais le peptide signal de ces protéines n'est pas clivé et sert d'ancre transmembranaire (comme les protéines de type II)⁵³⁶.

Le mécanisme de reconnaissance du peptide signal et de la translocation du polypeptide à travers la membrane du RE est un processus en plusieurs étapes⁴¹⁶, qui commence avec l'interaction du peptide signal avec une protéine dite "de reconnaissance" (SRP, "signal recognition protein"), dans le cytoplasme. Le complexe ribosomal-peptide-SRP reconnaît ensuite une protéine du RE qui sert de récepteur au complexe (récepteur-SRP), un récepteur ribosomal, ainsi qu'un complexe de translocation, le complexe Sec61p. Le polypeptide en aval de l'extrémité amino-terminale, en forme de boucle, subit alors une translocation vers la lumière du RE. La formation en boucle permet de maintenir ancré le peptide signal, de sorte que, pour les protéines de type I, le polypeptide naissant est relégué dans la lumière du RE^{245, 416}. Pour les protéines de type II, la formation d'une boucle est nécessaire pour retrouver la partie en amont de l'extrémité amino-terminale du côté cytoplasmique. Les mécanismes impliqués dans la translocation demeurent peu connus, quoique la présence d'acides aminés de charge fortement positive du côté cytoplasmique (donc en amont du peptide signal pour les protéines de type II et évidemment en aval pour ceux de type I) semble dicter l'insertion du polypeptide^{208, 385, 535}. Enfin, la libération du complexe SRP du peptide signal permet au processus d'élongation de se poursuivre; le peptide signal pourrait possiblement interagir avec d'autres protéines (dont le SSR ["signal sequence receptor" ou TRAP] et le TRAM ["translocating-chain associating membrane-protein"])²⁴⁵. Ces protéines pourraient ainsi interagir avec la future région transmembranaire des protéines de type II, ou même stabiliser d'autres régions transmembranaires. L'élongation du polypeptide se poursuit jusqu'à ce que la traduction de

l'ARNm prene fin. Notons finalement la présence de nombreuses protéines chaperonnes (par exemple, BiP) qui contribuent à donner à la protéine sa conformation finale^{201, 255, 436 202, 377, 450}; sinon, elles sont dégradées par des voies protéolytiques dans le RE²⁶² ou par celle de l'ubiquitine^{180, 225}.

2.5.1.3 Modifications post-traductionnelles

Lors de l'élongation de la chaîne polypeptidique, certaines modifications co-traductionnelles peuvent avoir lieu. La formation de ponts disulfures¹⁷³, l'oligomérisation des protéines²³⁹, ainsi que des modifications protéolytiques¹²⁶ contribuent à la maturation de la protéine. Une autre modification possible implique l'ajout de sucres à l'amide des asparagines, est dite la glycosylation liée à N²⁶⁴. En effet, la séquence N-X-S/T (ou X est n'importe quel acide aminé, sauf une proline) sert de cible pour l'ajout de N-acétylglucosamine dans la lumière du RE²⁰⁷. Ce glycane n'est que l'extrémité d'une chaîne de sucres qui, dans sa forme mature, peut être constituée de mannose et, dans les cas plus complexes, de galactose, de fucose et de N-acétylneuraminate²⁶⁴. Un important processus de modification de ces chaînes se fait tout au long du transport de la protéine du RE vers l'appareil de Golgi. Une deuxième forme de glycosylation, dite liée à l'O (groupe hydroxyle des sérine, thréonine ou l'hydroxylysine du collagène) est post-traductionnelle¹. En effet, cette modification, qui peut aussi s'accomplir sur les chaînes sucrées liées à N, dérive d'un ajout de galactose ou de N-acétylglucosamine sur l'acide aminé ou le sucre. Ces modifications ne se déroulent qu'à partir du *trans*-Golgi, et donc parmi les dernières saccules de l'appareil de Golgi.

Une modification co-traductionnelle qui a retenu beaucoup l'attention dans l'étude des mécanismes du tri des protéines membranaires est la liaison au glycosylphosphatidyl inositol (GPI)^{92, 133, 522}. Cette modification se fait sur les protéines transmembranaires de type I qui possèdent une petite région cytoplasmique. Les régions transmembranaire et cytoplasmique sont rapidement excisées par une enzyme similaire à la signal-peptidase et l'ectodomaine de la protéine est ancré à un complexe membranaire sucré, le GPI⁹². L'ancrage du GPI se fait sur un acide aminé de petite taille (souvent S, A ou G)⁵²². Cette réaction est catalysée par une transaminase à environ une dizaine d'acides aminés (hydrophiles) de la région transmembranaire. Les protéines membranaires liées au GPI sont transportées généralement au

domaine apical des cellules épithéliales polarisées; cette question sera abordée en détail dans la section sur le transport apical.

Il existe plusieurs autres modifications post-traductionnelles des protéines^{460, 465}. L'acétylation et la myristylation sont co-traductionnelles: l'acétylation est catalysée par une acétyltransférase retrouvée en association avec le ribosome⁴⁶⁰. La myristylation se rapporte aux protéines dont la méthionine amino-terminale est clivée par une aminopeptidase libérant une glycine. Cet acide aminé sera par la suite modifié par une myristoyltransférase, lui permettant de s'associer à la membrane cellulaire. L'ajout de myristate peut alors constituer une sorte de signal de ciblage membranaire pour des protéines cytoplasmiques, comme les protéines kinases A (PKA) et p60Src⁴⁶⁰. Finalement, l'ajout de palmitate ou de farnésyl sur les cystéines⁷³, la phosphorylation des sérines, thréonines ou tyrosines³⁸¹ et la méthylation des extrémités carboxy-terminales⁷⁵ sont parmi d'autres modifications possibles des protéines⁴⁰⁹.

2.5.1.4 *Transport vésiculaire*

Le transport des protéines membranaires du RE à l'appareil de Golgi, et ensuite vers les divers organites cytoplasmiques ou la membrane cellulaire, est un processus hautement complexe. Les protéines sont acheminées à leur diverses destinations à l'intérieur de vésicules de transport^{412, 458}. Certaines protéines "adaptrices" qui se retrouvent sur les vésicules ciblent celles-ci, par exemple, aux saccules de l'appareil de Golgi, aux endosomes, lysosomes ou à la membrane plasmique^{447, 458}.

Deux types de "vésicules-navettes" sont responsables du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi. Elles sont tapissées soit de COP I ("coatomer", "coat protein" I)⁹¹ ou de COP II²⁶⁹. Les COPs sont des complexes protéiques de sept sous-unités, nommées α , β , β' , γ , δ , ϵ et ζ -COP⁹¹. La protéine COP I se retrouve aussi dans les vésicules médiant le transport entre les saccules de l'appareil de Golgi, ainsi que celles se recyclant de l'appareil de Golgi vers le RE. Par contre, COP II n'est retrouvée que dans les vésicules impliquées dans le transport du RE vers l'appareil de Golgi²⁶⁹. En effet, le transport bidirectionnel des vésicules à COP I assure plutôt le renouvellement continu des protéines résidentes de l'appareil de Golgi, ainsi que

le rapatriement de protéines du RE qui ont échappé aux mécanismes de rétention. Il n'est donc pas surprenant que COP I interagisse avec certaines des séquences servant de signal de rétention des protéines du RE (KKXX carboxy-terminal ou XXRR amino-terminal)^{260, 458}. Il demeure que certaines protéines (possédant un signal carboxy-terminal FF et dites de la "famille Emp24") utiliseraient la voie de COP I pour leur transport spécifique vers l'appareil de Golgi²⁶⁰. Par contre, le mécanisme permettant à la majorité des autres protéines membranaires d'être sélectivement emmagasinées dans les vésicules à COP II n'est pas encore connu.

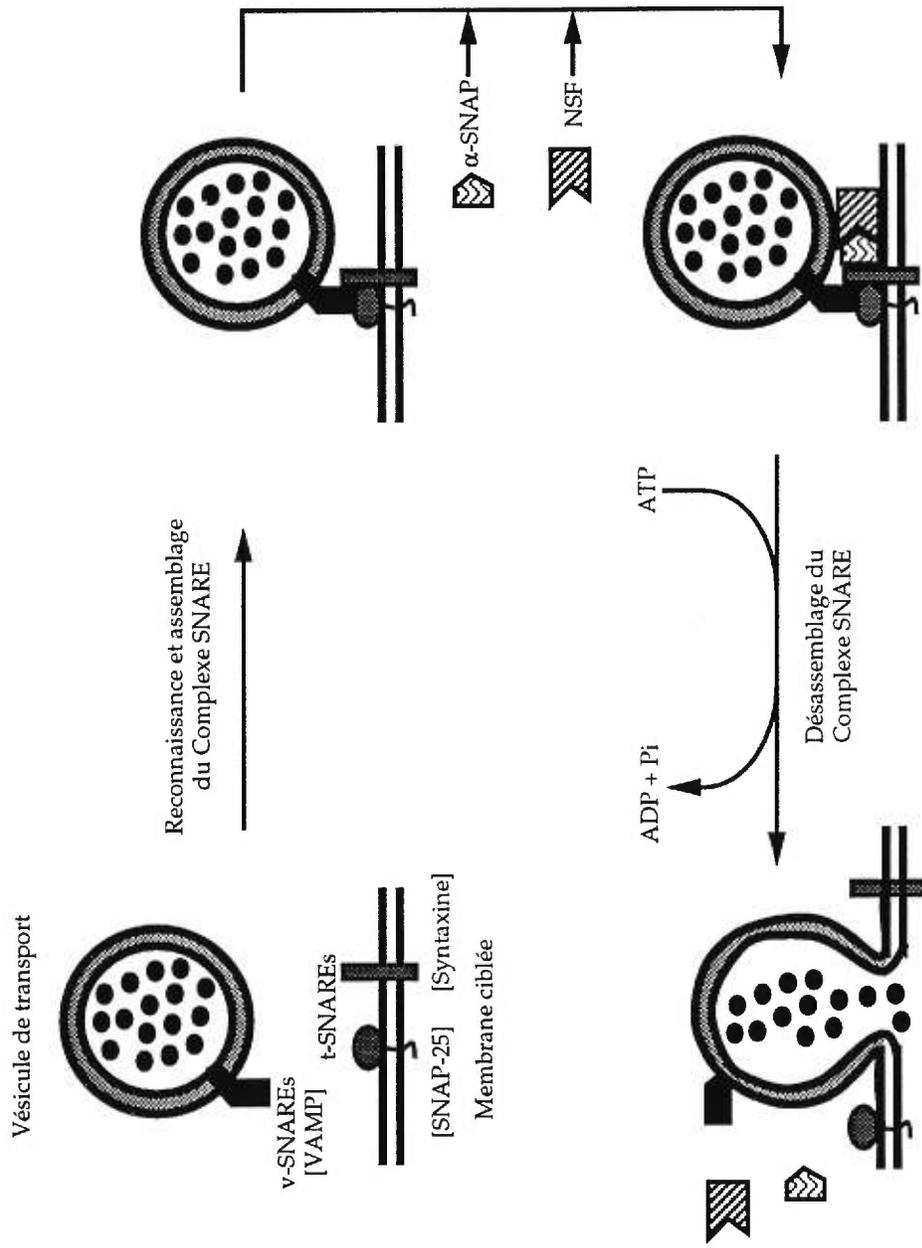
Outre les COPs, le transport vésiculaire nécessite d'autres éléments importants. La reconnaissance entre vésicule initiale et de destination se fait, respectivement, par les protéines v-SNARE ["vesicule"] et t-SNARE ["target"]. Les SNARES ("SNAP-Receptors") sont des protéines qui servent d'adresses pour certaines composantes du système vésiculaire^{28, 211}. Des SNAREs bien connues sont les protéines VAMP (v-SNARE) et SNAP25 (t-SNARE) impliquées dans la neurotransmission^{129, 177}. Il est d'ailleurs intéressant de noter la distribution spécifique des syntaxines (des t-SNAREs) dans les cellules polarisées: la syntaxine 3 est apicale, mais la syntaxine 4 est basolatérale. La syntaxine 2 n'est pas ciblée à un domaine particulier dans les cellules épithéliales, mais est apicale dans les cellules pancréatiques⁵⁴². Enfin, la syntaxine 5 est essentielle pour le transport entre l'appareil de Golgi et le RE⁴⁴⁸. Cette observation démontre comment les vésicules pourraient être ciblées vers des régions membranaires spécifiques dans les cellules. Les SNAREs servent de protéines d'amarage vésiculaire alors que la SNAP ("soluble NSF attachment protein", un complexe de six sous-unités) se lie à la NSF ("N-ethylmaleimide sensitive factor") pour initier le phénomène de fusion membranaire en hydrolysant l'ATP (figure 6)²¹¹. L'apport en énergie est assuré par l'ARF (pour COP I) ou SAR (pour COP II), des GTPases qui, liées à l'ATP, démarrent la formation vésiculaire. L'hydrolyse de l'ATP en ADP provoque le bourgeonnement de la vésicule⁴⁴⁷.

Si les SNAREs donnent une certaine identité aux composantes du système vésiculaire, il demeure qu'un système de transport hautement spécialisé nécessite un contrôle encore plus poussé et une discrimination claire

FIGURE 6

Page 29

Représentation de la reconnaissance des vésicules par les t-SNARES et les v-SNARES, composantes du transport vésiculaire



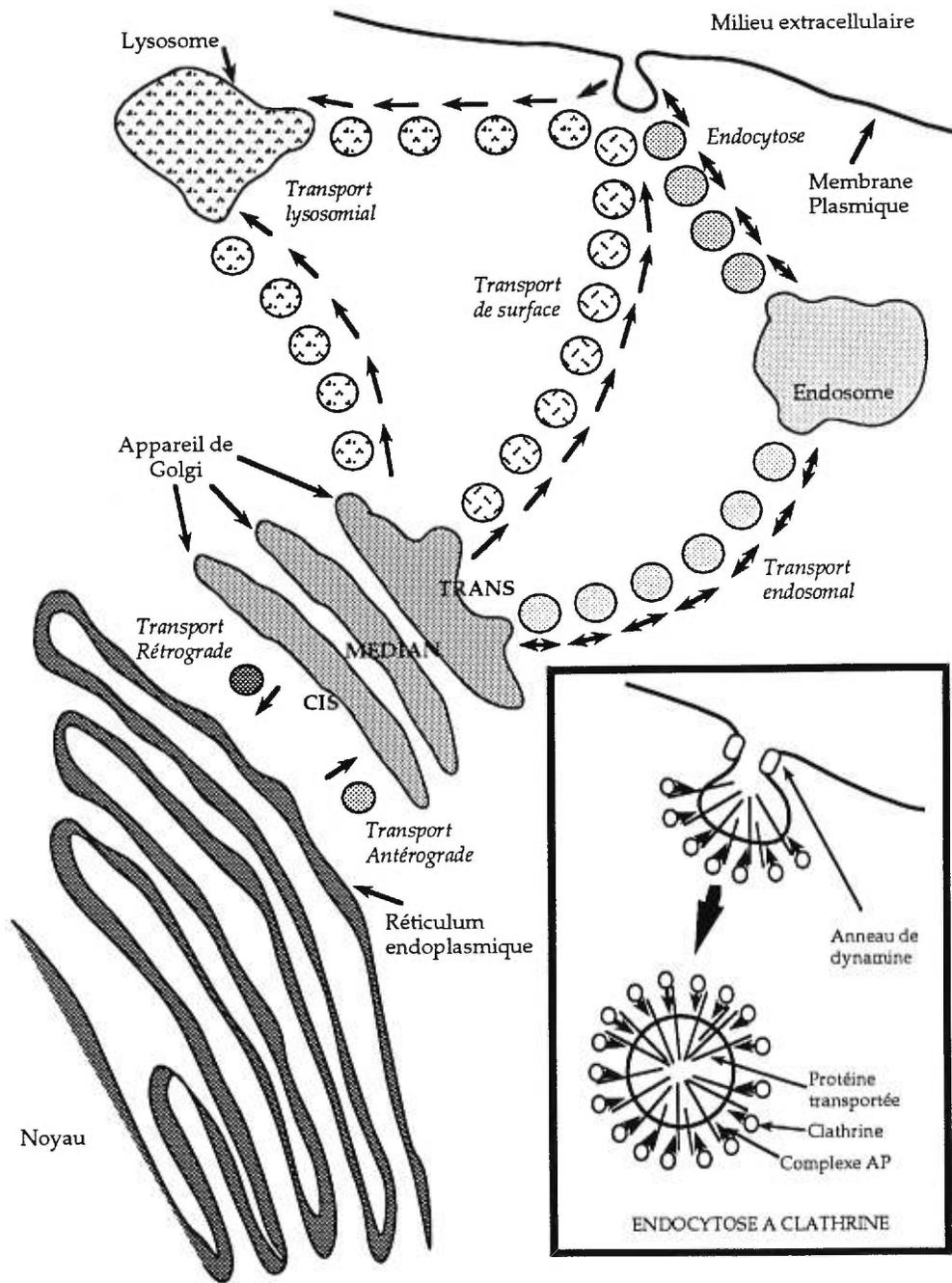
entre les différentes composantes cellulaires. Les protéines Rab sont des GTPases qui forment une sous-classe de la famille des protéines Ras³⁶⁶. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de la reconnaissance des v-SNAREs par les t-SNAREs. La multitude d'interactions que cela implique nécessite un nombre impressionnant de Rabs, dont environ une quarantaine sont connues aujourd'hui³⁶⁷. Dans leur forme liée au GDP, les Rabs s'associent aux vésicules de transport. Si la vésicule est destinée à fusionner avec le compartiment de destination, le GDP est converti en GTP, activant la protéine Rab qui permet le transport et enfin la fusion de la vésicule à sa destination^{402, 560}. Il est à noter que l'activation des Rabs est sévèrement contrôlée, car ces petites protéines sont impliquées dans une multitude de fonctions, du transport endosomal (Rab5)⁵⁶⁰ au transport des vésicules des synapses (Rab3)⁵⁶⁰ jusqu'à la formation des jonctions étanches des cellules épithéliales (Rab3B et Rab13)^{540, 559}. Les fonctions plus spécialisées des Rabs dans le transport vésiculaire seront développées ultérieurement.

Le transport vésiculaire des protéines membranaires une fois sorties de l'appareil de Golgi implique au moins deux complexes de protéines "adaptrices", AP-1 et AP-2^{260, 447}. A ces complexes doit s'ajouter la clathrine, protéine associée au recyclage des protéines membranaires de la surface cellulaire³⁹³, et la dynamine, GTPase impliquée dans le processus de bourgeonnement (figure 7)⁴²⁵. Les molécules de clathrine interagissent entre elles pour former des structures en formes de coquilles qui entourent les puits ou cavités de bourgeonnement, formant par la suite les vésicules à clathrine⁴⁴⁷. La fonction de la dynamine est d'étrangler les vésicules naissantes pour les libérer de la membrane qui les retient^{247, 458}. Pour ce faire, la dynamine interagit par son extrémité carboxy-terminale riche en prolines avec le domaine carboxy-terminal SH3 de l'amphiphysine II¹⁰². Le rôle de l'amphiphysine II est d'amener la clathrine à proximité de la membrane en se liant avec elle. L'interaction de l'amphiphysine avec la dynamine semble libérer la clathrine, permettant à la dynamine de créer un étranglement entre la vésicule et la membrane, et ainsi le bourgeonnement de la vésicule¹⁰². Dans les neurones, l'amphiphysine I interagit d'une manière similaire avec la clathrine, la dynamine et la sous-unité α du complexe AP-2 pour contrôler le recyclage des vésicules synaptiques¹⁰². Dans ce cas, deux protéines spécialisées, la synaptotagmine et la synaptotagmine, vont respectivement lier le domaine SH3

FIGURE 7

Page 32

Une vue d'ensemble du transport vésiculaire



de l'amphiphysine et le complexe AP-2³⁶¹. La synaptojanine, une inositol 5'-phosphatase, agit sur les lipides membranaires et la réorganisation du réseau d'actine¹⁰²; la synaptotagmine est la protéine qui rend le processus sensible à la concentration de calcium¹²⁹. Le transport des vésicules synaptiques possède donc de nombreuses similarités avec les systèmes de transport vésiculaire plus ubiquitaires.

Les protéines "adaptrices" AP-1 et AP-2 font le pont entre la formation des vésicules et les protéines membranaires qui y sont emprisonnées²⁶⁰. AP-1 est retrouvée dans les vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi et est constituée des sous-unités lourdes γ et $\beta 1$, d'une sous-unité moyenne $\mu 1$ et d'une petite sous-unité $\sigma 1$ ^{319, 424}. Quant à AP-2, elle est impliquée dans le transport endosomal et regroupe les sous-unités α puis $\beta 1$ ou $\beta 2$, $\mu 2$ et $\sigma 2$. Un nouveau complexe, AP-3 (sous-unités δ , $\beta 3$, $\mu 3$ et $\sigma 3$)^{108, 474}, a récemment été identifié, mais son interaction avec la clathrine ainsi que son rôle exact dans le transport des protéines membranaires n'a pas encore été entièrement caractérisé. Chaque sous-unité des APs interagit avec une composante spécifique de la vésicule de transport. Les sous-unités lourdes $\beta 1$ ou 2 interagissent avec la clathrine par une région en charnière, recrutant les molécules de clathrine pour débiter la formation de la coquille¹⁶⁶. D'autre part, les sous-unités γ , α ou δ interagiraient avec des facteurs impliqués dans une organisation du cytosquelette local, ou des éléments de modulation de la formation des APs²⁶⁰. Les sous-unités μ interagissent spécifiquement de leur côté avec les protéines membranaires³⁷¹. Des séquences à base d'acides aminés aromatiques (tyrosines) ou de leucines (LL), ont été démontrées comme pouvant interagir spécifiquement avec la chaîne μ ^{214, 320}. Enfin, il a été proposé que le contrôle de la reconnaissance de certains de ces signaux serait modulé par leur phosphorylation, quoique les mécanismes impliqués dans ce processus demeurent encore à l'étude^{36, 370, 466}.

Certaines protéines membranaires, dont le récepteur $\beta 2$ -adrénergique ($\beta 2AR$), utiliseraient d'autres protéines "adaptrices" pour se lier à la clathrine, dont la β -arrestine, qui est impliquée dans l'internalisation du $\beta 2AR$ de la surface cellulaire¹⁸⁶. Il est donc envisageable que d'autres protéines de transduction de signal couplées aux protéines G utilisent cette voie "AP indépendante". Outre la découverte de nouvelles protéines adaptrices, il

demeure que la caractérisation des séquences des protéines avec lesquelles elles interagissent est centrale à la meilleure compréhension des mécanismes de transport intracellulaire. Ces signaux moléculaires responsables du tri des protéines sont discutés dans la section suivante.

2.5.2 Les signaux de transport en général.

L'interaction entre les protéines membranaires et les éléments du transport vésiculaire se fait par des séquences d'acides aminés ou certaines structures retrouvées sur les protéines. Cette section tentera de présenter les contributions importantes des dernières années dans l'identification de quelques "signaux moléculaires de transport".

2.5.3 Quelques signaux de transport classiques.

2.5.3.1 *Le transport et la phosphorylation: récepteur mannose-6-phosphate*

Parmi les systèmes de transport les mieux connus se retrouve celui des enzymes lysosomiaux. L'étude de plusieurs maladies (mucopolysaccharidose, syndrome de Hunter, maladie de Tay-Sachs) causées par une anomalie dans le processus de transport de ces enzymes a grandement contribué à l'identification des mécanismes impliqués³⁶². Une phosphorylation au niveau des N-acétylglucosamines assure le ciblage de ces enzymes. Au niveau du *trans*-Golgi, le récepteur mannose-6-phosphate (M6P-R) reconnaît le signal phosphorylé; les vésicules destinées aux lysosomes sont alors identifiées et ciblées correctement. La faible affinité du récepteur pour le signal phosphate en milieu acide des lysosomes, ainsi que la présence de phosphatases dans les vésicules de transport, permet la dissociation du récepteur, son recyclage vers l'appareil de Golgi, ainsi que le relargage des enzymes aux lysosomes²⁶⁵.

2.5.3.2 *Vers les mitochondries*

La vaste majorité des protéines mitochondriales proviennent des gènes nucléaires; à peine 10 protéines sont codées par le génome de l'organite. La majorité des protéines sont donc synthétisées sur les ribosomes libres du cytoplasme; elles doivent être ciblées vers la mitochondrie par un système de transport spécialisé²⁹¹. Si les protéines Yjd1 et ctHsp70s (homologues des protéines bactériennes DnaJ et DnaK) chaperonnent le transport des protéines, il semble que la protéine MSF ("mitochondrial stimulation factor") soit seule à

interagir avec les signaux de transport mitochondrial²⁹¹. Les signaux de transport vers la mitochondrie sont constitués d'une séquence de 15 à 30 acides aminés, généralement basiques, et formant des α -hélices ou des feuillets- β amphiphiliques²¹⁰. Ces signaux amino-terminaux seraient reconnus par MSF, pour être excisés à la suite de l'arrivée à destination de la protéine. MSF s'amarrerait sur un de deux complexes de la membrane externe mitochondriale, Tom37/70 ou Tom20/22, après quoi un processus d'importation serait enclenché²¹⁰. Les protéines destinées à la membrane interne de la mitochondrie nécessitent l'apport d'un deuxième complexe, Tim²⁹¹. Des signaux de transport supplémentaires à ceux retrouvés à l'extrémité amino-terminale seraient responsables de la localisation interne exacte des protéines à l'intérieur de l'organite.

2.5.3.3 Vers le noyau

L'importation et l'exportation des protéines au niveau du noyau est un phénomène complexe. Si les pores nucléaires permettent la libre diffusion des petites protéines cytosoliques, le transport nucléaire demeure généralement un mécanisme de transport actif¹⁸⁷. Le processus implique la reconnaissance des protéines nucléaires par une des protéines "adaptrices", le complexe des importines α/β ou la transportine³⁶⁴. Ces protéines reconnaissent des signaux de transport dits "signaux de localisation nucléaire" (SLN). Ces séquences sont généralement riches en acides aminés basiques (SLN de l'antigène T du virus SV40: **KKKRRK**), ou du moins comportent un acide aminé basique critique (SLN de c-myc: **PAAKRVKLD**)³⁶⁴. La translocation de la protéine au noyau nécessite Ran, une GTPase de la famille Ras, et quelques autres protéines. Le contrôle du transport des protéines nucléaires est habituellement exercé par une phosphorylation (comme NF κ B/I κ B), une protéolyse (comme PKA) ou la liaison d'un ligand (comme les récepteurs des glucocorticoïdes); il s'agit donc souvent de libérer la protéine membranaire d'un facteur de rétention, ou de démasquer un SLN inactif³⁶⁴. Enfin, il existe aussi des signaux d'exportation nucléaire (comme **LPPLERLTLD** dans Rev du VIH-1, qui interagit avec la protéine "adaptrice" Rip), mais les mécanismes qui sont impliqués dans le transport débordent du cadre de cette thèse³⁶⁴.

2.5.3.4 Vers le réticulum endoplasmique

La protéine COP I a été précédemment décrite comme responsable, en plus du transport protéique ambisens (dit “antérograde/rétrograde”) de l’appareil de Golgi, du transport “rétrograde” du *cis*-Golgi vers le RE⁹¹. Cette protéine interagit avec les signaux de rétention cytoplasmiques KKXX ou XXRR des protéines membranaires destinées au RE³⁹⁴, et co-localise avec le récepteur KDEL p23/Erd2. La protéine Erd2 reconnaît la séquence KDEL d’ectodomains ou de protéines résidentes du lumen du RE^{242, 260, 395}. Il existe une variété de protéines résidentes du RE, dont plusieurs possèdent des rôles importants dans la maturation des protéines membranaires: par exemple, les protéines chaperones des groupes Hsp70 et Hsp90, les calnexines (signal RKPRRE) et les calréticulines (KDEL)²⁰². La localisation de BiP, une protéine Hsp70 qui possède un signal KDEL carboxy-terminal, n’est que légèrement altérée par la délétion de ce signal, suggérant l’existence de séquences de rétention encore inconnues⁴⁵⁸.

2.5.3.5 Vers l’appareil de Golgi

Des signaux moléculaires ont été identifiés pour les protéines destinées aux compartiments de l’appareil de Golgi, sauf le *cis*-Golgi. Plusieurs enzymes, de topologie membranaire de type II, retrouvés dans le Golgi médian (ou des saccules intermédiaires) possèdent le signal de localisation dans leur région transmembranaire; par contre, ce signal est fortement influencé par les séquences immédiatement en amont et en aval de ce domaine membranaire³¹⁰. Pour les protéines de type I du *trans*-Golgi, la séquence ou structure de transport se retrouve dans leur région cytoplasmique carboxy-terminale; la séquence YQRL de la protéine TGN38 est nécessaire et suffisante pour le ciblage de cette protéine²³³. Les acides aminés FFXFD, retrouvés dans le domaine cytoplasmique de la dipeptidyl aminopeptidase A, sont nécessaires au transport de l’enzyme au *trans*-Golgi³¹¹. Une autre séquence de ciblage de *trans*-Golgi, retrouvée dans la région cytoplasmique de l’enzyme furine, contient un regroupement d’acides aminés très acides (CPSDSEED~~E~~G); cette séquence s’ajoute à un signal YKGL pour aussi contrôler l’endocytose de l’enzyme⁵³⁸. La phosphorylation de sérines intracytoplasmiques par la caséine kinase II inhiberait le transport vers l’appareil de Golgi⁵³⁸.

2.5.3.6 Vers les lysosomes et les endosomes

La phosphorylation des N-acétylglucosamines de certaines glycoprotéines enzymatiques, sur les mannoses, a précédemment été décrit comme mécanisme de ciblage utilisé pour les enzymes lysosomiaux²⁶⁵. Deux autres signaux importants de transport lysosomal ont été identifiés: un premier signal, basé sur une tyrosine critique, est retrouvé dans le domaine intracytoplasmique de glycoprotéines lysosomiales (les Lgps, dont Lgp120), et la phosphatase acide lysosomiale (LAP)^{227, 236, 434}. Le deuxième signal a été identifié à l'intérieur du domaine cytoplasmique de CD3 γ (quoique complémentaire à un signal de transport lysosomal/endosomal YXXL) et du récepteur mannose-6-phosphate (M6P-R); il est constitué de deux leucines contiguës (LL)^{246, 285}. Si ces séquences représentent des adresses moléculaires lysosomiales, certaines peuvent aussi servir de signal au transport endosomal. En effet, le signal LL de CD3 γ (mais pas celui du M6P-R) et les signaux à base de tyrosines de la LAP et des Lgps servent de signal d'endocytose²³⁶. Ainsi, de nombreuses protéines membranaires contiennent ces "séquences d'endocytose" qui leur permettent d'être transportées de la surface cellulaire aux endosomes.

Le premier signal à base de tyrosine impliqué dans le transport endosomal a été identifié en étudiant des récepteurs naturels défectifs de la lipoprotéine de faible densité (LDL-R), mutations qui sont la cause de l'hypercholestérolémie familiale¹⁸³. Une simple substitution d'une tyrosine intracytoplasmique à une cystéine est suffisante pour inhiber substantiellement le taux d'endocytose de la protéine¹⁰⁰. Curieusement, la séquence consensus retrouvée dans le LDL-R (NPXY) ne sera pas similaire à celles des autres signaux à base de tyrosine (YXXL), mais retiendra des caractéristiques structurales communes^{71, 518}. La plus frappante démonstration du rôle d'une tyrosine dans un signal d'endocytose a été faite avec la protéine virale HA²⁷⁹. L'insertion d'une tyrosine à la position 543, à cinq acides aminés de la région transmembranaire et proche d'une structure locale en tour β , crée un signal artificiel d'endocytose; par contre, la présence d'une tyrosine à d'autres positions n'aboutissent pas à l'établissement d'un signal. La structure environnante de la tyrosine est donc critique²⁷⁹. Ainsi, plus récemment, la réinsertion d'une tyrosine dans un environnement local de tour β a aussi permis la création d'un signal d'endocytose artificiel dans un récepteur mutant

de la transferrine humaine (TR-R)⁸⁵. D'autres signaux "tyrosine-dépendants" furent identifiés dans les parties cytoplasmiques des récepteurs M6P-R²⁴³, de la transferrine humaine (TR-R)⁸⁵, polymérique de l'immunoglobuline (PIg-R)³⁷² et de l'asialoglycoprotéine (Asgp-R)¹⁷². L'analyse par mutagenèse de leurs domaines impliqués dans l'endocytose procurait d'autres indications concernant les structures susceptibles d'être importantes pour le fonctionnement optimal du signal: 1) la proximité de la région transmembranaire (habituellement à moins de 30 acides aminés de la tyrosine); 2) les acides aminés environnants, 3) dans certains cas, la possibilité de substituer la tyrosine pour une phénylalanine (tel que démontré pour le TR-R) et 4) une structure locale en tours β , d'où la présence d'acides aminés favorisant cette formation. Il est intéressant de noter que des délétions de la partie intracytoplasmique, quoique distales aux signaux d'endocytose, peuvent aussi affecter son efficacité, tel que démontré pour le TR-R et la LAP⁵¹⁸. Enfin, outre celui de CD3 γ , les domaines intracytoplasmiques de CD4 et du récepteur du fragment Fc des Ig (isotype B2) contiennent aussi des séquences LL importantes pour leur endocytose^{4, 235}.

Il existe donc une certaine similitude entre les séquences permettant le ciblage des protéines membranaires vers le *trans*-Golgi, les lysosomes et les endosomes; en effet, la corrélation entre l'utilisation des protéines adaptrices relativement analogues (AP-1, AP-2 et potentiellement AP-3) et la présence récurrente des séquences LL ou à base d'acides aminés aromatiques (YXXL/I/V ou NPXY) est frappante. Ceci suggère que des éléments additionnels (structures locales, acides aminés environnants, protéines auxiliaires aux APs) doivent être nécessaires pour que la protéine soit correctement acheminée à un des trois compartiments cellulaires. C'est ainsi qu'il a été proposé que la présence d'une glycine en amont des séquences YXXL des Lgps ajouterait à ces signaux de ciblage endosomal une adresse de transport lysosomal, et que la distance du signal de la membrane est critique pour la reconnaissance de ces séquences comme signaux lysosomiaux^{236, 434}.

2.5.4 Les signaux de transport des membranes apicale et basolatérale.

Les protéines membranaires des cellules épithéliales étant ciblées vers deux domaines membranaires définis, il n'est pas surprenant que les mécanismes de transport régissant ce ciblage nécessitent des signaux de

transport spécifiques^{228, 229}. Les premières études pour discerner les signaux de transport responsables du tri des protéines membranaires dans les cellules épithéliales utilisaient des protéines chimériques ou tronquées⁸⁶. Par exemple, de nombreuses protéines chimères furent créées entre la glycoprotéine basolatérale du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G ou G) et l'hémagglutinine (HA) apicale du virus de l'influenza^{87, 335, 336, 413, 441}. Les protéines chimères sont constituées d'une fusion entre le domaine extracytoplasmique (EX) de l'une et le domaine intracytoplasmique (IN) de l'autre glycoprotéine; la partie transmembranaire (TM) pouvant provenir soit de l'une, soit de l'autre des protéines étudiées. Il s'avère que le choix du domaine transmembranaire influence considérablement le transport des protéines chimères: une protéine HA(EX)-G(TM-IN) est apicale³³⁵, tandis qu'une protéine HA(EX-TM)-G(IN) est basolatérale⁵¹⁰. L'impact d'une partie TM différente sur la conformation et la stabilité globale de la protéine est probablement suffisante pour affecter le signal de transport. Cette conclusion est encore démontrée par l'effet de délétions sur le transport polarisé de l'hémagglutinine: si seul le domaine intracytoplasmique est éliminé, la protéine demeure apicale; tandis qu'une protéine sécrétée, correspondant uniquement au domaine extracytoplasmique, est sécrétée via les surfaces apicale et basolatérale¹⁸⁵.

Des phénomènes additionnels rendent l'interprétation du transport des protéines chimères ou tronquées difficile: par exemple, l'existence de plusieurs signaux de transport sur une même protéine²³⁷ ou l'existence de "signaux discrets"³²⁸, dont la reconnaissance par les mécanismes de transport serait haussée par la disparition ou l'inhibition d'un signal plus "dominant". L'analyse du ciblage de protéines possédant plutôt des mutations ponctuelles constitue donc une étape importante dans la caractérisation plus poussée des signaux de transport.

2.6 Signaux apicaux.

2.6.1 Les ectodomains.

L'élimination de la queue intracytoplasmique de certaines protéines membranaires basolatérales (comme les récepteurs de la lipoprotéine de faible densité (LDL) et du fragment Fc des immunoglobulines, ainsi que la glycoprotéine lysosomale 120) rend ces protéines tronquées apicales²³⁷. De

plus, le choix de l'ectodomaine de HA (une protéine apicale) pour créer de nouvelles protéines de fusion a souvent abouti à des protéines chimères apicales^{335,441}. Ces observations suggéraient l'existence de signaux de ciblage apical dans la partie extracytoplasmique de ces protéines, la force du signal apical de HA supplantant le signal de plusieurs protéines basolatérales bien connues, comme la glycoprotéine C (gpC) du virus de l'herpès⁵¹⁰. De façon générale, l'ectodomaine contribuerait donc surtout au transport polarisé apical, tandis que les signaux de ciblage basolatéral se situeraient davantage dans leur domaine cytoplasmique. Par contre, il demeure que l'influence additionnelle de la région transmembranaire sur le maintien de la conformation naturelle de l'ectodomaine ou de la région cytoplasmique de la protéine n'est pas à négliger: c'est le cas de la séquence transmembranaire de la neuraminidase du virus de l'influenza²⁷⁰.

2.6.2 Le glycosylphosphatidylinositol.

L'interaction des protéines avec des éléments lipidiques est un autre mécanisme par lequel les protéines membranaires peuvent être transportées à des domaines spécifiques. La région extracytoplasmique de certaines protéines apicales, comme la phosphatase alcaline, la dipeptidase rénale, le Thy-1 murin, la 5'-nucléotidase et le DAF ("Decay Accelerating Factor") interagit de façon covalente avec un glycolipide, le GPI^{47, 86, 293}. Cette modification des protéines, qui a été précédemment décrite comme glypiation, est un processus co-translationnel. Plusieurs études sur le transport polarisé de ces protéines a identifié un lien entre la présence de GPI et le ciblage apical^{298, 299}. Par exemple, une phosphatase alcaline placentaire mutée, non-associée au GPI, est transportée de façon non-polarisée⁴⁷. Les ectodomains de l'hormone de croissance^{294, 296} ou de protéines basolatérales (VSV-G ou HSV-gD)^{47, 482} qui ont été greffés à une séquence d'affinité aux glycolipides de protéines apicales (Thy-1 ou DAF)^{47, 294, 296} confirmèrent aussi la relation entre les deux phénomènes, car ces protéines chimères sont ciblées au domaine apical. Enfin, la mannosamine, enzyme qui inhibe le transport protéique apical, affecte aussi l'ancrage des protéines au GPI²⁹⁵. Il faut, par contre, noter que certaines cellules ne reconnaissent pas le GPI comme signal apical: les cellules FRT ne ciblent pas les protéines associées au GPI d'une manière spécifique; cette lignée cellulaire ayant apparemment développé certains mécanismes de ciblage qui lui sont propres⁵⁶⁷.

2.6.3 Les radeaux apicaux et le rôle des lipides; les *caveolae*.

Le lien entre le transport apical et la glypiation a amené plusieurs hypothèses sur le rôle de certains lipides dans le transport polarisé des protéines membranaires, surtout apicales. D'abord, la distribution de plusieurs lipides est elle-même polarisée dans les cellules épithéliales^{472, 528}; ensuite, des protéines apicales auraient une affinité plus grande pour les lipides destinés à ce domaine⁴⁸. Par exemple, les vésicules de transport apical sont riches en glycosphingolipides et en cholestérol, tandis que les vésicules basolatérales sont constituées de phosphatidylcholine et lipides liés au glycérol et pauvres en liens hydrogène^{298, 512, 528}. Cette propriété serait importante pour concentrer les protéines apicales, dont celles liées au GPI, dans des vésicules spécifiques⁴⁷¹. Ainsi, la protéine F du virus de Sendai interagit avec le cholestérol¹⁶ alors que la phosphatase alcaline placentaire s'associe préférentiellement aux vésicules intracellulaires riches en glycosphingolipides⁴⁸. Ces lipides agissent comme des éléments de "radeaux" moléculaires de transport apical ("apical rafts") pour les protéines qu'ils transportent⁴⁷¹.

Le concept de "radeau" correspond à un microdomaine dynamique riche en sphingolipides et en cholestérol, flottant dans une mer de glycérophospholipides membranaires⁴⁷¹. La formation de ces microdomaines est causée par des éléments *du feuillet membranaire externe* ayant (1) une température de transition gel/liquide plus élevée que les glycérophospholipides, (2) des interactions Van der Waals et des liens hydrogène causant une grande compaction et une fluidité diminuée et, enfin, (3) des chaînes acyles plus longues, plus saturées et plus régulières que les phospholipides^{205, 471}. Ces propriétés ont donc pour effet de regrouper les sphingolipides par rapport à la phosphatidylcholine et les glycérophospholipides. La constitution de ces microdomaines a été étudiée grâce à leur insolubilité au Triton X-100 à 4°C [d'où les DIGs, "detergent-insoluble glycolipid-enriched domains"]²⁰⁵. Il s'avère que plusieurs protéines apicales s'associent aux DIGs à leur sortie de l'appareil de Golgi, dont les protéines liées au GPI (particulièrement la phosphatase alcaline placentaire), le HA et la neuraminidase, ainsi que plusieurs enzymes intestinales²⁰⁵. De plus, les DIGs sont particulièrement enrichis en protéines acétylées, comme la sous-unité G α des protéines G hétérotrimériques³⁵⁶. L'association de ces protéines

de transduction de signaux implique que les microdomaines sont des centres de communication intracellulaire importants, surtout sous la forme de cavéolae, dont il sera question ultérieurement⁴⁷¹.

L'association de certaines protéines aurait une influence importante sur les propriétés fonctionnelles des microdomaines: entre autres, les annexines (II et XIIIb) et la cavéoline²⁰⁵. La présence d'anticorps contre l'annexine XIIIb inhibe le transport apical de HA sans influencer le ciblage basolatéral de la VSV-G, suggérant que ces protéines ont un rôle dans le transport apical des protéines^{149, 350}. Les cavéolines, comme les annexines, demeurent des protéines dont les fonctions sont encore mal connues. Les cavéolines sont des protéines retrouvées en grand nombre dans les DIGs, quoique pas de façon exclusive^{121, 154, 271, 387, 444, 462}. En effet, ces petites protéines de 23 kDa en forme d'épingle peuvent s'oligomériser en structures, les cavéolae³⁸⁶, impliquées dans l'endocytose au domaine basolatéral des cellules MDCK⁵⁶⁸, et la transcytose dans les cellules endothéliales⁴⁶³. Ces fonctions différentes peuvent être expliquées par l'existence de différentes espèces de cavéoline. La cavéoline-1 interagit avec le cholestérol³⁵⁷ et, malgré qu'elle soit retrouvée en hétéro-oligomères (cavéolines-1 et -2) formant les cavéolae à la membrane basolatérale, seule la cavéoline-1 est apicale et associée aux microdomaines^{205, 471}. Si la cavéoline-1 est impliquée dans le transport à la membrane apicale des cellules MDCK, il demeure que les cellules Caco-2 ou FRT ne possèdent pas de cavéolae, impliquant l'existence de mécanismes de transport différents^{344, 568}.

2.6.4 Des glycosylations?

La recherche pour d'autres signaux de transport apical (autres que la glypiation ou l'association à certains lipides) s'est avérée peu satisfaisante; l'apparente absence d'une séquence spécifique servant de signal de transport apical tend à suggérer qu'une conformation encore non-identifiée sert de signal^{430, 542}. L'hypothèse que certaines glycosylations constitueraient des signaux de transport apical a été mise de l'avant récemment; en effet, si l'association des protéines à des lipides constitue un signal de ciblage, il pourrait en être de même pour les sucres. En effet, K. Simons a proposé que les N-glycans pourraient constituer des signaux de transport apical^{151, 457}. De cette façon, certaines glycoprotéines s'associeraient aux lectines¹⁵⁰ des

microdomaines par leur N-glycans. Ce signal serait de faible affinité et masqué en présence d'un signal dominant de transport basolatéral. Cependant, ce modèle explique mal le transport non-ciblé de glycoprotéines ayant perdu le signal de ciblage basolatéral³²⁹.

2.7 Signaux basolatéraux: nécessités structurales et de séquence.

Ironiquement, un des premiers liens entre un signal à base de tyrosine et le transport *basolatéral* provient d'une protéine virale *apicale*, HA, où un signal tyrosine a été inséré dans le domaine intracytoplasmique pour étudier l'endocytose; la protéine mutante est transportée du côté basolatéral⁴⁵. L'exemple classique de signal de transport basolatéral d'une glycoprotéine virale demeure le signal YXXI retrouvé dans le domaine cytoplasmique de VSV-G⁵¹¹. Les Lgps contiennent aussi un signal de transport basolatéral "tyrosine-dépendant" qui est associé à l'endocytose²³⁷. Le LDL-R constitue un cas particulier: le signal d'endocytose, *proximal* à la membrane plasmique, peut servir de signal de transport basolatéral. Un deuxième signal de ciblage basolatéral, *distal*, contient aussi une tyrosine critique, mais ne constitue pas un signal d'endocytose. L'observation qu'un ensemble d'acides aminés (D ou E), en aval de chaque séquence centrée sur une tyrosine, est aussi critique pour le ciblage basolatéral du LDL-R suggère que la différenciation entre signaux basolatéraux et d'endocytose sera complexe et implique probablement de multiples éléments^{328, 330, 331}.

La similitude entre certaines des séquences de transport basolatéral et celles des signaux d'endocytose ou de transport lysosomal (notamment les séquences à base de tyrosine) suggère aussi l'existence d'éléments additionnels nécessaires pour les distinguer. L'observation que les signaux YXXL et LL peuvent transporter un cargo à une variété de compartiments *post-Golgi* tend à supporter cette idée.

La famille des signaux de transport basolatéraux "tyrosine-dépendants" ne constitue pas non plus la totalité des séquences impliquées dans le ciblage basolatéral. Par exemple, le signal basolatéral des récepteurs PIg-R¹³ et TR-R⁹⁵ se situe dans le domaine intracytoplasmique de la protéine mais n'est pas associé avec celui d'endocytose et ne contient pas de tyrosine essentielle; le consensus RNXDXXS/TXXS a été suggéré comme signal potentiel, mais

demeure encore à l'étude⁹⁵. De plus, la phosphorylation d'une sérine 664 entre les deux signaux (basolatéral et d'endocytose) du PIg-R permettrait le recyclage par transcytose du récepteur vers la membrane apicale en cachant le signal basolatéral^{63, 221, 351, 352, 497}. Enfin, le signal basolatéral du récepteur du fragment Fc des Ig correspond au signal d'endocytose, c'est-à-dire LL³³¹.

L'existence de signaux de transport basolatéral non cytoplasmiques a aussi été rapportée pour certaines glycoprotéines virales, dont gD de l'herpès^{294, 296}, p62 du virus de la forêt de Semliki (SFV)⁴³⁵ et d'une glycoprotéine chimère de deux variétés de virus de leucémie murine (MuLV)^{257, 258, 487}. Ces observations demeurent des cas isolés et se basent sur des protéines tronquées ou chimères, et exigeraient des études plus élaborées de mutagenèse pour être confirmées.

2.8 Liens entre cytosquelette, lipides et protéines G.

2.8.1 Cytosquelette.

Le rôle du cytosquelette dans la polarisation cellulaire est double: la formation et le support de domaines spécialisés, ainsi que l'apport d'éléments fonctionnels vers ces domaines, par les vésicules de transport^{60, 238, 430}. L'intégrité des compartiments intracellulaires dépend non seulement des membranes lipidiques, mais aussi de ces structures de soutien. Le cytosquelette est constitué de réseaux de protéines de nature et de fonctions distinctes: deux de ces systèmes nous sont d'un intérêt particulier, le réseau microtubulaire et la famille de l'actine et de ses protéines auxiliaires^{220, 340, 526}. Enfin, les réseaux sont étroitement associés à la membrane plasmique, particulièrement aux zones de contact entre les cellules.

2.8.1.1 *Le réseau microtubules/ protéines motrices*

Un exemple de lien moléculaire entre le transport vésiculaire (et donc la polarisation cellulaire) et l'organisation intracellulaire des microtubules est l'effet de Rab8, une GTPase impliquée dans le transport vésiculaire, sur la morphologie des cellules³⁹⁷. Des cellules fibroblastiques BHK surexprimant constitutivement Rab8 forment des grandes protubérances où sont transportées spécifiquement la glycoprotéine VSV-G et Rab8. La GTPase initierait une cascade qui aboutirait au *réarrangement local* du cytosquelette dans les cellules BHK³⁹⁷. Ce réarrangement n'est pas l'équivalent structural d'un domaine

épithélial spécifique, les cytosquelettes épithéliaux étant beaucoup plus complexes, mais il illustre bien le lien entre le transport vésiculaire et les réseaux de protéines. Cette observation rappelle aussi la distribution polarisée des microtubules dans les cellules épithéliales, leurs extrémités (-) vers l'extrémité apicale et (+) face à l'appareil de Golgi^{84, 142, 143}. Cette disposition est particulière, car elle est à l'opposé de celle retrouvée dans les autres cellules. En effet, à l'inverse des autres cellules (polarisées ou non), le centre d'organisation microtubulaire (COM, périphérique aux centrioles) est distal face à l'appareil de Golgi, et proche du domaine apical dans les cellules épithéliales⁸⁴. Par contre, ceci implique que l'extrémité (+) des microtubules *des microvillosités* se situe aux pointes de ces formations. Il est d'ailleurs à rappeler que le réseau des microtubules dendritiques est ambisens dans le neurone, et, étant donné que le COM est retrouvé sous le réseau de l'axone, seuls les microtubules axonaux ont uniformément leur extrémité (-) vers le corps cellulaire¹⁰⁴. C'est ainsi que des protéines "motrices" jumelées aux microtubules permettent le mouvement antérograde ([-] vers [+]) ou rétrograde ([+] vers [-]) des vésicules qui y sont amarrées. Deux groupes de protéines "motrices" sont associés à ces tâches: les kinésines (transport antérograde) et les dynéines/dynactines (transport rétrograde)^{220, 526}.

Les kinésines constituent une famille de protéines qui ont une structure de pinces ou de tenailles dont les extrémités rondes des branches ("têtes") possèdent une activité ATPase catalysant le mouvement. Ces "têtes" amino-terminales sont reliées par deux structures hélicoïdales ("queues") carboxy-terminales associées chacune avec le cargo transporté²²⁰. Les kinésines sont responsables de fonctions aussi variées que le mouvement des organites et la ségrégation des chromosomes, ainsi que le transport des vésicules. En effet, la très grande variation de séquences retrouvée dans les "queues" reflète bien ce phénomène⁵²⁶. L'attachement des kinésines aux vésicules se fait par un intermédiaire, la kinectine, à sa région hélicoïdale carboxy-terminale. La kinectine s'attache aux vésicules par des domaines hydrophobiques amino-terminales. L'inhibition de la kinectine par des anticorps affecte substantiellement le transport de la VSV-G du RE vers l'appareil de Golgi, soulignant son rôle dans le transport vésiculaire⁵²⁶. Par contre, vu que la perte de ces protéines (kinésine/kinectine) n'est pas nécessairement létale, d'autres réseaux, comme l'actine/myosine, pourraient alors s'associer aux extrémités

des microtubules pour forcer un mouvement directionnel⁵²⁶. L'implication d'autres protéines, ayant une fonction homologue ou auxiliaire à la kinectine, est aussi possible.

Un groupe de kinectines s'associent à une deuxième catégorie de protéines motrices, les dynéines/dynactines. Les dynéines sont constituées d'un complexe de chaînes lourdes, intermédiaires, mi-intermédiaires et légères⁵²⁶. L'activité motrice rétrograde des dynéines est associée à leurs chaînes lourdes. Elles assurent le mouvement des cils et flagelles ("dynéines d'axonèmes") ou du transport intracellulaire ("c-dynéines")⁵²⁶. Les dynéines cytoplasmiques interagissent avec les endosomes, les lysosomes et l'appareil de Golgi; le transport vers ces organites est habituellement assuré par le transport microtubulaire rétrograde⁸⁴. Par contre, dans les cellules épithéliales, le transport des vésicules de sécrétion apicales est associé aux moteurs dynéines⁸⁴. De récentes observations ont proposé que les chaînes intermédiaires sont responsables du ciblage cytoplasmique de la dynéine. Elles servent aussi de pont entre les chaînes lourdes et la dynactine, un complexe de protéines qui ancre le réseau dynéine aux organites. La dynactine pourrait ainsi interagir avec une molécule homologue à la kinectine⁵²⁶.

La réaction des cellules face aux agents déstabilisateurs du cytosquelette a donné certains indices sur le rôle des microtubules et des protéines qui leurs sont associées dans l'établissement de la polarité cellulaire. Lorsque les cellules épithéliales sont traitées avec le nocodazole, la colchicine ou le taxol, l'appareil de Golgi demeure fonctionnel mais quitte sa position périnucléaire et se disperse dans le cytoplasme⁴⁵³. Cette observation rappelle le positionnement graduel des organites par les microtubules lors de l'établissement de la confluence de la monocouche épithéliale⁴⁴. Ces agents ont un effet plus drastique sur le ciblage apical des protéines: ainsi, ils affectent grandement le transport d'hydrolases apicales²⁷ ou de l'hémagglutinine⁴²¹, mais peu celui de la VSV-G⁴²¹ ou d'autres protéines basolatérales¹²⁸.

2.8.1.2 *Actine et myosine*

Etant donné l'organisation des microtubules dans le cytoplasme des cellules épithéliales, la dynéine semble être le moteur principal du transport vésiculaire apical dans ces cellules^{84, 142}. Cependant, malgré une diminution

spécifique du transport des protéines apicales par les agents perturbateurs du réseau microtubulaire, il reste que le transport des vésicules apicales n'est pas entièrement inhibé^{327, 451, 531}. De plus, l'existence d'un réseau dense en filaments (le "terminal web"), sous-jacent au microvillosités, qui n'est pas accessible aux microtubules cytoplasmiques, suggère que d'autres systèmes doivent être utilisés pour le déplacement des vésicules vers cette région. Le réseau de l'actine est impliqué dans ces processus^{84, 143}. L'actine des microfilaments (actine F, par rapport à l'actine G globulaire) est disposée aussi de façon asymétrique, comme les microtubules¹⁹⁸. Elle est associée à une gamme de protéines, dont il fut question antérieurement. Parmi elles, la plus connue est la myosine. La myosine II est celle qui glisse le long de l'actine dans le muscle et qui crée la tension dans les faisceaux d'actine¹⁹⁸. La myosine I, en association avec la calmoduline, amarre l'actine des microvillosités à la membrane¹⁴²; elle est aussi la protéine motrice qui a une fonction homologue à la kinésine¹⁴³.

L'action de la myosine I est de diriger les vésicules ou organites, associés aux réseau d'actine, vers les membranes^{141, 143}. L'actine/myosine, en association avec les microtubules, a un rôle dans la transcytose, ce transport de vésicules du domaine basolatéral vers la région apicale³¹⁸. Ces vésicules doivent traverser le réseau de tonofilaments d'actine basal, le corps cellulaire ainsi que le "terminal web" pour arriver à destination; le réseau actine/myosine I est particulièrement adapté à accomplir cette tâche, car il s'étend de la membrane apicale à la lamina basale^{84, 143}. Ainsi, contrairement aux microtubules, dont le rôle tend à se limiter au transport apical, le réseau d'actine serait impliqué dans le transport des vésicules aux deux domaines membranaires, particulièrement à travers les régions pauvres en microtubules.

2.8.1.3 *Contacts entre les cellules et matrice extracellulaire*

Trois grandes familles de protéines transmembranaires sont impliquées dans les processus d'adhésion entre les cellules: la super-famille des immunoglobulines, la famille des cadhérines et les intégrines^{217, 359}. Ces deux dernières sont particulièrement importantes pour les cellules épithéliales. En effet, les cadhérines sont responsables des premiers signaux d'une cascade d'événements impliquant la réorganisation du cytosquelette et l'établissement

de la polarité cellulaire³⁵⁹. Les intégrines sont des protéines d'ancrage cellulaire à la lamina basale^{55,74}.

La cadhérine impliquée dans la formation des desmosomes, et la cadhérine principale des cellules épithéliales, est la E-cadhérine³⁵⁹. Comme pour les autres cadhérines, son activité dépend de la présence de calcium. L'association de cette protéine avec le réseau du cytosquelette permet de stabiliser le contact entre les cellules. Le domaine intracytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec le complexe de trois protéines homologues: la β -caténine, la plakoglobine et une protéine similaire à celle codée par le gène *armadillo* de la drosophile³⁵⁹. Ces protéines constituent un pont entre la E-cadhérine et l' α -caténine, qui, comme la vimentine et l' α -actinine, a une forte affinité pour l'actine et le réseau de spectrine (ou fodrine)¹⁹⁷. Une autre composante des desmosomes est la radicine, qui interagit avec l' α -caténine. L' α -caténine s'associe aussi à une famille de kinases, dont pYes, pSrc et la protéine kinase C¹¹⁸. L'activation de la GTPase Rho, intimement impliquée dans l'état de la polymérisation intracellulaire de l'actine, et la cascade de Ras sont accélérées par l'action de la E-cadhérine¹⁹⁸. Enfin, par son interaction avec la fodrine, la E-cadhérine recrute certaines ankyrines aux desmosomes³⁰. Les ankyrines interagissent avec des protéines membranaires pour les amener à des destinations membranaires spécifiques: les plus connues de ces protéines membranaires importantes sont les pompes Na/K ATPase et Cl/HCO₃^{-29,200}.

Les intégrines sont impliquées dans la solidification des interactions cellulaires avec la lamina basale. Interagissant avec l' α -actinine et la taline, les intégrines ancrent la cellule aux molécules qui lui sont sous-jacentes^{74,240}. L' α -actinine, à son tour, se branche au réseau d'actine. D'autres protéines servent aussi de lien des intégrines aux réseaux intracellulaires, dont la zyxine, la paxilline et la vinculine⁷⁴. Cette dernière est d'ailleurs homologue à l' α -caténine, et interagit avec le réseau de spectrine proximal à la membrane basolatérale¹⁹⁷. La stabilisation des intégrines de l'axe de polarisation cellulaire permet, entre autres, le développement des jonctions étanches au pôle apical opposé, et le cumul de protéines ZO-1 à ces endroits précis¹¹⁸. Cette stabilisation permet d'activer le transport des vésicules spécialisées aux domaines membranaires apical et basolatéral, maintenant clairement définis¹¹⁸.

Cette activation pourrait donc se faire par un signal spécifique dirigé, entre autres, par les protéines G hétérotrimériques.

2.8.2 Contribution des voies de transduction et des protéines G

2.8.2.1 *Petites protéines G (rabs)*

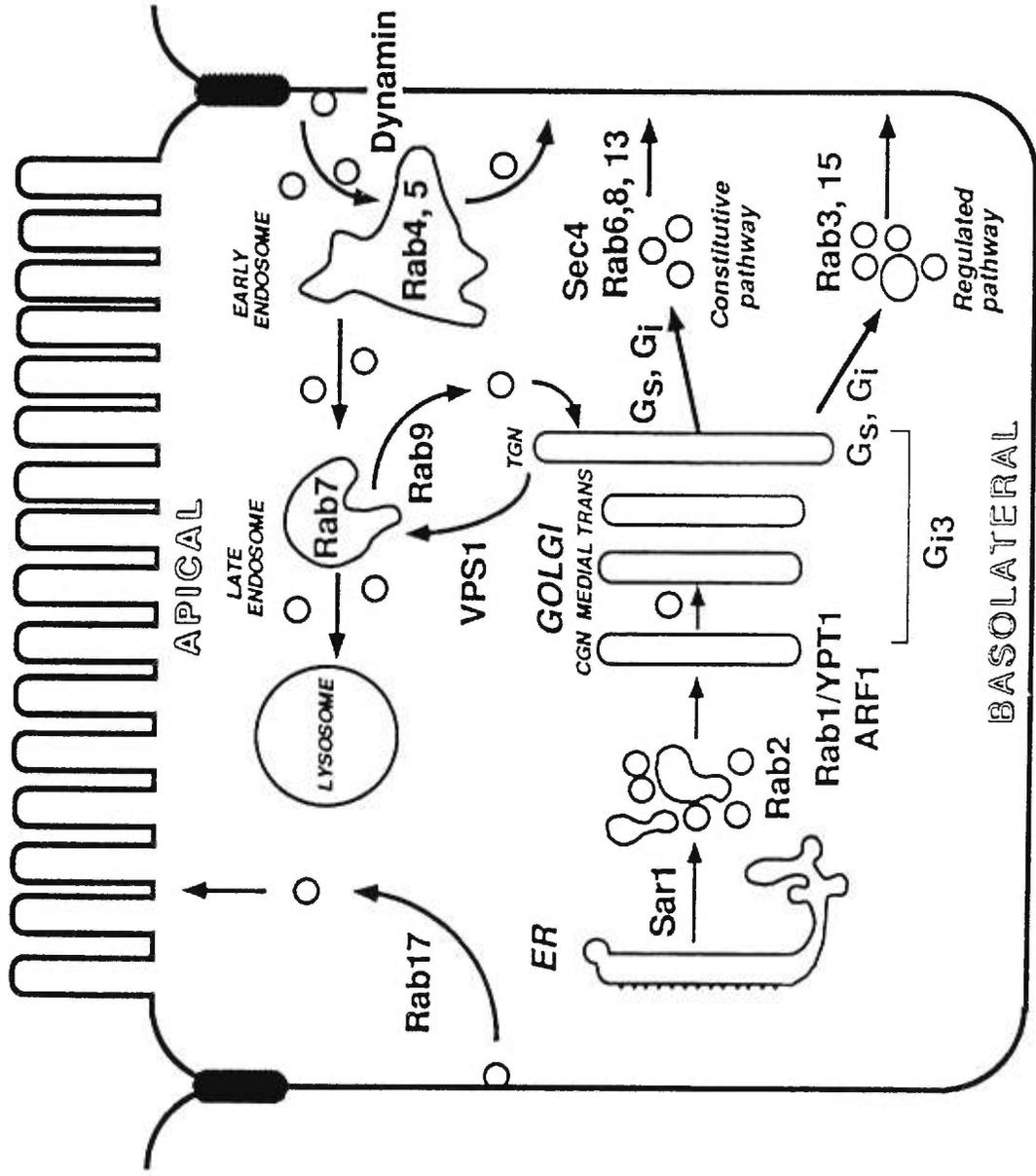
En décrivant les molécules impliquées dans le transport vésiculaire, il a été question de petites protéines possédant une activité GTPase et qui permettraient, par exemple, la reconnaissance spécifique de v-SNAREs par des t-SNAREs^{366, 402, 560}. Ces protéines homologues à Ras, nommées Rabs (“de **Rat brain**”), contrôlent les étapes importantes des mécanismes de transport par leur apport en GTP. Un autre groupe de petites protéines GTPases, les ARF-like (ARF/SAR, “ADP-Ribosylation Factors”)¹¹¹ s’ajoutent aux Rabs pour constituer la famille des “petites protéines G”. Ces petites protéines G monomériques sont toutes d’une taille d’environ 25 kDa. Les Rabs sont souvent modifiées par l’ajout d’un groupe farnésyle, ou palmitilées sur une cystéine à quatre acides aminés de l’extrémité carboxy-terminale; cette extrémité peut être clivée ultérieurement et méthylée⁷³. Le palmityle est nécessaire pour l’ancrage membranaire des protéines G, ainsi que pour l’interaction avec les vésicules de transport⁷³. Les ARFs sont myristilées à leur extrémité amino-terminale et c’est la myristilation qui permettrait l’association membranaire une fois la protéine ARF liée au GTP. La libération du GTP se fait une fois l’ARF ciblée à une membrane, relâchant les protéines adaptrices dans le cytosol¹¹¹.

Plusieurs protéines Rabs ont des fonctions spécialisées dans le transport ciblé des cellules polarisées (figure 8). Soulignons, entre autres, les protéines Rab5 (les isoformes Rab5A, B et C; transport endosomal) ainsi que Rab3B, Rab8 et Rab13 (formation des jonctions étanches) mentionnées précédemment^{366, 559}. La protéine Rab8 est basolatérale dans les cellules épithéliales²³² et se retrouve dans les dendrites des neurones²³¹; un peptide analogue à sa partie carboxy-terminale inhibe le ciblage basolatéral de VSV-G, impliquant cette protéine dans la reconnaissance des vésicules spécialisées du transport basolatéral²³². Certaines Rabs sont associées au transport endosomal plus en aval de Rab5: Rab4 (A, B; des endosomes à la membrane plasmique ainsi que la sécrétion apicale), Rab7 (vers les lysosomes) et Rab9 (vers l’appareil de Golgi), Rab22^{366, 373}. D’autres protéines Rabs sont impliquées

FIGURE 8

Page 51

Les protéines Rabs dans le transport spécialisé d'une cellule épithéliale (figure
tirée de Nuoffer et Balch, *Annu Rev. Biochem.* **63**:949)



dans le transport du RE vers l'appareil de Golgi (Rab1, 2), à l'intérieur de l'appareil de Golgi (Rab10) et dans le *trans*-Golgi (Rab6)³⁶⁶. Enfin, il y a des Rabs qui ne se retrouvent que dans certaines cellules spécialisées: Rab3A et C sont localisées dans les vésicules synaptiques des neurones^{366, 367}; Rab17 est spécifique aux cellules épithéliales et serait impliquée dans la transcytose³⁶⁷; les Rab11 et Rab25 sont impliquées dans le recyclage des endosomes apicaux^{181, 182}. Certains Rabs ont une distribution apicale dans les cellules épithéliales du rein (Rab11, Rab18, Rab20), mais sont non-polarisées dans les cellules épithéliales de l'intestin (Rab18)³⁰⁹, ou localisées dans les dendrites des neurones (Rab11)¹⁸². Ce phénomène découle peut-être des fonctions spécialisées de ces protéines dans les différents organes. Les protéines Rabs peuvent s'associer à des protéines auxiliaires dont les plus connues sont la rabphiline [pour Rab3] et la radaptine [pour Rab5]. Ces protéines aident ou agissent comme les protéines "effectrices" des Rabs³⁶⁶.

2.8.2.2 Protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques sont des complexes de trois sous-unités α , β , γ , qui sont associés à la transduction de signaux de la membrane plasmique vers des effecteurs cytoplasmiques. Ces protéines sont aussi impliquées dans le transport vésiculaire au niveau du RE, dans les endosomes et dans les domaines apicaux et basolatéraux^{26, 38}. Par exemple, le fluorure d'aluminium (AlF_4^-), un homologue de γ -GTP, agit sur la sous-unité $G\alpha$ -GDP et active de manière irréversible le transport des protéines dans l'appareil de Golgi⁵⁰⁷. Le transport *trans*-Golgi est inhibé par une addition de $GTP\gamma S$, le fluorure d'aluminium ou un excès de sous-unités $G\beta\gamma$, impliquant clairement les protéines G hétérotrimériques dans plusieurs étapes du transport vésiculaire¹⁴⁸. Ces étapes consisteraient, entre autres, en un effet inhibiteur sur l'action GTPase de la dynamine (qui interagit avec les sous-unités $G\beta\gamma$) suite à la stimulation de l'activité GTPase par les phosphatidyl inositols²⁹². L'activité inositol 5'-phosphatase de la synaptojanine (dans les neurones)³³⁴ ou de la protéine homologue OCRL-1 ["oculocérébrorénale-1"]⁵⁶² (dans l'appareil de Golgi) inactive les phospholipides, permettant l'oligomérisation de la dynamine. C'est à ce moment que la sous-unité inactive de $G\alpha$ interagit avec $G\beta\gamma$ ⁴⁴³.

2.8.3 Les phospholipides

Les phospholipides sont particulièrement impliqués dans le transport et la transduction de signaux, car ils demeurent des constituants communs à toutes les vésicules. Les plus importants à ce sujet sont les phosphoinositides, et particulièrement les phosphatidylinositols (PtdIns)¹⁰². Le noyau inositol peut être phosphorylé aux positions 3'-, 4'-, ou 5'-, donnant lieu à des stéréoisomères spécifiques, qui sont associés à des étapes distinctes de la formation de vésicules¹⁰². La plus classique de ces molécules est le PtdIns(4,5)P₂, qui a d'abord été impliqué dans l'exocytose du calcium¹⁰². Plusieurs enzymes régissant la structure des phosphatidylinositols sont importantes pour le transport vésiculaire. On retrouve parmi celles-ci les homologues de Vps34p [une 3'-PtdIns kinase] et Vps15p [sérine-thréonine-kinase liée à Vps34p], essentielles au transport vacuolaire (chez la levure) ou lysosomal (chez les mammifères)^{464, 485, 534}. La protéine Sec14p [PEP3 ou P1TP, "PtdIns-transfer protein"] convertit le diacylglycérol et la choline en phosphatidylcholine, régit le transfert de la phosphatidylcholine et du PtdIns entre les membranes, et a un rôle dans le transport en aval de l'appareil de Golgi^{78, 253}. Enfin, la 3'-phosphoinositide kinase p85/p110 est associée à l'endocytose de certains récepteurs, dont celui du PDGF ("platelet derived growth factor")⁴⁶⁷. Des mutations de ces protéines, ou la présence de wortmannine, un inhibiteur irréversible des 3'-PtdIns kinases, affectent grandement la formation et le transport vésiculaires^{204, 289, 481}.

Outre les enzymes impliquées dans la synthèse, le transfert ou la modification des PtdIns, un important indice du rôle actif de ces lipides dans le transport des vésicules est leur association directe avec les autres éléments de ce processus. La synaptojanine, une 5'-phosphatase, ainsi que la GTPase dynamine, lient le PtdIns(4,5)P₂ et l'inositol (1,4,5)-triphosphate^{102, 443}. L'implication de la synaptojanine dans la réorganisation du réseau de l'actine, et de la dynamine dans le bourgeonnement des vésicules, identifie un lien clair entre le processus de transport vésiculaire, le métabolisme des PtdIns et l'organisation du cytosquelette^{102, 443}.

Les GTPases assurent aussi des interconnexions entre les voies de transport vésiculaire et les PtdIns. En plus de la dynamine, plusieurs des ARFs, des Rabs et des protéines G hétérotrimériques sont associées aux

réseaux des phosphoinositides^{102, 443}. Par exemple, le PtdIns(4,5)P2 stimule l'échange du nucléotide guanine qui est régi par l'ARF⁶⁸. L'ARNO ("ARF nucleotide binding site opener") et le PtdIns(4,5)P2 activent la phospholipase D, aboutissant à la production locale de PtdIns(4,5)P2. La présence de ce lipide aiderait au recrutement des protéines nécessaires à la formation de la vésicule, comme les Rabs, les COPs et les APs. Une protéine Rab dont l'activité est contrôlée par une 3'-PtdIns kinase est Rab5, GTPase impliquée dans le transport endosomal¹⁰². Il a aussi été démontré que les protéines COPs et APs interagissent avec le PtdIns(4,5)P2 et l'inositol (1,4,5)-triphosphate^{102, 443}.

Le réarrangement local du cytosquelette est une autre conséquence de l'activation des PtdIns, particulièrement le PtdIns(4,5)P2. Plusieurs protéines accessoires de l'actine, dont la profiline, la gelsoline et la cofiline interagissent avec ce phospholipide¹⁰². De plus, les protéines Rho de la famille de GTPases homologues à Ras, comme Rho, Rac et Cdc42, sont ciblées par les p85/p110 et 5'-PtdIns(4) kinases. Ces protéines sont directement impliquées dans l'organisation du réseau d'actine, du cytosquelette et ainsi dans la gestion du transport vésiculaire¹⁰².

3. Utilisation des virus pour l'étude du transport polarisé des protéines.

Ce sont surtout les travaux de R.W. Compans et de E.E. Rodriguez-Boulan, vers la fin des années 1970, qui ont ouvert la voie à l'utilisation des virus dans l'étude du transport des protéines dans les cellules épithéliales^{431, 442}. L'étude des virus apporte deux nouveaux éléments à considérer: l'implication de la polarisation dans la pathogénèse virale et l'association de ce phénomène aux mécanismes d'assemblage et de maturation de la particule. Cette section tentera de présenter une vue d'ensemble des signaux de ciblage des protéines virales, sans être une liste exhaustive des déterminants moléculaires de transport de ces protéines.

3.1 Les virus non-enveloppés.

Si les virus enveloppés, et particulièrement les protéines de l'enveloppe de ces virus, ont beaucoup servi de modèles pour l'étude des mécanismes de

transport des protéines⁴²⁶, il reste que les virus qui ne possèdent pas d'enveloppe peuvent aussi être transportés à des régions spécifiques de la cellule. Il s'agit souvent d'un transport vers le noyau, comme c'est le cas du SV40 (virus simien 40) et des autres papovaviridae^{349, 551}. En effet, la protéine structurale VP1 possède un signal de localisation nucléaire dans son domaine amino-terminal; la protéine VP1 recruterait les autres protéines VP2 et VP3 pour l'assemblage viral nucléaire²¹.

L'assemblage polarisé de certains virus non-enveloppés dans les cellules épithéliales a aussi été rapporté. En effet, les capsides du virus SV40, sous des conditions non lytiques, seraient "secrétées" ou relâchées du domaine apical des cellules polarisées Vero C1008; le récepteur du virus est transporté aussi vers ce domaine^{24, 77}. D'une manière similaire, le même groupe a démontré plus récemment la "sécrétion" spécifique du virus de la poliomyélite du domaine apical des cellules Caco-2, d'origine intestinale, mais pas des cellules Vero C1008, d'origine rénale⁵²⁰. Cependant, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes demeurent peu connus et font encore l'objet d'études.

3.2 Les virus enveloppés.

3.2.1 Les virus nucléaires: les *herpesviridae*.

Les virus enveloppés bourgeonnent soit à *travers* une membrane, soit à l'aide de *vésicules* qui contiennent les nucléocapsides, et qui fusionnent par la suite avec la membrane⁴⁸⁶. Parfois, il se peut que le virus puisse même acquérir des enveloppes différentes tout au long de sa maturation, en bourgeonnant d'un compartiment cellulaire et se fusionnant avec un nouveau. C'est le cas des herpesviridae, qui bourgeonnent à la membrane nucléaire, perdent ensuite cette enveloppe initiale entre le noyau et l'appareil de Golgi, pour bourgeonner encore à la surface de la cellule¹⁸⁴. Certaines glycoprotéines virales, comme la gp110 d'EBV (virus Epstein-Barr), sont fortement concentrées à la membrane nucléaire et au RE; elles ne semblent pas nécessaires pour la formation de l'enveloppe virale au noyau ou pour les étapes suivantes de la maturation cytoplasmique des particules virales¹⁸⁴. Les mécanismes par lesquels les virus acquièrent une enveloppe et délaissent l'autre demeurent peu connus; ces événements se dérouleraient dans l'appareil de Golgi ou à l'intérieur de vésicules intracellulaires. Enfin, la glycoprotéine

majeure d'EBV, gp350/220, est incorporée au virus à la surface cellulaire, lieu où gp110 n'est pas transportée¹⁸⁴. Les glycoprotéines des herpesvirus ne semblent pas jouer un rôle majeur dans le lieu de l'assemblage du virus. Cependant, il a été démontré que les plusieurs glycoprotéines des virus HSV-1 et HSV-2 (dont gC et gD) sont transportées et ces virus relâchés à la surface basolatérale des cellules épithéliales polarisées MDBK (Madin-Darby bovine kidney), bien que le lien entre ciblage des glycoprotéines et bourgeonnement viral polarisé n'ait pas encore été démontré⁴⁸².

3.2.2 Les virus du RE et de l'appareil de Golgi: *coronaviridae* et *bunyaviridae*, *togaviridae* (*rubivirus*).

Les *coronaviridae* bourgeonnent dans l'appareil de Golgi et possèdent trois glycoprotéines principales (M [ou E1], S [ou E2] et HE)⁴⁹¹. La glycoprotéine M est la seule à être efficacement retenue dans les vésicules de l'appareil de Golgi, et cette rétention semble être associée à un signal de ciblage retrouvé à l'intérieur de la première de ses trois régions transmembranaires⁴⁹⁶. Cette glycoprotéine est essentielle pour la formation de l'enveloppe virale, et est responsable du ciblage du bourgeonnement du virus⁵¹⁴. La glycoprotéine M fait le lien entre la phosphonucléoprotéine N et l'enveloppe. Ayant bourgeonné dans l'appareil de Golgi, les *coronaviridae* sont transportés vers un des domaines membranaires des cellules épithéliales, selon le type de virus et l'origine des cellules: par exemple, le MHV (virus de l'hépatite murine) est ciblé du côté apical dans les cellules MDCK (rénales) et basolatéral dans les cellules Caco-2 (intestinales). Par contre, le TGEV ("transmissible gastroenteritis virus") est, par contre, transporté au domaine apical des cellules intestinales^{439, 440}.

Le virus de la rubéole, à la différence des autres *togaviridae* (comme les alphavirus Sindbis et le Semliki Forest virus), ne bourgeonne pas à la membrane plasmique mais dans l'appareil de Golgi. En plus, les glycoprotéines virales E1 et E2 possèdent des signaux de ciblage vers le RE/*cis*-Golgi^{223, 224}. Etant donné que les nucléocapsides et les glycoprotéines proviennent d'une polyprotéine précurseure, il s'avère que le signal d'ancrage membranaire de l'extrémité amino-terminale de E2 est équivalent au domaine carboxy-terminal de la nucléocapside. Après clivage de E2, la protéine de la capsid demeure ancrée à la membrane. L'assemblage de la capsid peut alors

se poursuivre¹⁵⁹. Les glycoprotéines seraient donc responsables du bourgeonnement viral dans l'appareil de Golgi.

Les bunyaviridae sont représentatifs d'un groupe de virus qui sont transmis par les insectes ou par des rongeurs et qui sont les agents étiologiques de certaines fièvres graves chez l'humain⁴⁵⁹. Ces virus bourgeonnent aussi par les membranes de l'appareil de Golgi pour être libérés ensuite par exocytose. Les glycoprotéines G1 et G2 sont aussi ciblées vers l'appareil de Golgi, par un signal de transport de leur domaine cytoplasmique^{12, 325}, mais le lien entre ce phénomène et le bourgeonnement viral n'est pas encore clairement établi. Si le bourgeonnement de ces virus est intracellulaire, il reste que cette libération de particules virales peut être faite de façon polarisée: le phlébovirus Punta Toro est dirigé vers la membrane basolatérale des cellules épithéliales⁷⁰.

3.2.3 Les virus des surfaces apicales: *orthomyxoviridae* et *paramyxoviridae*.

Le virus de l'influenza (ou de la grippe) est un virus de la famille des *orthomyxoviridae* qui bourgeonne à la surface apicale des cellules polarisées⁴³¹. Vu que les signaux de transport polarisé se retrouvent sur les glycoprotéines virales (HA et neuraminidase), les modèles actuels proposent que ce sont elles qui sont aussi responsables du bourgeonnement polarisé viral⁴²⁹: en effet, la protéine majeure de la capsid, M1, est plutôt impliquée dans le transport des ribonucléoprotéines virales du noyau vers le cytoplasme³²², et ne contiendrait aucun signal de ciblage. La protéine M1 interagirait d'une manière encore inconnue, lors du bourgeonnement à la surface cellulaire, avec les régions intracytoplasmiques de HA et de la neuraminidase²⁴⁴.

Parmi les *paramyxoviridae* qui ont été utiles pour l'étude de la polarisation du bourgeonnement viral, il y a le virus Sendai⁴³¹. Ce virus bourgeonne à la surface apicale des cellules épithéliales où sont transportées les glycoprotéines de son enveloppe⁴²⁹. La glycoprotéine hémagglutinine-neuraminidase (HN), une protéine membranaire de type II, est responsable de l'attachement du virus à son récepteur; la glycoprotéine F, de type I, est impliquée dans la fusion membranaire²⁷⁵. Les deux protéines interagissent avec la protéine M, qui fait elle-même le lien avec le complexe

nucléocapsidique⁴⁵². L'isolement récemment d'un virus Sendai ayant des caractéristiques distinctes dans son transport a suscité un intérêt particulier. Le virus Sendai F1-R bourgeonne de manière non-polarisée dans les cellules MDCK et possède une glycoprotéine F dont l'activité de fusion est augmentée, car la protéine mutante est clivée par des protéases cellulaires n'affectant pas le virus de type sauvage^{501, 504-506}. La capacité de ce virus de bourgeonner bidirectionnellement, combiné à l'activité augmentée de sa protéine F, changent radicalement la pathogénèse du virus. Les souris infectées avec le virus Sendai F1-R développent une infection systémique, alors qu'ordinairement ils souffrent d'une pneumonie localisée⁴⁹⁹. Des études sur l'effet de mutations affectant uniquement l'activité de la protéine F ou seulement la polarisation du virus ont établi l'implication de ces deux phénomènes dans le tropisme viral et la dissémination du virus chez l'hôte⁵⁰². Les protéines mutantes F affectées dans leur signal de polarisation seraient impliquées dans la fusion cellulaire, étant donné qu'elles doivent être présentes au domaine basolatéral pour qu'un tel phénomène ait lieu²⁵⁹. Enfin, les protéines M mutantes associées à la perte de la polarisation du bourgeonnement viral affectent l'organisation des microtubules dans la cellule, impliquant directement le cytosquelette dans le ciblage de l'assemblage du virus^{500, 503}. Ces études sur le virus Sendai sont les premières à intégrer le rôle du bourgeonnement polarisé dans la pathogénèse virale.

3.2.4 Les virus des surfaces basolatérales.

3.2.4.1 *Rhabdoviridae*

Avec le virus de l'influenza, le VSV a été parmi les premiers virus dont on a étudié le bourgeonnement polarisé^{161, 428, 431}. Le virus s'assemble à la surface cellulaire, et les deux principales protéines impliquées dans la formation du virion (à part le complexe ribonucléoprotéique) sont la glycoprotéine G et la protéine de la matrice, M. La glycoprotéine G utilise les voies du transport vésiculaire pour s'ancrer à la surface cellulaire, tandis que la protéine M est produite dans le cytoplasme par la traduction d'ARNm libres. Il s'ensuit que les trimères de glycoprotéines G interagissent avec M (qui s'associe au complexe ribonucléoprotéique) pour l'assemblage des nouveaux virions à la surface cellulaire⁵³⁹.

Le transport polarisé de la glycoprotéine G du virus à la membrane basolatérale est assuré par un signal de ciblage YXXI dans la partie cytoplasmique de la protéine^{510, 511}. Cependant, il se pourrait que le bourgeonnement basolatéral du virus puisse être rendu possible par un signal de ciblage retrouvé sur la protéine M, mais la nature de ce signal et les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés³¹. De plus, une interaction de la partie cytoplasmique de VSV-G avec une protéine, Tin2, n'a pas encore fait l'objet d'études plus détaillées: il pourrait s'agir d'une protéine effectrice de l'interaction du signal YXXI avec les protéines adaptrices⁴⁰⁵.

3.2.4.2 *Togaviridae* (*alphavirus* Sindbis et Semliki Forest virus)

Les protéines structurales des alphavirus Sindbis et SFV ("Semliki Forest virus") proviennent d'un polypeptide précurseur; cependant, les protéines capsidiques sont libérées rapidement par leur activité sérine-protéase. Le reste du polypeptide est transporté par les voies de transport vésiculaire pour devenir les glycoprotéines de l'enveloppe virale, E1 et p62. Les glycoprotéines et les protéines capsidiques sont toutes les deux essentielles pour la formation de nouvelles particules virales⁵⁶³. Dans les cellules épithéliales polarisées en culture, ces virus enveloppés bourgeonnent au domaine basolatéral; le signal responsable du transport polarisé se retrouve dans les glycoprotéines. Par contre, il a été rapporté que le signal de ciblage basolatéral n'est pas retrouvé dans la partie cytoplasmique de p62/E2, comme c'est le cas de la majorité des signaux de transport vers ce domaine⁴³⁵. Une mutagénèse plus poussée sera donc nécessaire pour trouver le signal de ciblage.

3.2.4.3 *Rétroviridae*

Quoique certaines sous-familles de rétrovirus bourgeonnent à des membranes intracellulaires, et non à la membrane plasmique, il demeure plus simple de présenter ensemble leurs mécanismes de bourgeonnement. Les rétrovirus possèdent deux groupes de protéines structurales majeures: les protéines structurales dérivées de la protéine précurseure Gag, et les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Les protéines Gag sont synthétisées dans le cytoplasme, tandis que les glycoprotéines suivent la voie du transport vésiculaire⁸⁰. Une revue plus complète du cycle viral et de l'assemblage des

rétrovirus sera présentée dans la section décrivant le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Il existe quatre catégories de particules rétrovirales (A, B, C ou D). Les particules de type A sont intracellulaires, et correspondent aux formes immatures du virus des tumeurs mammaires murin (MMTV), aux capsides entières intracellulaires des rétrovirus de type B ou D et des spumavirus. D'autres particules de type A sont en fait des rétrovirus endogènes défectifs (IAP, "Intracisternal A particles"). Les particules de type B correspondent aux particules MMTV matures; elles possèdent un corps central capsidique excentré et des spicules proéminentes qui constituent les glycoprotéines d'enveloppe. Les rétrovirus de type C regroupent la majorité des rétrovirus simples, ainsi que les virus du groupe de HTLV et les lentivirus. Usuellement, le nucléoïde de ces rétrovirus s'assemble parallèlement au processus du bourgeonnement; il prend alors une forme presque sphérique (rétrovirus du type MuLV) ou de cône (lentivirus). Le bourgeonnement se complète par la scission entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire et la capsid virale est centrale. Enfin, les rétrovirus de type D, dont le prototype est le virus du singe Mason-Pfizer (MPMV), ressemblent au virus de type B, mais leurs spicules sont moins saillants et leur nucléocapside est plutôt en forme de cylindre (figures 9 et 10)^{80, 361}.

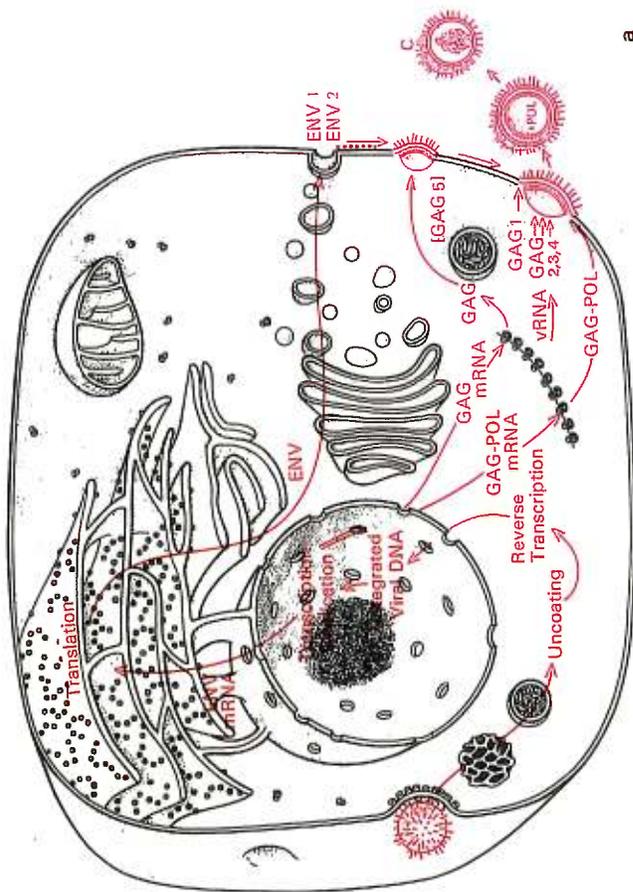
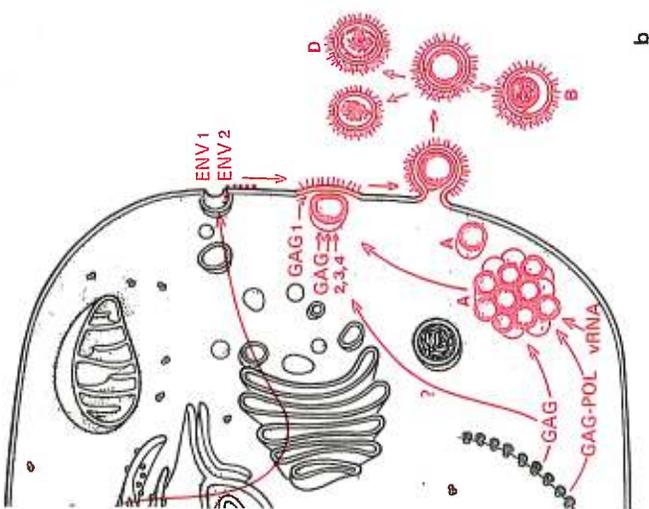
Deux protéines sont impliquées dans le choix du site d'assemblage de la particule rétrovirale: la composante des protéines Gag dénommée MA ("protéine de la matrice") et la glycoprotéine transmembranaire virale, ou TM. L'interaction de ces protéines avec les constituantes membranaires, les protéines "adaptrices" cellulaires, ainsi qu'entre elles et leurs homologues, est déterminante pour le lieu d'assemblage viral, l'incorporation des glycoprotéines et la production de virus infectieux²³⁴. Cependant, il est à noter que les glycoprotéines ne sont pas strictement nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement des rétrovirus, mais essentielles pour leur caractère infectieux^{234, 361}. Parmi les exemples les plus frappants de l'implication de la protéine MA dans l'assemblage est la conversion du virus MPMV (type D, assemblage du nucléoïde intracellulaire) à une morphologie virale de type C (assemblage à la surface cellulaire) par une substitution ponctuelle W->R dans la protéine de la matrice⁴¹⁸. Cependant, pour les rétrovirus de type C, le lieu de

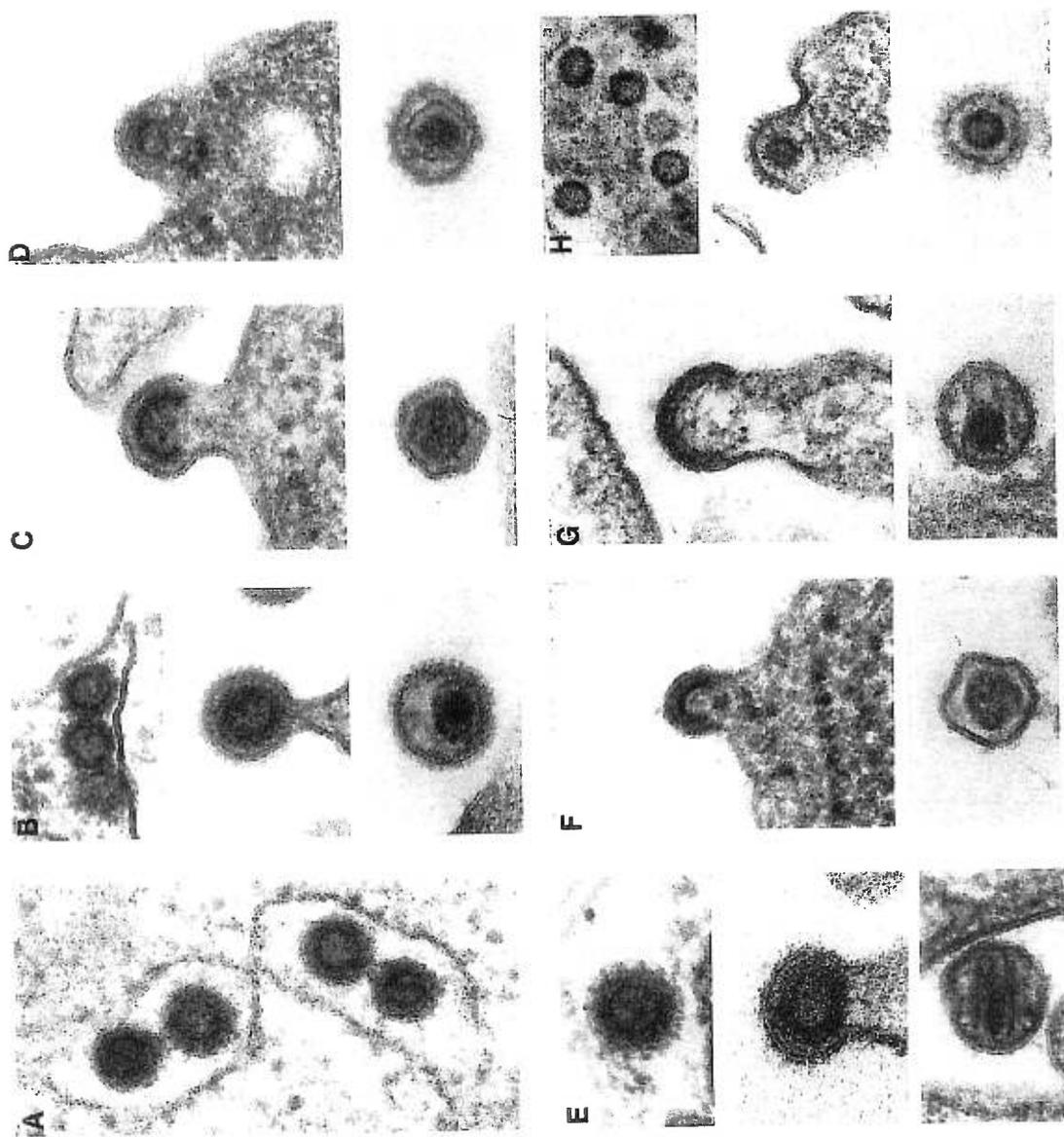
FIGURES 9 et 10

Pages 62 et 63

Représentation du cycle de réplication des rétrovirus: à la figure 9 (page 62, tirée de Dubois-Dalcq *et al.*), en "a", le cycle d'un rétrovirus de type C est illustré, tandis que les cycles des rétrovirus de type B ou D (avec intermédiaire

A) sont représentés en "b". A la figure 10, on retrouve des clichés, en microscopie électronique, de: **A.** Particules intracellulaires de type A. **B.** Assemblage du MMTV (type B). **C.** Assemblage du MuLV (type C). **D.** Assemblage du ALV [Avian Leukosis Virus] (type C). **E.** Assemblage du MPMV (type D). **F.** Particules du virus de leucémie bovine (BLV, groupe BLV/HTLV, type C). **G.** Particules d'un lentivirus, le virus de l'immunodéficience bovine (BIV, type C). **H.** Clichés d'un spumavirus, le virus syncytial bovin. Figure tirée de Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997): **Retroviruses**; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.





transport des glycoprotéines détermine le site de prédilection pour l'assemblage viral, particulièrement en ce qui concerne leur bourgeonnement basolatéral dans les cellules épithéliales polarisées⁴⁴². Enfin, les glycoprotéines des spumavirus possèdent aussi un signal de ciblage au RE de type KK, l'implication de ce signal sur le lieu de bourgeonnement du virus demeure encore à être étudiée¹⁷⁸.

4. Le virus de l'immunodéficience humaine.

Le bourgeonnement des rétrovirus dans les cellules épithéliales polarisées a jusqu'à maintenant été étudié en utilisant deux virus: le virus de la leucémie murine (MuLV)²⁵⁷ et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)^{136, 378}. Etant donné que ce dernier virus a été l'objet principal des travaux décrits dans cette thèse, une attention particulière sera accordé à sa pathogénèse, son cycle viral, ses protéines capsidiques et les glycoprotéines de son enveloppe. Par la suite, un bref regard sera porté sur les caractéristiques de deux autres rétrovirus, le virus de la leucémie humaine (HTLV) et le MuLV, dont il sera aussi question dans cet ouvrage. Enfin, un survol des interactions entre les cellules épithéliales et les rétrovirus permettra de placer dans un contexte plus naturel le phénomène de bourgeonnement polarisé des rétrovirus pour en dégager l'importance dans la pathogénèse de ce groupe de virus.

4.1 Le Syndrome d'immunodéficience acquise.

4.1.1 Découverte de l'agent étiologique du SIDA.

Plusieurs maladies sont associées aux rétrovirus, et ces derniers infectent une variété d'animaux^{169, 268, 348, 390, 408}. Cependant, c'est seulement en 1980 que le premier rétrovirus humain, responsable d'une leucémie grave des lymphocytes T, fut identifié (HTLV)⁴⁰⁷. Par contre, l'infection au HTLV demeurait un événement relativement rare et son importance était surtout restreinte à des régions spécifiques du globe, particulièrement aux Antilles, en Afrique de l'Ouest et au Japon^{58, 493}. L'importance des rétrovirus dans les maladies humaines allait changer dramatiquement avec l'avènement du SIDA, le syndrome de l'immunodéficience acquise.

En juin 1981, le Center for Disease Control (CDC) rapportait l'apparition d'une nouvelle forme d'immunodéficience aboutissant à une pneumonie causée par *Pneumocystis carinii*, chez des patients de la région de Los Angeles^{89, 190}. Par la suite, d'autres groupes signalèrent la manifestation de certaines autres maladies associées à une dégénérescence du système immunitaire: candidiose mucosale, sarcome de Kaposi, lésions chroniques ulcéreuses causées par le virus herpès simplex et infection agressive à cytomégalovirus^{323, 468}. L'isolement par les groupes de L. Montagnier (de l'Institut Pasteur)²², de R. Gallo (du NIH)¹⁶⁵ et aussi de D. Levy (de l'UCSF)²⁸⁶ d'un nouveau rétrovirus associé au développement de cette forme nouvellement identifiée d'immunodéficience progressive allait aboutir à l'identification du VIH, nom adopté par le Comité International sur la Taxonomie des Virus en 1986. La même année, une deuxième forme de VIH est isolée de patients en Afrique de l'Ouest, le VIH-2⁷⁶. Une douzaine d'années plus tard, le SIDA a atteint les niveaux pandémiques, et un effort considérable a été mobilisé pour lutter contre le virus en cause.

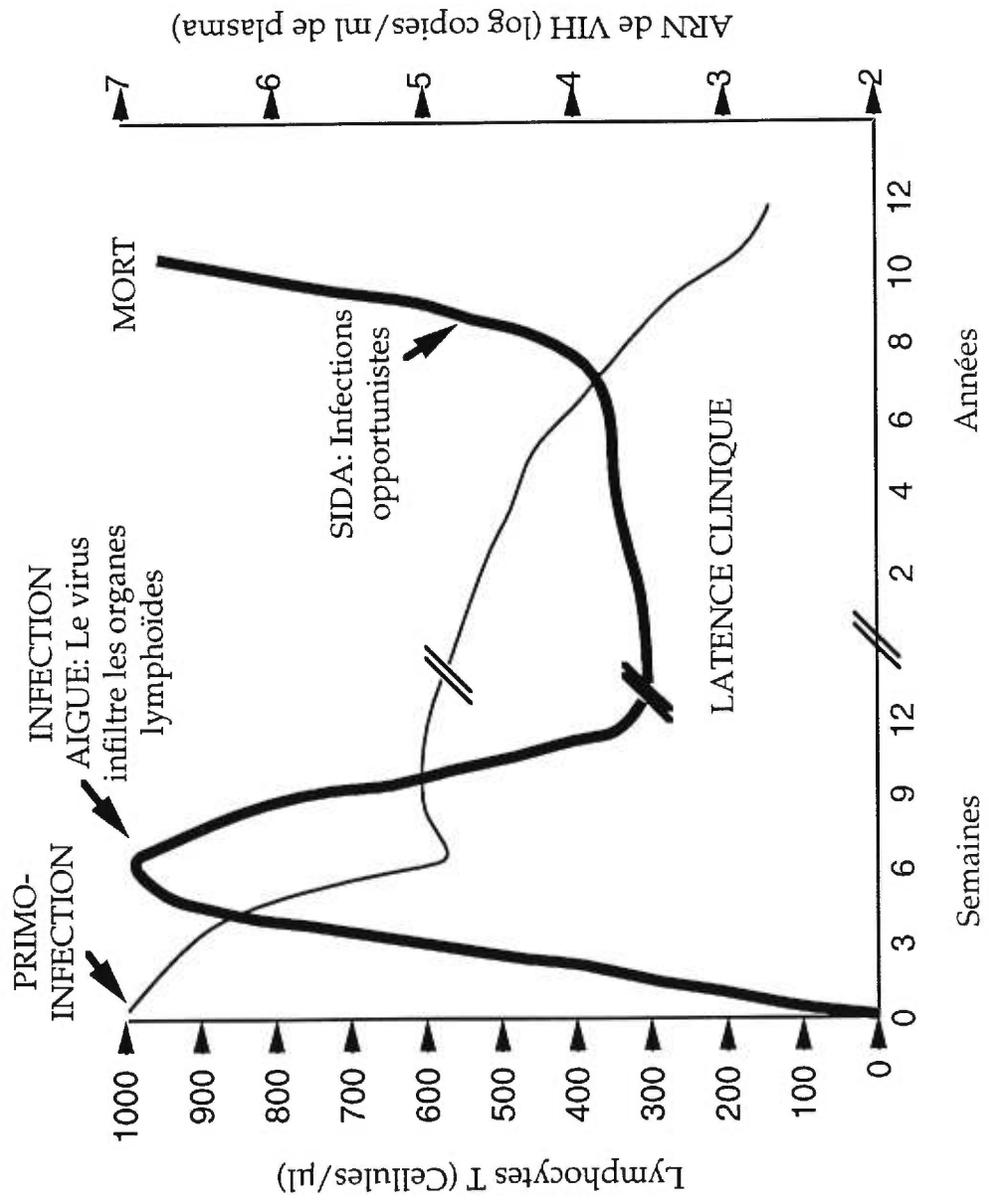
4.1.2 La pathogénèse du SIDA.

Le SIDA est une maladie complexe qui est caractérisée par une dégénérescence lente du système nerveux central, mais surtout par un déclin progressif de la population de lymphocytes CD4-positifs, aboutissant à un déséquilibre du système immunitaire et le développement d'infections opportunistes ainsi que de néoplasmes rares et agressifs. Le SIDA se présente généralement en trois phases (figure 11)³⁸⁴: 1) D'abord, il s'agit d'une phase aiguë de réplication virale intense (quelques semaines), souvent associée à l'apparition de symptômes semblable à ceux de la grippe. Le virus s'introduit dans les tissus lymphoïdes à cette étape. 2) La deuxième étape correspond à une longue période (jusqu'à 8 ans) de latence apparente (dans le sang périphérique) du virus, où apparaissent les anticorps de l'hôte contre les antigènes viraux (p24). Cependant, la réplication intense des virus, particulièrement dans les lieux leur servant d'abri (cellules quiescentes [macrophages, lymphocytes mémoires], tissus lymphoréticulaires [cellules dendritiques]), peu accessibles aux actions du système immunitaire, amène l'établissement de "réservoirs" de virus^{383, 384}. La réplication virale dans les lymphocytes circulants est donc relativement contrôlée à cette étape: il s'agit

FIGURE 11

Page 67

Phases dans la pathogénèse du VIH menant au SIDA. Figure modifiée de Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997): **Retroviruses**; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.



d'un équilibre fragile entre le nombre de lymphocytes CD4+ en circulation, la quantité de particules virales infectieuses produites, et le recyclage ou réapprovisionnement continu des deux populations^{222, 398, 399, 541}. 3) A la troisième phase, il y a une augmentation du titre viral apparent, face à la perte de l'équilibre fragile préalablement établi, et le début de l'établissement des infections opportunistes. La destruction des populations cellulaires CD4-positives devient donc le phénomène central de la maladie, le point critique étant la mainmise du virus sur la capacité de régénération du système immunitaire³⁹⁹.

L'utilisation de puissants inhibiteurs de réplication virale (les anti-protéases) a permis d'obtenir un modèle de la dynamique de réplication du virus pendant les phases cliniques du virus, particulièrement la "primo-infection" (phase 1)^{398, 399}. La demi-vie rapide du virus (6 h) ainsi que la vie moyenne des lymphocytes circulants infectés (1,6 j), et le temps que prend le virus à infecter de nouvelles cellules (2,2 j) démontrent l'équilibre fragile entre la réplication virale et l'action du système immunitaire^{398, 399}. Les caractéristiques des lieux servant de "réservoir viral", comme les macrophages, et autres cellules quiescentes, sont actuellement étudiées.

4.1.3 Le VIH, un rétrovirus.

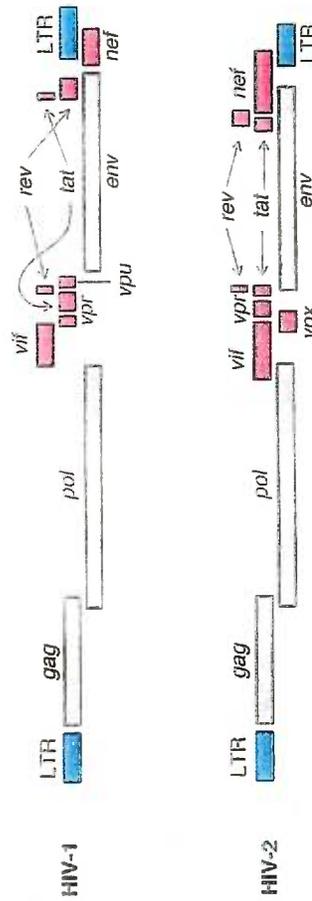
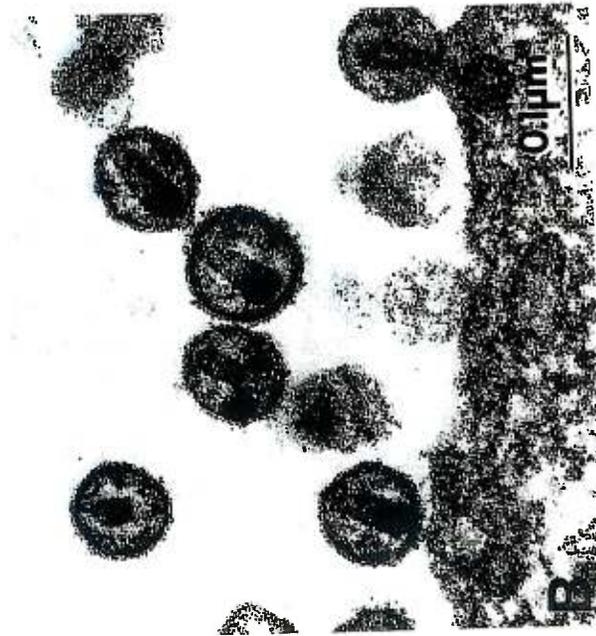
4.1.3.1 *Structure du virus*

Le VIH appartient à la sous-famille des lentivirus, des rétroviridae ayant une morphologie de type C. C'est un virus enveloppé d'environ 100 nm de diamètre qui apparaît en microscopie électronique comme un cône cylindrique entouré d'une bi-couche lipidique (figure 12)³⁰⁷. Le corps central composée de la protéine majeure CAp24 englobe deux molécules d'ARN de polarité positive, auxquelles sont associées la transcriptase inverse (RTp66/51, ADN polymérase ARN-dépendante), l'intégrase (INp31) et la protéine "de la nucléocapside" (NCp9). L'enveloppe virale provient de la membrane cellulaire duquel le virus a bourgeonné et contient 72 spicules, correspondants aux trimères de glycoprotéines virales de surface et transmembranaire (la SUp120 et la TMgp41), respectivement. Tapissant la surface interne de l'enveloppe, la protéine de la matrice MAp17 est ancrée par un lien myristyle et fait le lien entre le corps dense central et l'enveloppe virale³⁰⁷. Enfin, certaines protéines dites "accessoires" du VIH sont aussi incorporées au virion: la protéine Vpr est

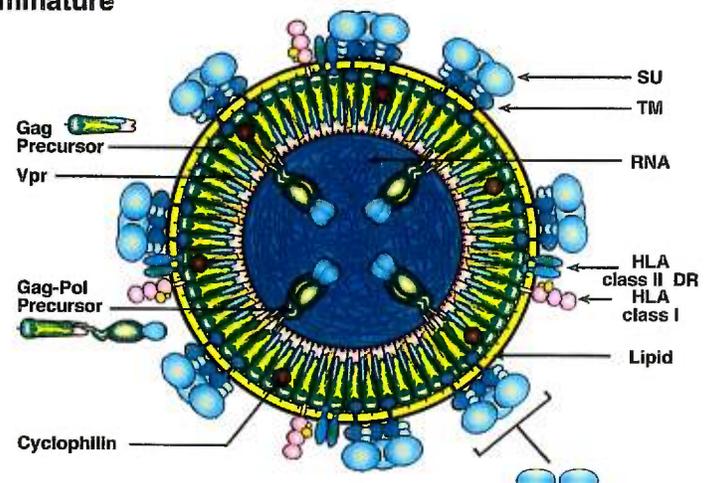
FIGURES 12 et 13

Pages 70 et 71

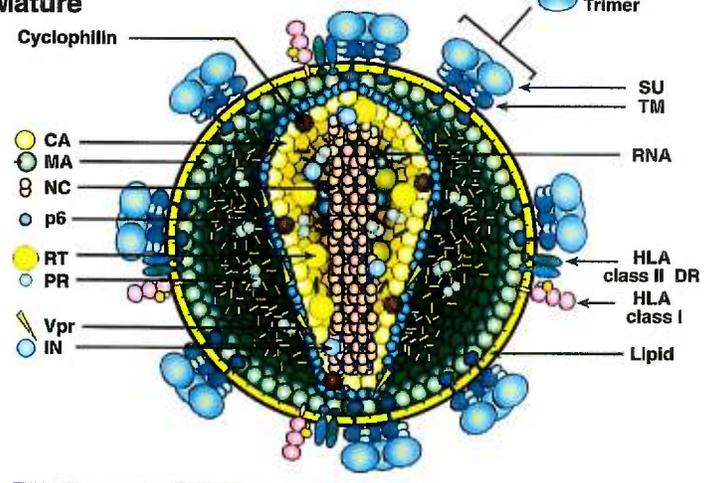
Structure génétique (figure 12a), morphologique (figure 12b) et moléculaire (figure 13) du VIH. Figures **12a** de Darnell *et al.*, **12b** de Levy, JA (1994): **HIV and the pathogenesis of AIDS**; ASM Press; Washington, DC; 359 pages, et **13** de Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997): **Retroviruses**; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.



Immature



Mature



█ Peptides processed between CA and NC,
█ between NC and p6, and
█ distal to PR.

en quantité appréciable^{82, 278}, mais les protéines Vif^{57, 251, 300} et Nef^{51, 382, 544} ont aussi été détectées dans la particule virale.

Plusieurs protéines cellulaires sont aussi incorporées au VIH, soit au niveau de l'enveloppe ou en s'associant à la capsid virale. La β -microglobuline¹⁴, les molécules DR du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II)²¹⁶, l'ICAM ("Intercellular adhesion molecule")¹⁵³, le CD55 (ou "decay accelerating factor", un inhibiteur du complément)³²¹ ainsi que le LFA-1 ("leukocyte function antigen"-1)²⁵ sont tous retrouvés dans l'enveloppe virale (figure 13). Leur présence permettrait l'attachement aux cellules CD4-négatives ou stabiliserait l'interaction virale avec les cellules CD4-positives en agissant comme récepteurs auxiliaires. Parmi les protéines cellulaires identifiées dans la capsid virale, la cyclophiline A est incorporée dans le VIH par son interaction avec la protéine CAp²⁴^{155, 306, 508}. Cette protéine s'avère essentielle pour le potentiel infectieux du virus en agissant possiblement comme une chaperone des protéines Gag. Enfin, l'actine interagit avec les protéines de la capsid et est retrouvée dans la particule virale⁴¹⁷.

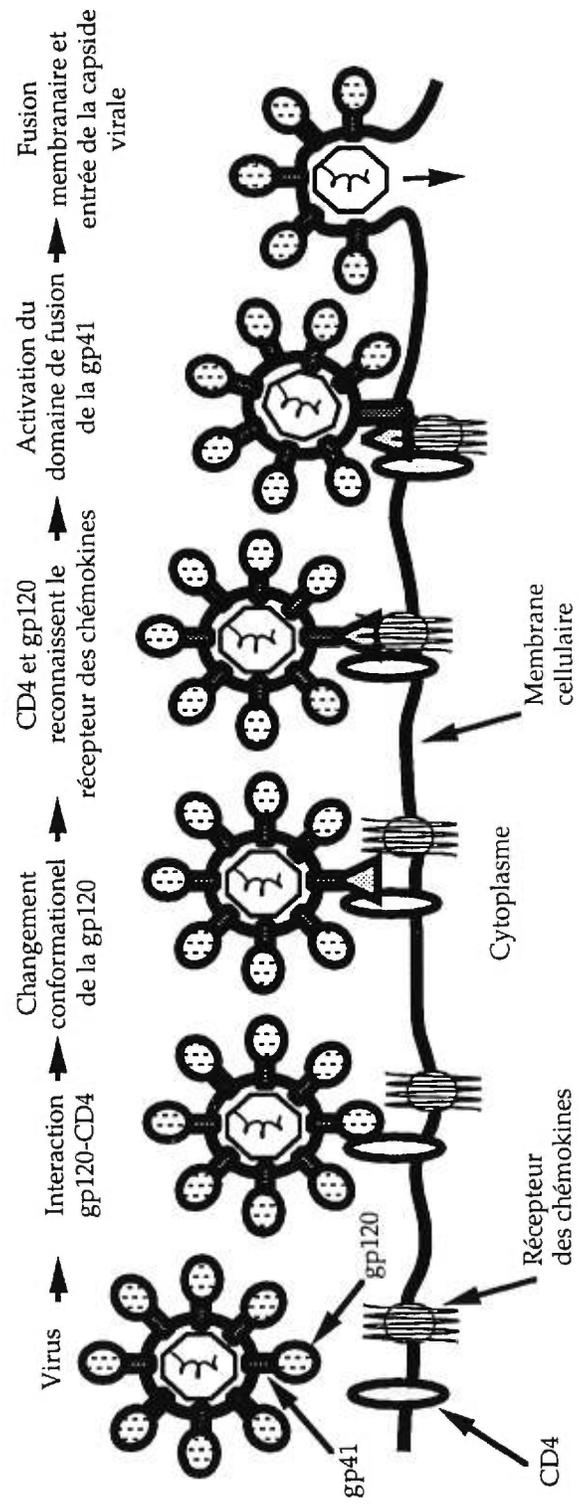
4.1.3.2 Organisation génétique du VIH

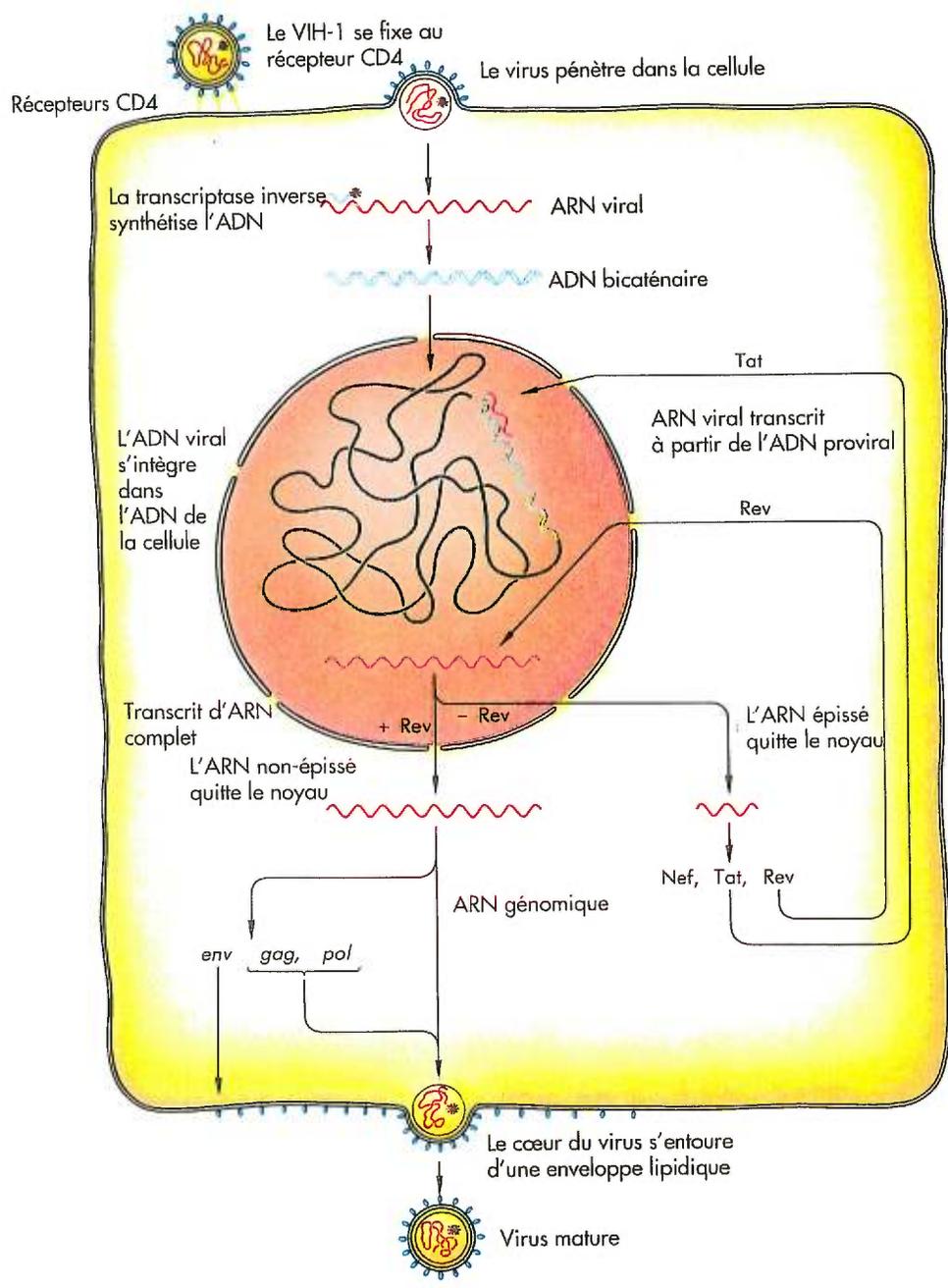
Le génome d'environ 9000 paires de bases du VIH code pour au moins neuf protéines différentes. Les gènes *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus, codent pour les protéines structurales majeures, les enzymes virales ainsi que les glycoprotéines de l'enveloppe, respectivement (figure 12)³⁰⁷. Outre ces gènes, deux autres sont nécessaires pour la production de particules virales: le gène *tat* code pour le transactivateur du LTR du virus^{101, 152}, tandis que le gène *rev* donne lieu à une protéine essentielle pour la phase tardive du cycle de multiplication viral^{144, 437, 476}. Enfin, les quatre gènes "accessoires" *vif*, *nef*, *vpr* et *vpu* (ainsi que *vpx* pour le VIH-2, qui ne possède pas de gène *vpu*) codent pour des protéines non-essentiellles pour la réplication du virus dans les lignées cellulaires^{83, 492, 516}: par exemple, la protéine Vif n'est nécessaire pour l'infection virale que dans certaines lignées cellulaires, dites "Vif-dépendantes". Cependant, ces protéines possèdent potentiellement des fonctions importantes dans le contexte naturel de l'infection au VIH.

FIGURES 14 et 15

Pages 74 et 75

Reconnaissance des récepteurs cellulaires par le VIH (figure 14) et cycle de réplication du VIH (figure 15, particulièrement au niveau des protéines Tat et Rev). La figure 15 provient de Watson, JD; M Gilman; J Witkowski; M Zoller (1994) **ADN Recombinant** ; deBoeck Ed.; Bruxelles, Belgique; 626 pages.





4.2 Cycle de réplication du VIH.

4.2.1 Reconnaissance des récepteurs cellulaires.

La première étape essentielle à l'entrée du VIH dans la cellule cible est l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe de surface gp120 avec le récepteur principal du VIH sur la membrane des cellules cibles (figure 14), la protéine CD4^{96, 261, 313}. Cette dernière est une protéine transmembranaire de type I impliquée dans la stabilisation de l'interaction entre le récepteur du lymphocyte T (TCR) et les molécules du CMH⁶¹. La gp120 interagit avec la protéine cellulaire CD4 pour créer un complexe qui sert d'appât au co-récepteurs du virus, c'est-à-dire les récepteurs des chémokines récemment identifiés⁴¹⁰. Les co-récepteurs sont des protéines à sept domaines transmembranaires dont le domaine cytoplasmique lie le GTP; leur rôle usuel est de déclencher des cascades intracellulaires lorsqu'ils interagissent avec leur ligand naturel, les chémokines⁴¹⁰. Le choix de co-récepteur utilisé semble dépendre d'un deuxième niveau de tropisme viral: si la gp120 possède une affinité accrue pour le co-récepteur CCR5, il est "macrophage-tropique", tandis que l'utilisation du co-récepteur CXCR4 est préféré des souches virales "lymphotropiques"^{8, 72, 110, 115, 146}. La région ciblée par la gp120 sur les récepteurs des chémokines est encore mal définie: il s'agit probablement d'une structure non-linéaire impliquant à la fois plusieurs domaines du co-récepteur, mais dont une section amino-terminale serait importante. Par contre, la région de la gp120 impliquée dans l'interaction avec le co-récepteur est bien connue pour son importance au niveau du tropisme viral: la boucle V3. Parallèlement, les domaines D1 et D2 de CD4 s'associent aussi avec le récepteur des chémokines^{277, 515, 550}. Enfin, l'utilisation d'autres récepteurs de chémokines (CCR2b, CCR3) a aussi été rapportée, particulièrement par des souches virales plus agressives, dites "bi-tropiques"¹¹².

L'interaction du complexe CD4-gp120 avec le co-récepteur libère un domaine impliqué dans la fusion membranaire qui est situé à l'extrémité amino-terminale de la glycoprotéine transmembranaire, gp41. De récentes études de cristallographie proposent que la partie extracellulaire de la gp41, qui possède deux α -hélices principales, est maintenue sous tension jusqu'à la libération du domaine de fusion qui est projeté dans la membrane cellulaire. À ce moment, l'affinité des deux α -hélices pour revenir à leur structure originale resserre la conformation de la gp41, rapprochant les membranes de

l'enveloppe virale et de la cellule cible. Une fois la nucléocapside libérée dans le cytoplasme cellulaire, cette dernière amorce le processus de transport vers le noyau cellulaire⁵⁴³.

Certaines cellules CD4-négatives ont démontré une disposition à l'infection au VIH. La présence de protéines cellulaires à la surface de l'enveloppe du virus (par exemple, le récepteur Fc³³²) pourrait être impliquée dans de tels processus, mais l'observation que le galactosyl céramide peut servir de récepteur au VIH^{33, 206, 303} suggère plutôt une interaction directe avec la gp120; le domaine d'interaction avec le galactosyl céramide se situerait entre les acides aminés 206 à 275 de la glycoprotéine de surface³².

4.2.2 Transport actif, transcription inverse et intégration génomique.

Une fois le complexe nucléocapsidique libéré dans le cytoplasme, il semble que la capsid se désintègre pour donner lieu aux premières étapes de la transcription inverse³⁹⁶. La protéine "de la nucléocapside", NCp9, chaperonne les acides nucléiques viraux jusqu'à leur intégration dans le génome cellulaire⁹⁸. Quant à la protéine de la matrice MAp17, son état hyperphosphorylé¹⁶⁴ permet la translocation du complexe de pré-intégration vers le noyau cellulaire⁵². Ce transport actif⁵³ permet au VIH, à la différence des oncornavirus^{287, 288}, d'infecter les cellules quiescentes⁵³⁷, comme les macrophages et les cellules microgliales. Cette propriété est importante pour l'élaboration des sanctuaires de réplication virale. La protéine accessoire Vpr contribue aussi à cette propriété de transport nucléaire du CPI²¹⁵, et des observations récentes confèreraient aussi à l'intégrase virale cette fonction¹⁶³.

La transcription inverse se fait entièrement dans le cytoplasme. La conversion du brin d'ARN de polarité positive exige la présence d'une amorce, présente sous la forme d'un ARNt-Lys incorporé préalablement dans le virion²⁰. Outre l'activité transcriptase inverse, la formation d'ADN bicaténaire nécessite la présence d'une activité ARNase H pour dégrader l'ARN, activité retrouvée sur la même protéine virale²⁵². L'activité ADN polymérase permet à l'enzyme virale de synthétiser le brin d'ADN de polarité positive créant l'ADN proviral bicaténaire, flanqué des LTRs ("Long terminal repeats") aux deux extrémités⁵³². L'intégration de l'ADN proviral est la dernière étape de l'établissement de l'infection. Nécessaire à l'expression des

gènes viraux, l'intégration est catalysée par l'intégrase virale, un autre produit du gène *pol* viral¹³⁹.

4.2.3 Expression génique: le LTR interagit avec des facteurs cellulaires et viraux.

La transcription des gènes viraux se fait par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II cellulaire. L'initiation de la transcription se fait au niveau du 5'-LTR, où se trouve une séquence TATAA (-27 à -22), reconnue par le facteur cellulaire de transcription TFIID¹⁶⁸. Le promoteur contient aussi des séquences riches en GC, reconnues par le facteur Sp1. La présence de la protéine Sp1 augmente considérablement le taux d'initiation de transcription. De plus, une région "enhancer" (-120 à -57) contient deux sites de liaison du facteur NFκB³⁵⁸. En effet, l'importance du complexe NFκB/IκB dans l'initiation de la transcription du VIH lors de l'activation des lymphocytes a été clairement établie. Outre la présence de facteurs positifs, une région de régulation négative (NRE) est aussi retrouvée à l'intérieur du LTR (-410 à -157): les facteurs USF ("upstream binding-factor"), NFAT-1 ("nuclear factor of activated T-cells") et AP-1 possèdent des sites de liaison à l'intérieur de cette région^{305, 438}. Enfin, le site de liaison du transactivateur viral Tat⁴⁷⁷ se retrouve en aval du site d'initiation de la transcription. La région TAR ("Tat-Responsive element")²⁰⁹ interagit avec la protéine Tat pour transactiver la transcription et l'élongation des ARNm viraux²⁵⁴.

4.2.4 Rev et la régulation post-transcriptionnelle.

La complexité du génome du VIH entraîne le chevauchement de plusieurs gènes et un contrôle élaboré de l'épissage des ARNm (figure 15). Trois familles d'ARNm sont produits par la transcription et l'épissage des gènes du VIH: les ARNm non-épissés pleine longueur (~ 9000 pb), les ARNm épissés une fois (~ 4 à 5000 pb) et les ARNm épissés plusieurs fois (~ 2000 pb). Les ARNm pleine longueur et épissés une fois codent pour les protéines structurales Gag, Pol et Env, ainsi que certaines protéines accessoires (Vif, Vpr et Vpu). Ces ARNm nécessitent la présence de Rev pour leur exportation du noyau vers le cytoplasme¹⁴⁵: la protéine Rev interagit avec le RRE ("Rev responsive element") retrouvé sur tous ces ARNm. Les ARNm épissés plusieurs fois codent pour les protéines Tat, Rev, Nef et sont transportés dans le cytoplasme de manière "Rev-indépendante". Le concours

immédiat de Tat pour la transactivation du LTR, de Rev pour l'éventuelle exportation des ARNm plus longs et peut-être de Nef pour la dégradation de CD4 permet au virus une régulation post-transcriptionnelle en deux temps: d'abord, l'optimisation des mécanismes transcriptionnels et traductionnels (Tat, Rev), ensuite, la production des protéines de structure (Gag, Env) pour l'assemblage viral⁹³.

4.2.5 Les principales protéines de structure Gag, GagPol et Env.

Les produits des gènes gag, pol et env sont les constituants majeurs de la particule virale. Etant donné leurs rôles distincts dans la morphogénèse et le bourgeonnement du VIH, les sections suivantes traiteront plus en détail de leur synthèse et maturation.

4.3 Les protéines Gag et GagPol.

4.3.1 Synthèse des protéines Gag et GagPol.

La synthèse des protéines précurseurs Pr55Gag et Pr160GagPol a lieu sur les ribosomes libres du cytoplasme. L'ARNm non-épissé est traduit dans plus de 90% des cas pour aboutir à la protéine Pr55Gag. Moins d'une fois sur dix, un changement de cadre de lecture à -1 résulte en la formation d'une protéine Pr160GagPol²⁴¹. Pendant la traduction des ARNm, les protéines sont myristilées à leur extrémité amino-terminale¹⁹³. Ce signal d'ancrage membranaire leur permet de s'associer à la membrane plasmique, condition nécessaire à la formation des particules virales⁴⁹. Les protéines Gag et GagPol interagissent entre elles par leur domaine central CAP24^{127, 230}, avec la protéine Vpr par leur domaine p6^{69, 389}, avec l'ARN génomique par leur domaine NCp9⁶, et avec la glycoprotéine TMgp41 de l'enveloppe virale par leur domaine MAp17 amino-terminal⁹⁰.

4.3.2 Les enzymes virales.

La protéase virale PRp11 s'active par autoclivage en *trans* et produit par la suite les quatre protéines Gag matures et les deux autres enzymes virales^{249, 250}. Cette protéase est reliée au groupe des protéases aspartates³⁰², de par la séquence DT/SG dans son site actif. La transcriptase inverse RTp66/p51 possède les activités ADN-polymérase ARN-dépendante, ARNase H et peut aussi synthétiser l'ADN à partir d'une matrice d'ADN^{19, 346}. La transcriptase inverse requiert une amorce déjà associée à la matrice d'ARN pour son activité

polymérase; cette amorce est l'ARNt-Lys²⁰. C'est l'unité p66 de la transcriptase inverse qui possède les activités enzymatiques²⁸¹; son taux d'erreur se situe à une par 1400 à 4000, ce qui la rend moins fidèle que plusieurs autres RT de rétrovirus^{411, 423}. Cette variabilité est la cause principale de l'évolution rapide des souches virales. Enfin, l'intégrase virale INp31 possède à la fois les activités de clivage et ligase d'ADN¹⁷⁹. Elle est active sous forme de dimère et catalyse l'insertion de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte. La structure de ces enzymes a été étudiée avec beaucoup de détails (par exemple, en cristallographie pour PR³³³, RT²⁶³ et le domaine catalytique de IN¹²²), particulièrement pour le développement de produits antiviraux.

4.3.3 Maturation des protéines Gag

4.3.3.1 Protéine de la matrice, p17

La protéine de la matrice constitue la partie amino-terminale de la polyprotéine Gag, et possède une glycine myristilée à cette extrémité⁴⁶⁵. Localisée entre le cône central et l'enveloppe virale, cette protéine joue un rôle important dans le bourgeonnement du virus, son potentiel infectieux, ainsi que son lieu d'assemblage. D'abord, la substitution de la glycine amino-terminale affecte grandement la morphologie du virus et entraîne la formation de pseudoparticules virales intracellulaires (VLPs, "virus like particles")¹⁷⁴. Un groupe d'acides aminés basiques, entre K18 et K32, pourrait alors servir de signal d'ancrage membranaire⁵⁶⁴; curieusement, ce même groupe d'acides aminés servirait de signal de localisation nucléaire lors du transport du complexe de pré-intégration⁴⁸⁸. La régulation de l'activité membranaire/nucléaire de ce signal serait faite par l'état de phosphorylation de la protéine, sur des sérines et/ou des tyrosines⁴⁸⁸.

La protéine de la matrice est impliquée dans l'incorporation des glycoprotéines du virus, présumément en interagissant avec la partie intracytoplasmique de la gp41^{90, 234}. Une délétion du deux tiers amino-terminal (en retenant la myristilation) de la protéine n'affecte pas le bourgeonnement du virus, mais l'incorporation des glycoprotéines est grandement diminuée^{114, 557}. Des délétions de la région amino-terminale de la protéine redirigent le bourgeonnement du virus au RE^{134, 558}. Les effets d'une série de substitutions ponctuelles ont été analysés et suggèrent que les cent premiers acides aminés sont impliqués dans l'incorporation des glycoprotéines¹¹⁴. Une récente analyse

de la structure de la protéine corrobore ces résultats²¹⁹: la disposition des protéines p17 sous la membrane permet l'incorporation du long domaine cytoplasmique de la gp41; cependant, les substitutions dans la p17 affectant sa structure, ne permettent plus l'incorporation des glycoprotéines. Ce modèle propose donc une certaine interaction de la p17 avec la glycoprotéine; certaines observations du bourgeonnement dans les lymphocytes corroboreraient l'existence d'une telle interaction⁵⁰.

4.3.3.2 *Protéine majeure de la capsid, p24*

La protéine majeure de la capsid du VIH est parmi les déterminants antigéniques majeurs du virus⁵³³. La majorité des protéines mutantes p24 inhibent partiellement, sinon complètement, la formation des particules virales^{226, 517}, et la plupart des domaines de la protéine sont essentiels: par exemple, une région conservée parmi les rétrovirus (MHR, "major homology region", acides aminés 285 à 304)^{113, 316} est impliquée dans la multimérisation des protéines Gag, et donc essentielle à l'assemblage viral¹¹³. Enfin, la p24 (positions 178 à 300) interagit avec les cyclophilines A³⁰⁶, interaction apparemment importante pour le potentiel infectieux du virus et inhibée par la cyclosporine.

4.3.3.3 *Protéine de la nucléocapsid, p9/p7*

La protéine de la nucléocapsid, NCp9, hydrophobe, fortement basique, lie l'ARN viral et le condense pour l'incorporer dans la particule virale⁶. L'absence de ce polypeptide dans la polyprotéine précurseur Gag entraîne la production de virus non-infectieux, sans ARN (VLPs, "virus-like particles"). La NCp9 possède deux motifs doigt à zinc (CX₂CX₄HX₄C), qui sont importants pour l'incorporation de l'ARN (par la structure en épingle qui sert de signal d'incorporation, dans la région 5' de *gag*) et l'ARNt-Lys, la stabilité du dimère d'ARN viral et l'interaction entre molécules NCp9 lors de l'assemblage viral⁹⁷. Etant donné sa forte association à l'ARN, la NCp9 est aussi impliquée dans le processus de transcription inverse⁹⁷.

4.3.3.4 *La petite protéine p6*

L'extrémité carboxy-terminale de la protéine Gag correspond à son domaine p6. Cette protéine riche en prolines est impliquée dans les dernières étapes de la maturation du virus; les virus possédant des délétions dans la

protéine p6 développent des défauts au niveau de la relâche du virus de la membrane cellulaire¹⁹². Le domaine p6 est aussi nécessaire pour l'incorporation de la protéine Vpr dans la particule virale^{69, 389}.

Des sites de clivage supplémentaires de la protéase virale à l'intérieur de la protéine Gag aboutissent aussi à la formation des petites protéines p2 (entre CA et NC) et p1 (entre NC et p6). Le rôle du clivage séquentiel des sites reconnus par la protéase virale sur Gag et GagPol est encore inconnu, mais, comme les protéines p2 et p1, pourrait être impliqué dans la maturation de la particule virale⁴⁰¹.

4.4 Les glycoprotéines Env.

4.4.1 Traduction, maturation et glycosylation des glycoprotéines Env: la gp160.

L'ARNm viral codant pour les glycoprotéines n'est pas traduit par les ribosomes libres du cytoplasme comme celui de *gag*, mais plutôt au niveau du réticulum endoplasmique où s'effectue la traduction des ARNm des protéines membranaires^{120, 124, 379, 546}. L'ARNm de Env est bicistronique¹⁴⁴; en amont du gène *env* se trouve *vpu*. La combinaison de ces deux gènes sur un même ARNm reflète bien leurs fonctions complémentaires à cette étape du cycle viral. La polyprotéine Env est une protéine membranaire de type I qui est fortement glycosylée dans le RE et l'appareil de Golgi. Son peptide signal constitue environ les 30 premiers acides aminés amino-terminaux, caractérisé par un regroupement de charges positives en amont d'un domaine riche en tryptophane précédant la région centrale hydrophobe essentielle à sa fonction¹³⁰. La glycosylation est importante pour la formation de la structure finale de la protéine. Dans l'appareil de Golgi, le précurseur est clivé (au niveau des acides aminés RXX/RR, de 508 à 511) par une protéase cellulaire de la famille des sérine-subtilisines, la furine. Ce clivage génère les sous-unités gp120 (complètement extracellulaire) et gp41 (possédant le domaine transmembranaire), qui demeurent associées l'une à l'autre¹⁹⁹. Il a été observé que seulement 5-20% du précurseur gp160 est converti en gp120/gp41; une quantité importante de glycoprotéine est donc acheminée vers le lysosome et dégradée⁵⁴⁶. Le cheminement du complexe gp120/gp41 (ou gp160) se faisant par les voies de transport vésiculaire, l'interaction de la gp120 avec le récepteur viral CD4 devient possible. La dégradation de la molécule CD4 par la

protéine virale Vpu à l'intérieur du RE sert vraisemblablement à contrecarrer ce phénomène^{547, 548}. L'endocytose accélérée de la protéine CD4 par l'autre protéine accessoire virale, Nef⁴, contribuerait aussi à empêcher l'interaction gp120/CD4, mais au niveau de la surface cellulaire.

4.4.2 Structure et fonctions des glycoprotéines matures: la gp120.

La glycoprotéine de surface du virus de l'immunodéficience humaine est la sous-unité de Env qui est la plus fortement glycosylée (figure 16); elle possède environ deux douzaines de sites de glycosylation (NXS/T), dont la moitié sont très conservés parmi les divers isolats²⁹⁰. De plus, près d'une vingtaine de cystéines conservées se retrouvent dans la gp120, suggérant l'importance de liens disulfures (neuf ont été identifiés) dans le maintien de la structure de la glycoprotéine²⁸⁴. Les extrémités amino- et carboxy-terminales de la gp120 sont impliquées dans son association avec la gp41 mais les régions responsables de l'interaction sur la gp41 sont moins connues. L'association non-covalente de ces deux glycoprotéines permet à une certaine quantité de la gp120 d'être libérée du complexe à la surface cellulaire; le rôle exact de ce processus dénommé "délestage" ("shedding") dans la pathogénèse virale n'est pas connu⁵⁴⁹. Structuellement, la gp120 se présente sous une forme plutôt globulaire, recouvrant la glycoprotéine transmembranaire gp41: d'un côté, on retrouve l'extrémité amino-terminale et les deux régions variables V1 et V2; de l'autre, les régions V4 et V5 et l'extrémité carboxy terminale. Au sommet de la glycoprotéine se trouve le domaine V3^{307, 549}.

Les régions variables sont des boucles dont les séquences en acides aminés diffèrent entre différents isolats viraux. Les acides aminés interagissant avec CD4 se retrouvent cependant dans les domaines conservés (domaines C1-C5): deux régions hydrophobes (entourant T257 dans C2 et W427 dans C4) et deux hydrophiles (entourant D368 dans C3 et D457 dans C4)³⁷⁴. Réciproquement, les acides aminés de CD4 impliqués dans cette interaction se retrouvent dans le domaine D1⁴³. La boucle V3 interagit avec le co-récepteur viral, un parmi les récepteurs des chémokines: la grande variabilité de cette boucle d'une trentaine d'acides aminés établit le tropisme (ou l'affinité) du virus pour les sous-populations cellulaires CD4-positives (macrophages ou lymphocytaires), et contribue aussi à définir l'activité syncytiale du virus (SI ["syncytium-inducing"] ou NSI) dans certaines lignées cellulaires en culture³⁴¹.

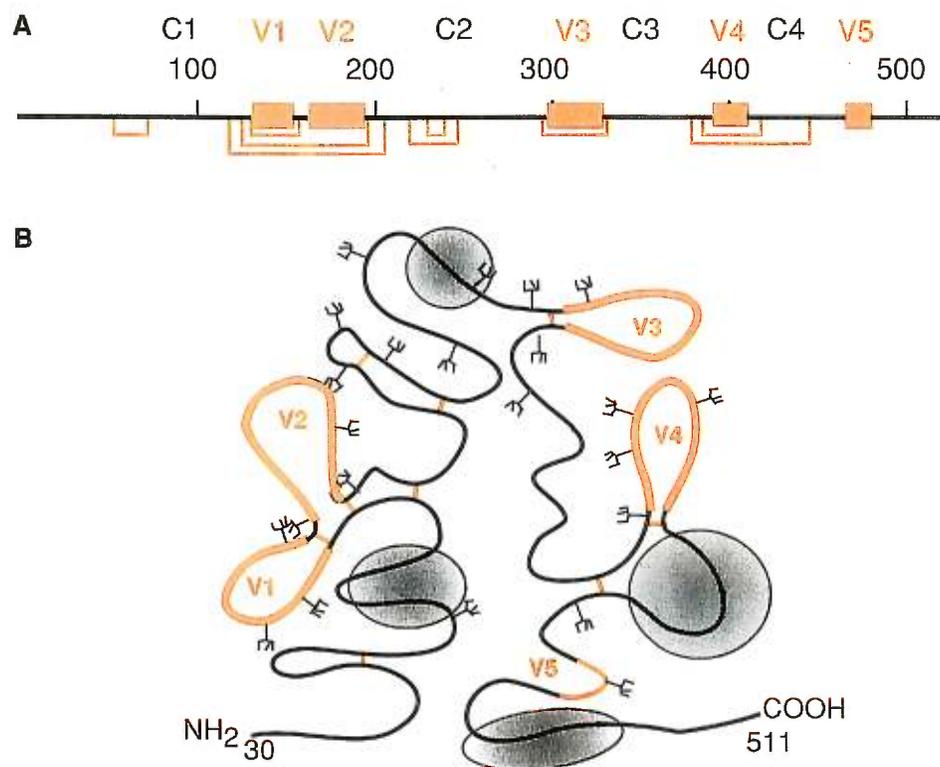
FIGURES 16 et 17

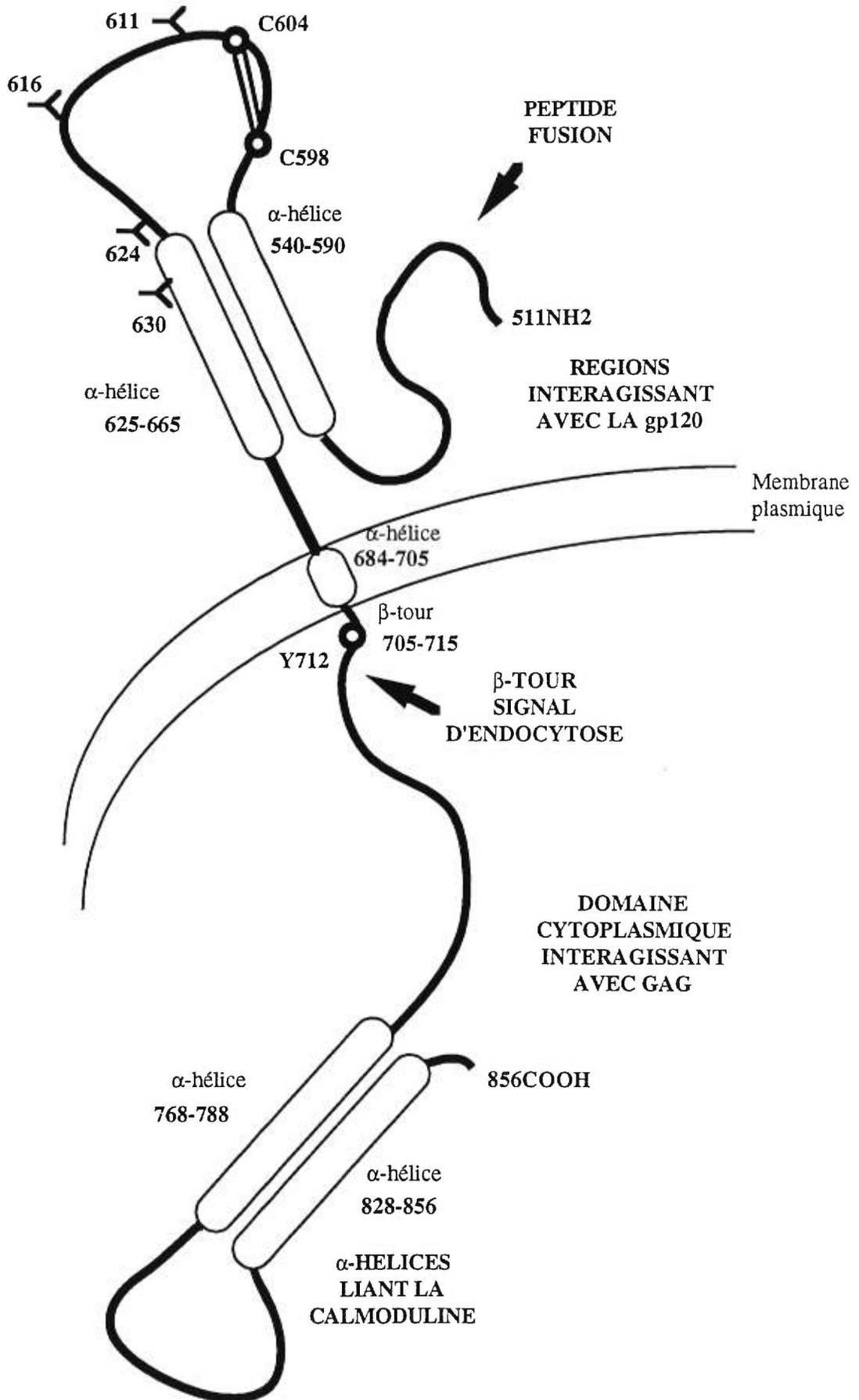
Pages 85 et 86

Figure 16: structure de la gp120 du VIH. En A, représentation linéaire des régions constantes (C) et variables (V). En B, schéma des liens disulfures, des sites de glycosylation et des régions interagissant avec CD4 sur la gp120.

Figure adaptée de Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997):
Retroviruses; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.

Figure 17: structure de la gp41 du VIH.





4.4.3 Structure et fonctions des glycoprotéines matures: la gp41.

La glycoprotéine transmembranaire du VIH est associée à trois fonctions fondamentales: la fusion membranaire (partie extracytoplasmique), l'ancrage membranaire (partie transmembranaire) et l'incorporation de Env dans la particule virale (partie cytoplasmique) (figure 17). Le domaine extracytoplasmique est disposé en forme de crochet, avec l'extrémité amino-terminale recourbée vers la membrane. Deux importantes α -hélices (environ aux positions 540 à 590 et 625 à 665) seraient disposées l'une devant l'autre dans cette région⁵⁴³. La présence de glycosylation (4 sites: 611, 616, 624, 637)¹⁴⁷ et d'un pont disulfure (entre les cystéines 598 et 604), ainsi que d'une région amino-terminale (positions 512 à 535, le "fusion peptide"²⁶⁷) constituent les caractéristiques structurales principales de l'ectodomaine de la gp41. Un motif constitué de leucines ("leucine zipper") est aussi présent dans la première α -hélice et est impliqué dans l'infection virale et la fusion membranaire, mais pas dans l'oligomérisation⁵⁹.

Suite à une région transmembranaire constituée d'une α -hélice hydrophobe chargée positivement (positions environ 684 à 705)¹⁶², la gp41 du VIH-1 possède un domaine intracytoplasmique particulièrement long par rapport aux autres rétrovirus. La structure de cette région est particulièrement importante, car des substitutions qui y sont introduites affectent la conformation globale de la glycoprotéine¹²³. Le domaine cytoplasmique renferme deux α -hélices amphipathiques, situées approximativement entre les acides aminés Y768 et R788 ainsi qu'entre R828 et L856³⁴³. Des peptides correspondant à ces deux hélices provoquent la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule, d'où le nom de "LLP" ("lentivirus lytic peptides"). De plus, ces α -hélices se lient fortement à la calmoduline. Enfin, les cystéines 764 et 837 sont palmitylées⁵⁵². La signification de ces diverses observations n'est pas encore connue.

Le groupe de Hoxie a récemment isolé une souche de virus d'immunodéficience simienne (VIS, apparentée au VIH) portant la substitution d'une tyrosine (Y721C) dans la partie intracytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire^{272, 273, 455}. Ce virus présente une réplication accélérée et une capacité accrue de fusion cellulaire. La quantité de glycoprotéines retrouvées à

la surface cellulaire est aussi supérieure à la souche sauvage. La tyrosine (ainsi qu'une tyrosine présente à une position homologue de la gp41 du VIH (Y712)⁴⁴⁹) est associée à un signal d'endocytose. Cependant, l'activité d'endocytose de la glycoprotéine d'enveloppe semble inhibée en présence de Gag¹²⁵, et donc n'explique pas entièrement le phénomène de répllication accélérée du virus mutant.

Etant donné que la présence de Gag influence la fonction de certaines structures de la gp41, il existe peut-être une interaction entre la partie intracytoplasmique de la glycoprotéine et la protéine de la matrice. Pourtant, si l'ensemble de la littérature s'entend sur l'importance de la protéine de la matrice pour l'incorporation des glycoprotéines dans la particule virale^{113, 376, 555, 557}, il en est tout autrement pour la région cytoplasmique de gp41^{119, 422, 480, 556, 565}. Des données récentes ont toutefois permis de suggérer un modèle permettant de réconcilier l'ensemble des observations. Il a été rapporté que l'élimination d'une très grande partie du domaine intracytoplasmique de la gp41 permet de rétablir l'incorporation des glycoprotéines dans un VIH possédant des substitutions dans la protéine M_{Ap}17 ou même dans un rétrovirus différent^{157, 158, 315, 317}; ceci a permis d'élaborer un nouveau modèle de l'incorporation des glycoprotéines au virus: lorsque des substitutions ou des délétions du domaine cytoplasmique affectent la structure générale de la région, il n'est plus capable de s'insérer dans l'espace restreint de la couche sous-membranaire de protéines Gag. Par contre, l'élimination complète de la partie cytoplasmique de la gp41 la libère de ces contraintes structurales, et son incorporation est achevée par les mécanismes gouvernant l'assemblage des rétrovirus classiques²³⁴. Soulignons, à cet égard, la démonstration récente d'une interaction entre la protéine p17 et le domaine cytoplasmique de la gp41 sur colonne d'affinité⁹⁰.

La partie cytoplasmique des glycoprotéines d'enveloppe de lentivirus, comme le VIH, pourrait avoir d'autres fonctions qui demeurent encore peu caractérisées: par exemple, la partie cytoplasmique de la glycoprotéine du VIH-2 favoriserait le bourgeonnement viral à la manière de la protéine Vpu^{39, 40}; le mécanisme impliqué demeure à être identifié.

4.5 Assemblage du VIH

L'assemblage du VIH se fait à la membrane plasmique comme pour les autres rétrovirus de type C. Les polyprotéines Gag et GagPol myristilées interagissent à la surface interne de la membrane cellulaire pour former la particule virale naissante. Environ vingt fois plus de protéines Gag que de protéines GagPol s'y retrouvent incorporées. Les trimères de glycoprotéines se retrouvent concentrés au lieu de bourgeonnement. L'ARN génomique est encapsidé par l'interaction de son signal d'encapsidation ψ avec des séquences "en doigt de zinc" ($CX_2CX_4HX_4C$) du domaine NCp9 des protéines Gag. La formation d'une structure en forme de croissant se poursuit jusqu'à ce qu'il y ait formation d'une structure en forme de bourgeon attachée à la membrane plasmique, puis libération du virus. La maturation de la particule virale se termine par l'activation de la protéase virale, qui, en clivant les polyprotéines du virus, est responsable de la formation de la structure conique dense visible en microscopie électronique.

5. Les virus HTLV et MuLV.

5.1 Indices apportées par l'étude de glycoprotéines de rétrovirus autres que le VIH

L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH dans un rétrovirus hétérologue (MuLV), tel que mentionné précédemment, nécessite la délétion de la partie intracytoplasmique de la glycoprotéine gp41. Cependant, les oncornavirus, rétrovirus plus "classiques", ne possèdent pas un long domaine cytoplasmique dans leur glycoprotéine transmembranaire (figures 18 à 21). Ceci permet à leurs glycoprotéines, comme celles de tant d'autres virus, d'être incorporées à des virus hétérologues. En prenant avantage de ce phénomène, appelé formation de virus *pseudotypes*^{276, 479}, nous pouvons étudier les mécanismes d'incorporation des glycoprotéines, mais aussi étudier leur effet sur le bourgeonnement et le tropisme des pseudotypes. Les prochaines sections décriront brièvement la biologie de deux rétrovirus dont les glycoprotéines ont fait l'objet d'études dans le cadre de ce travail.

5.2 Le virus de la leucémie T-lymphocytaire humaine.

La leucémie adulte des lymphocytes T a été décrite pour la première fois en 1977⁵²¹ au Japon et ses agents causatifs, les HTLV-I et II, en 1980 et

1982, respectivement^{248, 407}. Les virus furent identifiés surtout grâce à leur capacité d'immortaliser les lignées cellulaires T. L'organisation génétique des deux virus est très similaire: gènes *gag*, *pro* (protéase), *pol*, *env*, ainsi que *tax* (le transactivateur) et *rex* (fonction similaire à *rev* du VIH). Un premier changement de cadre de lecture est nécessaire dans *gag* pour passer à *gag-pro*, puis un deuxième pour *gag-pro-pol*. Les protéines de la capsidie (MAp19, CAp24 et NCp15) sont clivées d'une protéine précurseure par la protéase (PRp14); la polymérase/ARNase H/intégrase (p95) provient d'un précurseur encore plus long. Les protéines Rex (~p27) et Tax (~p40) proviennent d'ARNm doublement épissés^{58, 493}.

Les glycoprotéines d'enveloppe suivent les voies de maturation des protéines membranaires. La polyprotéine précurseure (~gp69) est clivée par une protéase cellulaire en gp46 (SU) et gp21 (TM). Le récepteur viral à la surface des cellules cibles n'est pas connu, mais les deux virus utilisent probablement la même molécule comme porte d'entrée. Curieusement, HTLV-I semble infecter préférentiellement les lymphocytes CD4-positifs *in vivo*, tandis que HTLV-II est retrouvé surtout dans les lymphocytes CD8-positifs⁵⁸; cependant, les leucémies sont usuellement de type CD4. Enfin, le contact cellule-à-cellule est habituellement requis pour la transmission efficace du virus¹⁰⁶, quoique certaines exceptions ont été rapportées. Il y a encore relativement peu d'analyses disponibles sur les glycoprotéines¹⁰⁵, et pratiquement aucune littérature sur la fonction du domaine intracytoplasmique.

5.3 Le virus de la leucémie murine.

Le virus de la leucémie murine est un rétrovirus classique de morphologie de type C. Son génome est constitué des gènes *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour les protéines capsidiques (MAp15, p12, CAp30, NCp10), les enzymes virales (PRp14, RTp80, INp46) et les glycoprotéines de l'enveloppe (TMp15E, SUgp70)⁸⁰.

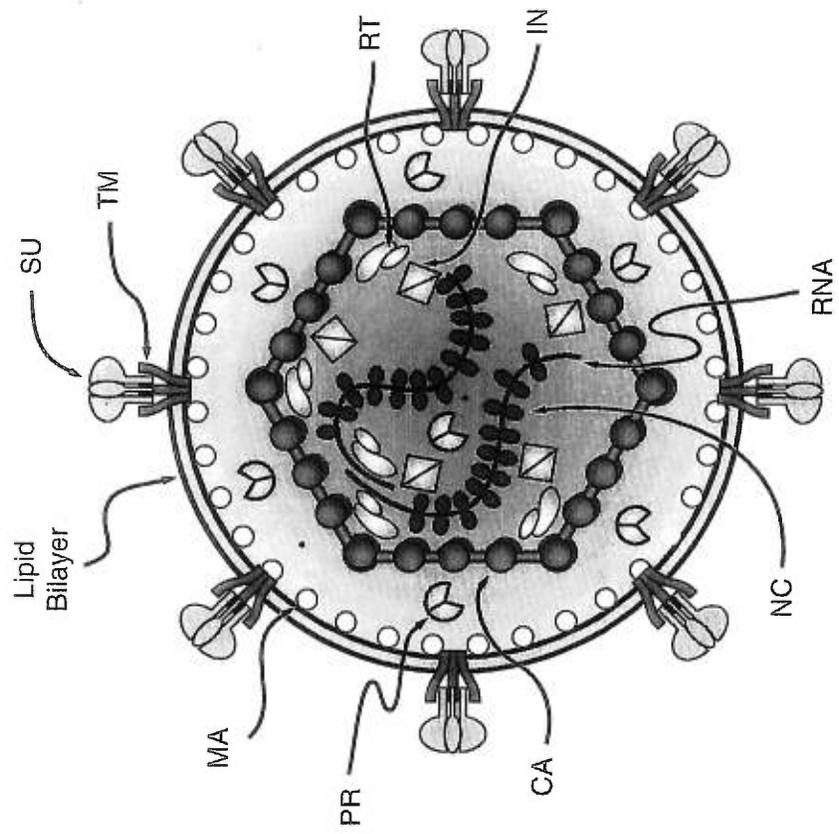
Les virus murins ont développé la capacité d'utiliser des récepteurs différents, établissant par le fait même une restriction plus ou moins grande de leur répertoire de cellules cibles^{80, 268}. Les virus écotropiques (comme le virus de Moloney) infectent principalement les cellules de souris. Les virus

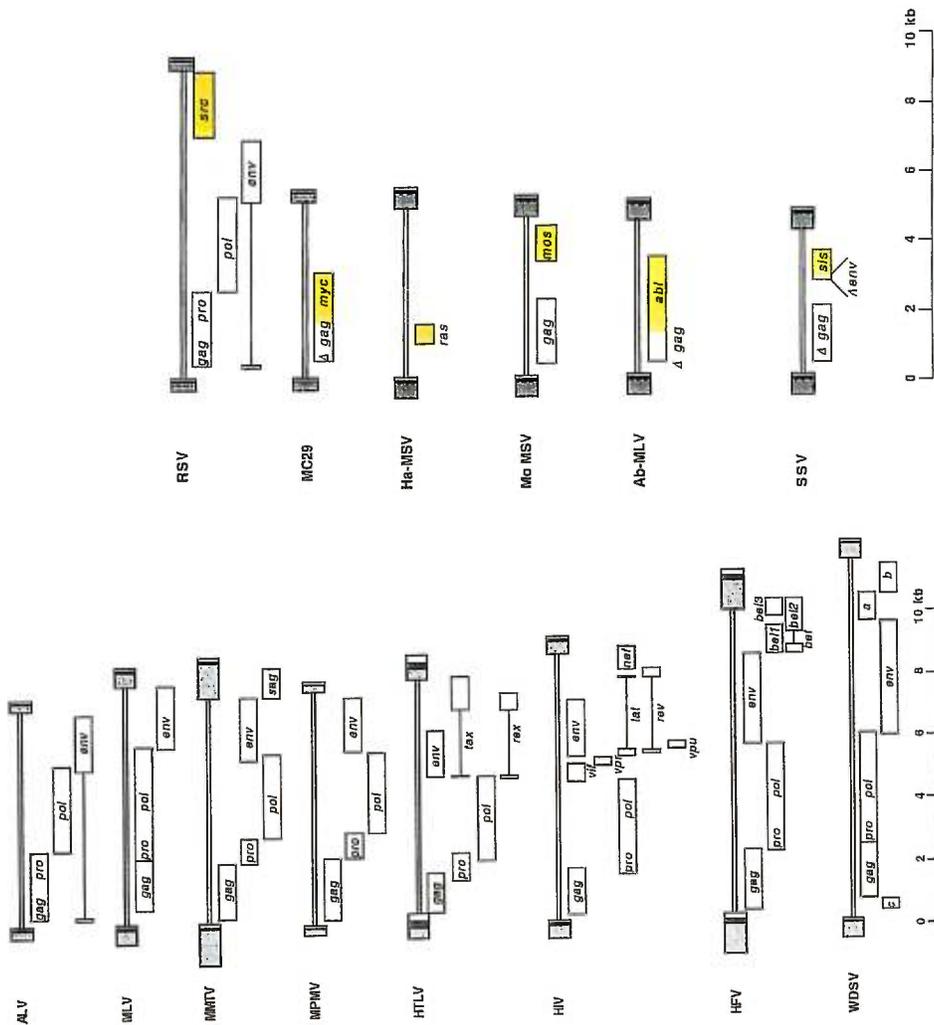
FIGURES 18 à 21

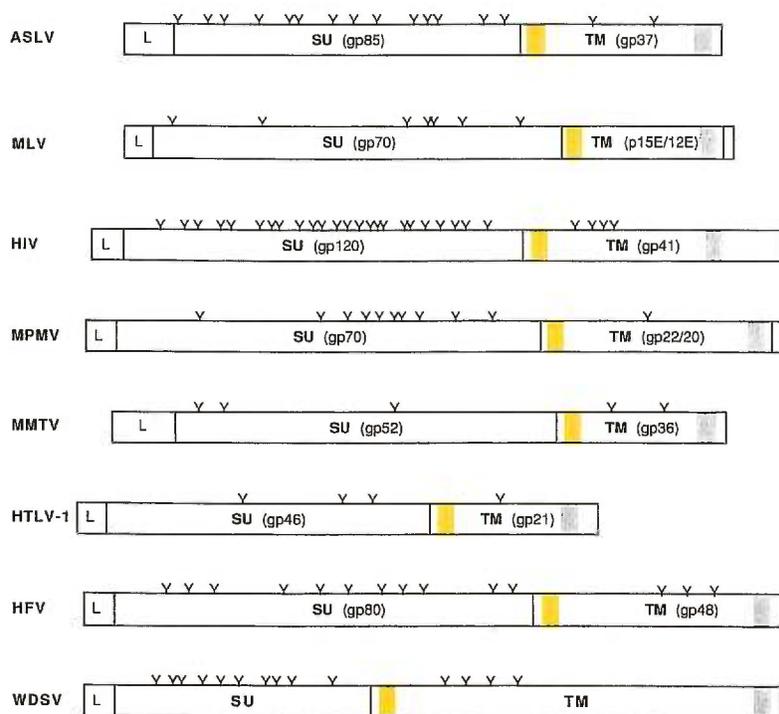
Comparaison des rétrovirus

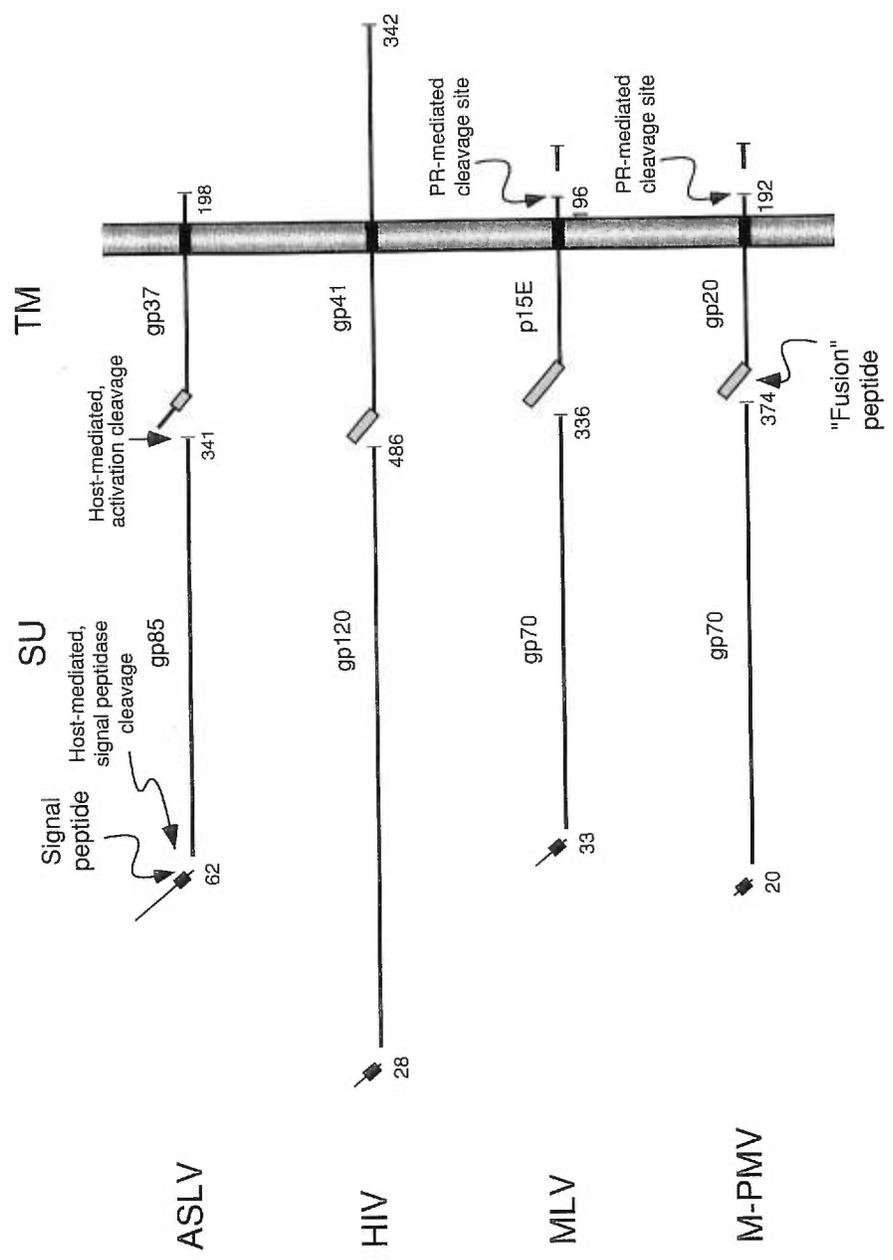
Pages 92 à 95

Figure 18: Structure du rétrovirus classique de type C (MuLV). Figure 19: Comparaison de l'organisation génétique des rétrovirus [avec, entre autres: HFV (Human Foamy virus) et WDSV (Walleye Dermal Sarcoma virus); voir *la liste des abréviations*]. Figure 20: Les glycoprotéines de rétrovirus: L=peptide signal; Y=glycosylation; région jaune=peptide fusion; région grise=domaine transmembranaire. On trouvera une représentation plus détaillée de quelques glycoprotéines à la figure 21. Toutes ces figures de: Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997): **Retroviruses**; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.









xénotropiques utilisent un récepteur qui est rare sur les cellules murines. Les virus amphotropiques infectent la vaste majorité des cellules murines et non-murines. Cependant, les virus amphotropiques n'interfèrent pas avec l'infection des virus dits polytropiques, qui ont un spectre d'infection aussi large. Le récepteur des virus écotropiques est un transporteur membranaire d'acides aminés basiques (Rec-1)⁵, tandis que le récepteur des virus amphotropiques est un transporteur membranaire de phosphate (Ram-1)³⁴². Ce sont tous les deux des protéines complexes à multiples domaines membranaires.

La protéine transmembranaire du MuLV n'est pas glycosylée. Sa partie cytoplasmique, longue d'une soixantaine d'acides aminés, est particulière car elle subit un clivage par la protéase virale pour produire les protéines p12E et le peptide R; ce dernier correspond aux 16 acides aminés carboxy-terminaux de la protéine⁴⁶. Ce phénomène est très important, car la présence du peptide R inhibe la formation de syncytiums, possiblement pour optimiser l'incorporation des glycoprotéines dans le virus.

6. Le projet de recherche: buts, hypothèses et développement de la problématique.

6.1 Cellules épithéliales et le VIH: interactions.

L'entrée des virus à l'intérieur des cellules polarisées nécessite l'interaction du virus avec son récepteur⁵¹⁹. Par exemple, le virus VSV infecte les cellules MDCK par la membrane basolatérale, alors le virus SV40 entre dans ces cellules par le domaine apical. D'autres virus peuvent infecter les cellules par les deux surfaces en utilisant deux récepteurs différents (HSV); le récepteur peut aussi être distribué de façon non-polarisée, comme c'est le cas du virus de l'influenza. La répartition polarisée des récepteurs viraux constitue un indice important sur le mode d'entrée du virus dans l'organisme. Le bourgeonnement polarisé d'un virus du domaine apical ou basolatéral de l'épithélium donne aussi une indication sur sa transmission vers les tissus de l'hôte et l'établissement des infections systémiques tel que déjà souligné dans le cas des travaux sur le virus Sendai et le développement d'une infection pantropique ou pneumotropique associé au phénotype de bourgeonnement du virus.

En leur qualité de barrières protectrices des organes envers le milieu externe³⁴⁷, les épithélia doivent souvent subir une infection virale pour que le virus puisse avoir accès à la circulation sanguine. Par exemple, les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées au niveau des muqueuses par lesquelles les réovirus et les poliovirus transitent en utilisant les voies de transcytose pour atteindre les tissus lymphoïdes sous-jacents³⁶³. Récemment, il a été démontré que le VIH pouvait aussi utiliser les voies de transcytose¹⁰, tout au moins *in vitro*, ce qui pourrait lui permettre d'accéder aux tissus sous-jacents aux épithélia³⁷.

L'infection expérimentale d'un chimpanzé par insémination artificielle ou transmission vaginale a été démontrée, et le VIS semble capable d'infecter le macaque sous ses conditions^{274, 489}. D'autres cellules associées aux épithélia, comme les cellules de Langerhans (dans les muqueuses génito-urinaires) ou de Peyer (dans l'épithélium rectal) seraient des cibles de choix pour le virus. Finalement, le VIH a été détecté à l'intérieur de nombreux organes d'individus infectés et est capable de réplication à l'intérieur des cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo*^{2, 81, 137, 138, 156, 354, 355, 375, 388, 498}. Cette réplication pourrait être associée à certains signes cliniques associés au SIDA par exemple au niveau intestinal^{266, 324}. Le bourgeonnement du domaine basolatéral des cellules épithéliales observé chez le virus de l'immunodéficience humaine (1 ou 2)^{18, 301} pourrait être d'une grande importance dans le contexte d'une transmission génito-urinaire ou intestinale.

Le domaine basolatéral est l'équivalent morphologique d'une région de contact entre membranes cellulaires. L'importance de ce phénomène dans la transmission du VIH, mais surtout du HTLV, pour la transmission virale optimale est d'ailleurs soupçonnée. Par exemple, le contact entre des monocytes ou lymphocytes infectés par le VIH ou du HTLV et une monocouche de cellules épithéliales facilite le transport des virus vers l'intérieur de l'épithélium^{42, 392, 403, 404}. La caractérisation d'un tel signal dans le domaine intracytoplasmique des glycoprotéines transmembranaires du VIH, du HTLV et du MuLV permettrait d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de transport, mais aussi sur l'importance du bourgeonnement polarisé pour ces virus.

6.2 Problématique du projet.

Le domaine intracytoplasmique de la gp41 a précédemment été identifié comme responsable du bourgeonnement basolatéral du VIH-1 dans les cellules épithéliales, et de même pour le VIH-2. Le travail sur la gp41 du VIH-1 a fait l'objet de mon mémoire de maîtrise et l'article en découlant est présenté en annexe de cette thèse. Le premier objectif de ce travail était donc de caractériser davantage le signal de transport polarisé du VIH. Etant donné l'existence de quatre tyrosines très conservés dans la partie intracytoplasmique de gp41 (VIH-1): (1) déterminer s'il existe un signal de transport basolatéral tyrosine-dépendant dans la partie cytoplasmique de gp41; (2) observer l'effet de la substitution d'une telle tyrosine sur l'incorporation des glycoprotéines et sur la cinétique de la multiplication virale et (3) l'effet de la substitution d'une telle tyrosine sur le potentiel infectieux du virus.

Le bourgeonnement du MuLV a précédemment été rapporté comme étant également vers le domaine basolatéral des cellules épithéliales. De plus, le HTLV se transmet de cellule à cellule beaucoup plus efficacement qu'en virus libre; étant donné l'analogie entre le domaine basolatéral et les régions de contact entre les membranes cellulaires, ceci suggérait aussi l'existence possible d'un signal de polarisation chez ce virus. La conservation d'un tel phénomène parmi plusieurs membres d'une même famille de virus pourrait aussi indiquer l'utilisation de mécanismes communs dans des étapes critiques de leur cycle viral et l'importance biologique du phénomène de polarisation du bourgeonnement viral. Le deuxième objectif du travail était donc: (1) déterminer, en utilisant la capacité des glycoprotéines de ces virus à s'incorporer dans le VIH, si elles possèdent un signal de transport basolatéral; (2) caractériser leur signal comme tyrosine dépendant ou non; (3) trouver si l'expression de glycoprotéines hétérologues au VIH assurent son bourgeonnement basolatéral en absence de la gp41.

Le bourgeonnement polarisé du VIH nécessite à la fois le transport des glycoprotéines Env au domaine basolatéral de la membrane plasmique, ainsi que leur incorporation à la particule virale. En parallèle avec les expériences portant sur le bourgeonnement polarisé du virus, la question de l'incorporation de la glycoprotéine a donc aussi été examinée. L'incorporation de la gp41 à

l'intérieur de rétrovirus hétérologues est inhibée par son long domaine cytoplasmique. Etant donné que l'élimination de ce domaine de la gp41 permet son insertion dans l'enveloppe du MuLV, il s'agissait de déterminer si les virus MuLV possédant l'Env du VIH peuvent non seulement changer de tropisme viral, mais cibler spécifiquement leur infection aux cellules CD4-positives dans une population mixte de lymphocytes du sang périphérique. Ce dernier aspect peut donc aussi avoir une importance pratique dans le développement de vecteurs rétroviraux ayant un tropisme similaire au VIH.

CHAPITRE 2:

ARTICLE 1

Cette étude de mutagénèse fait suite aux travaux que j'ai effectués lors de ma maîtrise sur l'identification du signal de transport basolatéral de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1. La substitution des tyrosines du domaine cytoplasmique de la gp41 a permis de révéler un signal moléculaire critique pour le transport ciblé des glycoprotéines et le bourgeonnement polarisé du VIH-1.

Ces observations ont fait l'objet d'une publication dans le journal de l'European Molecular Biology Organization (EMBO J.). Quoique j'aie effectué la majorité des expériences, il est à noter que M. Jean-Philippe Lalonde a effectué les cinétiques de réplication virale ainsi que les autres travaux illustrés à la fig. 6.

The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells

Robert Lodge¹, Jean-Philippe Lalonde¹,
Guy Lemay^{1,2} and Éric A. Cohen^{1,3}

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

³Corresponding author

Budding of retroviruses from polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) takes place specifically at the basolateral membrane surface. This sorting event is suspected to require a specific signal harbored by the viral envelope glycoprotein and it was previously shown that, as for most basolateral proteins, the intracytoplasmic domain plays a crucial role in this targeting phenomenon. It is well known that tyrosine-based motifs are a central element in basolateral targeting signals. In the present study, site-directed mutagenesis was used to generate conservative or non-conservative substitutions of each four intracytoplasmic tyrosines of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein. This approach revealed that the membrane-proximal tyrosine is essential to ensure both the basolateral localization of envelope glycoprotein and the basolateral targeting of HIV-1 virions. Substitutions of the membrane-proximal tyrosine did not appear to affect incorporation of envelope glycoprotein into the virions, as assayed by virion infectivity and protein content, nor its capability to ensure its role in viral infection, as determined by viral multiplication kinetics. Altogether, these results indicate that the intracytoplasmic domain of the HIV-1 envelope glycoprotein harbors a unique, tyrosine-based, basolateral targeting signal. Such a tyrosine-based targeting signal may play a fundamental role in HIV transmission and pathogenesis.

Keywords: basolateral signal/epithelial cells/human immunodeficiency virus/lentiviruses/protein targeting

Introduction

Maintaining the integrity of cellular architecture, through an asymmetrical distribution of surface and intracellular proteins, is essential to ensure that different cell types assume their role in tissue organization. Perhaps the best example of a specific subcellular distribution of plasma membrane proteins is observed at the surface of polarized epithelial cells (Simons and Fuller, 1985; Compans and Srinivas, 1991; Mellman *et al.*, 1993; Matter and Mellman, 1994). These cells are best known as essential building blocks of the intestinal wall lining, kidney tubules and various mucosal surfaces. In epithelial cells, two plasma membrane domains are clearly differentiated and exhibit

a distinct lipid and protein composition (Sargiacomo *et al.*, 1989; van Meer, 1993). The apical domain, often abundant with microvilli, faces the lumen of the organ; its surface harbors proteases and glycolytic enzymes, and houses most of the proteins involved in specialized functions. The basolateral domain is found below the tight junctions that link cells together to form a tight epithelium; in mucosal surfaces, this membrane is thus oriented toward the underlying extracellular matrix, cells or blood flow. The basolateral membrane mostly harbors proteins associated with cellular adsorption and housekeeping functions common to all cells.

The generation of different plasma membrane domains with the specific distribution of their proteins involves the sorting of these different proteins at the exit of the Golgi apparatus (Simons and Wandinger-Ness, 1990; Rodriguez-Boulan and Zurzolo, 1993). The exact nature of the hypothetical sorting signals still remains largely unknown. However, accumulating evidence points to the existence of distinct targeting signals on proteins destined to either the apical or basolateral membrane domain; in the absence of such signals, a roughly uniform distribution of the protein is generally observed at the cell surface (Wandinger-Ness *et al.*, 1990). In the last few years, tyrosine-based signals, especially in Y-X-X-aliphatic/aromatic consensus motifs, have been found in the intracytoplasmic domain of basolateral membrane proteins and associated with targeted protein delivery (Hunziker *et al.*, 1991; Matter *et al.*, 1992; Dagermont *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1993; Thomas and Roth, 1994; Höning and Hunziker, 1995; Ohno *et al.*, 1995). Interestingly, these tyrosine-based signals have also been found to be used as endocytosis signals (Hopkins, 1992; Prill *et al.*, 1993; Trowbridge *et al.*, 1993; Pytowski *et al.*, 1995).

Viral envelope glycoproteins are synthesized and transported by the normal cellular machinery, and it has long been recognized that they are good representative models for the study of intracellular protein transport pathways (Rodriguez-Boulan and Sabatini, 1978; Rodriguez-Boulan, 1983; Rodriguez-Boulan *et al.*, 1983; Tucker and Compans, 1993). Accordingly, different viruses have evolved mechanisms for the specific delivery of their envelope glycoproteins to one or the other membrane domains of polarized epithelial cells. Classical examples include the vesicular stomatitis virus G glycoprotein that harbors a critical intracytoplasmic tyrosine residue required for polarized basolateral targeting (Thomas *et al.*, 1993; Thomas and Roth, 1994). Likewise, addition of a tyrosine residue to the intracytoplasmic domain of the normally apical hemagglutinin envelope glycoprotein of influenza virus redirects this protein to the basolateral surface (Brewer and Roth, 1991). The targeting of viral envelope glycoproteins has important consequences in viral maturation and release: although capsid proteins

generally lack membrane domain targeting signals themselves, viral budding resulting in release of enveloped viruses specifically occurs through the membrane domain harboring an adequate envelope glycoprotein (Tucker and Compans, 1993).

In the case of human immunodeficiency virus (HIV-1), targeted viral release was shown to occur mainly through the basolateral membrane surface (Owens and Compans, 1989; Fantini *et al.*, 1991; Owens *et al.*, 1991). A specific basolateral release has also been previously suggested for another retrovirus, namely murine leukemia virus (Roth *et al.*, 1983; Kilpatrick *et al.*, 1988). More recently, we showed that targeting of HIV budding requires the intracytoplasmic portion of the envelope glycoprotein transmembrane moiety, gp41. Large carboxy-terminal deletions of this intracytoplasmic region severely impair polarized release of the virus, whereas smaller deletions have little or no effect (Gabuzda *et al.*, 1992b; Lodge *et al.*, 1994). The actual incorporation of the glycoproteins into the budding virions was also found to be essential, since alterations of the matrix protein precluding their incorporation into the viral particles also prevented targeting of viral budding (Dorfman *et al.*, 1994; Lodge *et al.*, 1994).

In the present study, we performed site-directed mutagenesis, individually substituting each of the intracytoplasmic tyrosine residues of the envelope glycoprotein of HIV-1. Non-conservative substitutions of the membrane-proximal tyrosine residue abolished basolateral targeting of both envelope glycoproteins and viral budding, but had no apparent effect on *in vitro* infectious potential of the resulting viruses. Such tyrosine-based basolateral signals may play a fundamental role in efficient urogenital transmission and pathogenesis of lentiviruses (Phillips and Bourinbaiair, 1992; Phillips *et al.*, 1994), promoting viral dissemination in the host and access to various sensitive cell types.

Results

Rationale for mutagenesis

Several viral and cellular membrane proteins have been shown to harbor tyrosine-based basolateral targeting determinants in their intracytoplasmic domains (Hunziker *et al.*, 1991; Matter *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993; Thomas and Roth, 1994). The HIV-1 gp41 transmembrane glycoprotein harbors four tyrosine residues in its 150 amino acid-long intracytoplasmic region, as shown in Figure 1A. These four residues are highly conserved between HIV-1 isolates; of the four, residues 712 and 768 are found in a Y-X-X-L context. Interestingly, different retroviral envelope glycoproteins also harbor one or more intracytoplasmic tyrosine residues in a similar context; and this is despite the fact that other retroviruses possess much shorter intracytoplasmic domains compared with HIV-1 (Figure 1B). We thus undertook this site-directed mutagenesis study in order to clarify the possible occurrence of a tyrosine-based basolateral targeting signal in HIV-1 envelope glycoproteins.

Substitution mutagenesis of the HIV envelope intracytoplasmic tyrosines

We used a technique of polymerase chain reaction (PCR) for the mutagenesis of an HIV-1 envelope gp160 plasmid

expression vector as described in Materials and methods. Using this technique, each tyrosine was substituted for a serine; such a substitution maintains the presence of an hydroxyl side chain at this position, but eliminates the aromatic ring and should thus be considered as a non-conservative substitution. The plasmid expression vectors encoding wild-type or mutant envelope glycoproteins were then introduced into polarized monolayers of MDCK cells in order to complement an envelope-defective proviral DNA as described in Materials and methods. This *trans*-complementation assay, performed by lipofection of confluent cells forming a tight monolayer on semi-permeable filters, was described previously (Lodge *et al.*, 1994). Released viral particles were then recovered in the upper chamber medium bathing the apical membrane or lower chamber medium bathing the basolateral membrane attached onto the semi-permeable filter. Recovered viral particles were then quantitated by a sensitive immunodetection method using an ELISA directed against the p24 viral capsid protein.

Substitution of the membrane-proximal tyrosine (Y712S) completely abolished the polarized basolateral release. The ratio of apically to basolaterally released virions was similar to the levels obtained with envelope-negative viruses. In contrast, substitution of either of the three other carboxy-terminal tyrosines (Y768S, Y795S, Y802S) maintained viral release exclusively basolateral (Figure 2A).

Further analysis of the tyrosine-dependent basolateral viral budding signal

To establish further the importance of tyrosine 712, we examined the effect of another non-conservative substitution to alanine (Y712A) as well as a conservative substitution for the aromatic amino acid, phenylalanine (Y712F). Furthermore, a proline residue found close to the tyrosine and well conserved among HIV viral isolates was changed for an alanine (P714A). This amino acid was chosen as a target for site-directed mutagenesis since it is known to promote the formation of β -turns and such a structure is suspected to play an important role as part of tyrosine-based targeting signals (Collawn *et al.*, 1990; Hopkins, 1992; Prill *et al.*, 1993; Trowbridge *et al.*, 1993; Pytowski *et al.*, 1995). When co-transfected in MDCK cells with the envelope-negative HIV proviral construct, the expression vector encoding the non-conservative Y712A substitution mutant did not rescue polarized budding of the virus. A significant amount of virus could also be detected in the apical-bathing medium of cells encoding the conservative Y712F mutant; however, viral release at the basolateral surface was still favored and it thus seems that this mutation does not completely eliminate the polarization signal (Figure 2B). Alanine substitution of the proline 714 residue abolished basolateral targeting and similar amounts of virus were released in both apical- and basolateral-bathing media. Taken together, these results indicate a critical role for an aromatic amino acid, preferably a tyrosine, in a membrane-proximal position and also suggest a role for a local secondary structure, namely a putative β -turn, in the targeting signal.

Plasma membrane distribution of the mutant envelope glycoprotein

The membrane targeting of envelope glycoproteins, rather than the polarized budding of viruses, was examined to

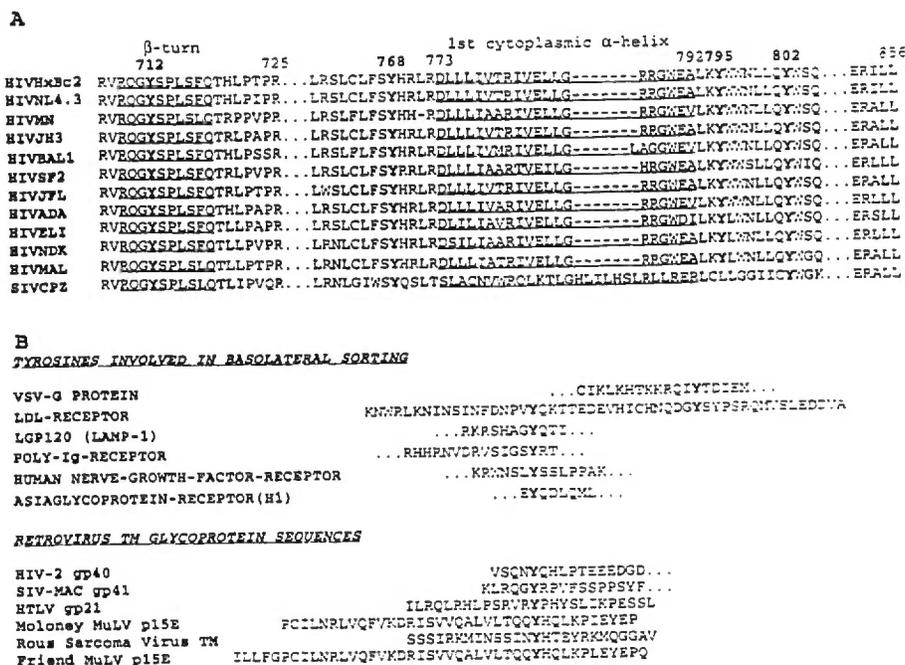


Fig. 1. (A) Conservation of tyrosine residues in the intracytoplasmic domain of various HIV or SIV Env glycoprotein isolates. Sequences surrounding the tyrosines are shown; gaps between the sequences are represented by dots. Predicted protein secondary structures are also included and amino acids are numbered from the first Met of gp160 (HXBc2). Single amino acid deletions are represented by a dash. (B) Positions of intracytoplasmic tyrosines in various retrovirus transmembrane (TM) glycoproteins. For comparative purposes, some known viral and cellular tyrosine-based basolateral signals are also included.

establish further the importance of the membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine in basolateral targeting of Env. Since the lipofection procedure on confluent MDCK cells was not sufficiently efficient to detect envelope protein expression *per se*, an alternate method was devised using virions pseudotyped with the vesicular stomatitis virus G envelope glycoprotein (VSV-G), since VSV is able to infect MDCK cells. Viruses having incorporated a mosaic of HIV-Env and VSV-G glycoproteins, or representing a VSV-G-containing and HIV-Env-containing heterogeneous viral population, were generated in transfected COS cells as described in Materials and methods. Immunoprecipitation of labeled pseudotyped viral particles with both a rabbit anti-VSV serum and a HIV-positive human serum clearly show the presence of gp120 and VSV-G glycoproteins (Figure 3A, lane 4). VSV-G-mediated infection allowed the transduction of wild-type or mutant HIV viral genomes by infection of MDCK cells with the pseudotyped viruses, allowing HIV-Env expression in a large amount of cells. Radiolabeling and surface immunoprecipitation were then performed by applying a monoclonal anti-gp120 antibody to either the apical or basolateral membrane compartments of filter-grown cells. The results of this experiment, shown in Figure 3B, confirmed that the wild-type glycoprotein is restricted to the basolateral surface, where virus budding occurs (compare lanes 5 and 8). Similarly, the presence of the Y712S mutant glycoprotein at both membrane surfaces (lanes 6 and 9) correlates with equivalent viral release

from both plasma membrane domains observed with this mutant. Immunoprecipitation of intracellular proteins with the same antibodies clearly shows that expression of wild-type Env and Y712S mutant glycoproteins was equivalent (lanes 2 and 3).

Effects of amino acid substitutions on glycoprotein incorporation into the virions

The intracytoplasmic tail has been shown to modulate various functions of retroviral glycoproteins. Viral envelope incorporation, glycoprotein cell surface expression, stability and infectious potential have all been shown to be altered by certain mutations in the intracytoplasmic domain of HIV gp41 (Dubay *et al.*, 1992; Gabuzda *et al.*, 1992b; Shimizu *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1993; Spies and Compans, 1994; Freed and Martin, 1995; LaBranche *et al.*, 1995). To achieve clear conclusions concerning the mutant glycoproteins, it was therefore necessary to ensure that these molecules are incorporated into the budding viral particles at a level comparable to the wild-type protein. This is especially important since it was previously demonstrated that actual incorporation of the envelope glycoprotein into the budding virion is required for the polarized release of the virus (Lodge *et al.*, 1994). In order to clarify this point for the different mutants, a *trans*-complementation infectivity assay was first performed using a reporter CAT gene (Helseth *et al.*, 1990). The envelope-negative proviral construct was modified to replace the non-essential *nef* gene by the CAT gene. This

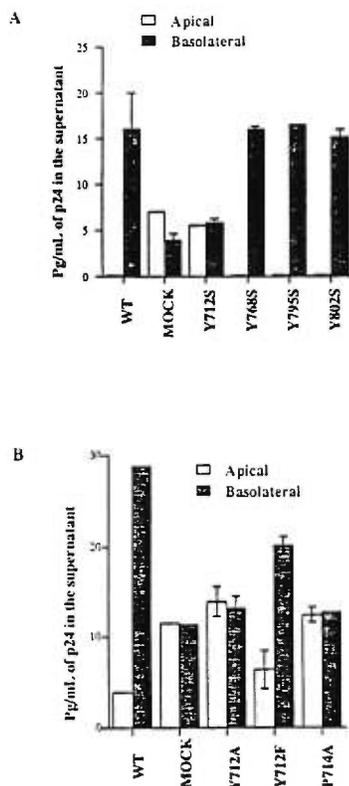


Fig. 2. (A) Effect of tyrosine-to-serine mutations in the gp41 intracytoplasmic domain on polarized virus release. The *env*-negative HXB110 proviral construct was co-transfected in equimolar amounts with plasmids encoding HIV wild-type (WT) or mutant (Y712S, Y768S, Y795S, Y802S) gp160 as described in the text. Apical and basolateral supernatants were harvested 48 h after lipofection, and p24 ELISA were performed as described in Materials and methods. (B) Effect of various substitutions (Y712A, Y712F) of the membrane-proximal gp41 intracytoplasmic tyrosine or a nearby proline (P714A). Viral release was detected as in (A). The mock results were obtained following introduction of *env*-negative proviral plasmid DNA alone and all results are presented as the average of separate values obtained from two separate lipofections plus or minus SD.

proviral construct was co-introduced with an expression plasmid for wild-type or either of the different mutant glycoproteins; MDCK cells grown in Petri dishes being used in these experiments. Identical amounts of recovered virus, as determined by RT (viral reverse transcriptase) measurement, was then used to infect susceptible CD4+ Jurkat lymphocytes and the resulting CAT activity was measured in the cell lysates, as described in Materials and methods. All HIV-1 glycoproteins harboring substitution mutations did confer the infectious potential to the envelope-negative CAT provirus (Figure 4). The capacity of the different envelope proteins to promote viral-mediated transfer of CAT activity is thus indicative of normal envelope incorporation into the virion and the capability to interact with the viral receptor to initiate infection. These results were also observed when viruses harboring mutant Y712S glycoprotein were recovered from apical or basolateral supernatants of cells grown on semi-permeable

membranes. Viruses from both apical and basolateral supernatants displayed similar ability to mediate CAT transfer, indicating that the Env glycoproteins incorporated into these viruses were functional (Figure 5A). This, again, clearly demonstrates that transport of the mutant glycoproteins themselves was no longer polarized and that virions can acquire the mutant Y712S envelope glycoprotein from either apical or basolateral cell surfaces. Furthermore, we directly confirmed that wild-type amounts of viral glycoproteins were present on virions released from both membrane surfaces in MDCK cells transfected with the Y712S mutant as determined by Western blot analysis (Figure 5B) and radioimmunoprecipitation of labeled viral particles (data not shown). Probing of the same nitrocellulose filter with the human HIV-positive serum detected similar amounts of major viral capsid protein p24 in the apical and basolateral supernatants of cells expressing the Y712S mutant, demonstrating that virions were recovered from both surfaces, while only basolateral virion-associated proteins were detected in the presence of wild-type envelope glycoprotein (data not shown).

Replication kinetics of mutant HIV viruses

In order to establish further that the mutant HIV envelope glycoproteins possess normal functional properties, appropriate mutations were introduced into an infectious proviral clone. The different proviral DNA constructs were then transfected into Jurkat CD4+ T cells and the kinetics of viral multiplication were followed through the measurement of reverse transcriptase activity in the supernatant (Figure 6B). Virus production was maximum at day 12 for the positive wild-type provirus control HXBc2. Similarly, all proviruses containing a substitution at tyrosine 712 (Y712S, Y712A, Y712F) or tyrosine 768 (Y768S, used as a control) exhibited equivalent levels of reverse transcriptase activity at day 12. These results indicate that there is no apparent loss of function in the *in vitro* replicative capacity of these proviruses containing substitutions in the tyrosine-based basolateral targeting signal. Furthermore, as determined by radioimmunoprecipitation of transfected Jurkat lymphocytes just before the peak of viral replication (day 12), expression levels of mutant viral glycoproteins, as well as their incorporation into the virion, were shown to be similar to the wild-type glycoprotein. This further establishes that defects in polarized release are not due to a deficient processing or incorporation of the mutant glycoproteins (Figure 6A).

Discussion

The identification of targeting signals resulting in polarized basolateral budding of HIV-1 is clearly an essential prerequisite for a better understanding of its interactions with epithelial cells. The intracytoplasmic domain of several basolateral membrane proteins has been shown to encompass the molecular determinants involved in their polarized transport (Hunziker *et al.*, 1991; Matter *et al.*, 1992; Geffen *et al.*, 1993). More recently, tyrosine-based basolateral targeting signals have been identified in the cellular polymeric immunoglobulin and LDL receptors as well as in the intracytoplasmic tail of the VSV-G (Figure 1B) (Casanova *et al.*, 1991; Aroeti *et al.*, 1993; Thomas *et al.*,

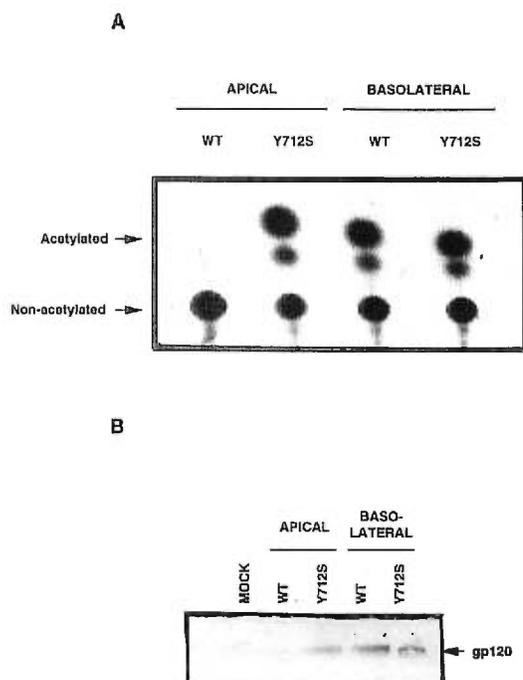
R.Lodge *et al.*

Fig. 5. (A) Infectivity of apical and basolateral viruses. The modified *env*-negative HIV proviral construct encompassing a reporter CAT gene was co-transfected in MDCK cells seeded on semi-permeable membranes, with an equimolar amount of wild-type or mutant *env*-expressing plasmids as described in Materials and methods. The apical or basolateral supernatants of three pooled transfected MDCK cell monolayers were used to infect Jurkat cells. CAT activity was measured 48 h after infection as described in Materials and methods, and analyzed by TLC followed by autoradiography. Positions of acetylated products and non-acetylated chloramphenicol substrate are indicated. (B) Western blot analysis was performed on viral pellets obtained by ultracentrifugation of either apical or basolateral cell-free pooled supernatants of three MDCK cell monolayers. The cells were transfected and viruses treated as in the viral polarized budding assay described in Materials and methods. Virus pellets were resuspended in RIPA and viral proteins separated on 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and incubated with the monoclonal antibody against gp120. Bound antibodies were then detected with horseradish peroxidase-linked anti-mouse immunoglobulin and revealed by using an enhanced chemiluminescence detection system, as described in Materials and methods. The position of gp120 is indicated by an arrow.

to the wild-type protein. This again supports the notion that the targeting signal responsible for HIV polarized budding resides in the envelope glycoprotein. These findings also clearly show that, in the presence of envelope glycoprotein, viral budding is restricted to this membrane surface due to Env-Gag protein interactions. Similarly to other published reports of tyrosine-based signals (Hopkins, 1992), conservative substitution for an aromatic phenylalanine residue had a somewhat less pronounced effect on basolateral targeting of viral budding. Also, the substitution of a nearby proline by an alanine impaired basolateral targeting, suggesting that the local conformation surrounding the tyrosine is also important to allow normal function of the signal. Based on similar tyrosine-dependent endocytosis signals (Collawn *et al.*, 1990; Hopkins, 1992;

Prill *et al.*, 1993; Trowbridge *et al.*, 1993; Pytowski *et al.*, 1995) and the helix-breaking character of the proximal proline, the best-fitting structure around the tyrosine residue would be similar to that of a β -turn conformation. This would also comply with a previous report indicating a potential overlapping endocytosis signal present in the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) and HIV TM glycoproteins and encompassing tyrosine 712 (LaBranche *et al.*, 1994, 1995; Rowell *et al.*, 1995; Sauter *et al.*, 1996). Such an overlapping between endocytosis and basolateral targeting signals was previously shown in other proteins (Hopkins, 1992; Prill *et al.*, 1993; Trowbridge *et al.*, 1993; Pytowski *et al.*, 1995). We showed previously that mutant gp41 glycoproteins harboring large deletions in the intracytoplasmic domain greatly impaired polarized budding of the virus, even though these deleted glycoproteins retained the membrane-proximal tyrosine (Lodge *et al.*, 1994). It is, therefore, most probable that important alterations, carboxy-terminal to the tyrosine-based signal, can also perturb the function of the tyrosine-based polarization signal.

The HIV envelope glycoprotein mutants altered in their polarization phenotype exhibited an identical efficiency in their ability to *trans*-complement the envelope-defective proviral mutant in the CAT infectivity assay. It should also be noted that we were able to obtain a reduction in the amount of CAT activity down to 20% of wild type, by reducing the amount of envelope-expressing plasmid, without any significant effect on the polarization phenotype (data not shown). Radioimmunoprecipitation and Western immunoblotting analysis confirmed the normal levels of mutant envelope glycoprotein incorporation. In addition, using proviral constructs, expression and processing of the mutant glycoproteins as well as their incorporation into virions were shown to be similar to wild type in infected CD4+ Jurkat cells. We can, therefore, clearly demonstrate the presence of the basolateral targeting signal independently from sequences mediating envelope incorporation and required for the infectious potential of the virus.

Although the viral envelope glycoprotein clearly harbors a targeting signal, it could not be excluded that other viral products participate in the phenomenon. HIV and other lentiviruses harbor genes encoding accessory proteins with various roles in viral replication and infectivity (Subbramanian and Cohen, 1994; Trono, 1995). The Nef, Vpr and Vif accessory viral proteins have been reported to be incorporated into the budding viral particle (Cohen *et al.*, 1990; Karczewski and Strebel, 1996; Welker *et al.*, 1996), whereas Vpu and Nef modulate surface expression of the viral envelope glycoprotein or the viral receptor (Willey *et al.*, 1992; Aiken *et al.*, 1994). In order to clarify a possible role of these proteins in HIV polarized budding, isogenic proviral constructs, encoding or lacking either one of the accessory proteins, were examined. None of these four proteins influenced polarized release of HIV, thus excluding any role of accessory viral products in basolateral targeting (results not shown).

Several studies have discussed the importance of epithelial cell infection in HIV pathogenesis (Bourinbaïar and Phillips, 1991; Fantini *et al.*, 1992; Phillips and Bourinbaïar, 1992; Tan *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1994). Such a polarized release of viruses may be important for

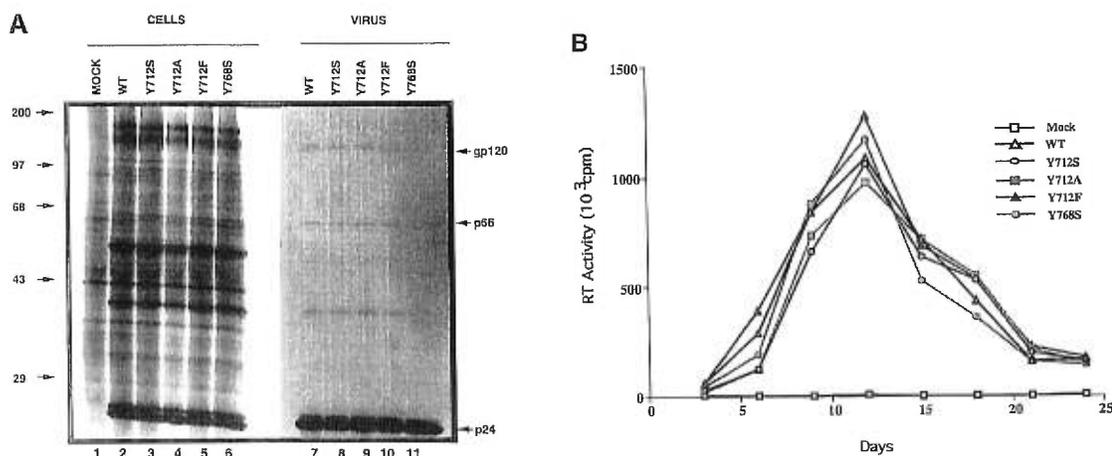


Fig. 6. (A) Detection of glycoproteins in the Jurkat-transfected cells and released virions. Jurkat cells were transfected with wild-type or various mutant provirus constructs as described in Materials and methods. Cells were subjected to metabolic labeling 12 days post-transfection with 150 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^{35}S]methionine for 5 h. Cell-free supernatants were harvested and cleared by ultracentrifugation; cells and viral pellets were then resuspended in RIPA lysis buffer. Viral proteins were immunoprecipitated with the HIV-positive human serum and resolved on a 10% SDS-PAGE gel. Labeled proteins were then revealed by autoradiography. Molecular weight markers are indicated. Virion-associated proteins are indicated by arrows. (B) Replication kinetics of mutant viruses. Aliquots of transfected Jurkat cell supernatants were recovered and analyzed for reverse transcriptase activity at different times post-transfection. Results are presented as trichloroacetic acid-precipitable values per 10^6 cells.

their dissemination in the host, as shown for a Sendai virus mutant whose pathology is strongly modified by alteration of the polarized budding phenotype (Tashiro *et al.*, 1990). Transmission of the HIV virus by direct cell-to-cell contact may increase the efficiency of viral spread and pathogenic potential; such regions of cell-to-cell contacts are considered to be somehow analogous to basolateral membrane surfaces since budding of basolaterally targeted viruses tends to occur at these intercellular contact zones (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1983). Accordingly, elegant electron microscope studies have shown a preponderant budding of HIV virions at contact sites between infected lymphocytes and cultured epithelial cells (Bugelski *et al.*, 1995). Budding of HIV has been observed preferentially in pseudopods of monocytes (Perotti *et al.*, 1996). Furthermore, the budding of HIV has been associated with cytoskeletal elements (Pearce-Pratt and Malamud, 1994; Fais *et al.*, 1995); cytoskeletal structures are strongly suspected of an involvement in establishing cellular differentiation in separate poles (Fath *et al.*, 1993).

Mutagenesis of intracytoplasmic tyrosine residues of two other retroviruses has been reported and gave rise to interesting observations consistent with the hypothesis that these residues may be critically involved in viral pathogenesis. In bovine leukemia virus, such a mutation affects the capability of the virus to disseminate in the organism (Willems *et al.*, 1995). In SIV, mutation of the membrane-proximal tyrosine results in the protein's more uniform distribution at the plasma membrane of infected cells (LaBranche *et al.*, 1995). This contrasts with the usual appearance of infected cells in which viral morphogenesis is usually restricted to one pole of the cell and suggests that the SIV membrane-proximal tyrosine may also be involved in a putative polarization signal. Mutations of the tyrosine affecting the overlapping endocytosis signal increase surface expression of the SIV glycoproteins and are associated with accelerated infection

kinetics (LaBranche *et al.*, 1994, 1995; Sauter *et al.*, 1996). Interestingly, these effects on viral replication were not observed for the HIV tyrosine substitutions, suggesting that other endocytosis signals may compensate for the loss of the tyrosine-based signal. Accordingly, these other endocytosis signals which are present in a full-length Env cytoplasmic tail would be absent from the much shorter Env cytoplasmic domain encoded by the SIV strain in the studies of Sauter *et al.* and LaBranche *et al.* Finally, although the role of this tyrosine-based sorting signal in *in vivo* infection remains unclear, a recent study reported that a membrane-proximal tyrosine to cysteine substitution may be linked to rapid CD4+ T-cell decline *in vivo*, as found in a HIV viral clone derived from a patient with an unusually high viral load at seroconversion (Gao *et al.*, 1996).

In conclusion, we have established the existence of a tyrosine-based signal in HIV glycoproteins that exhibits properties similar to the already described basolateral signal found on various viral and cellular membrane proteins. Although mutations of the critical membrane-proximal residue do not affect viral multiplication *in vitro*, the basolateral transport signal of the envelope glycoprotein, by mediating specific transport of HIV to distinct membrane domains, could play a critical role in HIV pathogenesis in its human host.

Materials and methods

Plasmid constructs

The HXBH10 proviral construct which contains a stop codon at the initiation site of the *env* gene and a frameshift at the *Kpn*I site (HXBH10 nucleotide position 5934; +1 = site of transcription initiation) in *env* has been described previously (HXBH10 env^{-}) (Terwilliger *et al.*, 1989a; Yao *et al.*, 1992). The HXBc2 proviral construct and pSVIII env plasmid have also been described previously (Fisher *et al.*, 1985; Ratner *et al.*, 1987; Gabuzda *et al.*, 1992b). pSVIII env is the *tat*-truncated, *rev* and *env*-expressing plasmid that was used as the HIV-1 wild-type or mutant

env-encoding plasmid throughout these experiments (Gabuzda *et al.*, 1992b). In order to ensure the total absence of Env protein, as in the *env*-negative proviral construct used in the polarization experiments, plasmid HXBH10CAT em^{-} (ATG-, *Kpn*I) was generated by cloning the *ApuI*-*Bam*HI fragment (nucleotide positions 1560 and 8058; +1 = site of transcription initiation) of HXBH10 em^{-} into pHXB Δem -CAT, a CAT-encoding proviral construct with a CAT gene cloned in *nef* (Terwilliger *et al.*, 1989b; Helseth *et al.*, 1990). The various isogenic proviral constructs were obtained as follows; *vpr*+/-: HxBRU and HxBRUR— with a stop codon at the initiation site of the *vpr* gene of HIV-BRU have been described elsewhere (Lavallée *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1995); *vpu*+/-: HXBH10 and HXBH10*vpu*-, were described previously (Yao *et al.*, 1992); *nef*+/-: pNL4.3-based pNLV102 and pNLV102 ΔXho , gifts of Dr S. Venkatesan, and described previously (Ahmad and Venkatesan, 1988); *vif*+/-: HXB2 and HXB2*vif*/stop, containing a frameshift in *vif* (Rainer *et al.*, 1987; Gabuzda *et al.*, 1992a), obtained from Dr Dana Gabuzda. Finally, plasmid SVCMV-VSV-G contains the *Eco*RI 1.6 kbp fragment of plasmid pMD.G (obtained from Dr D. Ory) under the early CMV promoter, and the SV40 virus origin of replication.

Site-directed mutagenesis in HIV gp41

Substitution of tyrosine 795 to serine was done using the unique site elimination site-directed mutagenesis procedure of Deng and Nickoloff (1992). The selection primer used to eliminate the unique *Sall* site in pSVIII em^{-} was 5'-GCTGCAGATCGATCGTTGCTT-3' and the mutagenic primer was 5'-CCCTCAAATCTTGGTGGGAATC-3', which also resulted in elimination of a *Ssp*I site. A megaprimer PCR-directed mutagenesis using Pfu polymerase (Stratagene) was used thereafter to generate the other substitution mutants (Upender *et al.*, 1995). Primer 5'-CTCTGTAGGTAGTTTGTCC-3' recognizes a non-HIV-related sequence 3' to the mutagenized sites and primer 5'-GCATCAAGCA-GCTCCAAGC-3' a sequence 5' to the mutagenized sites. In *env*, mutagenic primers used were: 5'-GCAGGGATCTTACCATTATCG-3' (for Y712S); 5'-CTCTTCAGCTCCACCGCTTG-3' (for Y768S); 5'-CTCCTACAGTCTTGGAGTCAG-3' (for Y802S); 5'-GCAGGG-ATTTACCAATTATCG-3' (for Y712F); 5'-GCAGGGAGCTTACC-ATTATCG-3' (for Y712A) and 5'-GCAGGGATATTCAGCAT-TATCGTTTCAG-3' (for P714A). The *Hind*III to *Xho*I (respectively HXB2 nucleotide positions 7683 and 8439; +1 = initiation of transcription) fragment of each PCR product was then cloned into pSVIII em^{-} . All mutants were sequenced and several clones tested to ensure proper mutagenesis and the absence of second-site mutations. Relevant mutated *env* fragments were recovered from the various pSVIII em^{-} -based vectors and subcloned into provirus construct HXB2.

Cell lines and antisera

The canine kidney polarized epithelial MDCK cell line and the SV40-transformed African green monkey kidney COS-7 cell line used in this study were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 8% fetal calf serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The Jurkat CD4+ human lymphoid cell line was maintained in RPMI-1640 containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (Cohen *et al.*, 1990). The HIV-1-positive human serum 162 used in this study has been previously described elsewhere (Lavallée *et al.*, 1994). The monoclonal anti-gp120 antibody 1001 and the rabbit VSV antiserum were obtained from American Bio-Technologies (ABT) and Dr Laurent Poliquin, respectively.

Viral polarized budding assay

Polarized budding of the viruses from MDCK cells was assayed as described previously, with modifications (Lodge *et al.*, 1994). Briefly, 10⁶ cells were seeded per 24.5 mm diameter chamber and grown for 2–3 days on semi-permeable 1 µm pore diameter filter membranes (Falcon No. 3102) in DMEM as described above. Polarization of the cell monolayer was tested by monitoring the electrical resistance between upper and lower chambers (Millicell-ERS resistance system, Millipore). Resistance across the monolayer was constantly above 550 ohms·cm² at the time of DNA transfection. Cells were washed with DMEM and 750 µl of DMEM containing 30 µl of prepared liposomes (Leventis and Silvius, 1990; Moulard *et al.*, 1994) were thoroughly mixed with 750 µl of DMEM containing 5 µg of DNA before pouring in the upper chamber over the cell monolayer. Medium was removed 24 h after lipofection, and cells were maintained in DMEM supplemented with serum and antibiotics. Media in the upper and lower chambers were harvested 48 h after lipofection, cellular debris removed by filtering through a 0.45 µm pore diameter filter (Millipore), and the filtrate ultracentrifuged at 30 000 r.p.m. in a Beckman 50.4 rotor for 1.5 h at 4°C. The pellet was

resuspended in 200 µl DMEM and p24 antigen was quantitated using an ELISA p24 kit (Coulter Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Incorporation of VSV-G in HIV virions

The lipofection procedure on confluent MDCK cell monolayers was not sufficiently efficient to detect the HIV glycoproteins. Therefore, an alternate method was used using HIV virions containing either wild-type or mutant Env and the G glycoprotein of VSV. In order to ensure that VSV-G is incorporated in HIV virions even in the presence of Env, 10⁶ COS cells were transfected with 10 µg of either proviral construct with or without 10 µg of SVCMV-VSV-G by the lipofection method (Leventis and Silvius, 1990; Moulard *et al.*, 1994). Cells were labeled 40 h after transfection with 150 µCi/ml of [³⁵S]methionine for 8 h. Supernatants were harvested and ultracentrifuged (30 000 r.p.m. for 1 h in a Beckman Ti50.4 rotor); viral pellets were then resuspended in RIPA lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 0.2% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. Viral proteins were immunoprecipitated with a mix of the HIV-positive human serum combined with the rabbit anti-VSV serum and loaded on a 10% SDS-PAGE gel as described previously (Yao *et al.*, 1995). Labeled proteins were then revealed by autoradiography.

Plasma membrane distribution of envelope glycoprotein

Wild-type or mutant HIV viruses having incorporated the VSV-G glycoprotein were generated as previously described in COS cells and harvested 40 h after transfection in 2 ml of DMEM supplemented with 8% FCS and filtered on 0.45 µm filters as described above. Identical volumes of cell-free supernatant containing the pseudotype viruses were then added for 8 h onto 10⁶ MDCK cells grown in 100 mm diameter Petri dishes. MDCK cells were then trypsinized and grown for 1–2 days on semi-permeable 1 µm pore diameter filter membranes as described above. After an 8 h labeling with 150 µCi/ml of [³⁵S]methionine (at the basolateral amino acid uptake surface), cells were extensively washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and treated for 4 h at 4°C, either at their apical or basolateral surface with the monoclonal anti-gp120 antibody. Cells were then washed, lysed with RIPA and added to protein A-Sepharose beads (Pharmacia). Intracellular proteins were obtained by immunoprecipitating the cell lysate supernatants of the surface protein immunoprecipitates with the same antibodies. Immunoprecipitation procedures were performed as previously described (Lavallée *et al.*, 1994). All immunocomplexes were separated on 10% SDS-PAGE and revealed by autoradiography.

Trans-complementation CAT infectivity assay

The trans-complementation assay used for determining the infectivity and efficient incorporation of either HIV wild-type or mutant Env glycoproteins has been described previously and was used with modifications (Terwilliger *et al.*, 1989b; Helseth *et al.*, 1990). Briefly, 5 µg of HXBH10CAT em^{-} (ATG-, *Kpn*I) and 5 µg of the various HIV *env*-expressing pSVIII em^{-} -based plasmids were co-transfected by lipofection into MDCK cells grown in 100 mm diameter tissue culture dishes or, alternatively, in cells seeded on semi-permeable membranes as described above. After 48 h transient expression, media were harvested, filtered on a 0.45 µm membrane and a 50 µl aliquot taken for a reverse transcriptase assay (Lee *et al.*, 1987). Typically, the equivalent of 10⁵ c.p.m. of the remaining supernatants was used to infect 10⁶ CD4+ Jurkat cells, maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% serum and 1% antibiotics. Alternatively, all of the apical or basolateral supernatants of three transfected MDCK cell monolayers on semi-permeable membranes were used to infect the Jurkat cells. After 48 h, lymphocytes were harvested and lysed; total protein yields were normalized (Bio-Rad Protein Assay) and a CAT assay performed on cell lysates (Gorman *et al.*, 1982; Leahy *et al.*, 1995). Acetylated and non-acetylated forms of [¹⁴C]chloramphenicol were separated by TLC and exposed on Kodak-XAR5 films. Quantitation of acetylated chloramphenicol over total chloramphenicol was carried out on a Molecular Dynamics personal laser densitometer.

Western blot analysis

In order to determine further Env protein incorporation in apically or basolaterally released virions, Western blot analysis was performed on viral pellets obtained from ultracentrifugation (as described above) of three pooled MDCK cell monolayer apical or basolateral supernatants. The cells were transfected and viruses treated as in the viral polarized budding assay described above. Virus pellets were resuspended in

RIPA and viral proteins separated by 10% SDS-PAGE. Following electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose (0.45 µm pore size; Schleicher and Schuell) by electroblotting overnight at 20 V in a Bio-Rad Trans Blot Cell. Blots were incubated for 1 h in blocking buffer [Tris-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween-20 and 2% non-fat dry milk] and incubated with the monoclonal antibody against gp120 for 1 h at a dilution of 1:1500. Bound antibodies were then probed with horseradish peroxidase-linked anti-mouse immunoglobulin (used at 1:1500), washed extensively and developed by using a sensitive enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit, Amersham Corp.). The blots were swapped with swapping solution [100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7)], washed extensively and treated first with the HIV-positive human serum (at 1:2000) and then probed with a horseradish peroxidase-linked anti-human immunoglobulin (used at 1:1500) as described previously to detect virion capsid proteins.

Viral replication kinetics

Proviral DNA constructs (15 µg) were transfected in Jurkat cells using the standard DEAE-dextran technique (Terwilliger *et al.*, 1989a; Yao *et al.*, 1995). Cells were recovered by centrifugation 3 days post-transfection and seeded in fresh medium at a concentration of 10⁶ viable cells/ml; the same procedure was repeated each 3 days. Cell supernatants were analyzed for the presence of virus by performing standard reverse transcriptase assays on 50 µl aliquots (Lee *et al.*, 1987).

Prior to the peak of viral replication, 5 × 10⁶ cells were labeled on day 12 post-transfection with 150 µCi/ml of [³⁵S]methionine for 5 h. Supernatants were harvested and ultracentrifuged (30 000 r.p.m. for 1 h in a Beckman T150.4 rotor); cells and viral pellets were then resuspended in RIPA lysis buffer. Viral proteins were immunoprecipitated with the HIV-positive human serum and loaded on a 10% SDS-PAGE gel as described previously (Yao *et al.*, 1995). Labeled proteins were then revealed by autoradiography. Quantitation of Env glycoprotein bands was performed on a Molecular Dynamics phosphorimager.

Acknowledgements

We thank Nash G. Daniel, Dr Xiaofan Yao (Université de Montréal, Montréal, Québec) and Dr David Sanders (Purdue University, West Lafayette, IN) for their input and helpful discussions. We must also thank Dr D. Ory (Washington University, St Louis, MO) and Richard Mulligan (Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, MA) for the VSV-G plasmid, Dr Laurent Poliquin (Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec) for the anti-VSV serum, and Drs Dana Gabuzda and Joseph Sodroski (Division of Human Retrovirology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) for their generous gifts of the *vif*-negative proviral construct and the pHBΔ_{env}-CAT provirus, respectively. We also thank Dr S. Venkatesan (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for his gift of plasmids pNLV102 and pNLV102ΔX_{ho}. This work was supported by a National Health Research Development Program (NHRDP)/MIRC grant to G.L. and É.A.C., as well as a FCAR group grant to É.A.C. and G.L. R.L. is the recipient of a NHRDP/MIRC studentship. G.L. is the recipient of a Chercheur-boursier award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and É.A.C. is the recipient of a NHRDP/AIDS career award.

References

Ahmad, N. and Venkatesan, S. (1988) Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, **241**, 1481–1485.

Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E. and Trono, D. (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, **76**, 853–864.

Aroeti, B., Kosen, P.A., Kuntz, I.P., Cohe, F.E. and Mostov, K.E. (1993) Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Cell Biol.*, **128**, 1149–1160.

Bourinbaïar, A.S. and Phillips, D.M. (1991) Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. AIDS*, **4**, 56–63.

Brewer, C.B. and Roth, M.G. (1991) A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.*, **114**, 413–421.

Bugelski, P.J., Maleeff, B.E., Klinkner, A.M., Ventre, J. and Hart, T.K. (1995) Ultrastructural evidence of an interaction between env and gag

proteins during assembly of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **11**, 55–64.

Casanova, J.E., Apodaca, G. and Mostov, K.E. (1991) An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell*, **66**, 65–75.

Cohen, É.A., Dehni, G., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1990) Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.*, **64**, 3097–3099.

Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I.S. and Tainer, J.A. (1990) Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, **63**, 1061–1072.

Compans, R.W. and Srinivasan, R.V. (1991) Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **170**, 141–181.

Dagermont, C., Le Bivic, A., Rothemberger, S., Iacopetta, B. and Kuhn, L.C. (1993) The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.*, **12**, 1713–1721.

Deng, W.P. and Nickoloff, J.A. (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.*, **200**, 81–88.

Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A. and Güttinger, H.G. (1994) Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.*, **68**, 1689–1696.

Dubay, J.W., Roberts, S.J., Hahn, B.H. and Hunter, E. (1992) Truncation of the human immunodeficiency virus type-1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.*, **66**, 6616–6625.

Fais, S., Capobianchi, M.R., Abbate, L., Castilletti, C., Gentile, M., Cordiali Fei, P., Ameglio, F. and Dianzani, F. (1995) Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with copolarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *J. AIDS*, **9**, 329–335.

Fantini, J., Baghdiguian, S., Yahi, N. and Chermann, J.-C. (1991) Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology*, **185**, 904–907.

Fantini, J., Yahi, N., Baghdiguian, S. and Chermann, J.-C. (1992) Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J. Virol.*, **66**, 580–585.

Fath, K.R., Mamajiwala, S.N. and Burgess, D.R. (1993) The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *J. Cell Sci., Suppl.*, **17**, 65–73.

Fisher, A.G., Collalti, E., Ramer, L., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1985) A molecular clone of HTLV-III with biological activity. *Nature*, **316**, 262–265.

Freed, E.D. and Martin, M.A. (1995) Virion incorporation with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.*, **69**, 1984–1989.

Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A. and Sodroski, J. (1992a) Role of *vif* in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.*, **66**, 6489–6495.

Gabuzda, D.H., Lever, A., Terwilliger, E. and Sodroski, J. (1992b) Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.*, **66**, 3306–3315.

Gao, F. *et al.* (1996) Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J. Virol.*, **70**, 1651–1667.

Gelfin, J., Fuhrer, C., Leitinger, B., Weiss, M., Huggel, K., Griffiths, G. and Spiess, M. (1993) Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20772–20777.

Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1044–1051.

Helseth, E., Kowalski, M., Gabuzda, D., Olshevsky, U., Haseltine, W. and Sodroski, J. (1990) Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J. Virol.*, **64**, 2416–2420.

Höning, S. and Hunziker, W. (1995) Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (Iamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.*, **128**, 321–330.

- Hopkins, C. (1992) Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 27–32.
- Hunziker, W. and Fumey, C. (1994) A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.*, **13**, 2963–2969.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K. and Mellman, J. (1991) Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell*, **66**, 907–920.
- Karczewski, M.K. and Strebler, K. (1996) Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 vif protein. *J. Virol.*, **70**, 494–507.
- Kilpatrick, D.R., Srinivas, R.V. and Compans, R.W. (1988) Expression of the spleen focus-forming virus envelope gene in a polarized epithelial cell line. *Virology*, **164**, 547–550.
- LaBranche, C.C., Sauter, M.M., Haggarty, B.S., Vance, P.J., Romano, J., Hart, T.K., Bugelski, P.J. and Hoxie, J.A. (1994) Biological, molecular and structural analysis of a cytopathic variant of a molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Virol.*, **68**, 5509–5522.
- LaBranche, C.C., Sauter, M.M., Haggarty, B.S., Vance, P.J., Romano, J., Hart, T.K., Bugelski, P.J., Marsh, M. and Hoxie, J.A. (1995) A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.*, **69**, 5217–5227.
- Lavallée, C., Yao, X.J., Latha, A., Göttlinger, H., Haseltine, W.A. and Cohen, É.A. (1994) Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.*, **68**, 1926–1934.
- Leahy, P., Carmichael, G.G. and Rossomando, E.F. (1995) Effects of ethanol concentration and incubation period at 65°C on Cat activity in mammalian cell extracts. *Biotechniques*, **19**, 894.
- Lee, M.H., Sano, K., Morales, F.E. and Imagawa, D.T. (1987) Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1717–1721.
- Leventis, R. and Silvius, J.R. (1990) Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 124–132.
- Lodge, R., Göttlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, É.A. and Lemay, G. (1994) The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.*, **68**, 4857–4861.
- Matter, K. and Mellman, J. (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 545–554.
- Matter, K., Hunziker, W. and Mellman, J. (1992) Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*, **71**, 741–753.
- Mellman, J., Yamamoto, E., Whitney, J.A., Kim, M., Hunziker, W. and Matter, K. (1993) Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *J. Cell Sci.*, **17**, 1–7.
- Mouland, A.J., Bevan, S., White, J.H. and Hendy, G.N. (1994) Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *J. Biol. Chem.*, **269**, 6918–6926.
- Ohno, H. et al. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, **269**, 1872–1875.
- Owens, R.J. and Compans, R.W. (1989) Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.*, **63**, 978–982.
- Owens, R.J., Dubay, J.W., Hunter, E. and Compans, R.W. (1991) Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 3987–3991.
- Pearce-Pratt, R. and Malamud, D. (1994) Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, **68**, 2898–2905.
- Perotti, M.E., Tan, X. and Phillips, D.M. (1996) Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes. *J. Virol.*, **70**, 5916–5921.
- Phillips, D.M. and Bourinbaier, A.S. (1992) Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology*, **186**, 261–273.
- Phillips, D.M., Zacharopoulos, V.R., Tan, X. and Pearce-Pratt, R. (1994) Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia. *Trends Microbiol.*, **2**, 454–458.
- Prill, V., Lehmann, L., von Figura, K. and Peters, C. (1993) The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.*, **12**, 2181–2193.
- Pytkowski, B., Judge, T.W. and McGraw, T.E. (1995) An internalization motif is created in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor by substitution of a tyrosine at the first position of a predicted tight turn. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9067–9073.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L.L., Mitsuya, H., Liou, R.S., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1987) Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Rev. Hum. Retrovir.*, **3**, 57–69.
- Ritter, G.D., Mulligan, M.J., Lydy, S.L. and Compans, R.W. (1993) Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology*, **197**, 255–264.
- Rodriguez-Boulan, E. (1983) Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Mod. Cell Biol.*, **1**, 119–170.
- Rodriguez-Boulan, E. and Sabatini, D.D. (1978) Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 5071–5075.
- Rodriguez-Boulan, E. and Zurzolo, C. (1993) Polarity signals in epithelial cells. *J. Cell Sci., Suppl.*, **17**, 9–12.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K.T. and Sabatini, D.D. (1983) Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J. Cell Biol.*, **96**, 866–874.
- Roth, M.G., Srinivas, R.V. and Compans, R.W. (1983) Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells. *J. Virol.*, **45**, 1065–1073.
- Rowell, J.F., Stanhope, P.E. and Siliciano, R.F. (1995) Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.*, **155**, 473–488.
- Sargiacomo, M., Lisanti, M., Graeve, L., LeBivic, A. and Rodriguez-Boulan, E. (1989) Integral and peripheral protein composition of the apical and basolateral membrane domains in MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, **107**, 277–286.
- Sauter, M.M. et al. (1996) An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.*, **132**, 795–811.
- Shimizu, H., Hasebe, F., Tsuchie, H., Morikawa, S., Ushijima, H. and Kitamura, T. (1992) Analysis of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a truncated transmembrane glycoprotein. *Virology*, **189**, 534–546.
- Simons, K. and Fuller, S.D. (1985) Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 243–288.
- Simons, K. and Wandinger-Ness, A. (1990) Polarized sorting in epithelia. *Cell*, **62**, 207–210.
- Spies, C.P. and Compans, R.W. (1994) Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology*, **203**, 8–19.
- Subbramanian, R.A. and Cohen, É.A. (1994) Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.*, **68**, 6831–6835.
- Tan, X., Pearce-Pratt, R. and Phillips, D.M. (1993) Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J. Virol.*, **67**, 6447–6452.
- Tashiro, M., Yamakawa, M., Tobita, K., Seto, J.T., Klenk, H.-D. and Rott, R. (1990) Altered budding site of a pantropic mutant of Sendai virus, FI-R, in polarized epithelial cells. *J. Virol.*, **64**, 4672–4677.
- Terwilliger, E.F., Cohen, É.A., Lu, Y.C., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1989a) Functional role of human immunodeficiency virus type 1 Vpu. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 5163–5167.
- Terwilliger, E.F., Godin, B., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1989b) Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that expresses the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 3857–3861.
- Thomas, D.C. and Roth, M.G. (1994) The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence by having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15732–15739.
- Thomas, D.C., Brewer, C.B. and Roth, M.G. (1993) Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3313–3320.
- Trono, D. (1995) HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell*, **82**, 189–192.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F. and Hopkins, C.R. (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 129–161.

- Tucker,S.P. and Compans,R.W. (1993) Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.*, **42**, 187-247.
- Upender,M., Raj,L. and Weir,M. (1995) Megaprimer method for *in vitro* mutagenesis using parallel templates. *Biotechniques*, **18**, 29-32.
- van Meer,G. (1993) Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 661-673.
- Wandinger-Ness,A., Bennett,M.K., Antony,C. and Simons,K. (1990) Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.*, **111**, 987-1000.
- Welker,R., Kottler,H., Kalbitzer,H.R. and Krausslich,H.G. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the virus proteinase. *Virology*, **219**, 228-236.
- Willems,L., Gatot,J.S., Mummericks,M., Portetelle,D., Burny,A., Kerkhofs,P. and Kettmann,R. (1995) The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for *in vivo* infection and maintenance of high viral loads. *J. Virol.*, **69**, 4137-4141.
- Willey,R.L., Maldarelli,F., Martin,M.A. and Strebel,K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.*, **66**, 226-234.
- Yao,X.J., Göttlinger,H., Haseltine,W.A. and Cohen,E.A. (1992) Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.*, **66**, 5119-5126.
- Yao,X.J., Subramanian,R.A., Rougeau,N., Boisvert,F., Bergeron,D. and Cohen,E.A. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.*, **69**, 7032-7044.

Received on May 31, 1996; revised on November 5, 1996

CHAPITRE 3:

ARTICLE 2

Des observations préliminaires, en utilisant des glycoprotéines tronquées des virus HTLV et MuLV, proposaient que le signal de polarisation retrouvé dans la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 n'était pas un phénomène unique au VIH chez les retrovirus. Une collaboration avec les équipes du Dr Marie-Christine Dokh lar (Institut Cochin, Paris, France) et du Dr David A. Sanders (Purdue University, West LaFayette, IN, USA) nous a permis d'obtenir des glycoprotéines de HTLV et de MuLV possédant des substitutions de leurs tyrosines du domaine cytoplasmique. Le but de cette étude consistait à déterminer si le facteur impliqué dans le transport polarisé des glycoprotéines de HTLV et MuLV était aussi un signal à base de tyrosine.

En plus de la participation des équipes française et américaine, la contribution de M. Jean-Philippe Lalonde, au niveau de la mise au point des essais CAT, doit être soulignée. Cependant, toutes les figures présentées dans ce chapitre sont le résultat d'expériences que j'ai effectuées et analysées. Elles ont fait l'objet de cette publication dans le Journal of Virology.

Two Distinct Oncornaviruses Harbor an Intracytoplasmic Tyrosine-Based Basolateral Targeting Signal in Their Viral Envelope Glycoprotein

ROBERT LODGE,¹ LÉLIA DELAMARRE,² JEAN-PHILIPPE LALONDE,^{1,3} JOHNJEFF ALVARADO,⁴
DAVID A. SANDERS,² MARIE-CHRISTINE DOKHÉLAR,² ÉRIC A. COHEN,¹ AND GUY LEMAY^{1,3*}

Département de Microbiologie et Immunologie¹ and Groupe de Recherche en Transport Membranaire,³ Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 75014 Paris, France²; and Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907⁴

Received 15 January 1997; Accepted 10 April 1997

It has been clearly established that the budding of the human immunodeficiency virus (HIV-1), a lentivirus, occurs specifically through the basolateral membrane in polarized epithelial cells. More recently, the signal was assigned to a tyrosine-based motif located in the intracytoplasmic domain of the envelope glycoprotein, as previously observed on various other viral and cellular basolateral proteins. In the present study, expression of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) or Moloney murine leukemia virus envelope glycoproteins was used for *trans*-complementation of an envelope-negative HIV-1. This demonstrated the potential of oncornaviral retrovirus envelope glycoproteins to confer polarized basolateral budding in epithelial Madin-Darby canine kidney cells (MDCK cells). Site-directed mutagenesis confirmed the importance of a common motif encompassing at least one crucial membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue. The conservation of a similar basolateral maturation signal in different retroviruses further supports its importance in the biology of this group of viruses.

Release of enveloped viruses often occurs at specific membrane domains in polarized epithelial cells exhibiting clear differentiation of their membrane surfaces into apical and basolateral domains. It has been observed that retroviral envelope glycoproteins are targeted to the basolateral membrane domain in such cells; as a result, viral release is also restricted to this cell surface (9, 21, 36, 37, 48). Initial observations have been made with murine retroviruses, but detailed analysis has been performed only in the last few years with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), which belongs to the *Lentivirinae* subfamily of retroviruses (29, 30). In those studies, it has been established that only the viral envelope glycoprotein (Env) harbors the targeting signal. Furthermore, incorporation of the envelope glycoprotein into the virions is essential to ensure targeting of viral budding; mutations of the viral matrix protein preventing envelope incorporation abolish targeting of viral budding (29). Furthermore, it was clearly shown that alteration of basolateral targeting of the viral envelope glycoprotein does not necessarily preclude its incorporation to the viral particle (30). Retroviruses are peculiar in their budding mechanism in the sense that the presence of envelope glycoprotein is not required for viral budding and release; however, viruses harboring a lipid envelope devoid of envelope glycoprotein are noninfectious (13, 49, 52, 56).

In the last few years, basolateral targeting signals involving crucial tyrosine residues have been found in intracytoplasmic regions of proteins destined for the basolateral domain of epithelial cells. Tyrosine-based basolateral signals were most frequently reported for different viral and cellular proteins, although alternative signals, including dileucine motifs, have also been observed (4, 18, 20, 32, 34, 61, 62). The intracyto-

plasmic tyrosine-based basolateral signals are also clearly related to endocytosis signals; the neighboring structure may well affect the ability of otherwise similar signals to act either as endocytic or basolateral signals (19, 42, 43, 63). The most common consensus motif observed in basolateral and endocytosis signals is Y-X-X-aliphatic/aromatic and, accordingly, the membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue in the HIV envelope glycoprotein is found in such a consensus (30).

The polarization signal of the membrane glycoprotein of HIV-1 was found to be part of the intracytoplasmic domain, and the membrane-proximal tyrosine was recently shown to be essential (30). Different amino acid substitutions for this crucial tyrosine residue eliminate the basolateral targeting (non-conservative substitutions) or reduce its efficiency (a conservative tyrosine-to-phenylalanine substitution): as a result, viruses are released bidirectionally from both the apical and the basolateral membrane surfaces as observed in the complete absence of viral envelope glycoprotein. The three other tyrosines in the intracytoplasmic region of the protein were clearly dispensable for basolateral polarized targeting (29, 30); their non-conservative replacement with a serine had no effect on the polarization phenotype. Local structural determinants are also likely to be involved since replacement of a proline residue near the membrane-proximal tyrosine abolishes the polarized budding of HIV-1.

Important amino acid residues or motifs involved in protein function are often revealed through sequence comparisons of proteins exhibiting similar biological properties. Envelope glycoproteins from other retroviruses, in addition to HIV-1, were also examined to determine if they harbor putative tyrosine-based basolateral targeting signals. This point also presents a further interest since most retroviruses possess much shorter intracytoplasmic domains than HIV-1 (30). Interestingly, sequence comparisons between intracytoplasmic domains of many different retroviruses showed the presence of at least one tyrosine residue in an adequate Y-X-X-aliphatic/aromatic con-

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station centre-ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-2422. Fax: (514) 343-5701. E-mail: lemay@ere.umontreal.ca.

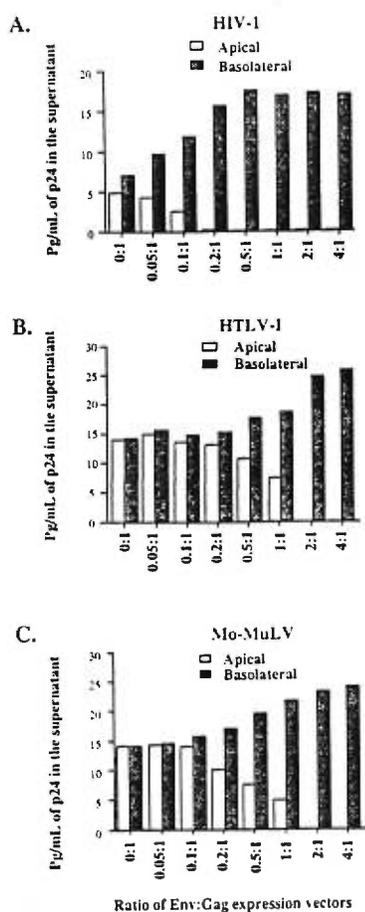


FIG. 1. Effect of retroviral glycoproteins on polarized HIV release. MDCK cells were grown on semipermeable filters (2.5-cm diameter; 1- μ m pore size) and then cotransfected with Env-negative HIV proviral DNA (0.5 μ g) and various amounts of plasmids encoding the envelope glycoprotein from either HIV-1 (A), HTLV-1 (B), or Mo-MuLV (C). In each case, the total amount of DNA was kept constant at 5 μ g by addition of vector plasmid DNA. Transfections were performed by lipofection as previously described (30), and supernatants were harvested from the apical and basolateral compartments 48 h after DNA introduction. Virus release was quantitated by p24 ELISA. Ratios refer to the amount, in each cotransfection, of Env-encoding plasmid relative to that of HIV Env-negative proviral DNA encoding Gag. Results are the means of two independent experiments, which differed by less than 10%.

pression assay (results not shown). We rather suspect a lower efficiency of heterologous Env incorporation into the viral particle. This may be due to lower efficiency of incorporation per se or indirectly to lower translational efficiency or stability of these glycoproteins, although this point was not further examined. However, it is quite clear that both HTLV-1 and Mo-MuLV envelope glycoproteins possess a basolateral targeting signal that can allow them to substitute for the HIV-1 envelope and promote basolateral maturation of the pseudotyped viruses.

Mutant envelope glycoproteins were next examined in order to confirm the presence of a distinct basolateral targeting sig-

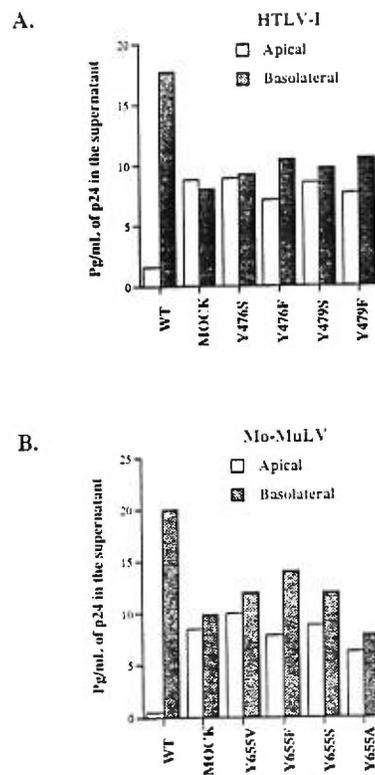


FIG. 3. Effect of HTLV-1 or Mo-MuLV glycoprotein intracytoplasmic tyrosine substitutions on HIV polarized release. Env-negative proviral DNA (0.5 μ g) was transfected in filter-grown MDCK cells with an eightfold excess of plasmids encoding the wild-type (WT) or the mutated envelope glycoprotein from either virus. Transfections were performed by lipofection as previously described, and supernatants were harvested from the apical and basolateral compartments 48 h after DNA introduction. Virus release was quantitated by p24 ELISA. Mock transfections were done with HIV Env-negative proviral DNA alone. Results are the means of two independent experiments, which differed by less than 10%.

nal on these glycoproteins. Basolateral tyrosine-based signals are often found in the intracytoplasmic domain, and this was shown to be the case for HIV (30). Since preliminary data obtained with deletion mutants also supported the importance of the intracytoplasmic domain in both HTLV-1 and Mo-MuLV (data not shown), we targeted this region for site-directed mutagenesis analysis. Tyrosine residues were thus individually examined in both the HTLV-1 and Mo-MuLV intracytoplasmic envelope glycoprotein region. Briefly, for the HTLV-1 mutants, the HTLV-1 fragment of the CR strain (35) was cloned in phagemid pGEM7ZF+, oligonucleotide-directed mutagenesis was performed (22), and the mutated DNA was cloned back into the Env-expressing plasmid (5, 6). Mo-MuLV Env substitutions were introduced by using degenerate double-stranded oligonucleotides cloned into the Mo-MuLV pLTRSDSA Env expression vector (28).

In HTLV-1, replacement of either tyrosine by serine (Y476S or Y479S) drastically affected HTLV-1 envelope-mediated polarized release of pseudotyped virions (Fig. 3A); similar amounts of viruses were found to bud from both the apical and the basolateral plasma membrane domains. An eightfold ex-

cess of the mutant Env-encoding plasmid, more than sufficient for optimal polarization with the wild-type protein, was used in these experiments. Conservative replacement of tyrosine by phenylalanine produced somewhat unexpected results, since neither substitution (Y476F or Y479F) resulted in the partial polarization phenotype previously observed with a similar substitution in the HIV glycoprotein. In the Mo-MuLV envelope, a deletion eliminating the tyrosine closest to the carboxy-terminal end did not affect the polarization phenotype (results not shown). In contrast, replacement of the membrane-proximal tyrosine by either valine, serine, or alanine essentially abolished the polarization. The phenylalanine substitution produced a somewhat intermediate phenotype as previously observed in HIV-1 (30).

Altogether, these data suggested that in both HTLV-1 and Mo-MuLV, as also previously described for HIV, intracytoplasmic tyrosine residues play a crucial role as basolateral targeting determinants. Further characterization was required to better support this idea, since the intracytoplasmic tail has been shown to modulate various functions of retroviral glycoproteins: viral envelope incorporation, glycoprotein cell surface expression, stability, and infectious potential have all been shown to be altered by certain substitutions in the intracytoplasmic domain (7, 8, 11, 12, 16, 23, 41, 44-46, 54, 58). To reach clear conclusions concerning the mutant glycoproteins, it was therefore necessary to ensure that these molecules are incorporated into the budding viral particles at a level comparable to that of the wild-type protein. This is especially important since, as previously mentioned, actual incorporation of the envelope glycoprotein into the budding virion is required for the polarized release of the virus (29). In order to clarify this point for the different mutants, an infectivity assay was performed using a reporter *CAT* gene. The envelope-negative HIV proviral construct was modified in order to replace the nonessential *nef* gene with the *CAT* gene (17, 60). This proviral construct was cotransfected into MDCK cells with an expression plasmid for wild-type glycoprotein or any of the mutant glycoproteins. The amount of recovered virus was then determined by a reverse transcriptase assay (26), the same amount of virus was used to infect susceptible Jurkat-TA lymphocytes (for HIV or HTLV-1 pseudotypes) or NIH 3T3 mouse fibroblasts (for Mo-MuLV pseudotypes), and the resulting CAT activity was measured in the cell lysates (14, 25). This assay can be used quantitatively since increasing or decreasing amounts of virus applied to the cells resulted in corresponding changes in CAT activity levels (data not shown). Cotransfections with various amounts of the plasmid used for expression of wild-type HIV-1 envelope glycoprotein were then performed. This revealed that viral infectivity begins to drop when less than half of the amount of HIV envelope expression vector is used relative to the Env-negative CAT proviral construct (Fig. 4A). Similar experiments performed with the heterologous glycoproteins revealed that the larger amounts of HTLV or Mo-MuLV envelope plasmid expression vector needed to achieve polarization do reflect the larger amount of these heterologous glycoprotein-expressing plasmids required for optimal transfer of CAT activity. Therefore, there exists a direct correlation between the level of heterologous Env required for infectivity and polarized budding. This may be due to reduced stability or differences in the maturation process but most likely reflects differences in the efficiency of heterologous envelope glycoprotein incorporation into the HIV capsid.

The same procedure was used to analyze the infectivity of the virions pseudotyped with the various envelope mutants using equimolar amounts of envelope-negative HIV proviral DNA and mutant envelope expression vectors. For Mo-MuLV,

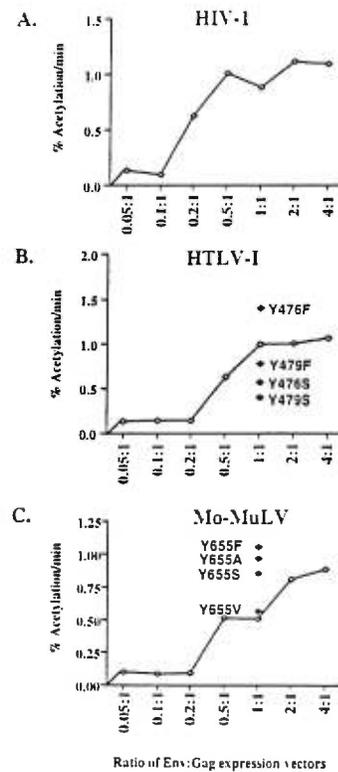


FIG. 4. The envelope-negative CAT-encoding proviral DNA was cotransfected into MDCK cells (10^6 cells in 75-cm² petri dishes) with various amounts of plasmids encoding the envelope glycoprotein from either HIV-1, HTLV-1, or Mo-MuLV. In each case, the total amount of DNA was kept constant at 20 μ g by addition of vector plasmid DNA containing the HIV-1 LTR (for HIV-1), CMV (for HTLV-1), or Mo-MuLV LTR (for Mo-MuLV) promoters. Equivalent amounts of the different viruses were then used to infect human Jurkat-TA cells (A and B) or murine NIH 3T3 cells (C). CAT assays with cell lysates were then performed, and the percentage of chloramphenicol conversion to acetylated forms was determined by scintillation counting. Results are presented as CAT activity relative to the ratios of Env-encoding plasmid to HIV Env-negative proviral DNA in each initial MDCK cell cotransfection. The mean CAT activity was calculated from two different incubation periods in the linear range of the assay. The results obtained at a 1:1 ratio for the different mutants described in the text are presented as closed symbols.

the different tyrosine mutants were able to confer infectivity as efficiently as or even better than the wild-type protein (Fig. 4C). The situation is somewhat more complex for HTLV-1. The conservative phenylalanine replacement of the membrane-proximal tyrosine (Y476F) increased the capacity to confer infectious potential compared to wild-type HTLV-1 envelope (Fig. 4B). However, similar replacement of the carboxy-proximal tyrosine (Y479F) had a very different effect. The conservative Y479F mutation reduced the infectivity of pseudotyped virus to approximately two-thirds of that obtained with the wild-type HTLV-1 glycoprotein (Fig. 4B). Both tyrosine-to-serine substitutions (Y476S and Y479S) had an even more negative effect on the infectivity of the pseudotyped virus. Similar results were also obtained when comparisons with the wild-type were made at different ratios of envelope

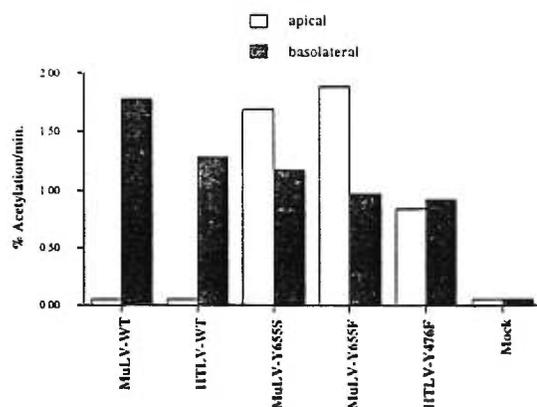


FIG. 5. Effect of HTLV-1 (Y476F) or Mo-MuLV (Y655S or Y655F) glycoprotein intracytoplasmic tyrosine substitutions on the infectivity of apically or basolaterally released pseudotyped viruses analyzed by using the CAT *trans*-complementation assay. Env-negative CAT-encoding proviral DNA (0.5 μ g) was transfected in filter-grown MDCK cells with an eightfold excess of plasmids encoding the wild-type (WT) or the mutated envelope glycoprotein. Transfections were performed by lipofection as previously described, and supernatants were pooled from the three apical or basolateral compartments 48 h after DNA introduction. Viruses released were used to infect Jurkat-TA (HTLV WT and mutant Y476F) or NIH 3T3 (Mo-MuLV WT and mutants) cells. Mock transfections were done with the HIV CAT-encoding Env-negative proviral DNA alone.

expression vector to Env-negative proviral DNA (data not shown).

Since all Mo-MuLV mutants analyzed exhibited an essentially identical or even greater efficiency than the wild-type glycoprotein in their ability to complement the envelope-defective CAT proviral construct, the loss of polarization is unlikely to be due to a difference in stability, processing, or virion incorporation of these proteins but must instead be due to alteration of a polarization signal per se. A conservative phenylalanine substitution at this position gave rise to an intermediate polarization phenotype. The CAT reporter assay was further used to confirm that the viral assembly takes place correctly in polarized cells lipofected with representative mutants already shown to possess normal infectivity while being affected in their polarized budding phenotype: Mo-MuLV mutants Y655S and Y655F and the HTLV-1 mutant Y476F. Confluent MDCK cells grown on semipermeable membranes were colipofected with the HIV CAT provirus and envelope expression vectors. Supernatants were then recovered from either the apical or the basolateral surface and tested for the presence of infectious virus by infection of susceptible cells followed by measurement of CAT activity. Results presented in Fig. 5 confirmed that glycoprotein envelope mutants lacking the ability to be targeted specifically at the basolateral surface are still normally incorporated into infectious virions released from either the apical or the basolateral membrane domain.

The effect of tyrosine substitutions observed in the Mo-MuLV glycoprotein is similar to our previous observations with the HIV glycoprotein, in which case it was also possible to demonstrate the presence of tyrosine-based basolateral targeting signals, independently of sequences mediating envelope incorporation and required for the infectious potential of the virus (30). In HTLV-1, the relative importance of the two tyrosines was more difficult to evaluate since replacement of tyrosine 479 significantly disrupts virus infectious potential.

However, viruses harboring a substitution of tyrosine 476 to phenylalanine are as infectious as, if not more infectious than, the wild-type HTLV-1 Env pseudotyped viruses. The lack of polarized budding observed with the Y476F mutant is therefore directly linked to the mutation. In contrast to the important distance between tyrosine residues in HIV-1, tyrosine 479 is very close to the membrane-proximal tyrosine 476 in HTLV-1. Replacement of a proline residue located close to the membrane-proximal tyrosine in HIV was previously shown to affect polarization, probably due to an alteration of a putative β -turn in this region (30). Neighboring β -turns are suspected to have an important role in tyrosine-based endocytosis and polarization sorting signals (19, 42, 43, 63). It is possible that replacement of the tyrosine at position 479 in HTLV-1 somehow affects the local structure in a similar manner. Furthermore, tyrosine 476 cannot be solely required, since it is not conserved in HTLV-2 (Fig. 1A). It should also be stressed that it is quite likely that the different functions are more uniformly distributed throughout the length of the much longer HIV glycoprotein intracytoplasmic domain while these different signals may be closely packed in the shorter intracytoplasmic domain of other retroviral glycoproteins, rendering it more difficult to dissociate these different functions. Nevertheless, these experiments clearly established that basolateral targeting is a phenomenon dependent on the envelope glycoproteins and is common to the envelope glycoproteins of members of both the *Oncornavirinae* and the *Lentivirinae*. The shorter intracytoplasmic tails of the two members of the *Oncornavirinae* examined in this study appear to encompass the required information for polarized viral budding which, as in HIV, is dependent on one or more critical membrane-proximal tyrosine residues located in the first 30 amino acid residues extending from the cytoplasmic face of the plasma membrane. The procedure used in this study took advantage of HIV pseudotyping with oncornavirus glycoproteins. However, incorporation of wild-type or mutant Mo-MuLV envelope glycoproteins into homologous virions using cotransfection with a MuLV-based retroviral vector harboring a puromycin resistance gene has confirmed the results obtained with the heterologous system (data not shown).

One of the intriguing aspects of the results is the ability of oncornavirus envelope glycoproteins to direct the site of lentivirus budding in polarized cells. There is no detectable sequence similarity between the membrane-spanning and cytoplasmic domains of the oncornavirus and lentivirus envelope glycoproteins, yet the oncornavirus proteins can efficiently prevent the budding of lentivirus particles from the apical membrane of polarized epithelial cells. The recovery of pseudotyped HIV virions with infectivity similar to that of wild-type or Y655-substituted Mo-MuLV envelope glycoproteins indicates that the tyrosine-based polarization signal is affecting the sorting of envelope glycoproteins rather than the association between glycoproteins and the retroviral particle. The data suggest a model in which Gag molecules, or a yet-unknown protein required for retroviral budding, are sorted together with the envelope glycoprotein to basolateral membranes through an association mediated by a structure of the envelope glycoprotein, a structure not readily recognized from sequence analysis. Further study of the incorporation of short intracytoplasmic Env glycoproteins into the HIV particle and of their ability to polarize the budding viruses may help elucidate the mechanisms involved in the recognition of Env by Gag in virus assembly and morphogenesis.

Tyrosines in Y-X-X-L motifs found in the cytoplasmic domain of Env proteins have been found in other retroviruses to be involved in viral pathogenesis. In bovine leukemia virus,

replacement of the tyrosine affects the capability of the virus to disseminate in the organism (64). In simian immunodeficiency virus, mutation of the membrane-proximal tyrosine results in the protein's more uniform distribution at the plasma membrane of infected lymphocytes (23).

Several studies have discussed the importance of epithelial-cell infection in HIV pathogenesis (1, 10, 39, 40, 59). A polarized release of viruses in these cells may be important for dissemination in the host as well as individual-to-individual transmission, which has been shown to occur mostly through infected cells rather than by free virus. It is well established that cell-to-cell transmission of retroviruses is more efficient than infection by cell-free virus, and this is especially true for HTLV-1, for which cell-free transmission is especially inefficient (3, 27). The conservation of basolateral maturation in different retroviruses may well reflect the importance of the phenomenon that could also have importance in other cell types, in addition to epithelial cells. It is generally thought that sites of intercellular contact are somehow analogous to basolateral surfaces, as far as transport of plasma membrane proteins is concerned; accordingly, budding of basolaterally targeted viruses tends to occur at these intercellular contact zones (47). Elegant electron-microscopic studies have shown the preferential budding of HIV virions at contact sites between infected lymphocytes and cultured epithelial cells (2, 39, 40). This, and the observation that virions tend to bud from a specific pole in infected lymphocytes, suggests the importance of polarization in cell-to-cell transmission of retroviruses, and this point will certainly deserve further study. Since replacement of the membrane-proximal tyrosine residue has an effect on the polarization phenotype, independently of any effect on envelope incorporation or viral infectivity, this raises the possibility of using the murine model for studying the importance of polarized budding in retroviral pathogenesis.

In conclusion, despite the large body of work that has been devoted to the topic, the identification of polarization signals on various additional proteins is still required in order to get a better overall understanding of polarized transport and sorting. Our demonstration of the polarization phenomenon, and identification of signals involved, is clearly an essential prerequisite for a better understanding of the interactions between retroviruses and epithelial cells; this can also have important consequences at the level of cell-to-cell transmission in other cell types.

We thank Arielle Rosenberg for many helpful discussions. We also thank Carole Danis and Johanne Mercier for technical support and Gwen Taylor and Bong-Suk Kim for help in cloning and sequencing the Mo-MuLV mutants.

This work was supported by a National Health Research Development Program/Medical Research Council (NHRDP/MRC) grant and a Fonds pour la formation des Chercheurs et d'Aide à la Recherche (FCAR) group grant (to G.L. and É.A.C.) and NIH NIAID grant 5 P01 AI35212-03 (to D.A.S.). R.L. is the recipient of a studentship from the NHRDP. É.A.C. is the recipient of a NHRDP AIDS career award, and G.L. is the recipient of a Chercheur-boursier award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

- Bourinbaïar, A. S., and D. M. Phillips. 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 4:56-63.
- Bugelski, P. J., B. E. Maleeff, A. M. Klinkner, J. Ventre, and T. K. Hart. 1995. Ultrastructural evidence of an interaction between Env and Gag proteins during assembly of HIV type 1. *AIDS Res. Human Retroviruses* 11: 55-64.
- Cann, A. J., and I. S. Y. Chen. 1996. Human T-cell leukemia virus types I and II, p. 1849-1880. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Virology*, 3rd ed., vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Dagermont, C., A. Le Bivic, S. Rothemberger, B. Iacopetta, and L. C. Kuhn. 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.* 12:1713-1721.
- Delamarre, L., C. Pique, D. Pham, T. Tursz, and M. C. Dokhèlar. 1994. Identification of functional regions in the human T-cell leukemia virus type-1 SU glycoprotein. *J. Virol.* 68:3544-3549.
- Delamarre, L., A. R. Rubenberg, C. Pique, D. Pham, and M. C. Dokhèlar. 1997. A novel human T-cell leukemia virus type-1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. *J. Virol.* 71:259-266.
- Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F. L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, and P. Sonigo. 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J. Virol.* 70:4380-4386.
- Dubay, J. W., S. J. Roberts, B. H. Hahn, and E. Hunter. 1992. Truncation of the human immunodeficiency virus type-1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* 66:6616-6625.
- Fantini, J., S. Baghdigouian, N. Yahi, and J.-C. Chermann. 1991. Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology* 185: 904-907.
- Fantini, J., N. Yahi, S. Baghdigouian, and J.-C. Chermann. 1992. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J. Virol.* 66:580-585.
- Freed, E. D., and M. A. Martin. 1995. Virion incorporation with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* 69:1984-1989.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski. 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 66:3306-3315.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Françoise, D. Thines, and M. de Wilde. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59:103-112.
- Gorman, C. M., L. F. Moffat, and B. H. Howard. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051.
- Goubau, P., M. Van Brussel, A. M. Vandamme, H. F. Liu, and J. Desmyter. 1994. A primate T-lymphotropic virus, PTLV-1, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (*Papio hamadryas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2848-2852.
- Granowitz, C., R. D. Berkowitz, and S. P. Goff. 1996. Mutations affecting the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus envelope protein: rapid reversion during replication. *Virus Res.* 41:25-42.
- Helseth, E., M. Kowalski, D. Gabuzda, V. Olshevsky, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1990. Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J. Virol.* 64:2416-2420.
- Höning, S., and W. Hunziker. 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat IgP 120 (lamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128:321-330.
- Hopkins, C. 1992. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.* 17:27-32.
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman. 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66:907-920.
- Kilpatrick, D. R., R. V. Srinivas, and R. W. Compans. 1988. Expression of the spleen locus-forming virus envelope gene in a polarized epithelial cell line. *Virology* 164:547-550.
- Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154:367-382.
- LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, and J. A. Hoxie. 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* 69:5217-5227.
- Landau, N. R., K. A. Page, and D. R. Littman. 1991. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.* 65:162-169.
- Leahy, P., G. G. Carmichael, and E. F. Rossomando. 1995. Effects of ethanol concentration and incubation period at 65°C on CAT activity in mammalian cell extracts. *BioTechniques* 19:894-898.
- Lee, M. H., K. Sano, F. E. Morales, and D. T. Imagawa. 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 25:1717-1721.
- Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.
- Li, Z., D. A. Sanders, S. C. Kayman, R. Kupelman, and A. Pinter. Characterization of a labile disulfide bond between SU and TM that is required for

- assembly and function of the murine leukemia virus envelope protein complex. Submitted for publication.
29. Lodge, R., H. Güttinger, D. Gabuzda, É. A. Cohen, and G. Lemay. 1994. The intracytoplasmic domain of gp11 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68**:4857-4861.
 30. Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and É. A. Cohen. 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* **16**:695-705.
 31. Mammann, F., E. Kondo, J. Sodroski, A. Bukovsky, and H. G. Güttinger. 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69**:3824-3830.
 32. Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**:741-753.
 33. Matter, K., E. M. Yamamoto, and I. Mellman. 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**:991-1004.
 34. Ohno, H., J. Stewart, M.-C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**:1872-1875.
 35. Oroszlan, S., and T. D. Copeland. 1985. Primary structure and processing of gag and env gene products of human T-cell leukemia viruses HTLV-ICR and HTLV-IATK. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **115**:221-233.
 36. Owens, R. J., and R. W. Compans. 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **63**:978-982.
 37. Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans. 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3987-3991.
 38. Perryman, S., J. Nishio, and B. Chesebro. 1991. Complete nucleotide sequence of Friend murine leukemia virus, strain FB29. *Nucleic Acids Res.* **19**:6950.
 39. Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaier. 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**:261-273.
 40. Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, X. Tan, and R. Pearce-Pratt. 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends Microbiol.* **2**:454-458.
 41. Pique, C., D. Pham, T. Tursz, and M. C. Dokhélar. 1993. The cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope can modulate envelope functions in a cell type-dependent manner. *J. Virol.* **67**:557-561.
 42. Prill, V., L. Lehmann, K. von Figura, and C. Peters. 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.* **12**:2181-2193.
 43. Pytowski, B., T. W. Judge, and T. E. McGraw. 1995. An internalization motif is created in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor by substitution of a tyrosine at the first position of a predicted tight turn. *J. Biol. Chem.* **270**:9067-9073.
 44. Ragheb, J. A., and W. F. Anderson. 1994. pH-independent murine leukemia virus centropic envelope mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12: TM in viral entry. *J. Virol.* **68**:3220-3231.
 45. Rein, A., J. Mirro, J. G. Haynes, S. M. Ernst, and K. Nagashima. 1994. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *J. Virol.* **68**:1773-1781.
 46. Ritter, G. D., M. J. Mulligan, S. L. Lydy, and R. W. Compans. 1993. Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology* **197**:255-264.
 47. Rodriguez-Boulan, E., K. T. Paskiet, and D. D. Sabatini. 1983. Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J. Cell Biol.* **96**:866-874.
 48. Ruth, M. G., R. V. Srinivas, and R. W. Compans. 1985. Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **45**:1065-1073.
 49. Ruta, M., M. J. Murray, M. C. Webb, and D. Kabat. 1979. A murine leukemia virus mutant with a temperature sensitive defect in membrane glycoprotein synthesis. *Cell* **16**:77-88.
 50. Schwartz, D. E., R. Tizard, and W. Gilbert. 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* **32**:853-869.
 51. Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama, and M. Hoshida. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3618-3622.
 52. Shields, A., O. N. Witte, E. Rothenberg, and D. Baltimore. 1978. High frequency of aberrant expression of Moloney murine leukemia virus in clonal infections. *Cell* **14**:601-609.
 53. Shimotohno, K., Y. Takahashi, N. Shimizu, T. Gajohori, D. W. Golde, I. S. Y. Chen, M. Miwa, and T. Sugimura. 1985. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3101-3105.
 54. Shimizu, H., F. Hasebe, H. Tsuchie, S. Morikawa, H. Ushijima, and T. Kitamura. 1992. Analysis of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a truncated transmembrane glycoprotein. *Virology* **189**:534-546.
 55. Shinnick, T. M., R. A. Lerner, and J. G. Sutcliffe. 1981. Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* **293**:543-548.
 56. Smith, A. J., M.-I. Chu, M.-L. Hammarström, and D. Rekosh. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{env} and Pr160^{gag/pol} expressed from a simian virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into viruslike particles. *J. Virol.* **64**:2743-2750.
 57. Spector, D. H., E. Wade, D. A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish, and S. A. Spector. 1990. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J. Virol.* **64**:2298-2308.
 58. Spies, C. P., and R. W. Compans. 1994. Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology* **203**:8-19.
 59. Tan, X., R. Pearce-Pratt, and D. M. Phillips. 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J. Virol.* **67**:6447-6452.
 60. Terwilliger, E. F., B. Godin, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that expresses the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3857-3861.
 61. Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Ruth. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* **268**:3313-3320.
 62. Thomas, D. C., and M. G. Ruth. 1994. The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence by having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.* **269**:15732-15739.
 63. Trowbridge, I. S., J. F. Gillawn, and C. R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:129-161.
 64. Willems, L., J. S. Gatot, M. Mammericks, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, and R. Kettmann. 1995. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J. Virol.* **69**:4137-4141.

CHAPITRE 4:

ARTICLE 3

L'incorporation des glycoprotéines est nécessaire pour que le bourgeonnement du VIH soit polarisé. L'étude des mécanismes impliqués dans ce phénomène nous a donc suscité un certain intérêt. En particulier, il s'agissait d'étudier les facteurs gouvernant l'incorporation spécifique des glycoprotéines au VIH . La récente démonstration qu'une grande délétion du domaine cytoplasmique de la gp41 rendait possible son incorporation dans le MuLV nous a permis de concevoir un vecteur rétroviral capable de cibler les cellules CD4+ dans une population mixte de cellules. La capacité d'un tel vecteur à transduire spécifiquement un gène dans les cellules CD4+ d'une population de lymphocytes périphériques est démontrée dans cet article, à paraître prochainement dans Gene Therapy.

Bien que j'ai effectué la majorité des travaux qui ont abouti à cette publication, les contributions de M. Ramu A. Subbramanian au niveau du maintien en culture des lymphocytes, et de Mlle Janique Forget en ce qui a trait à la mise au point des sondes GADPH, doivent être soulignées.



MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4⁺ peripheral blood lymphocytes

R Lodge, RA Subbramarian, J Forget, G Lemay and ÉA Cohen

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Human immunodeficiency virus (HIV) infection ultimately leads to the destruction of the CD4-positive lymphocyte subset and the onset of AIDS. In recent years, several gene therapy procedures making use of retroviral vectors that selectively target HIV susceptible cells have been proposed in order to interfere with HIV productive infection. However, the HIV glycoproteins' inability to be incorporated in other heterologous retroviruses considerably limits true HIV cell tropism of such vectors. We now report the use of murine leukemia virus (MuLV) viral particles harboring a truncated form of the HIV glycoprotein for specific gene delivery. Reporter *lacZ* gene transfer was determined to be

appropriately specific to CD4-positive cells when HeLaCD4 cells or peripheral blood lymphocytes (PBLs) were infected with these pseudotyped MuLV virus vectors. In contrast, MuLV viruses harboring amphotropic MuLV envelope glycoproteins displayed a broad and nonspecific infection of PBL subpopulations. This new approach, taking advantage of the ability of truncated HIV envelope glycoproteins to be incorporated into heterologous retroviral particles, may foreseeably be used in future interventions based on the coordinated delivery of therapeutic gene products specifically to cell types susceptible to HIV infection.

Keywords: retroviral vector; HIV Env; gene transfer; CD4⁺ cells

Introduction

Gene therapy has been proposed as a strategy for the treatment of a variety of genetic and viral diseases. Genetic alteration of the peripheral T lymphocytes has been shown to be of potential therapeutic relevance in inherited diseases, leukemias, and acquired immune deficiency syndrome (AIDS).^{1,2} The central goal of many gene therapy strategies is the efficient and stable delivery of genes. Many advantages are associated with the use of well characterized retroviral vectors for this purpose. However, one of the major limitations associated with using retroviral vectors in gene therapy is their low transducing efficiency. Accordingly, several approaches have been developed to increase retroviral transduction efficiency. Methods include optimization of infection conditions, increasing virus titer, and improving the specificity of the virus for its target cells. In fact, the use of nontargeted retroviral vectors in gene therapy is often considered inadequate since binding to nontarget cells would result in possible side-effects in undesired transduced cells. The use of *in vitro* transfer protocols, where cells are cultured and transduced *ex vivo*, can allow partial bypass of these limitations, but restricts the spectrum of diseases which may be treated. In many cases, systematic treatment can only be achieved through the use of

retroviral vectors that will deliver genes to specific cells *in vivo* and enable efficient expression in these cells.

Targeting retroviral vectors to specific cells can be achieved through inducible transcriptional control or preferably by achieving a specific infection of the desired cells by targeted transduction. The latter approach requires modification of the proteins involved in receptor recognition. Retroviruses use a variety of receptors to enter cells; some of these receptors such as the ecotropic and amphotropic murine leukemia virus (MuLV) receptors and many of the immunodeficiency-causing lentivirus receptors have been identified.³⁻⁶ However, targeted delivery of a murine-based retroviral vector to a specific subpopulation of human cells has yet to be truly achieved. Initial attempts to change viral tropism were done through the use of pseudotyped viruses;⁹⁻¹¹ MuLV is able to incorporate vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G), influenza virus hemagglutinin (HA), or heterologous retroviral glycoproteins, although this expands viral host range rather than restrict cell tropism. Even though several groups have generated chimeric Env-ligand fusion proteins designed to bind on to transferrin receptor, galactose receptor or the high density lipoprotein receptor, none of these fusion proteins were successfully incorporated into infectious viral particles.¹¹ The only reported success has been obtained using heregulin-Env fusion proteins binding to the Erb3/4-receptor, thus enabling specific MuLV infection of human breast cancer cell lines.¹² An alternative approach using receptor-single chain antibodies (scFv) fused to Env proteins has given rise to several difficulties; results obtained with low density lipoprotein scFv-Env chimeric proteins are still prom-

Correspondence: ÉA Cohen, Laboratoire de Rétr. rologie humaine, Département de Microbiologie et immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
Received 16 September 1997; accepted 5 January 1998



2

using, although virus titers remain poor.^{11,13} Most obstacles found in these strategies arise in the Env post-binding or membrane fusion steps, giving rise to abortive infection.¹¹ Therefore, whenever possible, it will be preferable to use authentic viral envelope glycoproteins exhibiting specificity towards the desired targeted cells.

Targeted transduction of CD4-positive lymphocytes is critical for HIV gene therapy approaches. Although the establishment of HIV-based vectors for such a strategy has been considered, it is more likely that grafting specific components of HIV on to other retroviruses would generate safer vectors. Although HIV's ability to infect nondividing cells is a great advantage over classical retroviral vectors, HIV's specific, targeted tropism for CD4⁺ cells must also be considered.^{11,14,15} Recently, chimeric HIV Env glycoproteins encompassing the cytoplasmic domain of the VSV G-glycoprotein were shown specifically to target VSV infection to CD4 expressing human epithelial HeLa cells.¹⁶ The incorporation of foreign glycoproteins in enveloped viruses, or pseudotyping, is a well known phenomenon. Reported HIV pseudotypes include HIV particles harboring MuLV Env, human T cell leukemia virus (HTLV) Env, VSV-G and herpes simplex virus (HSV) Env.¹⁷⁻²³ However, the inability of the HIV glycoproteins to be incorporated into MuLV viral particles has kept these envelope glycoproteins from being of potential use in gene therapy. The presence of a 150-amino acid long intracytoplasmic tail in the HIV gp41 transmembrane glycoprotein is believed to be the cause of such restricted incorporation of HIV Env; steric incumbrance and structure incompatibility between the long gp41 cytoplasmic domain and non-HIV matrix or capsid proteins would explain the specific incorporation.²⁴ This was further confirmed when HIV Gag matrix protein mutations were shown to disrupt the incorporation of HIV Env.²⁵⁻²⁷ Although the incorporation of HIV Env into the viral particle needs a specific interaction with the HIV matrix protein, other retroviral Env glycoproteins seem to bypass this step.^{28,29} This correlates well with the much shorter cytoplasmic domains of most retroviral Env glycoproteins.

We now confirm and extend recent observations by Mammano *et al*³⁰ and Schnierle *et al*,³¹ showing that truncation of the cytoplasmic portion of the Env glycoprotein enables its incorporation into heterologous MuLV virions. Furthermore, truncated envelope glycoproteins were efficiently incorporated into HIV virions harboring matrix protein mutations known to affect glycoprotein incorporation. MuLVs harboring the truncated HIV glycoproteins retain normal biological activity and specifically infect HeLa CD4 expressing cells and activated CD4-positive peripheral blood lymphocytes (PBLs), as determined by transduction of a *lacZ* reporter gene. Altogether, these results demonstrate the feasibility of using this approach to specifically transduce genes into the CD4 expressing cell subpopulation for gene therapy purposes.

Results

Incorporation of full-length and truncated HIV Env glycoproteins into viral particles

In order to investigate the incorporation of envelope glycoproteins, wild-type HIV Env expression vectors

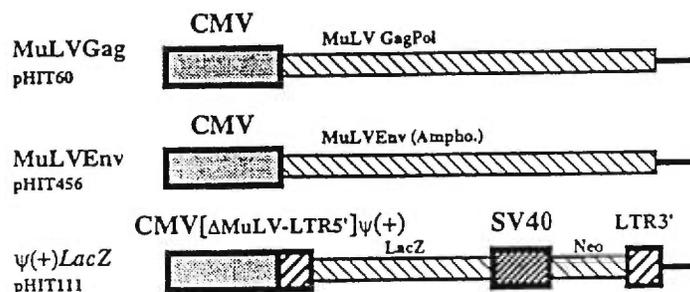
were cotransfected into 293T cells with either HIV Env-negative proviral DNA (HIVGag) or a MuLV GagPol-encoding plasmid (MuLVGag, described in Figure 1). After a 36 h delay following transfection, cells were subjected to metabolic radiolabeling with ³⁵S methionine, as described in Materials and methods. Viral proteins were then immunoprecipitated with HIV-positive patient and goat anti-MuLV Gag antisera and analyzed by SDS-PAGE. Cells transfected with the HIV Env-negative DNA or MuLV GagPol encoding plasmid alone expressed, respectively, the HIV or MuLV major Gag viral capsid proteins, p24 (HIV) or p30 (MuLV) (Figure 2a, lanes 2 and 3). These proteins were also detected in the virus particles recovered by ultracentrifugation of cell supernatants followed by immunoprecipitation (Figure 2b, lanes 2 and 3). When cells were cotransfected with the HIV Env expression vector and those encoding either HIV or MuLV Gag, the HIV glycoprotein gp120 could also be detected in both cell lysates (Figure 2a, lanes 4 and 5). However, incorporation of the HIV Env was restricted to the HIV viral particles (Figure 2b, compare lanes 4 and 5).

If the length of the HIV Env cytoplasmic domain is responsible for such a specific virion incorporation, full truncation of this domain should abrogate this restriction to virion incorporation and should confer to truncated HIV glycoproteins broad pseudotyping abilities, comparable with those of MuLV or other retroviral glycoproteins. To look into such a possibility, cells were again cotransfected with either the proviral HIV Env-negative plasmid or the MuLV GagPol encoding plasmid, and an expression vector encoding a HIV Env glycoprotein deleted of its carboxy-terminal 144-amino acids (HIVEnvΔ713-856, Figure 1b). Analysis of radioimmunoprecipitated proteins shows that the HIV Env truncated glycoproteins are correctly processed (Figure 2a, lanes 6 and 7) and incorporated into both HIV and MuLV virions (Figure 2b, lanes 6 and 7). This establishes that the specific incorporation of the HIV Env glycoproteins into the HIV viral particle, and the exclusion of such glycoproteins from other enveloped viruses thereof, is dependent on the presence of the HIV Env long cytoplasmic domain.

To investigate further the role of the HIV Env cytoplasmic domain in its specific incorporation into the HIV viral particle, an HIV Env-negative proviral DNA harboring a small deletion (amino acids 16-18) in the HIV matrix protein was generated (Figure 1b). This small deletion has been previously identified as abrogating HIV Env virion incorporation.^{25,32} This proviral DNA construct was cotransfected into cells with either the wild-type HIV Env, truncated HIV Env or MuLV Env glycoprotein expression vectors. Although the major capsid proteins (MuLV p30 and HIV p24) and all the different Env glycoproteins (MuLV gp70 and HIV gp120) could be detected in the cell lysates (Figure 2a, lanes 8, 9 and 12), the full-length HIV Env glycoproteins were specifically excluded from the p17-mutant virions (Figure 2b, lane 8), as was also the case in the MuLV virions (Figure 2b, lane 5). In contrast, the truncated HIV Env was incorporated in the p17 mutant virion (Figure 2b, lane 9). The MuLV Env, with its short intracytoplasmic domain, was uniformly incorporated into wild-type or mutant HIV virions or the MuLV virions (Figure 2b, lanes 11, 12 and 13). Altogether, these results demonstrate the role of the HIV Env cytoplasmic domain



a MuLV-based plasmids



b HIV-based plasmids

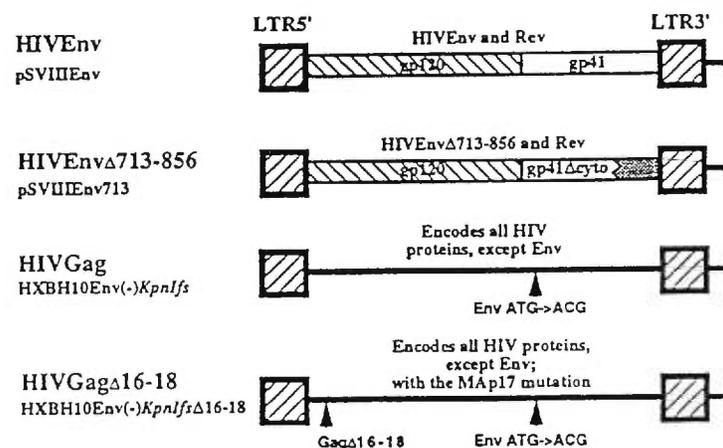


Figure 1 Schematic representation of plasmids and expression vectors. (a) MuLV-based plasmids. All plasmids contain an SV40 origin of replication, and transcription is driven by a CMV promoter.³⁶ pHIT111 is peculiar in that the CMV promoter is fused to the R region of the 5' MuLV LTR. This plasmid also harbors a neo resistance gene under transcriptional control of the SV40 promoter and 3' MuLV LTR sequences. (b) HIV-based plasmids. Transcription is driven by the HIV LTR, and therefore needs the presence of Tat for efficient expression of the reporter gene, and the SVCMV/Tat plasmid is thus used to supply Tat in experiments involving the HIV Env encoding plasmids and MuLVGag. All plasmids contain an SV40 origin of replication. The Env-negative proviral HIV plasmids²⁷ harbor a ATG to ACG point mutation at the initiation codon of Env and a KpnI frameshift at HIV-HxBc2 nucleotide position 5934. A stop codon at position 7902 is inserted in the HIV truncated-Env glycoprotein expression vector, resulting in the deletion of the cytoplasmic domain of the glycoproteins.³⁰ A small deletion in the p17-matrix encoding portion of the gag gene in HXBH10Env(-)/KpnIΔfs) Δ16-18 abrogates wild-type Env viral incorporation.

in specific incorporation into HIV, through a possible interaction with the HIV p17-matrix protein. The deletion of such a cytoplasmic domain eliminates any need for such a specific interaction, thereby rendering possible incorporation into MuLV virions.

Infectivity of pseudotyped MuLV virions

Incorporation of the truncated HIV Env glycoproteins into the MuLV viral particle being established, it was then necessary to determine if the pseudotyped MuLV viruses had incorporated fully functional envelope glycoproteins giving rise to infectious viruses. If such is the case, the viruses should specifically infect CD4-positive cells. Either the HIV Env-negative proviral DNA, the HIV

p17-matrix mutant Env-negative proviral DNA or the MuLVGag expression vector were thus cotransfected in COS cells with the HIV Env, truncated HIV Env, or MuLV Env encoding vectors, as described in Materials and methods. Cotransfections using MuLVGag vector also included a plasmid harboring a lacZ gene and RNA viral encapsidation sequences (Figure 1a). Such encapsidation sequences being absent on MuLVEEnv or MuLVGag, lacZ RNA is thus exclusively incorporated into MuLV virions using this approach. Conversely, the HIV p17-mutant or wild-type Env-negative full-length RNAs are encapsidated into their respective viral particles in all experiments involving HIV. Cell supernatants were harvested 48 h after transfection, and relative amounts of



4

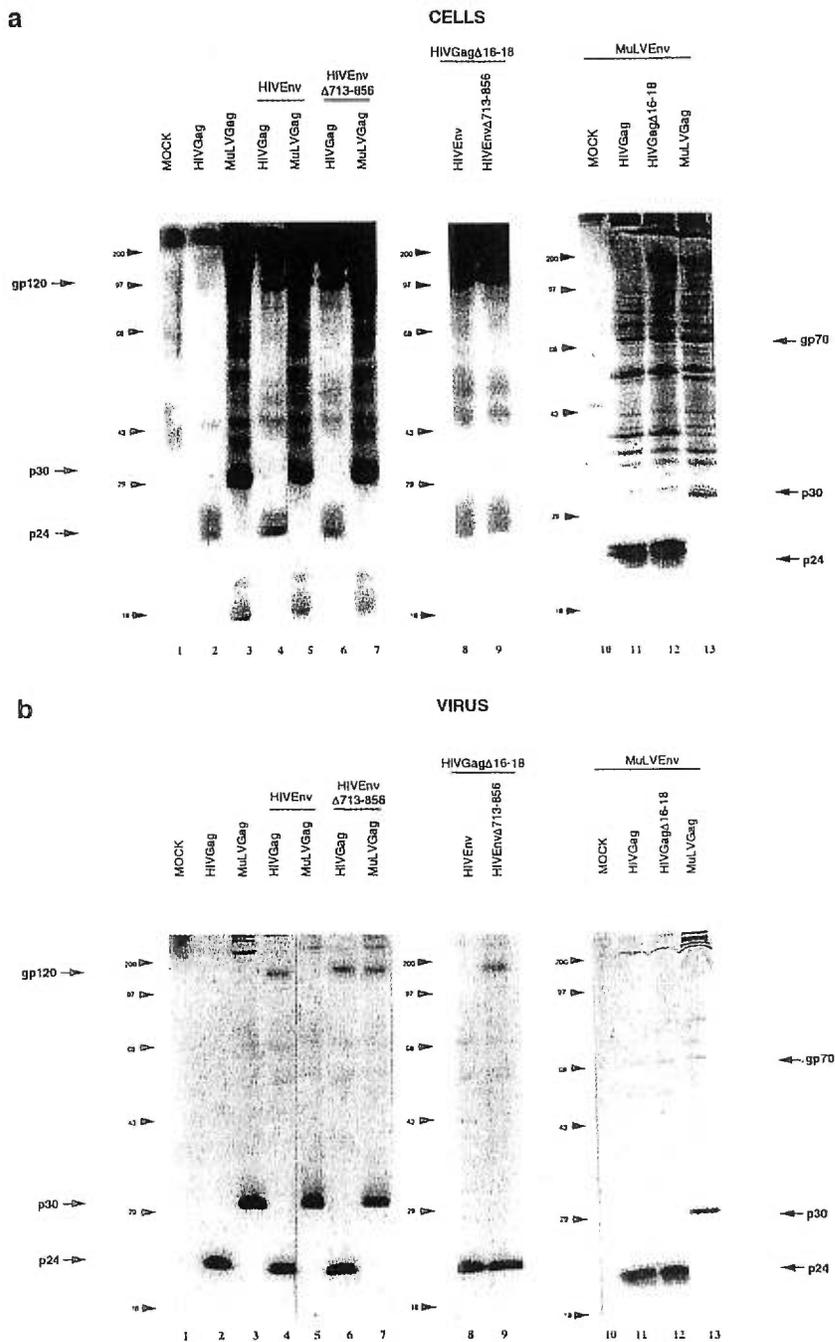


Figure 2 Expression and assembly of MuLV and HIV viral proteins. (a) Cells were cotransfected with the relevant Gag and Env encoding plasmids. Viral proteins were immunoprecipitated with an HIV-positive human serum combined with goat anti-MuLV Gag and anti-MuLV Env antisera, and resolved on a 11% SDS-PAGE gel. (b) Incorporation of glycoproteins in released HIV or MuLV virions. Labeled viral pellets were lysed in RIPA buffer, and immunoprecipitated as in (a) and viral proteins resolved on a 11% SDS-PAGE gel. Labeled proteins were then revealed by autoradiography. Position of molecular weight markers is shown and viral proteins are indicated by arrows.



recovered virus were estimated by reverse transcriptase (RT) assay. Equivalent amounts of virus produced from each cotransfection were used to infect either HeLa, HeLaCD4 or HeLaCD4LTR β -gal cells. Following infection, cells were fixed and stained as described in Materials and methods.

As expected, in HeLa cells, only MuLV-based viruses harboring the amphotropic MuLV envelope glycoprotein were able to transduce the *lacZ* gene (Figure 3). Since HeLa cells lack the CD4 receptor, all viruses harboring HIV glycoproteins did not infect the cells. Moreover, the HIV-based viruses used in this study do not possess intrinsic *lacZ* transduction ability, and therefore do not provide further information when used on these cells (Figure 3b).

In HeLaCD4 cells, similar transduction efficiencies were obtained with MuLV-based viruses having incorporated either the amphotropic MuLV Env or the truncated HIV Env glycoproteins (Figure 3a). Use of all other viruses resulted in background β -galactosidase activity (Figure 3). Again, no detection of HIV-based viruses was expected using these cells. The susceptibility of HeLaCD4 cells to the MuLV viruses harboring the truncated HIV Env demonstrates the functional capacity of such an envelope glycoprotein to mediate specific infection of CD4-positive cells and confirms the lack of incorporation of wild-type HIV Env in MuLV. Furthermore, the infectious potential of viruses harboring amphotropic Env or truncated HIV Env appears to be similar.

Finally, virus infection was tested on HeLaCD4LTR β -

gal cells. These cells harbor in their genome a *lacZ* gene under the transcriptional control of the HIV LTR promoter. Following HIV infection, and production of the Tat transactivating protein, they will thus express β -galactosidase activity due to Tat-mediated LTR transactivation.³³ In these cells, MuLV-mediated *lacZ* transduction was obtained when using the HIV truncated-Env or amphotropic MuLV Env glycoproteins, as in the HeLaCD4 cells (Figure 3a). Furthermore, HIVs having incorporated wild-type or truncated Env glycoproteins also efficiently gave rise to β -galactosidase activity in the cells, through Tat transactivation of endogenous *lacZ* (Figure 3b). However, mutant HIVs harboring the mutation in p17 known to prevent incorporation of HIV Env glycoproteins, remained uninfected in the case of the wild-type HIV glycoproteins only (Figure 3c). Similar efficiency of infection was obtained when the truncated HIV Env glycoproteins were incorporated into HIV, HIV (p17-mutant) or MuLV-based viruses. Altogether, these results demonstrate that the deletion of the HIV Env glycoprotein cytoplasmic domain does not alter the processing, maturation and ability of such glycoproteins to confer an infectious potential for CD4-positive cultured cell lines.

Reporter *lacZ* gene transduction in activated PBLs

Since the truncated HIV Env glycoproteins enable MuLVs to infect CD4-positive HeLa cells specifically, it should be possible to take advantage of such a mechanism to infect primary human cells expressing the CD4

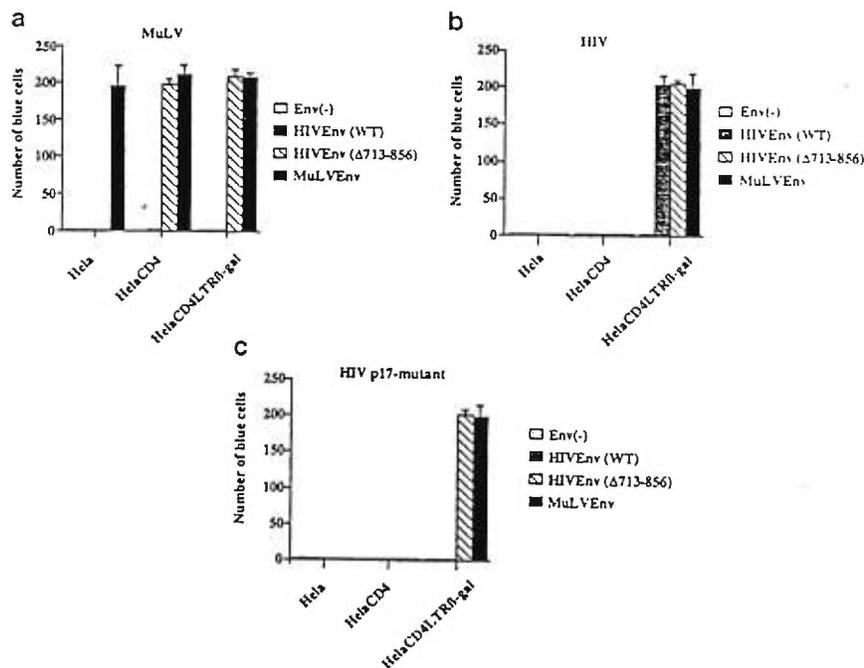


Figure 3 Infection with MuLV (a), HIV (b) or HIV p17-mutant (c)-based viruses harboring either MuLV Env, HIV Env, HIV truncated Env or no Env glycoproteins. Viruses were produced in COS cells, and volumes corresponding to equivalent virus amounts according to reverse transcriptase values were used to infect either one of the HeLa, HeLaCD4 or HeLaCD4LTR β -gal cell lines, as described in Materials and methods. Cells were then stained with X-gal and infected cells identified by the development of a blue color. Results are the average of two experiments and error bars represent standard deviation.



6

receptor. MuLVs harboring either HIV truncated Env or amphotropic MuLV Env glycoproteins were added to PHA-activated PBLs, as described in Materials and methods. MuLVs originating from cells expressing either wild-type HIV Env or no glycoproteins were used as negative controls, since the full-length HIV Env is not incorporated into MuLV. The same experiment was performed in the presence of antibodies against HIV Env (anti-gp120).

Following a delay to allow sufficient β -galactosidase expression, cells were fixed and stained for β -galactosidase expression. However, sensitivity of this assay was poor. PCR Southern analysis was therefore used to detect transduced *lacZ* DNA in infected cells. PCR was used to generate a fragment of 480 bp of the *lacZ* gene, and the nature of the reaction product was confirmed by Southern blot using a specific ³²P-labeled *lacZ* probe. The detection of *lacZ* DNA in cells infected with the MuLV viruses having incorporated either truncated HIV Env or MuLV amphotropic Env was easily achieved. Furthermore, *lacZ* gene transfer was specifically prevented upon treatment with anti-gp120 in the case of the truncated HIV Env glycoprotein MuLV pseudotype (Figure 4a). Amplification of the control GADPH gene confirmed the quality of each DNA sample. These results demonstrate the targeted delivery of a transduced *lacZ* gene into activated PBLs through the use of a MuLV retroviral vector harboring heterologous truncated HIV envelope glycoproteins. Identical results were obtained when cells were collected from a second blood donor.

Specificity of infection in PBLs

Although the specific infection of the CD4-positive cell population was suggested by the inhibitory effect of antibodies against gp120, CD4/CD8 cell sorting was further performed in order to identify the activated PBL populations targeted by the pseudotyped MuLVs. Activated PBLs were infected as described previously and sorted into separate CD4 expressing and CD8 expressing PBL subpopulations. A typical distribution of a sorted infected cell population is shown in Figure 4b. Subpopulations of CD4- or CD8-positive cells were then lysed and PCR Southern blot analysis performed to determine which subpopulation supported *lacZ* transduction. Both CD4-positive and CD8-positive PBL subpopulations acquired *lacZ* DNA upon infection with the MuLV virus harboring amphotropic Env (Figure 4c). However, only the CD4-positive cells demonstrated susceptibility to MuLVs harboring truncated HIV Env (Figure 4c). These results demonstrated the capacity of pseudotyped MuLVs to target and specifically infect CD4-positive PBLs.

The efficiency of *lacZ* transduction in sorted CD4-positive PBL subpopulations was estimated by Southern blotting of fragments obtained by PCR of serial dilutions of DNA from cells transduced with either MuLV Env or HIV Env harboring viruses (Figure 5). *LacZ* detection by this procedure in cells transduced with the HIV Env viruses required an approximately four-fold higher amount of DNA than the detection in cells infected with the amphotropic virus (compare lanes 2–7). Moreover, control cellular GADPH single-copy DNA could be detected at DNA levels similar to that of transduced *lacZ* in cells infected with the amphotropic virus. Since controls for *lacZ* and GADPH PCRs reveal similar efficiency

in serial dilutions of plasmids harboring the respective genes (results not shown), this suggests that transduction efficiency with the amphotropic virus is close to 100%. Therefore, despite the fact that infection was performed under conditions optimized for MuLV Env, truncated HIV Env viruses transduced *lacZ* efficiently, approaching 20–25% of the CD4-positive cells.

Discussion

In the present study, it was demonstrated that an HIV Env in which the 144 carboxy-terminal amino acids of the cytoplasmic domain have been deleted can still be incorporated into wild-type HIV particles. This contrasts with the situation observed with smaller deletions showing altered incorporation into the virion.³⁴ These observations can be reconciled, however, since the HIV Env with a complete truncation of its intracytoplasmic domain is also incorporated into HIV viruses harboring known matrix mutations that normally interfere with HIV Env incorporation.^{27,28} Truncation of the cytoplasmic HIV Env domain apparently alleviates any need for specific HIV Gag interaction, effectively converting the incorporation mechanisms to that of shorter cytoplasmic-domain glycoproteins. Accordingly, the truncated glycoprotein was incorporated into MuLV viral particles, in contrast to full-length envelope. Similar observations were also reported by other groups.^{30,31} Nevertheless, in order for the truncated glycoprotein to be useful for retroviral vectors, it must retain the general features of the wild-type glycoprotein, namely, correct processing, CD4-positive interaction and membrane fusion, all prerequisites to the release of the nucleocapsid into the cytoplasm. In fact, it proved to be, that in CD4 expressing HeLa cells, the infectious potential of the pseudotyped MuLV viruses was comparable to that of MuLV viruses harboring amphotropic MuLV Env, or HIV viruses possessing either full-length or truncated forms of HIV Env, as previously reported.³⁴ Moreover, pseudotyped viruses exhibited similar infectivity without the additional presence of full-length MuLV or HIV Env, as was shown necessary in the case of chimeric ligand-Env glycoproteins.³⁵ Finally, specific, targeted infection of the CD4-positive PBL subpopulation was obtained using the MuLV-based vector pseudotyped with the truncated HIV Env. Interestingly, despite the fact that infection was performed under conditions optimized for MuLV Env, truncated HIV Env viruses transduced PBLs with only slightly inferior efficiency to that of amphotropic MuLV viruses. These modified viral vectors are thus able to recognize efficiently and specifically infect CD4-positive cells in a mixed cell population.

There could be numerous advantages in using such a vector in gene therapy for AIDS. The true tropism of HIV, including possible CD4-independent cell tropism, should be retained by such pseudotyped viruses. Furthermore, tropism to CD4-positive macrophages or lymphocytes could be achieved by pseudotyping MuLV with truncated macrophage-tropic or T-tropic HIV Env glycoproteins. Access to CD4-positive nondividing cells (such as dendritic cells and macrophages) could eventually be obtained by grafting other functional elements of the HIV virus, such as the HIV matrix or Vpr proteins, on to MuLV viral vectors coated with such HIV truncated Env glycoproteins. This strategy could retain desired func-

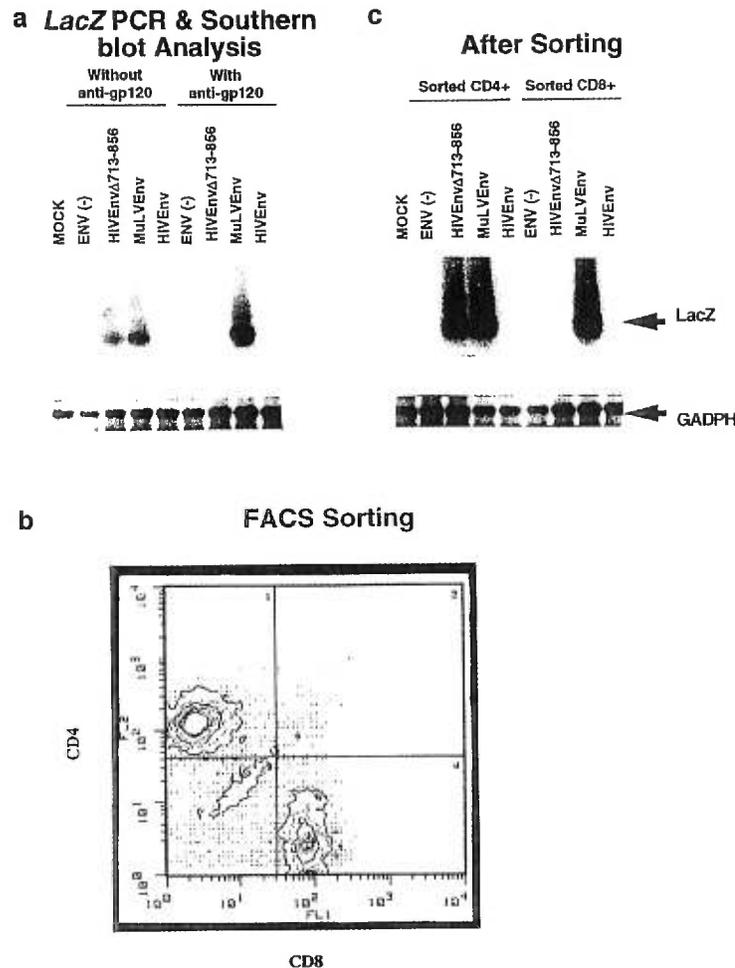


Figure 4 (a) LacZ transduction of PBLs as determined by PCR amplification of lacZ and Southern analysis. MuLV viruses harboring various glycoproteins were produced in COS cells and used to infect PBLs as described in Materials and methods, with or without concomitant addition of anti-gp120. Cells were then lysed and genomic DNA extracted. PCR was performed on aliquots of extracted DNA, followed by Southern blotting and hybridization with a lacZ specific probe. (b) Representative distribution of CD4 and CD8 populations of infected cells as determined by FACS analysis. Aliquots ($2-3 \times 10^5$) of infected cells were treated with a mix of anti-CD8 fluorescein isothiocyanate and anti-CD4 phycoerythrin-conjugated antibodies and sorted with a FACSTAR cell sorter. (c) Southern analysis of transduced cells following sorting. Infected cells were sorted as CD4⁻ or CD8⁺ cells, and transduction of lacZ was determined by PCR amplification and Southern analysis as in (a). Amplification of a GADPH gene fragment was performed in parallel on each DNA sample and the results are presented at the bottom of (a) and (c).

tions of the HIV virus while alleviating the potential of HIV replication through recombination events, or even synthesis of most HIV proteins, in gene therapy treatments. These CD4-positive cell-targeted MuLV vectors strategies are to be developed with the goal of delivering inhibitors of HIV replication in specific cells. Such viral targets could include either early or late steps in the viral replicative cycle. Therapeutic strategies include transduction of genes inhibiting proviral integration or gene expression, or activating suicide genes in HIV-infected cells. The use of gene therapy in AIDS could therefore focus on poorly accessible HIV susceptible cells, which harbor latent viruses, that remain the origin of viral resistance encountered within the current antiretroviral

therapies. Finally, the system developed in the present report is of great relevance for the study of gene expression in specific CD4-positive cell populations.

Materials and methods

Proviral constructs and expression plasmids

Plasmids pHIT60 and pHIT456 respectively encode the GagPol protein of MuLV and the amphotropic Env glycoprotein of MuLV. The pHIT111 plasmid harbors a lacZ gene under the transcriptional control of a modified CMV promoter that is fused to the R-U3 regions of the 5' MuLV LTR and Ψ -encapsidation sequences. All the pHIT plas-

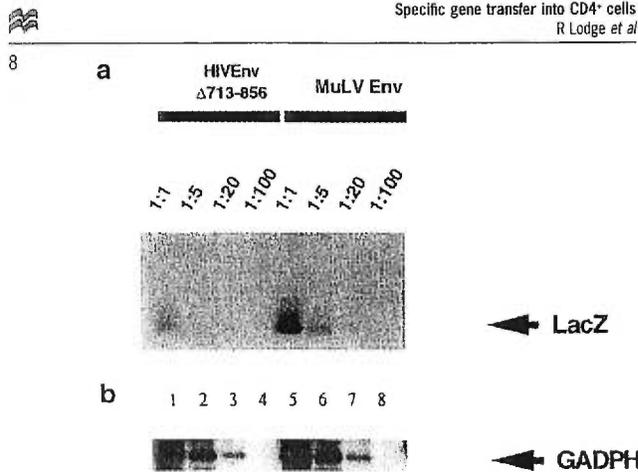


Figure 5 (a) *lacZ* transduction efficiency of truncated HIV Env and amphotropic Env MuLV viruses. Efficiency of *lacZ* transduction in sorted CD4⁺ positive PBL subpopulations was determined by Southern blotting of fragments obtained by PCR of shown serial dilutions of DNA from cells transduced with either MuLV Env or HIV Env harboring viruses. Control cellular GADPH DNA is shown in (b).

mid were obtained from AJ Kingsman (Oxford University, Oxford, UK).³⁶ Plasmid pSVIIIEnv713 was created by cloning the *KpnI*-*Bam*HI (corresponding to nucleotide positions 5893 and 8017 of HIV HXBc2 proviral DNA, respectively; +1 = site of initiation of transcription) segment of HXBH10 Δ ACT,³⁰ a proviral DNA containing a stop codon in *env* (corresponding to a TCA to TAA substitution at HIV-HXBc2 nucleotide position 7902), and encoding an Env truncated of its cytoplasmic domain (obtained from Heinrich G Göttinger, DFCL, Boston, MA, USA) in pSVIIIEnv, the vector used for expression of Env under the control of the HIV LTR promoter. The Env-negative proviral construct harboring a mutation in the matrix protein HXBH10Env-(*KpnI*fs) Δ 16-18 was generated by cloning the *Sall*-*Bam*HI (HXBH10 nucleotide positions 5372 and 8058, respectively; +1 = site of initiation of transcription) fragment of HXBH10Env-(*KpnI*fs) into HXBH10 Δ 16-18; both plasmids have been described elsewhere.^{25,37,38}

Cell lines and antisera

The 293T, COS, HeLa, HeLaCD4³⁹ and HeLaCD4LTR β -gal³³ cells were maintained in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and 1% streptomycin and penicillin. Human antiserum No. 162 against HIV proteins has been described elsewhere.³⁷ The goat antiserum against MuLV Gag (76S000127 and 79S000804) was obtained from Quality Biotech (Biological Carcinogenesis Branch, NCI, Camden, NJ, USA); antiserum raised against MuLV Env (80S00019) was also obtained from Quality Biotech.

Transfection, metabolic radiolabeling and radioimmunoprecipitation

DNA transfection in 293T cells (10⁶) were performed using liposomes, as previously described.³⁷ Briefly, 10 μ g of the GagPol encoding plasmids (pHIT60, HXBH10Env-(*KpnI*fs) or HXBH10Env-(*KpnI*fs) Δ 16-18) were cotrans-

ected with 15 μ g of one of the following Env encoding plasmid constructs: pHIT456, pSVIIIEnv or pSVIII-Env713. When pHIT60 was cotransfected with the HIV Env or truncated HIV Env plasmid expression vectors, 5 μ g of a HIV transactivating protein (Tat) encoding plasmid (SVCMVTat) was added to the DNA mix before transfection, since transcription of both Env genes is driven by the HIV LTR, and their efficient expression is thus dependent on the presence of Tat. Following a 36 h transient expression period, cells were labeled with 150 μ Ci/ml of ³⁵S methionine (Tran³⁵S-label; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) for 8 h in methionine free-medium. Supernatants were harvested and ultracentrifuged (30 000 r.p.m. for 1 h in a Beckman Ti50.4 rotor; Beckman Instruments, Mississauga, Ontario, Canada) to generate a crude viral pellet; cells and viral pellets were then resuspended in RIPA lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 0.2% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Viral proteins present in lysed cells or viral pellets were immunoprecipitated with a mix consisting of HIV-positive human, goat anti-MuLV Gag and goat anti-MuLV Env antisera (all used at 1:5000 dilutions) and loaded on to a 11% SDS-PAGE gel as described previously.³⁷ Labeled proteins were then revealed by autoradiography.

Infectivity assay using β -galactosidase activity

The infectivity assay used to determine if viruses harboring the different Env glycoproteins retained infectious capacity was similar to the one described by Kimpton and Emerman,³³ with several modifications, in order to comply with the MuLV *lacZ* transduction strategy elaborated by Soneoka *et al.*³⁶ Briefly, COS cells were lipofected with various combinations of GagPol encoding DNA and Env expression vectors as described in the previous section. Furthermore, 15 μ g of the pHIT111 *lacZ* vector was added to every transfection when pHIT60 was present, in order to obtain *lacZ* transduction through MuLV viruses. At 40 h after transfection, viruses were harvested in 2 ml of DMEM supplemented with 8% FCS and filtered on 0.45 mm pore diameter filters (Millipore) to remove cellular debris. A reverse-transcriptase assay was performed on aliquots of the filtered supernatants^{40,41} to determine virus yield. Equivalent amounts of the HIV (100 000 c.p.m.) or MuLV (150 000 c.p.m.) viruses were used to infect either HeLa, HeLaCD4 or HeLaCD4LTR β -gal cells, seeded the previous day in 24-well plates at 3 \times 10⁴ cells per well. Polybrene (10 μ g/ml) was added to the infected cells and diluted 8 h into the infection with fresh DMEM supplemented with 8% FCS and antibiotics. Finally, cells were washed, fixed and stained as previously described³³ 40 h after the start of infection and the number of blue cells determined using light microscopy.

Culture, isolation and infection of PBLs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from volunteers by Ficoll-Paque centrifugation as recommended by the manufacturer (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada) and washed thoroughly to remove platelets. PBLs were enriched from the PBMCs by two-step adherence to remove contaminating macrophages. Cells were cultured in the presence of phytohemagglutinin (PHA, 5 μ g/ml) for 72 h to obtain activated lymphocytes. Following activation, cells were washed



several times to remove the lectin and were maintained in RPMI supplemented with glutamine and 10% FCS, penicillin-streptomycin (100 U/ml), gentamycin (10 µg/ml) and 20 U/ml interleukin-2 (rIL2; Boehringer Mannheim, Laval, Quebec, Canada) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Infection of PBLs was performed in conditions similar to those described by Bunnel *et al.*⁴² Briefly, 1 × 10⁶ PBLs were seeded in six-well plates, at 2 ml per well, in phosphate-free RPMI supplemented with 10% FCS and rIL2 for 8 h, since phosphate depletion has been shown to enhance MuLV receptor expression in susceptible cells. Subsequent to the phosphate depletion step, cells were exposed to viruses (at a MOI of 0.1 as determined by the number of blue cells obtained with HeLaCD4LTRβ-gal cells) and centrifuged at low speed and 32°C for 60 min in a Beckmann GS-6R centrifuge (Beckman Instruments). Following centrifugation, cells were incubated for 12 h at 32°C, washed and maintained in RPMI supplemented with 10% FCS, rIL2 and the antibiotics as above. A second series of infected cells was treated with sheep anti-gp120 at a dilution of 1:250 throughout the infection procedure in order to determine the specificity of the viruses for targeting the CD4-positive cell population.

Analysis of infected PBLs by PCR and Southern blot

A *lacZ* PCR Southern blot strategy was used to detect transduced *lacZ* DNA in PBLs. Briefly, cells were lysed by repeated freezing and thawing, cell nuclei pelleted and treated with proteinase K (0.1 mg/ml)-1% SDS in Tris-buffered saline for 4 h at 50°C. DNA was extracted by two steps of phenol-chloroform and ethanol precipitation. A fifth of this crude extract was used to detect *lacZ* gene transduction by PCR amplification. Amplification was carried out using *Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) and required 30 cycles of 1 min at 94°C; 2 min at 50°C and 3 min at 72°C. The primers used to amplify *lacZ* were 5'-CTTCTATAGA CACGCAACAC-3' (sense) and 5'-CCCCTCGGA TTCTCCGTGGG-3' (antisense). Detection of the *lacZ* sequence was performed by Southern blotting and hybridization with a probe corresponding to the homologous *lacZ* region and generated by nick-translation using α³²P-dATP (3000 Ci/mmol; ICN Radiochemicals, Irvine, CA, USA). The glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GADPH) primers that were used as internal PCR amplification controls were 5-GCTGATGCCCCATG TTCGT-3 (sense oligonucleotide) and 5-CAAAGG TGGAGGAGTGGGTGT-3 (antisense oligonucleotide). The GADPH amplified product was detected using a probe covering the entire GADPH sequence⁴³ and generated by nick-translation.

FACS analysis of the transduced cells was performed with Cyto-Stat/Coulter Clone T8-FITC anti-CD8 fluorescein isothiocyanate or T4-RD1 anti-CD4 phycoerythrin-conjugated antibodies (Coulter Corporation, Miami, FL, USA). Following extensive washing, approximately 1–2 × 10⁵ CD4⁺ or CD8-positive cells were sorted using a FACSTAR cell sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Sorted cells were lysed and analyzed for *lacZ* transduction by PCR and Southern blot analysis as previously described. Quantification of signals on autoradiograms was performed with a Molecular Dynamics Personal Densitometer using ImageQuant software.

Acknowledgements

We thank Serge Sénéchal (Université de Montréal) and Nathalie Thessier (IRCM, Montréal, Québec, Canada) for their technical help in FACS analysis, Gary Pignac Kobinger, Drs Andrew J Mouland and Xiaojian Yao for helpful discussions. HXBH10ΔCT was kindly provided by Dr Heinrich G Göttinger (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). We also thank Dr Alan J Kingsman (Oxford University, Oxford, United Kingdom) for the pHIT plasmids. Sheep anti-gp120 (p288), the HeLaCD4 (HT4-6C) cells, and the HeLaCD4LTRβ-gal cells were respectively contributed by Dr Michael Phelan, Dr Bruce Chesebro and Dr Michael Emerman through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. RL is the recipient of a studentship of the National Health Research and Development Program (NHRDP). GL is the recipient of a scholarship from the 'Fond de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ). ÉAC is the recipient of a National Health Scientist award from NHRDP. This work was supported by grants from NHRDP/MRC and from the 'Fond pour la formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche' (FCAR) to GL and ÉAC.

References

- Lever AM. Gene therapy for HIV infection. *Brit Med Bull* 1995; 51: 149–166.
- Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 191–217.
- Maddon PJ *et al.* The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47: 333–348.
- Miller DG, Edwards RH, Miller AD. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 78–82.
- Miller DG, Miller AD. A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry. *J Virol* 1994; 68: 8270–8276.
- Weiss RA, Taylor CS. Retrovirus receptors. *Cell* 1995; 82: 531–533.
- Kavanaugh MP *et al.* Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7071–7075.
- Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989; 57: 659–666.
- Burns JC *et al.* Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8033–8037.
- Dong J, Roth MG, Hunter E. A chimeric avian retrovirus containing the influenza virus hemagglutinin gene has an expanded host range. *J Virol* 1992; 66: 7374–7382.
- Schnierle BS, Groner B. Retroviral targeted delivery. *Gene Therapy* 1996; 3: 1069–1073.
- Han X, Kasahara N, Kan YW. Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9747–9751.
- Somia NV, Zoppe M, Verma IM. Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to *in vivo* gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7570–7574.
- Palu G. Combined strategies for gene therapy of AIDS. *Gene Therapy* 1997; 4: 179–180.
- Lever AM. HIV and other lentivirus-based vectors. *Gene Therapy* 1996; 3: 470–471.



10

- 16 Johnson JE, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK. Specific targeting to CD4(+) cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J Virol* 1997; 71: 5060-5068.
- 17 Lusso P *et al*. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science* 1990; 247: 848-852.
- 18 Landau NR, Page KA, Littman DR. Pseudotyping with human T cell leukemia virus type 1 broadens the human immunodeficiency virus host range. *J Virol* 1991; 65: 162-169.
- 19 Landau NR, Littman DR. Packaging system for rapid production of murine leukemia virus vectors with variable tropism. *J Virol* 1992; 66: 5110-5113.
- 20 Spector DH *et al*. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J Virol* 1990; 64: 2298-2308.
- 21 Heng MC, Heng SY, Allen SG. Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. *Lancet* 1994; 343: 255-258.
- 22 Akkina RK *et al*. High-efficiency gene transfer into CD34⁺ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 1996; 70: 2581-2585.
- 23 Lodge R *et al*. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein. *J Virol* 1997; 71: 5696-5702.
- 24 Hunter E. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin Virol* 1994; 5: 71-83.
- 25 Dorfman T, Mammano F, Haseltine WA, Göttlinger HG. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 1994; 68: 1689-1696.
- 26 Yu X *et al*. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 1992; 66: 4966-4971.
- 27 Freed EO, Martin MA. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol* 1995; 69: 1984-1989.
- 28 Mammano F *et al*. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J Virol* 1995; 69: 3824-3830.
- 29 Freed EO, Martin MA. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 1996; 70: 341-351.
- 30 Mammano F *et al*. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J Virol* 1997; 71: 3341-3345.
- 31 Schnierle BS *et al*. Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8640-8645.
- 32 Lodge R *et al*. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* 1994; 68: 4857-4861.
- 33 Kimpton J, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J Virol* 1992; 66: 2232-2239.
- 34 Yu X, Yu QC, Lee TH, Essex M. The C-terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J Virol* 1992; 66: 5667-5670.
- 35 Cossel FL, Russell SJ. Targeting retrovirus entry. *Gene Therapy* 1996; 3: 946-956.
- 36 Soneoka Y *et al*. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 628-633.
- 37 Lodge R, Lalonde JP, Lemay G, Cohen EA. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* 1997; 16: 695-705.
- 38 Yao XJ, Göttlinger H, Haseltine WA, Cohen EA. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J Virol* 1992; 66: 5119-5126.
- 39 Chesebro B, Wehrly K. Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J Virol* 1988; 62: 3779-3788.
- 40 Goff S, Traktman P, Baltimore D. Isolation and properties of Moloney murine leukemia virus mutants: use of a rapid assay for release of virion reverse transcriptase. *J Virol* 1981; 38: 239-248.
- 41 Lee MH, Sano K, Morales FE, Imagawa DT. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1717-1721.
- 42 Bunnell BA *et al*. High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7739-7743.
- 43 Kobinger GP *et al*. Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency virus type 1 vpu gene. *Gene Therapy* 1997; 4: 868-874.

CHAPITRE 5:
DISCUSSION

Objectifs et stratégies.

L'objectif principal des travaux de cette thèse consistait à définir les structures ou séquences de glycoprotéines du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) servant de signal de transport des virions vers le domaine basolatéral des cellules épithéliales. En effet, dans le cadre de mes travaux de maîtrise, la découverte que la partie intracytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire du VIH possédait au moins une partie d'un tel signal de ciblage vers la membrane basolatérale nécessitait une caractérisation plus poussée pouvant permettre l'étude des mécanismes impliqués dans ce phénomène. Parallèlement, une analyse des propriétés de transport polarisé de deux autres glycoprotéines de rétrovirus, différents du VIH, fut amorcée. En effet, les indices apportés par l'étude des régions cytoplasmiques moins longues, plus simples, des glycoprotéines des virus HTLV et MuLV pourraient aboutir à des résultats utiles par comparaison avec le long domaine cytoplasmique de la gp41 du VIH-1. De plus, aucune étude détaillée de signaux de ciblage sur ces glycoprotéines n'était disponible, voire aucune étude sur le ciblage de la glycoprotéine du HTLV dans les cellules épithéliales et rien ne permettait d'affirmer que les signaux de transport des trois glycoprotéines transmembranaires puissent être similaires.

Pour identifier les signaux de transport basolatéral de ces trois glycoprotéines d'enveloppe de rétrovirus, des cellules MDCK cultivées sur de membranes semi-perméables furent utilisées. L'utilisation de membranes semi-perméables pour l'étude du transport polarisé des protéines est aujourd'hui bien établie, permettant l'accès aux milieux baignant les domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique. Les constructions plasmidiques peuvent être alors introduites par lipofection à l'intérieur des cellules MDCK, assurant une intégrité de la monocouche cellulaire au temps de la transfection. Après une expression transitoire, les particules virales sont recueillies et quantifiées par un test immuno-enzymatique (ELISA) très sensible détectant la protéine majeure de la capsid du VIH, la CAp24. Tel que décrit au chapitre 3, les glycoprotéines des virus HTLV et MuLV furent donc étudiées dans un contexte de pseudotypes du virus VIH. Ceci doit être souligné, car la mise au point de méthodes de détection aussi sensibles que celle utilisée pour le VIH exigerait sans doute un temps considérable. L'incorporation des

glycoprotéines hétérologues au VIH a donc permis de contourner cet obstacle.

Comme précédemment observé pour le VIH, l'introduction de quantités molaires croissantes des plasmides codant pour les glycoprotéines du HTLV ou du MuLV, avec l'ADN *env*-négatif du VIH, a permis d'établir pour la première fois que les glycoprotéines du virus HTLV pouvaient diriger une capsid hétérologue (celle du VIH) vers la membrane basolatérale des cellules MDCK. Cette propriété sous-entend l'existence d'un signal de transport basolatéral sur la glycoprotéine. De même, les glycoprotéines du MuLV ciblaient le bourgeonnement du VIH vers le domaine basolatéral confirmant la présence d'un signal basolatéral sur ces protéines tel que déjà observé par un autre groupe utilisant une approche différente⁴⁴².

En plus des résultats préliminaires obtenus par l'analyse de plusieurs glycoprotéines tronquées du VIH, du HTLV et du MuLV (présentés dans mon mémoire), trois facteurs ont contribué à préciser la stratégie de mutagenèse qui serait utilisée par la suite pour l'étude du signal de polarisation des trois virus: 1) la caractérisation d'un nouveau signal d'endocytose à base de tyrosine à l'intérieur du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine du virus d'immunodéficience simienne (VIS); 2) l'analyse d'un nombre grandissant de signaux de transport basolatéral des protéines cellulaires indiquant que ces derniers chevauchent souvent ce type de signal endosomal à base de tyrosine et, enfin, 3) la forte conservation parmi les souches de VIH des quatre tyrosines intracytoplasmiques de la gp41, dont deux se retrouvent dans la séquence optimale YXXL. Cependant, aucune des tyrosines ne se trouvait dans l'extrémité carboxy-terminale de la molécule, bien que nos résultats avec les glycoprotéines gp41 tronquées suggéraient un rôle de cette région dans le ciblage. Comme pour plusieurs études précédentes sur l'incorporation de la gp41 au VIH, l'analyse de glycoprotéines tronquées doit être interprétée avec prudence. En effet, l'altération de la région cytoplasmique affecte certaines des fonctions de l'ectodomaine et il est donc logique de soupçonner que la modification d'une partie de la région cytoplasmique puisse avoir des conséquences sur les fonctions d'une autre région du même domaine. Ce phénomène est d'ailleurs illustré par certaines délétions du récepteur pour la transferrine et de la phosphatase alcaline placentaire⁵¹⁸.

Signal de polarisation du VIH.

Une analyse de la glycoprotéine du VIH contenant une substitution de la tyrosine la plus rapprochée de la membrane plasmique en sérine (Y712S) a établi cet acide aminé comme la seule des quatre tyrosines du domaine cytoplasmique de la gp41 à faire partie d'un signal de transport basolatéral (chapitre 2). En plus de l'effet d'une telle substitution sur la polarisation du bourgeonnement viral, la distribution même des glycoprotéines à la surface cellulaire était affectée pour la glycoprotéine mutante, ce qui illustre bien que les glycoprotéines de l'enveloppe sont les seules molécules qui déterminent à quel domaine membranaire le VIH va bourgeonner. S'il est clair que cette tyrosine fait partie intégrale d'un signal de transport basolatéral, il demeurerait aussi essentiel d'examiner l'effet de la mutation sur les autres fonctions de la glycoprotéine.

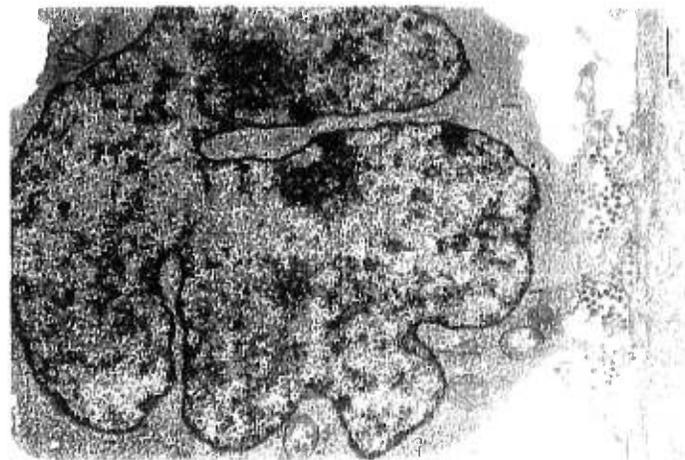
Dans une expérience permettant de mesurer le potentiel infectieux des virions ayant incorporé les glycoprotéines sauvages ou celles possédant une substitution de la tyrosine, il a été démontré que les deux glycoprotéines confèrent aux virus une efficacité similaire d'infection. De plus, une analyse de la cinétique de la réplication de ces virus dans une lignée lymphocytaire permet de conclure que le virus mutant se réplique normalement. Ces résultats illustrent donc que la substitution de la tyrosine influence d'une façon assez spécifique le signal de polarisation, et que les autres fonctions des glycoprotéines mutantes ne sont pas affectées. Il faut toutefois noter le chevauchement entre signaux d'endocytose et signaux de transport basolatéral.

Comme il a été mentionné vers la fin de l'introduction générale^{272, 273, 455}, l'isolement d'une souche de VIS possédant une cinétique rapide de réplication ainsi qu'une expression accrue des glycoprotéines à la surface de la cellule a soulevé de nombreuses hypothèses sur la contribution de signaux de transport à base de tyrosine dans la pathogénèse virale. Le modèle de l'équipe de Siliciano propose que le signal d'endocytose ne soit actif qu'en absence de Gag, permettant l'élimination de glycoprotéines inutiles au bourgeonnement du virus à la surface de la cellule⁴⁴⁹. La distribution uniforme du bourgeonnement du virus mutant à la surface de lymphocytes observée en microscopie électronique (illustrée à la figure 22)^{50, 455} impliquerait une forme de ciblage, de

FIGURE 22

Page 136

Ces figures, tirées de **Tan *et al.*** (à gauche) et de **Bugelski *et al.*** (à droite), illustrent comment le bourgeonnement polarisé du VIH pourrait se manifester aux sites de contact entre les cellules (à gauche: entre lymphocyte et lignée épithéliale ME-180) et dans les lymphocytes (à droite: bourgeonnement à un pôle du lymphocyte). Ces phénomènes demeurent encore à l'étude.



polarisation du bourgeonnement dans les lymphocytes. La contribution de signaux supplémentaires est aussi envisageable; en effet, l'interaction avec la machinerie de transport protéique, c'est-à-dire le complexe AP2, et une séquence YXXL en aval de celle étudiée a été démontrée³⁶⁹. Il demeure qu'une mutagénèse encore plus fine, ciblant les acides aminés entourant le signal de transport et la tyrosine permettrait peut-être de délimiter avec plus de précision les acides aminés importants soit pour l'endocytose, soit pour le transport basolatéral de la protéine. Dans cette optique, un début d'analyse plus complète du signal a été amorcée mais mériterait d'être poursuivie.

La présence d'un signal YXXL ne suffit pas en soi à la mise en place d'un signal de transport ou d'endocytose fonctionnel. Ainsi, il a déjà été mentionné que la structure la plus souvent associée à un signal d'endocytose est celle d'un tour β . La présence d'une proline à proximité de la tyrosine du signal de polarisation est un indice de cette structure particulière⁵¹³. La perte d'un signal fonctionnel de polarisation lors de la substitution de la proline en alanine laisse envisager qu'une structure en tour β est présente et nécessaire pour le signal de transport basolatéral. L'effet d'une autre substitution sur le signal de polarisation a aussi été étudiée: une phénylalanine fut introduite à la place de la tyrosine en vue d'observer l'effet d'une substitution de la tyrosine par un autre acide aminé aromatique. En effet, il est connu que certaines tyrosines de signaux d'endocytose sont interchangeables avec des phénylalanines²²⁹. L'observation d'un bourgeonnement polarisé du virus, quoique moins accentuée, permet de postuler que le signal de transport basolatéral constitue un signal où une telle substitution peut avoir lieu. Cependant, les résultats du groupe de Hoxie indiquent qu'une telle substitution est inhibitrice du signal d'endocytose retrouvé dans la glycoprotéine du VIS^{272, 273}. La signification de ces observations demeure encore à être établie. La possibilité de maintenir le signal de polarisation intact en substituant la tyrosine par une phénylalanine indique toutefois qu'à la différence de certaines protéines cellulaires⁴⁶⁶, le signal de transport ne nécessiterait pas de phosphorylation pour être fonctionnel puisque la phénylalanine ne peut être phosphorylée. Par contre, ceci n'implique pas que la glycoprotéine du VIH n'est pas phosphorylée: jusqu'à maintenant, et à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible à ce sujet. Cependant, si un tel projet devait être démarré, l'analyse devrait porter à la fois sur les glycoprotéines de la surface

cellulaire et du virion puisqu'une telle modification pourrait être spécifique à un des deux contextes.

Il a été question d'incorporation de protéines cellulaires dans le virion lors de l'introduction. Si le complexe AP interagit avec le signal YXXL de la glycoprotéine, il est donc possible que de tels complexes puissent se retrouver à l'intérieur de la particule virale. Par contre, le modèle de Siliciano *et al.* ne préconise pas une telle association; en effet, puisque l'interaction avec Gag bloque l'endocytose, elle inhiberait vraisemblablement une telle incorporation de AP2 (ou, plus précisément, de la chaîne μ du complexe de transport). Une étude de l'incorporation de cette protéine dans les virus MuLV pourrait être plus pertinente: l'incorporation de ces glycoprotéines dans le virion se faisant apparemment par une interaction plus indirecte avec les protéines Gag.

L'interaction du signal de polarisation du VIH avec les adaptines a récemment été démontrée utilisant la chromatographie d'affinité. Une importante critique de ces expériences demeure leur nature *in vitro*, et, malgré la grande quantité d'observations supportant de tels résultats, il demeure qu'une interaction dans un système plus physiologique n'a pas encore été démontré. Une possibilité à explorer serait donc l'utilisation d'un système d'interaction du type double-hybride mis au point directement dans les cellules mammaliennes³⁰⁸. Le caractère encore nouveau de ce système qui n'a pas encore entièrement fait ces preuves, ainsi que le temps qui devrait être investi dans une telle approche suggère la recherche d'autres avenues pour vérifier *in vivo* l'importance de ces interactions.

Le signal de polarisation des autres rétrovirus.

L'étude des glycoprotéines des virus MuLV et HTLV et de leur signal de polarisation a permis de mettre en évidence la conservation de ce signal parmi plusieurs rétrovirus. Il est à noter que l'approche retenue dans cette étude utilisait des VIH pseudotypes ayant incorporé ces glycoprotéines hétérologues. En effet, l'efficacité du virus HTLV à infecter des cellules comme virus libre est normalement très limité, et le rétrovirus se propage presque exclusivement via une transmission de cellule-à-cellule¹⁰⁶. L'efficacité observée dans le test de complémentation visant à transduire le gène rapporteur CAT dans les lymphocytes indique peut-être que le facteur responsable de la

faible transmissibilité du virus réside sur les protéines Gag du HTLV, protéines remplacées par celles du VIH dans nos expériences (chapitre 3). Outre l'intérêt dans la transmission du virus, les expériences élaborées pour étudier l'effet de la substitution des deux tyrosines (YXXYXXL) dans le contexte de la glycoprotéine transmembranaire du HTLV ont permis d'évaluer l'importance de ces acides aminés dans la fonction de la glycoprotéine. En effet, les virus ayant incorporés des glycoprotéines possédant une substitution dans une des deux tyrosines (sauf Y476F) furent considérablement affectés dans leur potentiel d'infection. Cependant, l'absence du bourgeonnement polarisé du virus ayant incorporé la glycoprotéine mutante Y476F permet de déduire que cette tyrosine est importante pour le signal de transport polarisé, indépendamment d'un effet sur l'incorporation ou l'infection des cellules par le virus.

La partie intracytoplasmique de la protéine p15E du MuLV a surtout jusqu'à maintenant été étudiée pour les mécanismes gouvernant le clivage du "peptide R" carboxy-terminal. D'ailleurs, puisque des mutations ponctuelles peuvent souvent affecter le clivage de ce peptide, une analyse du domaine cytoplasmique peut parfois s'avérer difficile^{194, 509}. Cependant, les glycoprotéines mutantes construites dans notre étude se sont toutes avérées fonctionnelles (sauf dans leur signal de polarisation). Il serait sans doute intéressant de poursuivre les travaux sur MuLV dans le cadre d'un virus homologue sans passer par le pseudotypage; certaines études sur la protéine Gag, au niveau de la protéine de la matrice ou de la protéine de la capsid^{7, 478}, le transport de Gag et l'incorporation des glycoprotéines dans le virion^{109, 494, 495} pourraient être poursuivies dans le cadre du bourgeonnement polarisé.

L'effet de certaines autres glycoprotéines sur le bourgeonnement polarisé du VIH a été étudié, sans être mentionné dans les publications précédentes. La glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire, une glycoprotéine basolatérale, permet le bourgeonnement polarisé du VIH à ce domaine. Des études ont été entreprises pour vérifier si la glycoprotéine apicale hémagglutinine permettrait de rediriger le bourgeonnement d'un rétrovirus (le MuLV) vers le domaine apical. A ce moment, les résultats demeurent préliminaires.

Importance potentielle de la polarisation du bourgeonnement dans la pathogénèse virale.

La prochaine dans la perspective de ce travail sur les glycoprotéines virales est une approche essentiellement biopathologique: l'observation de l'effet d'un rétrovirus mutant dans son signal de bourgeonnement polarisé (par exemple, MuLV) sur son hôte pourra en effet donner de précieuses informations sur l'importance de ce phénomène dans la pathogénèse virale. Dans cet ordre d'idée, on peut déjà souligner les travaux de Tashiro et coll. (mentionnés au chapitre 1) sur le virus Sendai indiquant l'importance du bourgeonnement polarisé dans la pathogénèse de ce virus. Dans le cas des rétrovirus, un isolat clinique du VIH associé à un déclin rapide de la population lymphocytaire CD4-positive et à une charge virale anormalement élevée possède une substitution de la tyrosine du signal de ciblage; cette découverte permet donc d'entrevoir un rôle important de la polarisation dans la pathogénèse rétrovirale¹⁶⁷.

L'infection des cellules épithéliales par le VIH est associé au développement de perturbations intestinales et au dysfonctionnement du rein lors du développement du SIDA^{17, 41, 88, 94, 107, 360, 414, 523}. Les cellules épithéliales pourraient être impliquées directement dans le développement de ces aspects de la maladie puisque plusieurs études démontrent que ces cellules peuvent être infectées par le VIH^{2, 81, 137, 138, 156, 354, 355, 375, 388, 498}. Cette cytotoxicité peut être due à une multitude de facteurs viraux et cellulaires. Parmi les facteurs viraux, la toxicité des glycoprotéines est maintenant un phénomène bien documenté: entre autres, deux régions en hélice- α de la partie intracytoplasmique de la glycoprotéine ont été associées à la formation de pores à la membrane plasmique³⁴³. Cette caractéristique est peut être une des raisons ayant rendu difficile nos essais d'établissement de lignées épithéliales stables exprimant les glycoprotéines (données non présentées).

Le domaine basolatéral des cellules épithéliales est analogue, par son interaction avec les cellules voisines, aux zones de contact entre les cellules, polarisées ou non. Le ciblage de certains éléments du cytosquelette dans ces zones d'interactions cellulaires est facilement observable; c'est aussi un domaine privilégié pour la transmission du virus entre les cellules^{50, 135, 391, 392, 400, 403, 404}. Les phénomènes de bourgeonnement du VIH aux zones de contacts

entre les cellules et son ciblage spécifique à la région basolatérale des cellules épithéliales peuvent donc être reliés. L'étude de la glycoprotéine mutante dans le signal de polarisation pourrait permettre de poursuivre l'étude du lien entre ces deux phénomènes.

Signal d'incorporation des glycoprotéines virales.

La polarisation du bourgeonnement du VIH dépend donc d'un signal de polarisation à l'intérieur de la glycoprotéine, mais aussi de l'incorporation de cette glycoprotéine dans la particule virale, présumément en interagissant avec Gag³⁰¹. L'incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, à l'opposé des autres glycoprotéines de rétrovirus, est un processus très sélectif. La longue partie intracytoplasmique de la gp41 serait le facteur limitant dans cette sélection. Selon le modèle de Hunter²³⁴ (figure 23), l'incorporation de la glycoprotéine du VIH est un processus actif, nécessitant une interaction avec Gag; les autres glycoprotéines des rétrovirus nécessiteraient une interaction indirecte ou encore l'établissement de mécanismes impliquant une exclusion des autres protéines cellulaires dans la particule virale en formation. Récemment, il a été démontré que la délétion de la partie cytoplasmique de la gp41 convertissait le mode d'incorporation de la molécule, d'actif à indirect^{157, 158, 317}. L'incorporation de cette gp41 tronquée dans un virus hétérologue MuLV devenait alors possible^{317, 461}. Pour étudier ce phénomène complémentaire mais aussi essentiel au bourgeonnement viral polarisé, une approche fut élaborée pouvant mener à l'établissement de nouveaux vecteurs rétroviraux possédant le tropisme naturel du VIH. Cette application a donc potentiellement une importance dans l'élaboration de nouvelles stratégies de thérapie génique.

Une fois que l'incorporation de la glycoprotéine gp41 tronquée dans les particules virales MuLV fut confirmée, ces virus MuLV possédant le tropisme du VIH furent utilisés pour transduire un gène rapporteur LacZ d'une manière à cibler les cellules CD4+ d'une population de lymphocytes du sang périphérique. L'ADN du gène rapporteur est clairement identifiable, en utilisant une sonde spécifique, dans les cellules CD4+ lorsque le vecteur rétroviral possédant la gp41 est utilisé. Quoique cette technologie est encore loin d'une application médicale réelle, la démonstration d'une telle stratégie utilisant des vecteurs possédant un tropisme équivalent au VIH ouvre la voie à

plusieurs autres expériences qui jusqu'à maintenant demeuraient difficiles à concevoir faute de vecteurs ciblant spécifiquement les cellules CD4+.

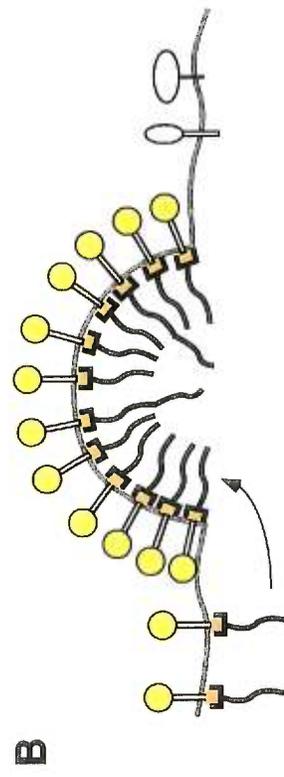
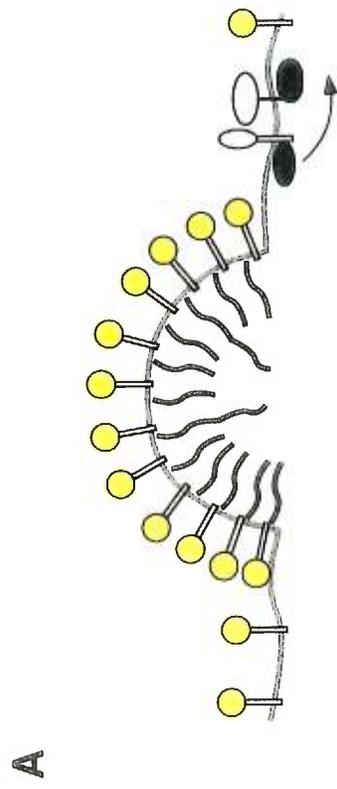
Elaboration d'un modèle récapitulatif.

Les observations recueillies sur l'incorporation des glycoprotéines et sur les déterminants responsables du bourgeonnement polarisé des virus nous permettent d'élaborer un modèle de l'assemblage des rétrovirus en général et du VIH en particulier. Les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont synthétisées dans le RE et sont acheminées à la surface de la cellule par les voies du transport vésiculaire. Bien que le lieu précis de l'interaction entre les glycoprotéines Env de lentivirus et les protéines Gag n'a pas encore été identifié, plusieurs observations suggèrent une telle interaction, particulièrement en ce qui a trait au VIH. Cependant, il faut souligner que les glycoprotéines des rétrovirus simples (à courte queue cytoplasmique) pourraient être incorporées dans le virion de façon passive: tel serait le cas des glycoprotéines tronquées du VIH. La découverte d'un signal de transport de type YXXL dans la partie cytoplasmique des glycoprotéines du VIH permet d'incorporer au modèle d'assemblage les processus par lesquels le virus contrôle la quantité de glycoprotéines présentes à la surface cellulaire. Ainsi, le modèle de Siliciano *et al.* propose que l'interaction du signal YXXL (avec AP-2) permet l'endocytose des glycoprotéines qui ne sont pas incorporées dans la particule virale. Le lieu d'une telle interaction (AP-2/Env) serait au niveau de la membrane plasmique, en aval de celle impliquant Gag. Une affinité plus grande de l'Env pour les protéines Gag, par rapport à AP-2, expliquerait aussi l'effet inhibiteur de Gag sur l'endocytose des glycoprotéines. Cet effet inhibiteur de Gag doit aussi être pris en considération dans l'étude du bourgeonnement polarisé du virus. En effet, l'interaction de l'Env avec les adaptines impliquées dans le ciblage basolatéral précéderait celle avec Gag. Ceci permettrait aux glycoprotéines de récupérer par après les protéines de la capsidie menant à l'assemblage polarisé du virus. Cette interaction des glycoprotéines suggère l'existence de complexes AP non-identifiés responsables du ciblage basolatéral et qui reconnaissent les signaux à base de tyrosine. L'utilisation de ce mécanisme autant par le MuLV que par le VIH suggère qu'il est indépendant du mode d'incorporation des glycoprotéines. Cependant, cette incorporation demeure essentielle pour le bourgeonnement polarisé des particules virales.

FIGURE 23

Page 144

Les modèles d'incorporation des glycoprotéines de E. Hunter. En **A.**, les glycoprotéines nécessitent une certaine interaction avec les protéines Gag; elles sont incorporées "de façon active". En **B.**, les glycoprotéines sont incorporées dans la particule virale de façon passive, mais certaines protéines membranaires cellulaires en sont exclues par des mécanismes encore inconnus. Figure tirée de Coffin, JM; SH Hughes et HE Varmus (1997): **Retroviruses**; CSH Press; Cold Spring Harbor, NY; 843 pages.



CHAPITRE 6:
CONCLUSIONS ET
CONTRIBUTIONS MAJEURES

Les glycoprotéines des rétrovirus (et spécifiquement le VIH) possèdent donc de nombreuses fonctions dans le cycle de réplication viral. Parmi elles, il y a la reconnaissance du récepteur, la fusion de l'enveloppe virale ainsi qu'une participation comme constituante importante du virus même. Dans le cas du VIH en particulier, la gp120 est un déterminant antigénique majeur du virion. Le travail décrit dans cette thèse a permis de clarifier une autre fonction importante des glycoprotéines des rétrovirus: le choix du lieu de bourgeonnement. Ce phénomène pourrait être non seulement essentiel pour la dissémination et la transmission optimales du VIH, mais aussi pour celle du HTLV, et sans doute pour les rétrovirus murins pouvant être plus facilement utilisés comme modèle de pathogénèse. Le concept de bourgeonnement viral ciblé ou polarisé n'est donc pas restreint aux cellules épithéliales, mais a des implications directes dans la biologie de plusieurs groupes de virus.

Brièvement, les contributions majeures et originales de cette thèse peuvent être résumées comme suit:

1) Démonstration d'un signal nécessaire pour le ciblage du bourgeonnement basolatéral du virus de l'immunodéficience humaine. Ce signal est constitué d'une tyrosine essentielle disposée dans une séquence YXXL et probablement d'une structure locale en tour β . Ce signal est responsable du transport des glycoprotéines au domaine basolatéral des cellules épithéliales, et ce phénomène entraîne le bourgeonnement du virus à ce domaine.

2) Démonstration d'un signal de transport basolatéral conservé dans les glycoprotéines de plusieurs rétrovirus. Le signal retrouvé dans le domaine intracytoplasmique des glycoprotéines des virus HTLV et MuLV est aussi basé sur une tyrosine critique ou essentielle au signal.

3) Démonstration qu'une glycoprotéine de rétrovirus hétérologue peut diriger le bourgeonnement du VIH vers le domaine basolatéral des cellules épithéliales. Cette observation souligne que le ciblage approprié des glycoprotéines ainsi que leur

incorporation à la particule virale contribuent au bourgeonnement polarisé du virus.

4) Démonstration que des vecteurs rétroviraux basés sur MuLV qui ont incorporé des glycoprotéines tronquées du VIH transduisent spécifiquement un gène dans les cellules CD4-positives d'une population de lymphocytes périphériques. Ces observations confirment des résultats déjà rapportés dans la littérature mais permettent d'entrevoir l'utilité de ces vecteurs dans des stratégies de thérapie génique et de concevoir de nouvelles expériences impliquant une telle approche de transduction ciblée de gènes vers les cellules CD4-positives.

En plus de ces contributions, j'ai aussi eu la possibilité de participer à d'autres projets tout au long de mes études doctorales. Ces projets sont reliés de loin ou de proche à cette thèse. Quelques uns ont abouti à des publications:

Lodge, R.; J.L. Darlix et E.A. Cohen (1998). L'infection par le VIH: Rôle des facteurs viraux. *M/S Médecine-Sciences* **14**: 148-154 [présenté en annexe].

Subbramanian, R.A.; A. Kessous-Elbaz; **R. Lodge**; J. Forget; X.J. Yao; D. Bergeron et E.A. Cohen (1998). Human immunodeficiency virus type-1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **187** (7): 1103-1111.

Lalonde, J.P.; J. Deschambeault; **R. Lodge**; E.A. Cohen et G. Lemay (1998). A tyrosine-based intracytoplasmic signal of the HIV-1 envelope glycoprotein is involved in restriction of budding at one pole of infected lymphocytes. En préparation.

CHAPITRE 7:
BIBLIOGRAPHIE
GENERALE

1. **Abeijon, C., et C.B. Hirschberg.** 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **17**:32-36.
2. **Adachi, A., S. Koenig, H.E. Gendelman, D. Daugherty, S. Gattoni-Celli, A.S. Fauci, et M.A. Martin.** 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **61**:209-213.
3. **Adams, A.E.M., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat, et J.R. Pringle.** 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **111**:131-142.
4. **Aiken, C., J. Konner, N.R. Landau, M.E. Lenburg, et D. Trono.** 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement of a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell.* **76**:853-864.
5. **Albritton, L.M., L. Cheng, D. Scadden, et J.M. Cunningham.** 1989. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell.* **57**:659-666.
6. **Aldovini, A., et R.A. Young.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of non-infectious virus. *J. Virol.* **64**:1920-1926.
7. **Alin, K., et S.P. Goff.** 1996. Mutational analysis of interactions between the Gag precursor proteins of murine leukemia viruses. *Virology.* **216**:418-24.
8. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, et E.A. Berger.** 1996. CC-CKR5: a Rantes, MIP1-alpha, MIP1-beta receptor as a fusion co-factor for macrophage tropic HIV-1. *Science.* **272**:1955-1958.
9. **Almers, W., et C. Stirling.** 1984. Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Membr. Biol.* **77**:169-186.
10. **Amerongen, H.M., R. Weltzin, C.M. Farnet, P. Michetti, W.A. Haseltine, et M.R. Neutra.** 1991. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: A mechanism for transmission of AIDS. *J. AIDS Hum. Retrovirology.* **4**:760-765.

11. **Anderson, J.M., B.R. Stevenson, L.A. Jesaitis, D.A. Goodenough, et M.S. Mooseker.** 1988. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby kidney cells. *J. Cell Biol.* **106**:1141-1149.
12. **Andersson, A.M., L. Melin, A. Bean, et R.F. Pettersson.** 1997. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a Bunyaviridae (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J. Virol.* **71**:4717-4727.
13. **Aroeti, B., P.A. Kosen, I.P. Kuntz, F.E. Cohen, et K.E. Mostov.** 1993. Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Cell Biol.* **128**:1149-1160.
14. **Arthur, L.O., J.W. Bess, R.C. Sowder, R.E. Benveniste, D.L. Mann, J.C. Chermann, et L.E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science.* **258**:1935-1938.
15. **Arvan, P., et J. Lee.** 1991. Regulated and constitutive protein targeting can be distinguished by secretory polarity in thyroid epithelial cells. *J. Cell Biol.* **112**:365-376.
16. **Asano, A., et K. Asano.** 1988. Binding of cholesterol and inhibitory peptide derivatives with fusogenic hydrophobic sequence of F glycoprotein of HVJ (Sendai virus): possible implication in the fusion process. *Biochem.* **27**:1321-1331.
17. **Asmuth, D.M., S.M. Hammer, et C.A. Wanke.** 1994. Physiological effects of HIV infection on human intestinal epithelial cells: an in vitro model for HIV enteropathy. *AIDS.* **8**:205-211.
18. **Ball, J.M., M.J. Mulligan, et R.W. Compans.** 1997. Basolateral sorting of the HIV type 2 and SIV envelope glycoproteins in polarized epithelial cells: role of the cytoplasmic domain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **13**:665-75.
19. **Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature.* **226**:1209-1211.
20. **Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. Le Grice, et J.L. Darlix.** 1989. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J.* **8**:3279-3285.

21. **Barouch, D.H., et S.C. Harrison.** 1994. The interaction between the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* **68**:3982-3989.
22. **Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, et L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science.* **220**:868-871.
23. **Bartles, J.R., H.M. Feracci, B. Stieger, et A.L. Hubbard.** 1987. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell Biol.* **105**:1241-1251.
24. **Basak, S., H. Turner, et R.W. Compans.** 1992. Expression of SV40 receptors on apical surfaces of polarized epithelial cells. *Virology.* **190**:393-402.
25. **Bastiani, L., S. Laal, M. Kim, et S. Zolla-Pazner.** 1997. Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type-1 virions. *J. Virol.* **71**:3444-3450.
26. **Bauerfeind, R., et W.B. Huttner.** 1993. Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules, and synaptic vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:628-635.
27. **Bennett, G., S. Parsons, et E. Carlet.** 1984. Influence of colchicine and vinblastine on the intracellular migration of secretory and membrane glycoproteins:I. Inhibition of glycoprotein migration in various rat cell types as shown by light microscope radioautography after injection of ³H-fucose. *Am. J. Anat.* **170**:521-530.
28. **Bennett, M.K.** 1995. SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:581-586.
29. **Bennett, V.** 1992. Ankyrins: adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **267**:8703-8706.
30. **Bennett, V.** 1990. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol. Rev.* **70**:1029-1065.
31. **Bergmann, J.E., et P.J. Fusco.** 1988. The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral

membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. *J. Cell Biol.* **107**:1707-1715.

32. **Bhat, S., R.V. Mettus, E. Premkumar Reddy, K.E. Ugen, V. Srikanthan, W.V. Williams, et D.B. Weiner.** 1993. The galactosyl ceramide/sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **9**:175-181.

33. **Bhat, S., S.L. Spitalnik, F. Gonzalez-Scarano, et D.H. Silberberg.** 1991. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:7131-7134.

34. **Binder, L.I., A. Frankfurter, et L.I. Rebhun.** 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* **101**:1371-1378.

35. **Blobel, G.** 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:1496-1500.

36. **Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L.C. Cantley, J.S. Bonifacino, et T. Kirchhausen.** 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* **15**:5789-5795.

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

38. **Bomsel, M., et K. Mostov.** 1992. Role of heterotrimeric G proteins in membrane traffic. *Mol. Biol. Cell.* **3**:1317-1328.

39. **Bour, S., U. Schubert, K. Peden, et K. Strebel.** 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J. Virol.* **70**:820-829.

40. **Bour, S., et K. Strebel.** 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J. Virol.* **70**:8285-8300.

41. **Bourgoignie, J.J.** 1990. Renal complications of human immunodeficiency virus type-1. *Kidney Int.* **37**:1571-1584.

42. **Bourinbaiar, A.S., et D.M. Phillips.** 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. AIDS Hum. Retrovirology.* **4**:56-63.

43. **Brand, D., K. Srinivasan, et J. Sodroski.** 1995. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J. Virol.* **69**:166-171.
44. **Bre, M.-H., T.E. Kreis, et E. Karsenti.** 1987. Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable deetyrosinated microtubules. *J. Cell Biol.* **105**:1283-1296.
45. **Brewer, C.B., et M.G. Roth.** 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* **114**:413-421.
46. **Brody, B.A., S.S. Rhee, M.A. Sommerfelt, et E. Hunter.** 1992. A viral protease mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:3443-3447.
47. **Brown, D.A., B. Crise, et J.K. Rose.** 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science.* **245**:1499-1501.
48. **Brown, D.A., et J.K. Rose.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* **68**:533-544.
49. **Bryant, M., et L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:523-527.
50. **Bugelski, P.J., B.E. Maleeff, A.M. Klinkner, J. Ventre, et T.K. Hart.** 1995. Ultrastructural evidence of an interaction between env and gag proteins during assembly of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **11**:55-64.
51. **Bukovsky, A.A., T. Dorfman, A. Weimann, et H.G. Gottlinger.** 1997. Nef association with human immunodeficiency virus type-1 virions and cleavage by the viral protease. *J. Virol.* **71**:1013-1018.
52. **Bukrinsky, M.I., S. Haggerty, M.P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, et M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature.* **365**:666-669.

53. **Bukrinsky, M.I., N. Sharova, M.P. Dempsey, T.L. Stanwick, S. Bukrinskaya, S. Haggerty, et M. Stevenson.** 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6580-6584.
54. **Burgin, K.E., M.N. Waxham, S. Rickling, S.A. Westgate, W.C. Mobley, et P.T. Kelly.** 1990. In situ hybridization histochemistry of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**:1788-1798.
55. **Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, et C. Turner.** 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:487-525.
56. **Butor, C., et J. Davoust.** 1992. Apical to basolateral cell surface ratio and polarity of MDCK cells grown on different supports. *Exp. Cell Res.* **203**:115-127.
57. **Camaur, D., et D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **70**:6106-6111.
58. **Cann, A.J., et I.S.Y. Chen.** 1996. Human T-cell leukemia virus types I and II, p. 1849-1880. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
59. **Cao, J., L. Bergeron, E. Helseth, M. Thali, H. Repke, et J. Sodroski.** 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **67**:2747-2755.
60. **Caplan, M., et K.S. Matlin.** 1989. Sorting of membrane and secretory proteins in polarized epithelial cells, p. 71-127. *In* K. Matlin, J. Valentich (ed.), *Functional epithelial cells in culture*. Alan R. Liss, New York.
61. **Capon, D.J., et R.H.R. Ward.** 1991. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:649-678.
62. **Carson, D.D., J.P. Tang, J. Julian, et S.R. Glasser.** 1988. Vectorial secretion of proteoglycans by polarized rat uterine epithelial cells. *J. Cell Biol.* **107**:2425-2435.
63. **Casanova, J.E., P.P. Breitfeld, S.A. Ross, et K.E. Mostov.** 1990. Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science.* **248**:742-745.

64. **Cereijido, M., A. Ponce, et L.G. Mariscal.** 1989. Tight junctions and apical/basolateral polarity. *J. Membr. Biol.* **110**:1-9.
65. **Cereijido, M., E.S. Robbins, W.J. Dolan, A. Rotunno, et D. Sabatini.** 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell. Biol.* **77**:853-880.
66. **Chamak, B., et A. Prochiantz.** 1989. Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development.* **106**:483-491.
67. **Chant, J.** 1996. Generation of cell polarity in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:557-565.
68. **Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Beraudfour, C.L. Jackson, et M. Chabre.** 1996. A human exchange factor for ARF contains sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature.* **384**:481-484.
69. **Checroune, F., X.J. Yao, H.G. Gottlinger, D. Bergeron, et E.A. Cohen.** 1995. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the p6 domain of Pr55Gag. *J. AIDS Hum. Retrovirology.* **10**:1-8.
70. **Chen, S.Y., Y. Matsuoka, et R.W. Compans.** 1991. Assembly and polarized release of Punta Toro virus and effects of brefeldin A. *J. Virol.* **65**:1427-1439.
71. **Chen, W.J., J.L. Goldstein, et M.S. Brown.** 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**:3116-3123.
72. **Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, et J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* **85**:1135-1148.
73. **Chow, M., C.J. Der, et J.E. Buss.** 1992. Structure and biological effects of lipid modifications on proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:629-636.
74. **Clark, E.A., et J.S. Brugge.** 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* **268**:233-239.

75. **Clarke, S.** 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxy-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:355-386.
76. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J.M. Champalimaud, et L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West Africa patients with AIDS. *Science.* **223**:343-346.
77. **Clayson, E.T., L.V. Brando, et R.W. Compans.** 1989. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J. Virol.* **63**:2278-2288.
78. **Cleves, A.E., T.P. McGee, E.A. Whitters, K.M. Champion, J.R. Aitken, W. Dowhan, M. Goebel, et V.A. Bankaitis.** 1991. Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell.* **64**:789-800.
79. **Coates, T.D., R.G. Watts, R. Hartman, et T.H. Howard.** 1992. Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell Biol.* **117**:765-774.
80. **Coffin, J.M.** 1996. Retroviridae: the viruses and their replication, p. 1767-1847. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
81. **Cohen, A.H., N.C. Sun, P. Shapshak, et D.T. Imagawa.** 1989. Demonstration of human immunodeficiency virus in renal epithelium in HIV-associated nephropathy. *Mod. Pathol.* **2**:125-128.
82. **Cohen, E.A., G. Dehni, J.G. Sodroski, et W.A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.
83. **Cohen, E.A., R.A. Subbramanian, et H.G. Gottlinger.** 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:219-235.
84. **Cole, N.B., et J. Lippincott-Schwartz.** 1995. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:55-64.
85. **Collawn, J.F., M. Stangel, L.A. Kuhn, V. Esekogwu, S. Jing, I.S. Trowbridge, et J.A. Tainer.** 1990. Transferrin receptor

internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*. **63**:1061-1072.

86. **Compans, R.W., et R.V. Srinivas.** 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:141-181.

87. **Compton, T., I.E. Ivanov, T. Gottlieb, M. Rindler, M. Adesnik, et D.D. Sabatini.** 1989. A sorting signal for the basolateral delivery of the vesicular stomatitis virus G protein lies in its luminal domain: Analysis of the targeting of VSV G-influenza hemagglutinin chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:4112-4116.

88. **Connor, E., S. Gupta, V. Joshi, F. DiCarlo, J. Offenberger, A. Minnefor, C. Uy, J. Oleske, et N. Ende.** 1988. Acquired immunodeficiency syndrome-associated renal disease in children. *J. Pediatr.* **113**:39-44.

89. **Centers for Disease Control.** 1981. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **30**:250.

90. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**:5783-5788.

91. **Cosson, P., et F. Letourneur.** 1997. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:484-487.

92. **Cross, G.A.M.** 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:1-39.

93. **Cullen, B.R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol. Rev.* **56**:375-394.

94. **D'Agati, V., J.I. Suh, L. Carbone, J.T. Cheng, et G. Appel.** 1989. Pathology of HIV-associated nephropathy: a detailed morphologic and comparative study. *Kidney Int.* **35**:1358-1370.

95. **Dagermont, C., A. Le Bivic, S. Rothemberger, B. Iacopetta, et L.C. Kuhn.** 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.* **12**:1713-1721.

96. **Dalglish, A.G., P.C.L. Beverly, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, et R.A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* **312**:763-766.

97. **Darlix, J.L., et B.P. Roques.** 1993. La nucléocapside du virus humain HIV-1. *Médecine/Sciences.* **9**:952-958.
98. **Darlix, J.L., C. Yu, L. Berthoux, M. Ottmann, N. Jullian, et B. Roques.** 1995. La nucléocapside du VIH-1: un paradigme pour la recherche et ses applications médicales. *Médecine/Sciences.* **11**:420-429.
99. **Darnell, J., H. Lodish, et D. Baltimore.** 1993. *Biologie moléculaire de la cellule*, 2ème éd., DeBoeck-Wesmael, Bruxelles. 1102 p.
100. **Davis, C.G., I.R. van Driel, D.W. Russell, M.S. Brown, et J.L. Goldstein.** 1987. The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J. Biol. Chem.* **262**:4075-4082.
101. **Dayton, A.I., J.G. Sodroski, C.A. Rosen, W.C. Goh, et W.A. Haseltine.** 1986. The transactivator gene of the human T-cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell.* **44**:941-947.
102. **De Camilli, P., S.D. Emr, P.S. McPherson, et P. Novick.** 1996. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science.* **271**:1533-1539.
103. **De Camilli, P., F. Navone, P. Miller, W.E. Theurkauf, et R.B. Vallee.** 1984. Distribution of microtubule associated protein-2 (MAP-2) in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience.* **11**:819-846.
104. **de Hoop, M.J., et C.G. Dotti.** 1993. Membrane traffic in polarized neurons in culture. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:85-92.
105. **Delamarre, L., C. Pique, D. Pham, T. Tursz, et M.C. Dokhelar.** 1994. Identification of functional regions in the human T-cell leukemia virus type I SU glycoprotein. *J. Virol.* **68**:3544-3549.
106. **Delamarre, L., A.R. Rosenberg, C. Pique, D. Pham, I. Callebaut, et M.C. Dokhelar.** 1996. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J. AIDS Hum. Retrovirology.* **13**:S85-S91.
107. **Délézay, O., N. Yahy, C. Tamalet, S. Baghdiguian, J.A. Boudier, et J. Fantini.** 1997. Direct effect of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) on intestinal epithelial cell differentiation: relationship to HIV-1 enteropathy. *Virology.* **238**:231-242.

108. **Dell'Angelica, E.C., H. Ohno, C.E. Ooi, E. Rabinovitch, K.W. Roche, et J.S. Bonifacino.** 1997. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* **16**:917-928.
109. **Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F.L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, et P. Sonigo.** 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J. Virol.* **70**:4380-4386.
110. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, et N.R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* **381**:661-666.
111. **Donaldson, J.G., et R.D. Klausner.** 1994. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:527-532.
112. **Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman, et R.W. Doms.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion co-factors. *Cell.* **85**:1149-1158.
113. **Dorfman, T., A. Bukovsky, A. Ohagaen, S. Hoglund, et H.G. Gottlinger.** 1994. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:8180-8187.
114. **Dorfman, T., F. Mammano, W.A. Haseltine, et H.G. Gottlinger.** 1994. Role of the matrix protein in the association of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**:1689-1696.
115. **Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, K. R.A., J.P. Moore, et W.A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature.* **381**:667-673.
116. **Driever, W., et C. Nusslein-Volhard.** 1988. The bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner. *Cell.* **54**:95-104.

117. **Driever, W., et C. Nusslein-Volhard.** 1988. A gradient of bicoid protein in drosophila embryos. *Cell.* **54**:83-93.
118. **Drubin, D.G., et W.J. Nelson.** 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* **84**:335-344.
119. **Dubay, J.W., S.J. Roberts, B.H. Hahn, et E. Hunter.** 1992. Truncation of the human immunodeficiency virus type-1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* **66**:6616-6625.
120. **Dubois-Dalcq, M., K.V. Holmes, et B. Rentier.** 1984. *Assembly of enveloped RNA viruses.* Springer-Verlag, New York. 235 p.
121. **Dupree, P., R.G. Parton, G. Raposo, T.V. Kurzchalia, et K. Simons.** 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* **12**:1597-1605.
122. **Dyda, F., A.D. Hickman, T.M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, et D.R. Davies.** 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotide transferases. *Science.* **266**:1981-1986.
123. **Earl, P., S. Koenig, et B. Moss.** 1991. Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia vectors. *J. Virol.* **65**:31-41.
124. **Earl, P.L., B. Moss, et R.W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP-BiP, assembly and transport of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
125. **Egan, M.A., L.M. Carruth, J.F. Rowell, X. Yu, et R.F. Siliciano.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J. Virol.* **70**:6547-6556.
126. **Ehlers, M.R.W., et J.F. Riordan.** 1991. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochem.* **30**:10065-10074.
127. **Ehrlich, L.S., B.E. Agresta, et C.A. Carter.** 1992. Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein in vitro. *J. Virol.* **66**:4874-4883.

128. **Eilers, U., J. Klumperman, et H.-P. Hauri.** 1989. Nocodazole, a microtubule-active drug, selectively interferes with apical but not basolateral protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Cell Biol.* **108**:13-22.
129. **Elferink, L.A., et R.H. Scheller.** 1993. Synaptic vesicle proteins and regulated exocytosis. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:75-79.
130. **Ellerbrok, H., L. D'Auriol, C. Vaquero, et M. Sitbon.** 1992. Functional tolerance of the human immunodeficiency virus type-1 envelope signal peptide to mutations in the amino-terminal and hydrophobic regions. *J. Virol.* **66**:5114-5118.
131. **Ellis, J.A., et J.P. Luzio.** 1995. Identification and characterization of a novel protein (p137) which transcytoses bidirectionally in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **270**:20717-20723.
132. **Emr, S.D., et V. Malhotra.** 1997. Membranes and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:475-476.
133. **Englund, P.T.** 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:121-138.
134. **Facke, M., A. Janetzko, R.L. Shoeman, et H.G. Krausslich.** 1993. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **67**:4972-4980.
135. **Fais, S., M.R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, et F. Dianzani.** 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *AIDS.* **9**:329-335.
136. **Fantini, J., S. Baghdiguian, N. Yahi, et J.-C. Chermann.** 1991. Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology.* **185**:904-907.
137. **Fantini, J., N. Yahi, S. Baghdiguian, et J.-C. Chermann.** 1992. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J. Virol.* **66**:580-585.

138. **Fantini, J., N. Yah, et J.-C. Chermann.** 1991. Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:9297-9301.
139. **Farnet, C., et W.A. Haseltine.** 1990. Integration of human immunodeficiency virus DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4164-4168.
140. **Farquhar, M.G.** 1985. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**:447-488.
141. **Fath, K.R., et D.R. Burgess.** 1993. Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* **120**:117-127.
142. **Fath, K.R., S.N. Mamajiwalla, et D.R. Burgess.** 1993. The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:65-73.
143. **Fath, K.R., G.M. Trimbur, et D.R. Burgess.** 1994. Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **126**:661-675.
144. **Feinberg, M.B., R.F. Jarrett, A. Aldovini, R.C. Gallo, et F. Wong-Staal.** 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell.* **46**:807-817.
145. **Felber, B.K., M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, et G.N. Pavlakis.** 1989. Rev protein of HIV-1 affects the stability and transport of viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:1495-1499.
146. **Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy, et E.A. Berger.** 1996. HIV-1 entry co-factor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein coupled receptor. *Science.* **272**:872-877.
147. **Fenouillet, E., I. Jones, B. Powell, D. Schmitt, M.P. Kieny, et J.C. Gluckman.** 1993. Functional role of the glycan cluster of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) ectodomain. *J. Virol.* **67**:150-160.
148. **Ferro-Novick, S., et P. Novick.** 1993. The role of GTP-binding proteins in transport along the exocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:575-599.

149. **Fiedler, K., F. Lafont, R.G. Parton, et K. Simons.** 1995. Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J. Cell Biol.* **128**:1043-1053.
150. **Fiedler, K., R.G. Parton, R. Kellner, T. Etzold, et K. Simons.** 1994. VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* **13**:1729-1740.
151. **Fiedler, K., et K. Simons.** 1995. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell.* **81**:309-312.
152. **Fisher, A.G., M.B. Feinberg, S.F. Josephs, M.E. Harper, L.M. Marselle, G. Reyes, M.A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouck, R.C. Gallo, et F. Wong-Staal.** 1986. The transactivator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature.* **320**:367-371.
153. **Fortin, J.F., R. Cantin, G. Lamontagne, et M. Tremblay.** 1997. Host-derived ICAM I glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type-1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* **71**:3588-3596.
154. **Fra, A.M., E. Williamson, K. Simons, et R.G. Parton.** 1994. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem.* **269**:30745-30748.
155. **Franke, E.K., H.E.H. Yuan, et J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature.* **372**:359-362.
156. **Frankel, S.S., K. Tenner-Racz, P. Racz, B.M. Wenig, C.H. Hansen, D. Heffner, A.M. Nelson, M. Pope, et R.M. Steinman.** 1997. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* **151**:89-96.
157. **Freed, E.O., et M.A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* **70**:341-351.
158. **Freed, E.O., et M.A. Martin.** 1995. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**:1984-1989.
159. **Frey, T.K.** 1994. Molecular biology of rubella virus. *Adv. Virus Res.* **44**:69-160.

160. **Fujimoto, T., et K. Ogawa.** 1990. Fodrin in the human polymorphonuclear leukocyte: redistribution induced by the chemotactic peptide. *J. Cell Sci.* **96**:477-484.
161. **Fuller, S., C.H. von Bonsdorff, et K. Simons.** 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell.* **38**:65-77.
162. **Gabuzda, D.H., U. Olshevsky, P. Bertani, W.A. Haseltine, et J. Sodroski.** 1991. Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor. *J. AIDS Hum. Retrovirology.* **4**:34-40.
163. **Gallay, P., T. Hope, D. Chin, et D. Trono.** 1997. HIV-1 infection of non-dividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:9825-9830.
164. **Gallay, P., S. Swingler, C. Aiken, et D. Trono.** 1995. HIV-1 infection of non-dividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of viral matrix protein is a key regulator. *Cell.* **80**:379-388.
165. **Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, et P.D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* **224**:500-503.
166. **Gallusser, A., et T. Kirchhausen.** 1993. The β 1 and β 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* **12**:5237-5244.
167. **Gao, F., S.G. Morrison, D.L. Robertson, C.L. Thornton, S. Craig, G. Karlsson, J. Sodroski, M. Morgado, B. Galvaocastro, H. Von Briesen, S. Beddows, J. Weber, P.M. Sharp, G.M. Shaw, B.H. Hahn, et WHO and NIAID networks for HIV isolation and characterization.** 1996. Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J. Virol.* **70**:1651-1667.
168. **Garcia, J.A., F.K. Wu, R. Mitsuyasu, et R.B. Gaynor.** 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* **6**:3761-3770.

169. **Gardner, M.B., M. Endres, et P. Barry.** 1992. The simian retroviruses: SIV and SRV, p. 133-276. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 3. Plenum Press, New York, NY.
170. **Garoff, H.** 1985. Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**:403-445.
171. **Gausch, C.R., W.L. Hard, et T.F. Smith.** 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931-935.
172. **Geffen, I., C. Fuhrer, B. Leitinger, M. Weiss, K. Huggel, G. Griffiths, et M. Spiess.** 1993. Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **268**:20772-20777.
173. **Gething, M.-J., et J. Sambrook.** 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* **355**:33-45.
174. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. De Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, et M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55Gag virus-like particles from recombinant baculovirus infected insect cells. *Cell.* **59**:103-112.
175. **Gilbert, S.F.** 1991. *Developmental biology*. 3rd ed., Sinauer, Sunderland, MA. 891 p.
176. **Girard, M., et L. Hirth.** 1989. *Virologie moléculaire*. Doin, Paris. 617 p.
177. **Goda, Y., et T.C. Sudhof.** 1997. Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable? *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:513-518.
178. **Goepfert, P.A., K.L. Shaw, G.D. Ritter, Jr., et M.J. Mulligan.** 1997. A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **71**:778-784.
179. **Goff, S.P.** 1992. Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* **26**:527-544.
180. **Goldberg, A.L.** 1995. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science.* **268**:522-523.
181. **Goldenring, J.R., K.R. Shen, H.D. Vaughan, et I.M. Modlin.** 1993. Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung. *J. Biol. Chem.* **268**:18419-18422.

182. **Goldenring, J.R., J. Smith, H.D. Vaughan, P. Cameron, W. Hawkins, et J. Navarre.** 1996. Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* **270**:G515-G525.
183. **Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.W. Anderson, D.W. Russell, et W.J. Schneider.** 1985. Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**:1-39.
184. **Gong, M., et E. Kieff.** 1990. Intracellular trafficking of two Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J. Virol.* **64**:1507-1516.
185. **Gonzalez, A., L. Rizzolo, M. Rindler, M. Adesnik, D.D. Sabatini, et T. Gottlieb.** 1987. Nonpolarized secretion of truncated forms of the influenza hemagglutinin and the vesicular stomatitis virus G protein from MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:3738-3742.
186. **Goodman, O.B., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, et J.L. Benovic.** 1996. β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β -2 adrenergic receptor. *Nature.* **383**:447-450.
187. **Görlich, D., et I.W. Mattaj.** 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science.* **271**:1513-1518.
188. **Goslin, K., et G. Banker.** 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**:1507-1516.
189. **Goslin, K., D.J. Schreyer, P.J.H. Skene, et G. Banker.** 1988. Development of neuronal polarity: GAP43 distinguishes axonal from dendritic growth cone. *Nature.* **336**:672-674.
190. **Gottlieb, M.S., R. Schroff, H. Schanker, J.D. Weisman, P.T. Fan, R.A. Wolf, et A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1430.
191. **Gottlieb, T.A., G. Beaudry, L. Rizzolo, A. Colman, M. Rindler, M. Adesnik, et D. Sabatini.** 1986. Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:2100-2104.

192. **Gottlinger, H.G., T. Dorfman, J.G. Sodroski, et W.A. Haseltine.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:3195-3199.
193. **Gottlinger, H.G., J.G. Sodroski, et W.A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5781-5785.
194. **Granowitz, C., R.D. Berkowitz, et S.P. Goff.** 1996. Mutations affecting the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus envelope protein: rapid reversion during replication. *Virus Res.* **41**:25-42.
195. **Griffiths, G., et K. Simons.** 1986. The trans-Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* **234**:438-443.
196. **Gumbiner, B.M.** 1992. Epithelial morphogenesis. *Cell.* **69**:385-387.
197. **Gumbiner, B.M., et P.D. McCrea.** 1993. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:155-158.
198. **Hall, A.** 1998. Rho Gtpases and the actin cytoskeleton. *Science.* **279**:509-514.
199. **Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H.D. Klenk, et W. Garten.** 1992. Inhibition of furin mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature.* **360**:358-361.
200. **Hammerton, R.W., K.A. Krzeminski, R.W. Mays, T.A. Ryan, D.A. Wollner, et W.J. Nelson.** 1991. Mechanism for regulating cell surface distribution of Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. *Science.* **254**:847-850.
201. **Hammond, C., et A. Helenius.** 1994. Folding of VSV-G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science.* **266**:456-458.
202. **Hammond, C., et A. Helenius.** 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:523-529.
203. **Handler, J.S.** 1989. Overview of epithelial polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **51**:729-740.
204. **Hansen, S.H., A. Olsson, et J.E. Casanova.** 1995. Wortmannin, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, inhibits transcytosis in polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**:28425-28432.

205. **Harder, T., et K. Simons.** 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:534-542.
206. **Harouse, J.M., S. Bhat, S.L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D.H. Silberberg, et F. Gonzalez-Scarano.** 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science.* **253**:320-323.
207. **Hart, G.W.** 1992. Glycosylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:1017-1023.
208. **Hartmann, E., T.A. Rapoport, et H.F. Lodish.** 1989. Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5786-5790.
209. **Hauber, J., et B.R. Cullen.** 1988. Mutational analysis of the transactivation responsive region of the human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat. *J. Virol.* **62**:673-679.
210. **Haucke, V., et G. Schatz.** 1997. Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. *Trends Cell Biol.* **7**:103-106.
211. **Hay, J.C., et R.H. Scheller.** 1997. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:505-512.
212. **Hediger, M.A., M.J. Coady, T.Y. Ikeda, et E.M. Wright.** 1987. Expression, cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature.* **330**:379-381.
213. **Heidemann, S.R., J.M. Landers, et M.A. Hamborg.** 1981. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* **91**:661-665.
214. **Heilker, R., U. Manning-Krieg, J.F. Zuber, et M. Spiess.** 1996. In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* **15**:2893-2899.
215. **Heinzinger, N.K., M.I. Bukrinsky, S.A. Haggerty, A.M. Ragland, V. Kewalramani, M.A. Lee, H.E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, et M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences the nuclear localization of viral nucleic acids in non-dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:7311-7315.
216. **Henderson, L.E., R. Sowder, T.D. Copeland, S. Oroszlan, L.O. Arthur, W.G. Robey, et P.J. Fischinger.** 1987.

Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human cell lymphotropic virus type III. *J. Virol.* **87**:629-632.

217. **Herrenknecht, K., et R. Kemler.** 1993. Characterization of recombinant E-cadherin (uvomorulin) expressed in insect cells. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:147-154.

218. **Herskowitz, I.** 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.* **80**:187-197.

219. **Hill, C.P., D. Worthylake, D.P. Bancroft, A.M. Christensen, et W.I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric HIV-1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3099-3104.

220. **Hirokawa, N.** 1998. Kinesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* **279**:519-526.

221. **Hirt, R.P., G.J. Hughes, S. Frutiger, P. Michetti, C. Perregaux, O. Poulain-Godefroy, N. Jeanguenat, M.R. Neutra, et J.-P. Kraehenbul.** 1993. Transcytosis of the polymeric Ig receptor requires phosphorylation of serine 664 in the absence but not in the presence of dimeric IgA. *Cell.* **74**:245-255.

222. **Ho, D.D., A.U. Neumann, A.S. Perelson, W. Chen, J.M. Leonard, et M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* **373**:123-126.

223. **Hobman, T.C., H.F. Lemon, et K. Jewell.** 1997. Characterization of an endoplasmic reticulum retention signal in the rubella virus E1 glycoprotein. *J. Virol.* **71**:7670-7680.

224. **Hobman, T.C., L. Woodward, et M.G. Farquhar.** 1995. Targeting of a heterodimeric membrane protein complex to the Golgi: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Mol. Biol. Cell.* **6**:7-20.

225. **Hochstrasser, M.** 1992. Ubiquitin and intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:1024-1031.

226. **Hong, S.S., et P. Boulanger.** 1993. Assembly-defective point mutants of the human immunodeficiency virus type 1 gag precursor phenotypically expressed in recombinant baculovirus infected cells. *J. Virol.* **67**:2787-2798.

227. **Höning, S., et W. Hunziker.** 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **128**:321-332.
228. **Hopkins, C.R.** 1991. Polarity signals. *Cell.* **66**:827-829.
229. **Hopkins, C.R.** 1992. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.* **17**:27-32.
230. **Hu, S.L., B.M. Travis, J. Garrigues, J.M. Zarling, P. Sridhar, T. Dykers, J. Eichberg, et C. Alpers.** 1990. Processing, assembly and immunogenicity of human immunodeficiency virus core antigens expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology.* **179**:321-329.
231. **Huber, L.A., M.J. de Hoop, P. Dupree, M. Zerial, K. Simons, et C. Dotti.** 1993. Protein transport to the dendritic plasma membrane of cultured neurons is regulated by Rab8p. *J. Cell Biol.* **123**:47-55.
232. **Huber, L.A., S. Pimplikar, R.G. Parton, H. Virta, M. Zerial, et K. Simons.** 1993. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* **123**:35-45.
233. **Humphrey, J.S., P.J. Peters, L.C. Yuan, et J.S. Bonifacino.** 1993. Localization of TGN38 to the Trans-Golgi network: involvement of a cytoplasmic tyrosine-containing sequence. *J. Cell Biol.* **120**:1123-1135.
234. **Hunter, E.** 1994. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin. Virol.* **5**:71-83.
235. **Hunziker, W., et C. Fumey.** 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* **13**:2963-2969.
236. **Hunziker, W., et H.J. Geuze.** 1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* **18**:379-389.
237. **Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, et I. Mellman.** 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell.* **66**:907-920.
238. **Hurtley, S.M.** 1998. Cell biology of the cytoskeleton. *Science.* **279**:459.
239. **Hurtley, S.M., et A. Helenius.** 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**:277-307.

240. **Hynes, R.O.** 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. **69**:11-25.
241. **Jacks, T., M.D. Power, F.R. Masiarz, P.A. Luciw, P.J. Barr, et H.E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. **331**:280-283.
242. **Jackson, M.R., T. Nilsson, et P.A. Peterson.** 1993. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **121**:317-333.
243. **Jadot, M., W.M. Canfield, W. Gregory, et S. Kornfeld.** 1992. Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J. Biol. Chem.* **267**:11069-11077.
244. **Jin, H., G. Leser, et R.A. Lamb.** 1994. The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity. *EMBO J.* **13**:5504-5514.
245. **Johnson, A.E.** 1997. Protein translocation at the ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends Cell Biol.* **7**:90-95.
246. **Johnson, K.F., et S. Kornfeld.** 1992. A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl-terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J. Biol. Chem.* **267**:17110-17115.
247. **Jones, S.M., K.E. Howell, J.R. Henley, H. Cao, et M.A. McNiven.** 1998. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*. **279**:573-577.
248. **Kalyanaraman, V.S., M.G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Miyoshi, D. Blayney, D. Golde, et R.C. Gallo.** 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. **218**:571-573.
249. **Kaplan, A.H., M. Manchester, et R. Swanstrom.** 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type-1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J. Virol.* **68**:6782-6786.
250. **Kaplan, A.H., et R. Swanstrom.** 1991. Human immunodeficiency virus type-1 Gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:4528-4532.

251. **Karczewski, M.K., et K. Strebel.** 1996. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J. Virol.* **70**:494-507.
252. **Katz, R.A., et A.M. Skalka.** 1994. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:133-173.
253. **Kearns, B., T.P. McGee, P. Mayinger, A. Gedvilaite, S.E. Phillips, S. Kagiwada, et V.A. Bankaitis.** 1997. An essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature.* **386**:101-105.
254. **Keen, N.J., M.J. Gait, et J. Karn.** 1996. Human immunodeficiency virus type-1 Tat is an integral component of the activated transcription-elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:2505-2510.
255. **Kelley, W.L., et C. Georgopoulos.** 1992. Chaperones and protein folding. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:984-991.
256. **Kenny, A.J., et S. Marcoux.** 1982. Topology of microvillar membrane hydrolases of the kidney and intestine. *Physiol. Rev.* **62**:91-128.
257. **Kilpatrick, D.R., R.V. Srinivas, et R.W. Compans.** 1988. Expression of the spleen focus-forming virus envelope gene in a polarized epithelial cell line. *Virology.* **164**:547-550.
258. **Kilpatrick, D.R., R.V. Srinivas, E.B. Stephens, et R.W. Compans.** 1987. Effects of deletion of the cytoplasmic domain upon surface expression and membrane stability of a viral envelope glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **262**:16116-16121.
259. **Kim, J., T. Adachi, Y. Yoneda, et Y. Okada.** 1990. Fusion of Madin-Darby canine kidney cells by HVJ (Sendai virus): absence of direct association of virus particles with the site of membrane fusion. *Eur. J. Cell Biol.* **51**:128-134.
260. **Kirchhausen, T., J.S. Bonifacino, et H. Riezman.** 1997. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:488-495.
261. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guétard, T. Hercend, J.C. Gluckman, et L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* **312**:767-768.

262. **Klausner, R.D., J. Lippincott-Schwartz, et J.S. Bonifacino.** 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:403-431.
263. **Kohlstaedt, L.A., J.M. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice, et T.A. Steitz.** 1992. Crystal structure at 3.5 angstroms resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* **256**:1783-1790.
264. **Kornfeld, R., et S. Kornfeld.** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631-664.
265. **Kornfeld, S.** 1987. Trafficking of lysosomes enzymes. *FASEB J.* **1**:462-468.
266. **Kotler, D.P., S. Reka, A. Borcich, et W.J. Chronim.** 1991. Detection, localization and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am. J. Pathol.* **139**:823-830.
267. **Kowalski, M., L. Bergeron, T. Dorfman, W. Haseltine, et J. Sodroski.** 1991. Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *J. Virol.* **65**:281-291.
268. **Kozak, C.A., et S. Ruscetti.** 1992. Retroviruses in rodents, p. 405-481. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 1. Plenum Press, New York, NY.
269. **Kuehn, M.J., et R. Schekman.** 1997. COP II and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:477-483.
270. **Kundu, A., R.T. Avalos, C.M. Sanderson, et D.P. Nayak.** 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.* **70**:6508-6515.
271. **Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, et K. Simons.** 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi network derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **118**:1003-1014.
272. **LaBranche, C.C., M.M. Sauter, B.S. Haggarty, P.J. Vance, J. Romano, T.K. Hart, P.J. Bugelski, et J.A. Hoxie.** 1994. Biological, molecular and structural analysis of a cytopathic variant from a molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:5509-5522.

273. **LaBranche, C.C., M.M. Sauter, B.S. Haggarty, P.J. Vance, J. Romano, T.K. Hart, P.J. Bugelski, M. Marsh, et J.A. Hoxie.** 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* **69**:5217-5227.
274. **Lackner, A.A., M. Schiodt, et G.C. Armitage.** 1989. Mucosal epithelial cells and Langerhans cells are targets for infection by the immunosuppressive type D retrovirus simian AIDS retrovirus serotype 1. *J. Med. Primatol.* **18**:195-207.
275. **Lamb, R.A., et D. Kolakofsky.** 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1177-1204. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
276. **Landau, N.R., K.A. Page, et D.R. Littman.** 1991. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.* **65**:162-169.
277. **Lapham, C.K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N.Y. Nguyen, D.S. Dimitrov, et H. Golding.** 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science.* **274**:602-605.
278. **Lavallée, C., X.J. Yao, A. Ladha, H. Gottlinger, W.A. Haseltine, et E.A. Cohen.** 1994. Requirement of the Pr55Gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type-1 viral particles. *J. Virol.* **68**:1926-1934.
279. **Lazarovits, J., et M. Roth.** 1988. A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell.* **53**:743-752.
280. **Le Bivic, A., A. Quaroni, B. Nichols, et E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell Biol.* **111**:1351-1361.
281. **Le Grice, S.F.G., T. Naas, B. Wohlgensinger, et O. Schatz.** 1991. Subunit selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**:3905-3911.

282. **Lehmann, R., et C. Nusslein-Volhard.** 1991. The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*. **112**:679-691.
283. **Leighton, J., Z. Brada, L.W. Estes, et G. Justh.** 1969. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science*. **158**:472-473.
284. **Leonard, C.K., M.W. Spellman, L. Riddle, R.J. Harris, J.N. Thomas, et T.J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type-1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-10382.
285. **Letourneur, F., et R.D. Klausner.** 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*. **69**:1143-1157.
286. **Levy, J.A., A.D. Hoffman, S.M. Kramer, J.A. Landis, J.M. Shimabukuro, et L.S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. **225**:840-842.
287. **Lewis, P., et M. Emerman.** 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:510-516.
288. **Lewis, P., M. Hensel, et M. Emerman.** 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* **11**:3053-3058.
289. **Li, G.P., C. Dsouzaschorey, M.A. Barbieri, R.L. Roberts, A. Klippel, L.T. Williams, et P.D. Stahl.** 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:10207-10211.
290. **Li, Y., L. Luo, N. Rasool, et C.Y. Kang.** 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J. Virol.* **67**:584-588.
291. **Lill, R., F.E. Nargang, et W. Neupert.** 1996. Biogenesis of mitochondrial proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:505-512.

292. **Lin, H.C., et A.G. Gilman.** 1996. Regulation of dynamin I GTPase activity by G protein beta-gamma subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **271**:27979-27982.
293. **Lisanti, M.P., I.W. Caras, M.A. Davitz, et E. Rodriguez-Boulan.** 1989. A glycosphingolipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **109**:2145-2156.
294. **Lisanti, M.P., I.W. Caras, T. Gilbert, D. Hanzel, et E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7419-7423.
295. **Lisanti, M.P., M.C. Field, I.W. Caras, A.K. Menon, et E. Rodriguez-Boulan.** 1991. Mannosamine, a novel inhibitor of glycosyl phosphatidylinositol incorporation into proteins. *EMBO J.* **10**:1969-1977.
296. **Lisanti, M.P., A. Le Bivic, A. Saltiel, et E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Preferred apical distribution of glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchored proteins : a highly conserved feature of the polarized epithelial cell phenotype. *J. Membr. Biol.* **113**:155-167.
297. **Lisanti, M.P., A. Le Bivic, M. Sargiacomo, et E. Rodriguez-Boulan.** 1989. Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney cell glycoproteins: evidence for intracellular sorting and polarized cell surface delivery. *J. Cell Biol.* **109**:2117-2127.
298. **Lisanti, M.P., et E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem. Sci.* **15**:113-118.
299. **Lisanti, M.P., M. Sargiacomo, L. Graeve, A.R. Saltiel, et E. Rodriguez-Boulan.** 1988. Polarized apical distribution of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:9557-9561.
300. **Liu, H., X. Wu, M. Newman, G.M. Shaw, B.H. Hahn, et J.C. Kappes.** 1995. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J. Virol.* **69**:7630-7638.
301. **Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E.A. Cohen, et G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized

budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68**:4857-4861.

302. **Loeb, D.D., C.A. Hutchison, M.H. Edgell, W.G. Farmerie, et R. Swanstrom.** 1989. Mutational analysis of human immunodeficiency virus type-1 protease suggests functional homology with aspartic proteases. *J. Virol.* **63**:111-121.

303. **Long, D., J.F. Berson, D.G. Cook, et R.W. Doms.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type-1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide. *J. Virol.* **68**:5890-5898.

304. **Louvard, D., M. Kedinger, et H.P. Hauri.** 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:157-195.

305. **Lu, Y., M. Stenzel, J.G. Sodroski, et W.A. Haseltine.** 1989. Effects of long terminal repeat mutations on human immunodeficiency virus type-1 replication. *J. Virol.* **63**:4115-4119.

306. **Luban, J., K.L. Bossolt, E.K. Franke, G.V. Kalpana, et S.P. Goff.** 1993. Human immunodeficiency virus type-1 Gag protein binds to the cyclophilins A and B. *Cell.* **73**:1067-1078.

307. **Luciw, P.A.** 1996. Human immunodeficiency viruses and their replication, p. 1881-1952. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

308. **Luo, Y., A. Batalao, H. Zhou, et L. Zhu.** 1997. Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques.* **22**:350-352.

309. **Lutcke, A., R.G. Parton, C. Murphy, V.M. Olkkonen, P. Dupree, A. Valencia, K. Simons, et M. Zerial.** 1994. Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J. Cell Sci.* **107**:3437-3448.

310. **Machamer, C.E.** 1991. Golgi retention signals: do membranes hold the key? *Trends Cell Biol.* **1**:141-144.

311. **Machamer, C.E.** 1993. Targeting and retention of Golgi membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:606-612.

312. **Madara, J.L., et K. Dharmasathaphorn.** 1985. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J. Cell Biol.* **101**:2124-2133.

313. **Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. McDougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss, et R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. **47**:338-348.
314. **Madin, S.H., et N.B. Darby.** 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**:574-576.
315. **Mammano, f., E. Kondo, J. Sodroski, A. Bukovsky, et H.G. Göttinger.** 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69**:3824-3830.
316. **Mammano, F., A. Ohagen, S. Hoglund, et H.G. Gottlinger.** 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* **68**:4927-4936.
317. **Mammano, F., F. Salvatori, S. Indraccolo, A. De Rossi, L. Chieco-Bianchi, et H.G. Gottlinger.** 1997. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells. *J. Virol.* **71**:3341-3345.
318. **Maples, C.J., W.G. Ruiz, et G. Apodaca.** 1997. Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **272**:6741-6751.
319. **Marks, M.S., H. Ohno, T. Kirchhausen, et J.S. Bonifacino.** 1997. Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol.* **7**:124-128.
320. **Marks, M.S., L. Woodruff, H. Ohno, et J.S. Bonifacino.** 1996. Protein targeting by tyrosine- and dileucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* **135**:341-354.
321. **Marschang, P., J. Sodroski, R. Wurzner, et M.P. Dierich.** 1995. Decay accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type I from inactivation by human complement. *Eur. J. Immunol.* **25**:285-290.

322. **Martin, K., et A. Helenius.** 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell.* **67**:117-130.
323. **Masur, H., M.A. Michelis, J.B. Greene, I. Onorato, R.A. Stouwe, R.S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H.W. Murray, et S. Cunningham-Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. Initial manifestations of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-1438.
324. **Mathijs, J.M., M. Hing, J. Grierson, D.E. Dwyer, C. Goldschmidt, D.A. Cooper, et A.L. Cunningham.** 1988. HIV infection of rectal mucosa. *Lancet.* **1**:1111.
325. **Matsuoka, Y., S.Y. Chen, C.E. Holland, et R.W. Compans.** 1996. Molecular determinants of Golgi retention in the Punta Toro virus G1 protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **336**:184-189.
326. **Matter, K., M. Brauchbar, K. Bucher, et H.-P. Hauri.** 1990. Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Cell.* **60**:429-437.
327. **Matter, K., K. Bucher, et H.P. Hauri.** 1990. Microtubule perturbation retards both the direct and the indirect apical pathway but does not affect sorting of plasma membrane proteins in intestinal epithelial cells (Caco-2). *EMBO J.* **9**:3163-3170.
328. **Matter, K., W. Hunziker, et I. Mellman.** 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell.* **71**:741-753.
329. **Matter, K., et I. Mellman.** 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:545-554.
330. **Matter, K., J.A. Whitney, E.M. Yamamoto, et I. Mellman.** 1993. Common signals control LDL receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell.* **74**:1053-1064.
331. **Matter, K., E.M. Yamamoto, et I. Mellman.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**:991-1004.
332. **McKeating, J.A., P.D. Griffiths, et R.A. Weiss.** 1990. HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus induced Fc receptor. *Nature.* **343**:659-661.

333. **McKeever, B.M., M.A. Navia, P.M.D. Fitzgerald, J.P. Springer, C.T. Leu, J.C. Heimbach, W.K. Herber, I.S. Sigal, et P.L. Darke.** 1989. Crystallization of the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus, HIV-1. *J. Biol. Chem.* **264**:1919-1921.
334. **McPherson, P.S., E.P. Garcia, V.I. Slepnev, C. David, X.M. Zhang, D. Grabs, W.S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto, et P. De Camilli.** 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature.* **379**:353-357.
335. **McQueen, N., D.P. Nayak, E.B. Stephens, et R.W. Compans.** 1986. Polarized expression of a chimeric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of the influenza virus hemagglutinin have been replaced by those of the vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:9318-9322.
336. **McQueen, N.L., D. Nayak, E.B. Stephens, et R.W. Compans.** 1987. Basolateral expression of a chimeric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of vesicular stomatitis virus G protein have been replaced by those of the influenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **262**:16233-16240.
337. **McRoberts, J.A., M. Taub, et M.H.J. Saier.** 1981. The Madin Darby canine kidney (MDCK) cell line, p. 117-139. *In* G. Sato (ed.), *Functionally differentiated cell lines.* Alan R. Liss, Inc., New York.
338. **Mellman, I., E. Yamamoto, J.A. Whitney, M. Kim, W. Hunziker, et K. Matter.** 1993. Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:1-7.
339. **Mellors, J.W., C.R.J. Rinaldo, P. Gupta, R.M. White, J.A. Todd, et L.A. Kingsley.** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* **272**:1167-1170.
340. **Mermall, V., P.L. Post, et M.S. Mooseker.** 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science.* **279**:527-533.
341. **Milich, L., B. Margolin, et R. Swanstrom.** 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67**:1919-1921.

342. **Miller, D.G., R.H. Edwards, et A.D. Miller.** 1994. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:78-82.
343. **Miller, M.A., T.A. Mietzner, M.W. Cloyd, W.G. Robey, et R.C. Montelaro.** 1993. Identification of calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **9**:1057-1065.
344. **Mirre, C., L. Monlauzeur, M. Garcia, M.H. Delgrossi, et A. Le Bivic.** 1996. Detergent resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am. J. Physiol.* **271**:C887-C894.
345. **Misfeldt, D.S., S.T. Hamamoto, et D.R. Pitelka.** 1976. Transepithelial transport in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**:1212-1216.
346. **Mizutani, S., et H.M. Temin.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature.* **226**:1211-1213.
347. **Molitoris, B.A., et W.J. Nelson.** 1990. Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *J. Clin. Invest.* **85**:3-9.
348. **Montelaro, R.C., J.M. Ball, et K.E. Rushlow.** 1992. Equine retroviruses, p. 257-360. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 2. Plenum Press, New York, NY.
349. **Moreland, R.B., et R.L. Garcea.** 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology.* **185**:513-518.
350. **Moss, S.E.** 1997. Annexins. *Trends Cell Biol.* **7**:87-89.
351. **Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti, et C. Okamoto.** 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **116**:577-583.
352. **Mostov, K.E.** 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:63-84.
353. **Mostov, K.E., et D.L. Deitcher.** 1986. Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell.* **46**:613-621.
354. **Moyer, M.P., et H.E. Gendelman.** 1991. HIV replication and persistence in human gastrointestinal cells cultured in vitro. *J. Leuk. Biol.* **49**:499-504.

355. **Moyer, M.P., R.I. Huot, A. Ramirez, S. Joe, M.S. Meltzer, et H.E. Gendelman.** 1990. Infection of human gastrointestinal cells by HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **6**:1409-1415.
356. **Mumby, S.M.** 1997. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:148-154.
357. **Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia, et K. Simons.** 1995. VIP21/Caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:10339-10343.
358. **Nabel, G., et D. Baltimore.** 1985. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature.* **326**:711-713.
359. **Nathke, I.S., L.E. Hinck, et W.J. Nelson.** 1993. Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible mechanisms for modulation of cadherin function, organization and distribution. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:139-145.
360. **Nelson, J.A., C. Reynolds-Kohler, W. Margaretten, C.A. Wiley, C.E. Reese, et J.A. Levy.** 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet.* **i**:259-262.
361. **Nermut, M.V., et D.J. Hockley.** 1996. Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:1-23.
362. **Neufeld, E.F.** 1989. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, β -hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **264**:10927-10930.
363. **Neutra, M.R., et J.P. Kraehenbuhl.** 1993. The role of transepithelial transport by M cells in microbial invasion and host defense. *J. Cell Sci. - Suppl.* **17**:209-215.
364. **Nigg, E.A.** 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature.* **386**:779-787.
365. **Nobes, C.D., et A. Hall.** 1995. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell.* **81**:53-62.
366. **Novick, P., et M. Zerial.** 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:496-504.

367. **Nuoffer, C., et W.E. Balch.** 1994. GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:949-990.
368. **Nusslein-Volhard, C.** 1991. Determination of the embryonic axes of *Drosophila*. *Development-Suppl.* **1**:1-10.
369. **Ohno, H., R.C. Aguilar, M.C. Fournier, S. Hennecke, P. Cosson, et J.S. Bonifacino.** 1997. Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology.* **238**:305-315.
370. **Ohno, H., M.-C. Fournier, G. Poy, et J.S. Bonifacino.** 1996. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.* **271**:29009-29015.
371. **Ohno, H., J. Stewart, M.-C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, et J.S. Bonifacino.** 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* **269**:1872-1875.
372. **Okamoto, C.T., S.P. Shia, C. Bird, K.E. Mostov, et M.G. Roth.** 1992. The cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor contains two internalization signals that are distinct from its basolateral sorting signal. *J. Biol. Chem.* **267**:9925-9933.
373. **Olkonen, V.M., P. Dupree, I. Killisch, A. Lutcke, M. Zerial, et K. Simons.** 1993. Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *J. Cell Sci.* **106**:1249-1261.
374. **Olshevsky, U., E. Helseth, C. Furman, J. Li, W.A. Haseltine, et J. Sodroski.** 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* **64**:5701-5707.
375. **Omary, M.B., D.A. Brenner, C.Y. deGrandpré, K.A. Roebuck, D.D. Richman, et M.F. Kagnoff.** 1991. HIV-1 infection and expression in human colonic cells: infection and expression in CD4+ and CD4- cell lines. *AIDS.* **5**:275-281.
376. **Ono, A., M. Huang, et E.O. Freed.** 1997. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions. *J. Virol.* **71**:4409-4418.

377. **Ou, W.-J., P.H. Cameron, D.Y. Thomas, et J.J.M. Bergeron.** 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature*. **364**:771-776.
378. **Owens, R.J., J.W. Dubay, E. Hunter, et R.W. Compans.** 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:3987-3991.
379. **Pal, R., S. Mumbauer, G.M. Hoke, A. Takatsuki, et M.G. Sarngadharan.** 1991. Brefeldin A inhibits the processing and secretion of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **7**:707-712.
380. **Palade, G.E.** 1975. Intracellular aspects of the processing of protein synthesis. *Science*. **189**:347-358.
381. **Pallen, C.J., Y.H. Tan, et G.R. Guy.** 1992. Protein phosphatases in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:1000-1007.
382. **Pandori, M.W., N.J. Fitch, H.M. Craig, D.D. Richman, C.A. Spina, et J.C. Guatelli.** 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type-1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* **70**:4283-4289.
383. **Pantaleo, G., C. Graziosi, J.F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C.H. Fox, J.M. Orenstein, D.P. Kotler, et A.S. Fauci.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. **362**:355-358.
384. **Pantaleo, G., C. Graziosi, et A.S. Fauci.** 1993. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **328**:327-335.
385. **Parks, G.D., et R.A. Lamb.** 1993. Role of NH₂-terminal positively charged residues in establishing membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* **268**:19101-19109.
386. **Parton, R.G.** 1996. Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:542-548.
387. **Parton, R.G., et K. Simons.** 1995. Digging into caveolae. *Science*. **269**:1398-1399.
388. **Patrick, S.L., T.C. Wright, H.E. Fox, et H.S. Ginsberg.** 1993. Human immunodeficiency virus infection of early passage cervical epithelial cultures. *Internat. J. STD & AIDS*. **4**:342-345.

389. **Paxton, W., R.I. Connor, et N.R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of Gag and mutational analysis. *J. Virol.* **67**:7229-7237.
390. **Payne, L.N.** 1992. Biology of avian retroviruses, p. 299-404. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 1. Plenum Press, New York, NY.
391. **Pearce-Pratt, R., et D. Malamud.** 1994. Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:2898-2905.
392. **Pearce-Pratt, R., et D.M. Phillips.** 1993. Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Biol. Reprod.* **48**:431-445.
393. **Pearse, B.M.F., et M.S. Robinson.** 1990. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:151-171.
394. **Pelham, H.R.** 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:530-535.
395. **Pelham, H.R.B.** 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:1-23.
396. **Peliska, J.A., et S.J. Benkovic.** 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* **258**:1112-1118.
397. **Peränen, J., P. Auvinen, H. Virta, R. Wepf, et K. Simons.** 1996. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **135**:153-167.
398. **Perelson, A.S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, et D.D. Ho.** 1997. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature.* **387**:188-191.
399. **Perelson, A.S., A.U. Neumann, M. Markowitz, J.M. Leonard, et D.D. Ho.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* **271**:1582-1586.
400. **Perotti, M., X. Tan, et D.M. Phillips.** 1996. Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes. *J. Virol.* **70**:5916-5921.

401. **Pettit, S.C., M.D. Moody, R.S. Wehbie, A.H. Kaplan, P.V. Nantermet, C.A. Klein, et R. Swanstrom.** 1994. The p2 domain of human immunodeficiency virus type-1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.* **68**:8017-8027.
402. **Pfeffer, S.R.** 1994. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:522-526.
403. **Phillips, D.M., et A.S. Bourinbaiar.** 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology.* **186**:261-273.
404. **Phillips, D.M., V.R. Zacharopoulos, X. Tan, et R. Pearce-Pratt.** 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia. *Trends Microbiol.* **2**:454-458.
405. **Pimplikar, S.W., E. Ikonen, et K. Simons.** 1994. Basolateral protein transport in streptolysin O-permeabilized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **125**:1025-1035.
406. **Pinto, M., S. Robine-Leon, M.-D. Appay, M. Kedinger, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann, K. Haffen, J. Fogh, et A. Zweibaum.** 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* **47**:323-330.
407. **Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.D. Minna, et R.C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from flesh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:7415-7419.
408. **Poulet, F.M., P.R. Bowser, et J.W. Casey.** 1992. Retroviruses of fish, reptiles and molluscs, p. 1-38. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 3. Plenum Press, New York, NY.
409. **Pouliot, J.-F., et R. Béliveau.** 1994. Modifications post-traductionnelles des protéines par les lipides. *Médecine/Sciences.* **10**:65-73.
410. **Premack, M.A., et T.J. Schall.** 1996. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Med.* **2**:1174-1178.
411. **Preston, B.D., B.J. Poiez, et L. Loeb.** 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* **242**:1168-1171.
412. **Pryer, N.K., L.J. Wuestehube, et R. Schekman.** 1992. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:471-516.

413. **Puddington, L., C. Woodgett, et J.K. Rose.** 1987. Replacement of the cytoplasmic domain alters sorting of a viral glycoprotein in polarized cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:2756-2760.
414. **Rao, T.K.S., E.J. Filippone, A.D. Nicastri, S.H. Landesman, E. Frank, C.K. Chen, et E.A. Friedman.** 1984. Associated focal and segmented glomerulosclerosis in the acquired immune deficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **310**:669-673.
415. **Rapoport, T.A.** 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum. *Science.* **258**:931-936.
416. **Rapoport, T.A., M.M. Rolls, et B. Jungnickel.** 1996. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:499-504.
417. **Rey, O., J. Canon, et P. Krogstad.** 1996. Gag protein associates with F-actin to microfilaments. *Virology.* **220**:530-534.
418. **Rhee, S.S., et E. Hunter.** 1990. A single amino-acid substitution within the matrix of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell.* **63**:77-86.
419. **Richardson, J.C.W., V. Scalera, et N.L. Simmons.** 1981. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim. Biophys. Acta.* **673**:26-36.
420. **Rindler, M.J., L.M. Chuman, L. Shaffer, et M.H. Saier.** 1979. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell Biol.* **81**:635-648.
421. **Rindler, M.J., I.E. Ivanov, et D.D. Sabatini.** 1987. Microtubule acting drugs lead to the nonpolarized delivery of the influenza hemagglutinin to the cell surface of polarized Madin Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **104**:231-241.
422. **Ritter, G.D., M.J. Mulligan, S.L. Lydy, et R.W. Compans.** 1993. Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology.* **197**:255-264.
423. **Roberts, J.D., K. Bebenek, et T.A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.* **242**:1171.
424. **Robinson, M.S.** 1997. Coats and vesicle budding. *Trends Cell Biol.* **7**:99-103.

425. **Robinson, M.S.** 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:538-544.
426. **Rodriguez-Boulan, E.** 1983. Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Mod. Cell Biol.* **1**:119-170.
427. **Rodriguez-Boulan, E., et W.J. Nelson.** 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* **245**:718-725.
428. **Rodriguez-Boulan, E., K.T. Paskiet, et D.D. Sabatini.** 1983. Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J. Cell Biol.* **96**:866-874.
429. **Rodriguez-Boulan, E., et M. Pendergast.** 1980. Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell.* **20**:45-54.
430. **Rodriguez-Boulan, E., et S.K. Powell.** 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:395-427.
431. **Rodriguez-Boulan, E., et D.D. Sabatini.** 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**:5071-5075.
432. **Rodriguez-Boulan, E., P.J. Salas, M. Sargiacomo, M. Lisanti, A. Le Bivic, Y. Sambuy, D. Vegas-Salas, et L. Graeve.** 1989. Methods to estimate the polarized distribution of surface antigens in cultured epithelial cells. *Methods Cell Biol.* **32**:37-56.
433. **Rogalski, A.A., et S.J. Singer.** 1989. Association of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J. Cell Biol.* **99**:1092-1100.
434. **Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell, et S. Kornfeld.** 1996. The targeting of Lamp-1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* **132**:565-576.
435. **Roman, L.M., et H. Garoff.** 1986. Alteration of the cytoplasmic domain of the membrane-spanning glycoprotein p62 of Semliki Forest virus does not affect its polar distribution in established lines of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Biol.* **103**:2607-2618.
436. **Rose, J.K., et R.W. Doms.** 1988. Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:257-288.
437. **Rosen, C.A., J.G. Sodroski, W.C. Goh, A.I. Dayton, J. Lippke, et W.A. Haseltine.** 1986. Post-transcriptional regulations

accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature*. **319**:555-559.

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

439. **Rossen, J.W., C.P. Bekker, W.F. Voorhout, M.C. Horzinek, A. Van der Ende, G.J. Strous, et P.J. Rottier.** 1995. Coronaviruses in polarized epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**:135-138.

440. **Rossen, J.W., G.J. Strous, M.C. Horzinek, et P.J. Rottier.** 1997. Mouse hepatitis virus strain A59 is released from opposite sides of different epithelial cell types. *J. Gen. Virol.* **78**:61-69.

441. **Roth, M.G., D. Gundersen, N. Patil, et E. Rodriguez-Boulan.** 1987. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *J. Cell Biol.* **104**:769-782.

442. **Roth, M.G., R.V. Srinivas, et R.W. Compans.** 1983. Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **45**:1065-1073.

443. **Roth, M.G., et P.C. Sternweis.** 1997. The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:519-526.

444. **Rothberg, K., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, et R.G.W. Anderson.** 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. **68**:673-682.

445. **Rothman, J.E.** 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*. **372**:55-63.

446. **Rothman, J.E., et L. Orci.** 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*. **355**:409-415.

447. **Rothman, J.E., et F.T. Wieland.** 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. **272**:227-234.

448. **Rowe, T., C. Dascher, S. Bannykh, H. Plutner, et W.E. Balch.** 1998. Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates. *Science*. **279**:696-700.

449. **Rowell, J.F., P.E. Stanhope, et R.F. Siliciano.** 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein.

- Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.* **155**:473-488.
450. **Sabatini, D.D., D. Louvard, et M. Adesnik.** 1993. Membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:573-580.
451. **Salas, P.J.I., D. Misek, D.E. Vega-Salas, D. Gundersen, M. Cereijido, et E. Rodriguez-Boulan.** 1986. Microtubules and actin filaments are not critically involved in the biogenesis of epithelial cell polarity. *J. Cell Biol.* **102**:1853-1857.
452. **Sanderson, C.M., H.-H. Wu, et D.P. Nayak.** 1993. Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoproteins in vivo. *J. Virol.* **68**:69-76.
453. **Sandoval, I.V., J.S. Bonifacino, R.D. Klausner, M. Hendart, et J. Wehland.** 1984. Role of microtubules in the organization and the localization of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **99**:113s-118s.
454. **Sargiacomo, M., M. Lisanti, L. Graeve, A. Le Bivic, et E. Rodriguez-Boulan.** 1989. Integral and peripheral protein composition of the apical and basolateral membrane domains in MDCK cells. *J. Membr. Biol.* **107**:277-286.
455. **Sauter, M.M., A. Pelchen-Matthews, R. Bron, M. Marsh, C.C. LaBranche, P.J. Vance, J. Romano, B.S. Haggarty, T.K. Hart, W.M.F. Lee, et J.A. Hoxie.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.* **132**:795-811.
456. **Schatz, G., et B. Dobberstein.** 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* **271**:1519-1525.
457. **Scheiffele, P., J. Peränen, et K. Simons.** 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* **378**:96-98.
458. **Schekman, R., et L. Orci.** 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science.* **271**:1526-33.
459. **Schmaljohn, C.S.** 1996. Bunyaviridae: the viruses and their replication, p. 1447-1471. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
460. **Schmidt, M.F.G.** 1989. Fatty acylation of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **988**:411-426.

461. **Schnierle, B.S., J. Stitz, V. Bosch, F. Nocken, H. Merget-Millitzer, M. Engelstadter, R. Kurth, B. Groner, et K. Cichutek.** 1997. Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**:8640-8645.
462. **Schnitzer, J.E., D.P. McIntosh, A.M. Dvorak, J. Liu, et P. Oh.** 1995. Separation of caveolae from associated microdomains of GPI anchored proteins. *Science.* **269**:1435-1439.
463. **Schnitzer, J.E., P. Oh, E. Pinney, et J. Allard.** 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* **127**:1217-1232.
464. **Schu, P.V., K. Takegawa, M.J. Fry, J.H. Stack, M.D. Waterfield, et S.D. Emr.** 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science.* **260**:88-91.
465. **Schultz, A.M., L.E. Henderson, et S. Oroszlan.** 1988. Fatty acylation of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:611-647.
466. **Shiratori, T., S. Miyatake, H. Ohno, C. Nakaseko, J.S. Bonifacino, et T. Saito.** 1997. Tyrosine phosphorylation controls the internalization of CTLA4 by regulating its interaction with the clathrin-associated complex AP-2. *Immunity.* **6**:583-589.
467. **Shpetner, H., M. Joly, D. Hartley, et S. Corvera.** 1996. Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *J. Cell Biol.* **132**:595-605.
468. **Siegal, F.P., C. Lopez, G.S. Hammer, A.E. Brown, S.J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S.Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, et B.R. Adelsberg.** 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.* **305**:1439-1444.
469. **Simons, K.** 1987. Membrane traffic in an epithelial cell line derived from the dog kidney. *Kidney Int.* **32**:S201-S207.
470. **Simons, K., et S.D. Fuller.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**:243-288.
471. **Simons, K., et E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**:569-572.

472. **Simons, K., et G. van Meer.** 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochem.* **27**:6196-6202.
473. **Simons, K., et A. Wandinger-Ness.** 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell.* **62**:207-210.
474. **Simpson, F., A.A. Peden, L. Christopoulou, et M.S. Robinson.** 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**:835-845.
475. **Singer, S.J.** 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:247-296.
476. **Sodroski, J., W.C. Goh, C. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, et W.A. Haseltine.** 1986. A second posttranscriptional transactivator gene is required for HTLV-III replication. *Nature.* **321**:412-417.
477. **Sodroski, J., R. Patarca, C. Rosen, et W.A. Haseltine.** 1985. Location of the trans-acting region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science.* **229**:74-77.
478. **Soneoka, Y., S.M. Kingsman, et A.J. Kingsman.** 1997. Mutagenesis analysis of the murine leukemia virus matrix protein: identification of regions important for membrane localization and intracellular transport. *J. Virol.* **71**:5549-5559.
479. **Spector, D.H., E. Wade, D.A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish, et S.A. Spector.** 1990. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J. Virol.* **64**:2298-2308.
480. **Spies, C.P., et R.W. Compans.** 1994. Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology.* **203**:8-19.
481. **Spiro, D.J., W. Boll, T. Kirchhausen, et M. Wesslingresnick.** 1996. Wotmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* **7**:355-367.
482. **Srinivas, R.V., N. Balachandran, F.V. Alonso-Caplan, et R.W. Compans.** 1986. Expression of herpes-simplex virus glycoproteins in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **58**:689-693.
483. **St Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Riehlstein, et C. Nusslein-Volhard.** 1989. Multiple steps in the localization of bicoid

RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development-Suppl.* **107**:13-19.

484. **St Johnston, D., et C. Nusslein-Volhard.** 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell.* **68**:201-219.

485. **Stack, J.H., P.K. Herman, P.V. Schu, et S.D. Emr.** 1993. A membrane associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.* **12**:2195-2204.

486. **Stephens, E.B., et R.W. Compans.** 1988. Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:489-516.

487. **Stephens, E.B., et R.W. Compans.** 1986. Nonpolarized expression of a secreted murine leukemia virus glycoprotein in polarized epithelial cells. *Cell.* **47**:1053-1059.

488. **Stevenson, M., et H.E. Gendelman.** 1994. Cellular and viral determinants that regulate HIV-1 infection in macrophages. *J. Leuk. Biol.* **56**:278-288.

489. **Stewart, G.J., J.P. Tyler, A.L. Cunningham, J.A. Barr, G.L. Driscoll, J. Gold, et B.J. Lamont.** 1985. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type III by artificial insemination by donor. *Lancet.* **ii**:581-585.

490. **Stowers, L., D. Yelon, L.J. Berg, et J. Chant.** 1995. Regulation of the polarization of T-cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:5027-5031.

491. **Sturman, L., et K.V. Holmes.** 1985. The novel glycoproteins of coronaviruses. *Trends Biochem. Sci.* **10**:17-20.

492. **Subbramanian, R.A., et E.A. Cohen.** 1994. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.* **68**:6831-6835.

493. **Sugamura, K., et Y. Hinuma.** 1993. Human retroviruses: HTLV-I and HTLV-II, p. 399-435. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 2. Plenum Press, New York, NY.

494. **Suomalainen, M., et H. Garoff.** 1994. Incorporation of homologous and heterologous proteins into the envelope of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **68**:4879-4889.

495. **Suomalainen, M., K. Hultenby, et H. Garoff.** 1996. Targeting of Moloney murine leukemia virus gag precursor to the site of virus budding. *J. Cell Biol.* **135**:1841-1852.
496. **Swift, A.M., et C.E. Machamer.** 1991. A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J. Cell Biol.* **115**:19-30.
497. **Sztul, E., M. Colombo, P. Stahl, et R. Samanta.** 1993. Control of protein traffic between distinct plasma membrane domains. Requirement for a novel 108,000 protein in the fusion of transcytotic vesicles with the apical plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **268**:1876-1885.
498. **Tan, X., R. Pearce-Pratt, et D.M. Phillips.** 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J. Virol.* **67**:6447-6452.
499. **Tashiro, M., I. James, S. Karri, K. Wahn, K. Tobita, H.D. Klenk, R. Rott, et J.T. Seto.** 1991. Pneumotropic revertants derived from a pantropic mutant, F1-R, of Sendai virus. *Virology.* **184**:227-234.
500. **Tashiro, M., N.L. McQueen, J.T. Seto, H.D. Klenk, et R. Rott.** 1996. Involvement of the mutated M protein in altered budding polarity of a pantropic mutant, F1-R, of Sendai virus. *J. Virol.* **70**:5990-5997.
501. **Tashiro, M., E. Pritzer, M.A. Khoshnan, M. Yamakawa, K. Kuroda, H.D. Klenk, R. Rott, et J.T. Seto.** 1988. Characterization of a pantropic variant of Sendai virus derived from a host range mutant. *Virology.* **165**:577-583.
502. **Tashiro, M., J.T. Seto, S. Choosakul, M. Yamakawa, H.D. Klenk, et R. Rott.** 1992. Budding site of Sendai virus in polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology.* **187**:413-422.
503. **Tashiro, M., J.T. Seto, H.D. Klenk, et R. Rott.** 1993. Possible involvement of microtubule disruption in bipolar budding of a Sendai virus mutant, F1-R, in epithelial MDCK cells. *J. Virol.* **67**:5902-5910.
504. **Tashiro, M., M. Yamakawa, K. Tobita, H.D. Klenk, R. Rott, et J.T. Seto.** 1990. Organ tropism of Sendai virus in mice: proteolytic activation of the fusion glycoprotein in mouse organs and budding site at the bronchial epithelium. *J. Virol.* **64**:3627-3634.

505. **Tashiro, M., M. Yamakawa, K. Tobita, H.D. Klenk, J.T. Seto, et R. Rott.** 1992. Significance of basolateral domain of polarized MDCK cells for Sendai virus-induced cell fusion. *Arch. Virol.* **125**:129-139.
506. **Tashiro, M., M. Yamakawa, K. Tobita, J.T. Seto, H.D. Klenk, et R. Rott.** 1990. Altered budding site of a pantropic mutant of Sendai virus, F1-R, in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **64**:4672-4677.
507. **Taylor, T.C., R.A. Kahn, et P. Melancon.** 1992. Two distinct members of the ADP-ribosylation factor family of GTP-binding proteins regulate cell-free intra-Golgi transport. *Cell.* **70**:69-79.
508. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C.T. Walsh, J. Sodroski, et H.G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* **372**:363-365.
509. **Thomas, A., K.D. Gray, et M.J. Roth.** 1997. Analysis of mutations within the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus transmembrane protein. *Virology.* **227**:305-313.
510. **Thomas, D.C., C.B. Brewer, et M.G. Roth.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* **268**:3313-3320.
511. **Thomas, D.C., et M.G. Roth.** 1994. The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence by having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.* **269**:15732-15739.
512. **Thompson, T.E., et T.W. Tillack.** 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers in plasma membranes of mammalian cells. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**:361-386.
513. **Thornton, J.M.** 1992. Proteins structures: the end point of the folding pathway, p. 59-81. *In* T. E. Creighton (ed.), *Protein folding*. Freeman, New York, NY.
514. **Tooze, J., et S.A. Tooze.** 1985. Infection of AtT20 murine pituitary tumour cells by mouse hepatitis virus strain A59: virus budding is restricted to the Golgi region. *Eur. J. Cell Biol.* **37**:203-212.
515. **Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J.M. Binley, W.C. Olson, G.P. Allaway, C. Chengmayer, J. Robinson, P.J.**

- Maddon, et J.P. Moore.** 1996. CD4-independent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR5. *Nature*. **384**:184-187.
516. **Trono, D.** 1995. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell*. **82**:189-192.
517. **Trono, D., M.B. Feinberg, et D. Baltimore.** 1989. HIV-1 gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell*. **59**:113-120.
518. **Trowbridge, I.S., J.F. Collawn, et C.R. Hopkins.** 1993. Signal dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:129-161.
519. **Tucker, S.P., et R.W. Compans.** 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* **42**:187-247.
520. **Tucker, S.P., C.L. Thornton, E. Wimmer, et R.W. Compans.** 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* **67**:4274-4282.
521. **Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, et H. Uchino.** 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. **50**:481-492.
522. **Udenfriend, S., et K. Kodukula.** 1995. How glycosyl phosphatidylinositol anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:563-591.
523. **Ullrich, R., M. Zeitz, W. Heise, M. L'Age, G. Hoffken, et E.O. Riecken.** 1989. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus: evidence for HIV-induced enteropathy. *Ann. Intern. Med.* **111**:15-21.
524. **Vachon, P.H., et J.F. Beaulieu.** 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*. **103**:414-423.
525. **Valerius, N.H., O. Stendhal, J.H. Hartwig, et T.P. Stossel.** 1981. Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell*. **24**:195-202.
526. **Vallee, R.B., et M.P. Sheetz.** 1996. Targeting of motor proteins. *Science*. **271**:1539-1544.
527. **van Meer, G.** 1989. Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:247-275.

528. **van Meer, G.** 1989. Polarity and polarized transport of membrane lipids in a cultured epithelium, p. 43-69. *In* K. Matlin, J. Valentich (ed.), *Functional epithelial cells in culture*. Alan R. Liss, New York.
529. **van Meer, G.** 1993. Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:661-673.
530. **Van Meer, G., B. Gumbiner, et K. Simons.** 1986. The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature.* **322**:639-641.
531. **van Zeijl, M.J.A.H., et K.S. Matlin.** 1990. Microtubule perturbation inhibits intracellular transport of an apical membrane glycoprotein in a substrate-dependent manner in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Regul.* **1**:921-936.
532. **Varmus, H.** 1987. Reverse transcription. *Sci. Am.* **257**:56-64.
533. **Veronese, F.D., T.D. Copeland, S. Oroszlan, R.C. Gallo, et M.G. Sarngadharan.** 1988. Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J. Virol.* **62**:795-801.
534. **Volinia, S., R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, L.K. MacDougall, R. Stein, M.J. Zvelebil, J. Domin, C. Panaretou, et M.D. Waterfield.** 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* **14**:3339-3348.
535. **von Heijne, G.** 1990. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **115**:195-201.
536. **von Heijne, G., et Y. Gavel.** 1988. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **174**:671-678.
537. **von Schwedler, U., R.S. Kornbluth, et D. Trono.** 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:6992-6996.
538. **Voorhees, F., E. Deignan, E. van Donselaar, J. Humphrey, M.S. Marks, P.J. Peters, et J.S. Bonifacino.** 1995. An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of TGN localization and internalization from the cell surface. *EMBO J.* **14**:4961-4975.

539. **Wagner, R.R., et J.K. Rose.** 1996. Rhabdoviridae: the viruses and their replication, p. 1121-1135. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields' Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
540. **Weber, E., G. Berta, A. Tousson, P. St John, M.W. Green, U. Gopalokrishnan, T. Jilling, E.J. Sorscher, T.S. Elton, D.R. Abrahamson, et K.L. Kirk.** 1994. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **125**:583-594.
541. **Wei, X., S.K. Ghosh, M.E. Taylor, V.A. Johnson, E.A. Emini, P. Deutsch, J.D. Lifson, S. Bonhoeffer, M.A. Nowak, B.H. Hahn, M.S. Saag, et G.M. Shaw.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Nature.* **373**:117-122.
542. **Weimbs, T., S.H. Low, S.J. Chapin, et K.E. Mostov.** 1997. Apical targeting in polarized epithelial cells: there's more afloat than rafts. *Trends Cell Biol.* **7**:393-399.
543. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S.C. Harrison, J.J. Skehel, et D.C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* **387**:426-430.
544. **Welker, R., H. Kottler, H.R. Kalbitzer, et H.G. Krausslich.** 1996. Human immunodeficiency virus type-1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology.* **219**:228-236.
545. **Wick, M.J., J.L. Madara, B.N. Fields, et S.J. Normark.** 1991. Molecular cross talk between epithelial cells and pathogenic microorganisms. *Cell.* **67**:651-659.
546. **Willey, R.L., J.S. Bonifacino, B.J. Potts, M.A. Martin, et R.D. Klausner.** 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:9580-9584.
547. **Willey, R.L., F. Maldarelli, M.A. Martin, et K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type-1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-234.
548. **Willey, R.L., M. Maldarelli, M.A. Martin, et K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type-1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**:7193-7200.

549. **Willey, R.L., et M.A. Martin.** 1993. Association of human immunodeficiency virus type-1 glycoproteins with particles depends on interactions between the third variable and conserved regions of gp120. *J. Virol.* **67**:3639-3643.
550. **Wu, L.J., N.P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A.A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, et J. Sodroski.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. *Nature.* **384**:179-183.
551. **Wychowski, C., D. Benichou, et M. Girard.** 1986. A domain of SV40 capsid polypeptide VP1 that specifies migration into the cell nucleus. *EMBO J.* **5**:2569-2576.
552. **Yang, C., C.P. Spies, et R.W. Compans.** 1995. The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**:9871-9875.
553. **Yisraeli, J.K., et D.A. Melton.** 1988. The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into *Xenopus* oocytes. *Nature.* **336**:592-595.
554. **Yisraeli, J.K., S. Sokol, et D.A. Melton.** 1990. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development.* **108**:289-298.
555. **Yu, X., Q.C. Yu, T.H. Lee, et M. Essex.** 1992. The C-terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J. Virol.* **66**:5667-5670.
556. **Yu, X., X. Yuan, M.F. McLane, T.H. Lee, et M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* **67**:213-221.
557. **Yu, X.F., X. Yuan, Z. Matsuda, T.H. Lee, et M. Essex.** 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type-1 is required for incorporation of viral envelope glycoprotein into mature virions. *J. Virol.* **66**:4966-4971.
558. **Yuan, X., X. Yu, T.H. Lee, et M. Essex.** 1993. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the gag precursor. *J. Virol.* **67**:6387-6394.

559. **Zahraoui, A., G. Joberty, M. Arpin, J.J. Fontaine, R. Hellio, A. Tavitian, et D. Louvard.** 1994. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **124**:101-115.
560. **Zerial, M., et H. Stenmark.** 1993. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:613-620.
561. **Zhang, J.Z., B.A. Davletov, T.C. Sudhof, et R.G.W. Anderson.** 1994. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2 - implications for membrane recycling. *Cell.* **78**:751-760.
562. **Zhang, X., A.B. Jefferson, V. Auethavekiat, et P.W. Majerus.** 1995. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:4853-4856.
563. **Zhao, H., et H. Garoff.** 1992. Role of cell surface spikes in alphavirus budding. *J. Virol.* **66**:7089-7095.
564. **Zhou, W., L.J. Parent, J.W. Wills, et M.D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type-1 gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556-2569.
565. **Zingler, K., et D.R. Littman.** 1993. Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J. Virol.* **67**:2824-2831.
566. **Zurzolo, C., A. Le Bivic, A. Quaroni, L. Nitsch, et E. Rodriguez-Boulan.** 1992. Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *EMBO J.* **11**:2337-2344.
567. **Zurzolo, C., M.P. Lisanti, I.W. Caras, L. Nitsch, et E. Rodriguez-Boulan.** 1993. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid epithelial cells. *J. Cell Biol.* **121**:1031-1039.
568. **Zurzolo, C., W. Van't Hof, G. van Meer, et E. Rodriguez-Boulan.** 1994. Caveolin/VPI21 and glycosphingolipid clusters in the sorting of glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein in epithelial cells. *EMBO J.* **13**:42-53.

CHAPITRE 8:
[ANNEXE 1]
ARTICLE DE MAITRISE

The Intracytoplasmic Domain of gp41 Mediates Polarized Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in MDCK Cells

ROBERT LODGE,^{1,2} HEINRICH GÖTTLINGER,³ DANA GABUZDA,³ ÉRIC A. COHEN,¹
AND GUY LEMAY^{1,2*}

Département de Microbiologie et Immunologie¹ and Groupe de Recherche en Transport Membranaire,² Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, and Division of Human Retrovirology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts 02115³

Received 14 February 1994/Accepted 6 April 1994

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been shown to exhibit a specific basolateral release in polarized epithelial cells. Previous investigators have used vaccinia virus recombinants expressing HIV proteins to demonstrate that virus release is nonpolarized in the absence of viral envelope glycoproteins. In this study, we developed a transient expression system which allows the use of Madin-Darby canine kidney polarized epithelial cells directly grown on semipermeable membranes. This procedure allowed us to investigate polarized HIV viral budding following introduction of proviral DNA constructs. Expression of *env* gene products *in trans* demonstrated the ability to polarize *env*-negative viruses in a dose-dependent manner. The targeting signal for polarized virus release was shown to be present in the envelope gp41 transmembrane protein and absent from the gp120 portion of *env*. At least part of this signal is within the gp41 intracytoplasmic domain. Mutants of the p17^{gag} matrix protein were shown to be nonpolarized only when unable to interact with the envelope glycoproteins. Together, these data are consistent with a model of polarized virus budding in which capsid proteins, lacking a targeting signal, are targeted for specific basolateral release via an interaction of p17 with the envelope glycoprotein containing the polarization signal in its intracytoplasmic domain.

Contact between epithelial cells induces the formation of tight junctions subdividing the membrane surface into two domains. The apical domain faces the lumen of the organ (kidney or intestine), whereas the basolateral side of the cell is in contact with the blood circulation (9, 26). In polarized epithelial cells, such as Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, membrane-associated proteins are specifically sorted to one or the other plasma membrane domain. This targeting of membrane proteins leads to a nonhomogeneous or polarized distribution of surface proteins and allows each domain to develop a specific structure and function (2, 10, 18, 30).

The budding of enveloped viruses in epithelial cells is polarized, with different viruses maturing through specific cell surfaces (25, 36). In most cases, the polarized maturation and budding of enveloped viruses is dependent on the site of transport of their viral envelope glycoproteins. The glycoproteins are targeted to their specific membrane in the absence of all other viral proteins, suggesting that they may harbor the sole signal necessary for polarized viral maturation. The targeting signals for polarized sorting are probably similar in cellular and viral proteins, but no general consensus sequence or structure for apical or basolateral sorting has yet been conclusively identified (2, 10, 18, 30).

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been shown to exhibit a specific basolateral release in polarized epithelial cells (22, 23), similar to the maturation of other retroviruses in polarized cells (13, 27). Retrovirus envelope

glycoproteins are not required for the formation and release of mature virions with a lipid envelope (7, 28, 29, 31). However, the viruses which are produced in the absence of envelope glycoproteins are noninfectious. Interestingly, it has been reported that such envelope-negative viruses are released in a nonpolarized fashion (23). The *gag* gene products alone are thus apparently devoid of targeting signals and require association with the envelope glycoproteins for their polarized transport.

The envelope glycoproteins of HIV-1 are processed and transported to the cell surface by the same mechanism as other membrane glycoproteins. The gp160^{gag} precursor polypeptide matures into two functional subunits through cleavage by the cellular protease furin (8). The gp120 extracellular subunit is involved in recognition of the cellular receptor CD4. The gp41 transmembrane subunit interacts noncovalently with gp120 to retain it at the membrane surface and is involved in membrane fusion (14).

We developed a transient expression system which allows the use of polarized epithelial MDCK cells directly grown on semipermeable membranes to investigate HIV-1 polarized budding following introduction of proviral DNA constructs. Virus particle production was detected by using a sensitive p24^{gag} protein assay on virion pellets from the medium bathing either membrane domain. The expression of Env glycoproteins *in trans* was shown to polarize the budding of *env*-negative viruses to the basolateral domain. To define the targeting domain in the viral envelope glycoproteins, we studied the effects of mutations in these proteins on the sorting of budding virions. These experiments also identified a region in the carboxyl terminus of the gp41 intracytoplasmic domain which is required for polarized viral budding.

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station A, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-2422. Fax: (514) 343-5701. Electronic mail address: lemay@ERE-UMontreal.CA.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs. The HXBH10 (34) proviral construct which contains a stop codon at the initiation site of the *env* gene and a frameshift at the *KpnI* site (nucleotide position 5934; +1 is the transcription initiation site) in *env* has been previously described (37). This envelope-negative construct is referred to ATG- in this study. The *SalI-BamHI* (HXBe2 nucleotide positions 5331 to 8017) fragment of a *tat* truncated HXBc2 plasmid which contains a stop codon at the end of the gp120 sequence of *env* was subcloned into the envelope expressor pSVIIIenv (6) to create a gp120 expression plasmid. The plasmid encoding gp41 (BRU-derived pTEnv [24]) contains a deletion in most of gp120 but retains the signal peptide required for translocation to the endoplasmic reticulum, allowing correct export to the cell surface (gift of Lautaro Perez, University of Minnesota). Plasmid pEnv83, encoding glycoproteins retained in the endoplasmic reticulum as a result of a glutamic acid-to-arginine substitution at amino acid position 83, was provided by Joseph Sodroski and Udy Olshevsky (Dana Farber Cancer Institute, Boston, Mass.). Other constructs expressing truncated forms of the glycoproteins have been described elsewhere (6). Proviral plasmids expressing mutant forms of the matrix p17 protein have been also described elsewhere (4).

Cell culture. MDCK cells were seeded at 10^6 cells per 24.5-mm-diameter chamber and grown for 2 to 3 days on semipermeable 0.45- μ m-pore-diameter membranes (Costar no. 3425) and maintained in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 8% fetal calf serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. MDCK cells were used at a passage lower than 100, and the polarization of the cell monolayer was tested by monitoring development of electrical resistance between upper and lower chambers. Resistance across the monolayer was constantly above 550 ohms \cdot cm² at the time of DNA introduction (Millicell-ERS resistance system; Millipore).

Lipofection and transient expression. Cells were washed with phosphate-buffered saline, and the lower chamber was filled with Opti-MEM (Gibco/BRL), supplemented with 1% antibiotics. A total of 5 μ g of DNA was mixed thoroughly with 750 μ l of Opti-MEM, while 30 μ l of Lipofectin (Gibco/BRL) was mixed into 750 μ l of Opti-MEM in a separate tube. Diluted DNA and Lipofectin were then combined and mixed well prior to pouring into the upper chamber over the cell monolayer. Cells were then incubated as described above. Medium was removed 24 h after lipofection, and the cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with serum and antibiotics.

Virus quantitation. Media in the upper and lower chambers were harvested 48 h after lipofection. Cellular debris were removed by filtering through a 0.45- μ m-pore-diameter filter (Millipore), and the filtrate was ultracentrifuged at 30,000 rpm in a Beckman Ti 50.4 rotor for 1.5 h at 4°C. The virus pellet was resuspended in 200 μ l of Dulbecco modified Eagle medium and p24 antigen was detected by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) HIVAG-1 kit (Abbott Laboratories) according to the manufacturer's instructions. The p24 concentrations (picograms per milliliter) were then converted to total picograms of p24 released through each side of the membrane.

RESULTS

Optimization of the transient expression system in MDCK cells. Preliminary experiments were performed to establish a simple transient expression system that would allow rapid analysis of polarized viral budding upon introduction of proviral DNA constructs. The use of Lipofectin proved to be slightly more

efficient than other transfection procedures (DEAE-dextran, calcium phosphate precipitation) when DNA was introduced into MDCK cells grown to confluency on semipermeable membranes. The lipofection method was thus used for subsequent studies since this method also appeared to be less disruptive to the integrity of the cell monolayer. The p24 ELISA assay was sufficiently sensitive to measure virus in the pellet obtained following ultracentrifugation of media bathing the transfected cells 48 h after introduction of plasmids.

Effect of gp160 on viral budding. The role of the viral envelope protein gp160 in targeting of viral budding was examined by using this transient expression system in MDCK cells. A plasmid containing complete proviral DNA (ATG+) or a proviral mutant defective in gp160 synthesis (ATG-) was transfected into MDCK cell monolayers, and the release of p24 in the medium bathing either the apical or basolateral domain was measured. The amounts of p24 were similar in the apical and basolateral chamber sides when the cells expressed *env*-negative viruses. In contrast, the amount of p24 detected in the basolateral medium of cells expressing wild-type viruses was more than 95% of the total amount of p24 detected (Fig. 1A). We then examined whether this polarization phenotype could be achieved by providing the gp160 protein in *trans*. Cotransfection of increasing amounts of an expression vector encoding gp160 with the *env*-negative proviral construct restored polarization of viral budding (Fig. 1B). As relative amounts of introduced envelope expressor decreased, apical release of virions increased until reaching close to 50% of total virus release. These data indicate a loss of polarized budding at *env:gag* ratios approaching 1:100. It was thus clearly established that gp160 is responsible for targeted HIV-1 budding to the basolateral surface of MDCK cells when expressed in *cis* or in *trans*. This effect was observed even when the molar ratio between *env* and *gag* was much lower than expected for wild-type virus.

Identification of the *env* moiety harboring the basolateral targeting signal. The *trans*-complementing assay was further used to localize the signal in gp160 responsible for basolateral transport of virions. The *env*-negative proviral construct was cotransfected with either a gp120 or gp41 expression vector. When the plasmid expressing only the gp120 portion of gp160 was used, the ratio of apical to basolateral virus release was similar to that observed with the *env*-negative provirus alone (Fig. 2). Conversely, expression of gp41 was sufficient to restore normal polarized budding of virions. Some recent data (15) indicate that, in contrast with earlier claims (24), the gp41 construct might not give rise to authentic gp41 but rather might give rise to uncleaved precursor retaining a small part (about 1/10) of gp120. However, since complete gp120 is not sufficient for polarization of virus release, it is most likely that the polarization signal responsible for basolateral targeting resides in gp41. The total amount of p24 released was greater when the gp120 expressor was introduced than when the gp41 expressor was introduced (Fig. 2). This observation is also consistent with previous data (Fig. 1) showing an apparent increase in total virus release in the absence of polarization. The exact reason for this phenomenon was not further investigated.

Similar experiments were performed with a plasmid encoding a mutant HIV-1 Env protein which is retained in the endoplasmic reticulum to gain further insight into intracellular events involved in polarized basolateral transport mediated by viral glycoproteins. Expression of this mutant HIV-1 envelope protein (Env83) did not result in polarized virus budding, suggesting that the intracellular expression of envelope per se is not sufficient for polarization.

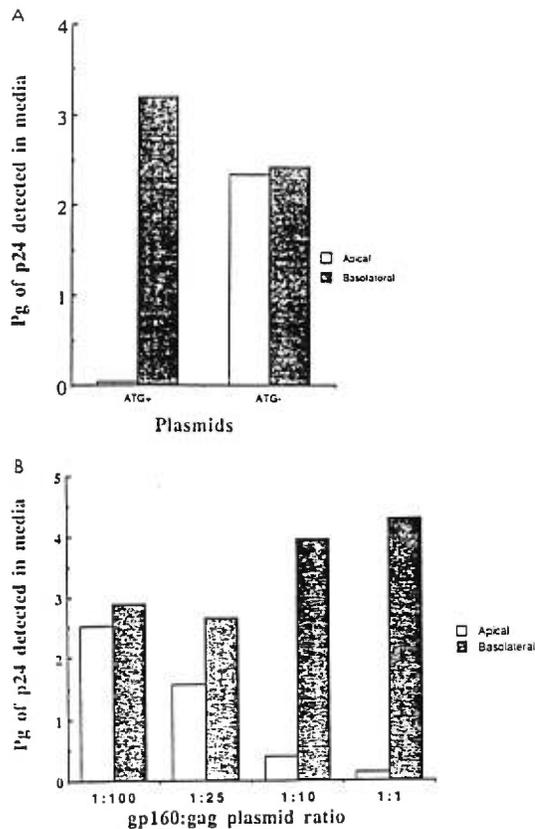


FIG. 1. Effect of gp160 on polarized virus release. (A) Proviral DNAs (5 μ g) expressing (ATG+) or lacking (ATG-) the envelope glycoproteins were transfected into MDCK cells. Apical and basolateral supernatants were harvested 48 h after lipofection, and virus release was detected by p24 ELISA as described in Materials and Methods. (B) A proviral construct lacking Env glycoproteins was cotransfected with a gp160^{env} expression plasmid, and virus release was detected as described for panel A. Increasing molar ratios of the env expressor plasmid relative to the amount of proviral DNA were used.

Effects of mutations in the gp41 intracytoplasmic domain. The intracytoplasmic domain has been shown to encompass the basolateral targeting signal of other viral and cellular proteins (1, 3, 11, 17, 20, 32, 35). On the basis of this observation, experiments were performed to determine if the basolateral targeting signal, apparently present in gp41, can be assigned to the intracytoplasmic domain. Three envelope mutants which encode for gp160 proteins containing a deletion of 131, 103, or 43 amino acids at the carboxyl terminus of gp41 did not restore polarized budding of virions (Fig. 3). In contrast, a gp41 protein containing a deletion of only six amino acids at the carboxyl terminus restored polarized budding, with more than 95% of the virus released at the basolateral side, similar to that observed with the wild-type Env protein.

Other mutations in the gp41 C-terminal end gave rise to intermediate phenotypes. Deletion of 11, 17, or 43 amino acids gradually decreased the ability of gp41 to promote polarized virus release. These results indicate that the signal necessary

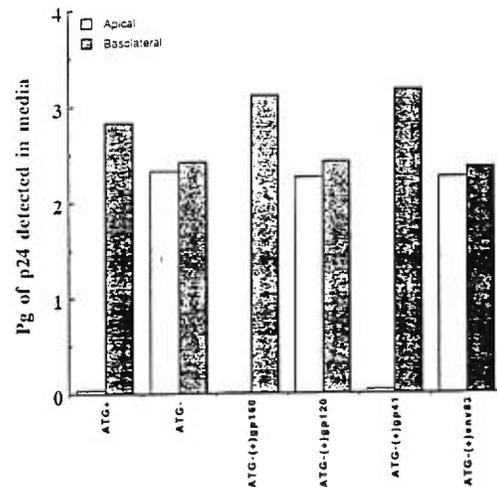


FIG. 2. Effect of env expression on polarized virus release. The env-negative proviral DNA was cotransfected with equimolar amounts of plasmids encoding either gp160, gp120, gp41, or a mutant gp160 retained in the endoplasmic reticulum (Env85) (total of 5 μ g of DNA). Apical and basolateral supernatants were harvested, and p24 assays were performed as described in Materials and Methods.

for basolateral transport of glycoproteins and polarized budding of virions is, at least in part, located within the intracytoplasmic domain of gp41. The boundary of the sequence or structure acting as a signal appears to be close to the carboxy-terminal end, since deletion of as few as 11 amino acids is sufficient to significantly reduce basolateral targeting. Most of these gp41 mutants exhibited almost normal amounts of Env incorporation into the viral particle, as determined in a previous study (6) (Fig. 3). The slightly reduced amounts of virion-associated Env glycoproteins associated with these C-terminal truncations in gp41 expressed in COS cells were previously shown to result from decreased levels of cell-associated Env glycoproteins rather than to a specific defect in virion incorporation (6). These small decreases are not likely to cause the lack of targeting, especially since both the Δ 846-856 and Δ 851-856 gp41 mutants exhibited different polarization phenotypes and yet were shown to be similarly incorporated into the virions. Furthermore, our previous data suggested that even a 10-fold reduction in the level of Env glycoproteins should not significantly affect the extent of polarization (Fig. 1B). It is most likely that the effect of small deletions on the polarization phenotype is due not to an indirect effect on envelope incorporation but rather to a loss of a polarization signal located in the intracytoplasmic region of gp41. This polarization signal thus appears to be distinct from sequences required for Env incorporation into viral particles.

Effect of alterations in the p17 matrix protein on polarized virus release. It was previously shown that sequences within the p17 matrix protein domain of the HIV-1 gag precursor are essential for Env glycoprotein incorporation into assembling virions (4, 38). To determine whether a specific interaction between Env and Gag proteins is required for polarized virus release, the effects of mutations in the p17 matrix protein were examined. Without exception, substitutions and deletions in the p17 matrix protein previously shown to prevent the incorporation of Env glycoprotein (4) caused a nonpolarized distri-

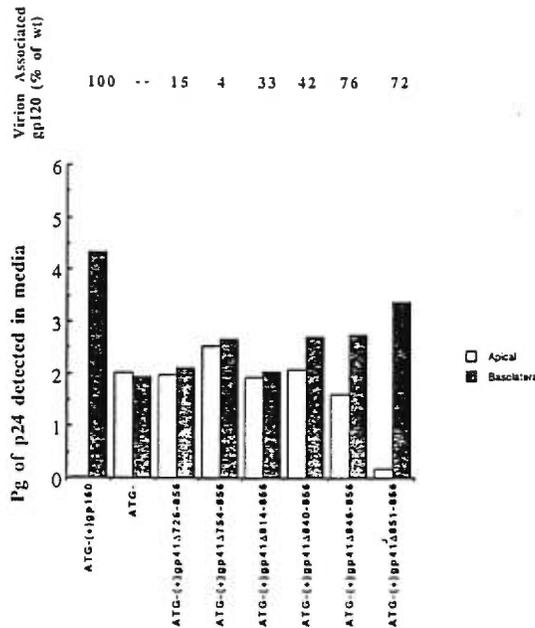


FIG. 3. Effect of C-terminal truncations in gp41 on polarized virus release. Plasmids encoding different Env proteins truncated in their gp41 intracytoplasmic domains were cotransfected in equimolar amounts with the *env*-negative proviral plasmid (total of 5 μ g of DNA). Apical and basolateral media were harvested, and viral p24 was quantitated as described in Materials and Methods. Numbers refer to the positions of deleted amino acids in each mutant. The amino acids are numbered relative to the initial methionine of the *env* gene. The amounts of envelope proteins associated with virus particles relative to wild-type level have been determined in a previous study (6) and are shown at the top.

bution of p24 (Fig. 4). By contrast, two mutants with alterations near the C-terminal end of the p17 matrix protein did not affect Env glycoprotein incorporation (4) (mutants Δ 112-114 and N125R) and also retained a normal polarized phenotype (Fig. 4). These results demonstrate a clear correlation between the ability of mutant p17^{env} to interact with Env glycoprotein and polarized Gag protein release.

DISCUSSION

This report describes a method to investigate polarized HIV-1 viral budding by using MDCK cells without disturbing their differentiated state. This experimental system has the additional advantage of using HIV-1 proviral constructs, thus simulating conditions which are likely to be closer to that of natural HIV-1 infections than previously used vaccinia virus vectors.

Using this approach, we have confirmed previous findings which demonstrated that HIV-1 glycoproteins are responsible for viral polarized budding from the basolateral surface of epithelial cells (22, 23). The *trans*-complementation system in which an *env*-negative provirus and an envelope expressor plasmid were coexpressed confirmed that the Env glycoproteins are responsible for polarized virus release. However, virions were still released in a polarized fashion when lesser amounts of the glycoproteins were incorporated. It is possible

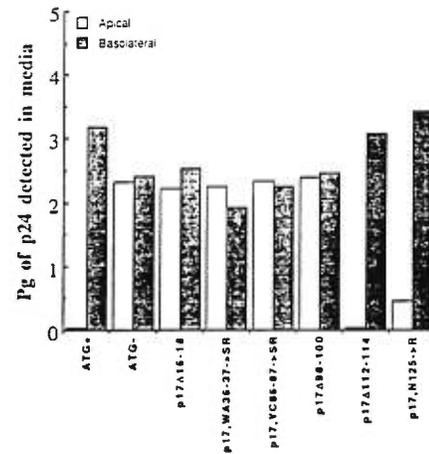


FIG. 4. Effects of mutations in the matrix p17^{env} protein on polarized virus release. Proviral constructs which contain mutations in the p17 matrix protein were introduced by lipofection into MDCK cells, supernatants were harvested, and viral p24 was quantitated as described in Materials and Methods. Numbers refer to the positions of the altered amino acids relative to the initial methionine of Gag.

that these virions harbor Env molecules but at a level below a threshold required for correct transport to the basolateral surface.

The intracytoplasmic domain of several glycoproteins has been shown to harbor a signal responsible for their proper targeting to the basolateral surface (1, 3, 11, 17, 20, 32, 35). Accordingly, we have demonstrated that small carboxy-terminal deletions of the intracytoplasmic domain of gp41 were sufficient to significantly alter polarized transport, indicating that this region is important in the targeting process.

Results obtained with a mutant Env glycoprotein incorrectly transported to the cell surface initially suggested that the polarized transport of Env, and presumably its incorporation into the virion, is required for polarized budding. To further examine this possibility, we analyzed the effect of mutations in the p17 matrix protein. The results of this study demonstrated that mutations, previously shown to affect the incorporation of envelope glycoproteins (4), also precluded the polarization of viral budding. Conversely, mutations which do not affect the incorporation did not alter the polarization phenotype. These data support the view that an interaction between the envelope and the rest of the capsid, through the amino-terminal region of p17, is required for polarization of virus release.

Altogether, the results of this study demonstrate that the gp41 protein, harboring an intracytoplasmic signal for polarized virus release, must interact with the p17 matrix protein in order for basolateral targeting of virus budding to occur. These data are consistent with a mechanism by which viral capsids can be targeted to the cell surface by the same cellular machinery responsible for the transport of membrane proteins. An association of capsids with transport vesicles has been previously suggested for other retroviruses (12). The association of capsids with specific vesicles destined for the basolateral membrane domain might be favored by the presence of viral envelope proteins interacting with p17. Additional studies are required to specifically demonstrate whether such a phenomenon is actually involved.

Several previous studies have stressed the potential importance of epithelial cell infection in HIV pathogenesis (5, 16, 19,

21, 33). The polarized release of viruses is likely to be important for their dissemination in the host as well as for their pathogenic potential. The studies in this report describe a method which may lead to a better understanding of mechanisms involved in polarized virus budding in epithelial cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lautaro Perez for his generous gift of plasmid pTREny, Joseph G. Sodroski and Udy Olshesky for their gift of plasmid pInV83, and Xiaojian Yao for helpful discussions.

This work was supported by grants from the National Health Research program (NIHRDP) and MRC to E.A.C., by a FCAR group grant to E.A.C. and G.L., and by NIH grant AI01017 to D.G. R.L. was supported by the FCAR through the Groupe de Recherche en Transport Membranaire. E.A.C. is the recipient of a NHRDP AIDS career award, and G.L. is the recipient of a Chercheur-boursier award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Casanova, J. E., G. Apodaca, and K. E. Mostov. 1991. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66:65-75.
- Compans, R. W., and R. V. Srinivas. 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170:141-181.
- Compton, T., I. E. Ivanov, T. Gottlieb, M. Rindler, M. Adesnik, and D. D. Sabatini. 1989. A sorting signal for the basolateral delivery of the vesicular stomatitis virus G protein lies in its luminal domain: analysis of the targeting of VSV G-influenza hemagglutinin chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4112-4116.
- Dorfman, T., F. Mammann, W. Haseltine, and H. G. Güttlinger. 1994. Role of the p17 matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 68:1689-1696.
- Fantini, J., N. Yahi, S. Baghdiguan, and J.-C. Chermann. 1992. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J. Virol.* 66:580-585.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski. 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 66:3306-3315.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55gag virus-like particles from recombinant baculo-virus-infected insect cells. *Cell* 59:103-112.
- Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H.-D. Klenk, and W. Garten. 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature (London)* 360:358-361.
- Handler, J. S. 1989. Overview of epithelial polarity. *Annu. Rev. Physiol.* 51:729-740.
- Hopkins, C. R. 1991. Polarity signals. *Cell* 66:827-829.
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman. 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66:907-920.
- Jones, T. A., G. Blaug, M. Hansen, and E. Burkli. 1990. Assembly of Gag- β -galactosidase proteins into retrovirus particles. *J. Virol.* 64:2265-2279.
- Kilpatrick, D. R., R. V. Srinivas, and R. W. Compans. 1988. Expression of the spleen focus-forming virus envelope gene in a polarized epithelial cell line. *Virology* 164:547-550.
- Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.
- Marcon, L., and J. Sodroski. 1994. gp120-independent fusion mediated by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein: a reassessment. *J. Virol.* 68:1977-1982.
- Mathjis, J. M., M. C. Hing, J. Grierson, D. E. Dwyer, C. Goldschmidt, D. A. Cooper, and A. L. Cunningham. 1988. HIV infection of rectal mucosa. *Lancet* i1111.
- Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71:741-753.
- Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti, and C. Okamoto. 1992. Plasma membrane proteins sorting in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 116:577-583.
- Moyer, M. P., R. I. Huot, A. Ramirez, S. Joe, M. S. Meltzer, and H. E. Gendelman. 1990. Infection of human gastrointestinal cells by HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6:1409-1415.
- Neame, S. J., and C. M. Isacke. 1993. The cytoplasmic tail of CD44 is required for basolateral localization in epithelial MDCK cells but does not mediate association with the detergent-insoluble cytoskeleton of fibroblasts. *J. Cell Biol.* 121:1299-1310.
- Nelson, J. A., C. Reynolds-Köhler, W. Margaretten, C. A. Wiley, C. E. Reese, and J. A. Levy. 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* i259-262.
- Owens, R. J., and R. W. Compans. 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 63:978-982.
- Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans. 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3987-3991.
- Perez, L., M. A. O'Donnell, and E. B. Stephens. 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor-binding glycoprotein. *J. Virol.* 66:4134-4143.
- Rodriguez-Boulan, E. 1983. Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Mod. Cell Biol.* 1:119-170.
- Rodriguez-Boulan, E., and W. J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245:718-725.
- Roth, M. G., R. V. Srinivas, and R. W. Compans. 1983. Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells. *J. Virol.* 45:1065-1073.
- Ruta, M., M. J. Murray, M. C. Webb, and D. Kabat. 1979. A murine leukemia virus mutant with a temperature sensitive defect in membrane glycoprotein synthesis. *Cell* 16:77-88.
- Shields, A., O. N. Witte, E. Rothenberg, and D. Baltimore. 1978. High frequency of aberrant expression of Moloney murine leukemia virus in clonal infections. *Cell* 14:601-609.
- Simons, K., and A. Wandinger-Ness. 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62:207-210.
- Smith, A. J., M.-I. Cho, M.-L. Hammarskjöld, and D. Rekosh. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 Pr155^{env} and Pr160^{env/gag} expressed from a simian virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into virus like particles. *J. Virol.* 64:2743-2750.
- Stephens, E. B., and R. W. Compans. 1986. Nonpolarized expression of a secreted murine leukemia virus glycoprotein in polarized epithelial cells. *Cell* 47:1053-1059.
- Tan, X. T., R. Pearce-Pratt, and D. M. Phillips. 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J. Virol.* 67:6447-6452.
- Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5163-5167.
- Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* 268:3313-3320.
- Tucker, S. P., and R. W. Compans. 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* 42:187-247.
- Yao, X. J., H. Güttlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen. 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of *tyro*-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* 66:5119-5126.
- Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T.-H. Lee, and M. Essex. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* 66:4966-4971.

CHAPITRE 9:
[ANNEXE 2]
ARTICLE-SYNTHESE

L'infection par le VIH : rôle des facteurs viraux

Robert E. Lodge
Jean-Luc Darlix
Éric A. Cohen

L'étude de la dynamique de la population virale a montré que la présence de cellules sanctuaires infectées, quiescentes, empêchait l'éradication du virus par les thérapies actuelles. Une meilleure connaissance du mode d'entrée du virus et de sa réplication devrait permettre d'envisager de nouveaux modes d'intervention antivirale: les inhibiteurs de la transcriptase inverse restent les mieux connus, mais on peut espérer agir aussi sur la protéine NCp7 de la nucléocapside virale et sur les protéines de la matrice virale. En effet, NCp7 chaperonne la transcriptase inverse et est impliquée dans la libération de la particule virale, et les protéines de la matrice sont actives au niveau de l'entrée du noyau viral (complexe de préintégration) dans le noyau cellulaire. En outre, la compréhension du rôle des protéines accessoires Vpu et Nef dans l'endocytose de CD4, les transports intracellulaires et le bourgeonnement demeurent des objectifs importants pour pouvoir développer des virus atténués et mettre au point des vaccins contre le VIH.

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est dû à l'infection par un rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'histoire naturelle de cette infection se distingue par plusieurs phases de durée relativement variable: après l'infection primaire, les effets nocifs de la réplication virale s'accumulent et aboutissent à la détérioration progressive du système immunitaire et du système nerveux central; la maladie devient alors chronique. Malgré les progrès remarquables qui ont marqué la recherche sur le SIDA et le VIH depuis le début des années 1980, le SIDA demeure une maladie toujours mortelle. Les agents thérapeutiques actuellement utilisés en cli-

nique ciblent deux enzymes-clés du cycle de multiplication du VIH, la transcriptase inverse et la protéase. Cependant, ce cycle comporte bien d'autres étapes au cours desquelles une intervention thérapeutique efficace pourrait être entreprise. Il s'avère donc nécessaire de bien caractériser les étapes de la réplication du VIH dans les différents types cellulaires impliqués dans sa pathogénie. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la réplication et la dynamique du virus demeure essentielle au développement de nouvelles approches antivirales. Dans le cadre des IX^{es} entretiens du centre Jacques-Cartier, le colloque sur la pathogénie du SIDA a réuni, sous le thème du

ADRESSES

R.E. Lodge: *étudiant en 3^e cycle*. E.A. Cohen: *directeur du laboratoire de rétrovirologie humaine du département de microbiologie et immunologie*. Laboratoire de rétrovirologie humaine, Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada. J.L. Darlix: *directeur du laboratoire de rétrovirologie*. Unité de virologie humaine, Ecole normale supérieure de Lyon, Inserm U. 412, 49, allée d'Italie, 69364 Lyon, France.

rôle des facteurs viraux et de l'hôte, de nombreux spécialistes pour discuter des développements les plus récents dans ce domaine. Nous aborderons les derniers progrès concernant le rôle des facteurs viraux dans la physiopathologie du SIDA qui ont été discutés lors de ce colloque.

La dynamique virale

L'une des contributions importantes des deux dernières années a été la démonstration d'une association étroite entre la réplication virale et la progression clinique du SIDA. En effet, il est maintenant admis que le VIH se réplique de manière active tout au long de l'infection naturelle. A la suite de l'infection primaire par le virus, il s'établit un équilibre précaire dans lequel la destruction des lymphocytes T CD4⁺ induite par la réplication virale est compensée par le renouvellement continu de cette même population cellulaire (*m/s n° 8-9, vol. 12, p. 978*) [1]. Les études initiales de D. Ho (*Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, USA*) [2] ont permis d'élaborer un premier modèle de la dynamique de réplication du virus (*m/s n° 6-7, vol. 12, p. 820*). En utilisant des inhibiteurs puissants de la protéase virale, l'équipe de Ho a pu rapporter différentes données nouvelles extrapolées de l'effet de ces agents antiviraux sur la cinétique virale: la demi-vie des virus circulants (environ 6 heures), le temps mis par le virus pour établir l'infection chronique d'autres cellules (2,2 jours), le temps de remplacement complet de la population virale par les formes résistantes aux inhibiteurs (2 semaines). Par ailleurs, ces études ont également montré que la durée de vie des lymphocytes CD4⁺ infectés est de 1,6 jour, que dix milliards de virions doivent être recyclés par jour, et que 99 % de ces virus proviennent de cellules nouvellement infectées. Malgré la capacité des nouveaux agents thérapeutiques de diminuer considérablement la charge virale (au-delà de 99 %), il existe des compartiments cellulaires à l'abri des voies circulantes qui permettent au virus de survivre dans l'hôte sans pour autant contribuer de manière substantielle à la charge virale. Ces cellules chroniquement infectées par

m/s n° 2, vol. 14, février 98

le VIH s'insèrent dans un modèle dans lequel le virus, après une infection importante des lymphocytes et une production virale massive, s'établit à l'intérieur de ces « sanctuaires de la réplication virale » (*m/s n° 2, vol. 14, p. 196*). Seule l'élaboration de stratégies antivirales agressives, précoces et continues, telles les nouvelles tri-thérapies, permettront l'éradication du virus dans les cellules chroniquement infectées ainsi que dans les cellules servant de réservoir latent pour le VIH (*m/s suppl. 2, vol. 12, p. 9*). Par ailleurs, M. Stevenson (*University of Massachusetts, Worcester, USA*) a souligné que l'inhibition de l'infection de cellules qui ne se divisent pas, tels les macrophages et les lymphocytes CD4⁺ quiescents, pourrait contribuer à éliminer l'établissement de compartiments cellulaires servant de réservoir au virus.

L'entrée du virus

La première étape essentielle à l'établissement de l'infection par le VIH est l'interaction du virus avec la surface de la cellule. L'événement le mieux connu est la reconnaissance de la molécule CD4 par la glycoprotéine virale gp120 (*m/s n° 3, vol. 3, p. 180*) [3]. Les régions et structures locales impliquées dans cette interaction indépendante du pH sont bien connues et ont déjà fait l'objet de plusieurs revues [4]. La découverte récente des co-récepteurs du VIH constitue une étape marquante de la recherche sur le SIDA de la dernière année (*m/s n° 8-9, vol. 12, p. 975; m/s n° 10, vol. 12, p. 1185*) [5]. J. Sodroski (*Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA*), D. Littman (*Skirball Institute, New York, USA*), W. Paxton et T. Dragic (*Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, USA*), E. Berger et G. Alkhatib (*NIH, Bethesda, MD, USA*) ainsi que P. Lusso (*San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italie*) ont ainsi montré que ces co-récepteurs correspondent aux récepteurs des chimiokines dont la structure est constituée de sept domaines transmembranaires dont le segment cytoplasmique lie le GTP (*m/s n° 2, vol. 13, p. 264*) [6-12]. Ainsi, P. Champagne *et al.* ont mentionné (voir p. 142 de ce numéro) que l'identification de ces nouveaux co-récepteurs a permis d'expliquer la non-permissi-

vité de certaines cellules à l'infection au VIH et la résistance de certains individus à cette infection (*m/s n° 8-9, vol. 12, p. 1037*). Enfin, la découverte des différents récepteurs de chimiokines dans les lymphocytes (CXCR4) ou dans les macrophages (CCR5), a permis une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'entrée du virus dans la cellule (*m/s n° 2, vol. 13, p. 264*) (figure 1) [13-16].

L'interaction de la molécule CD4 avec l'enveloppe virale induit des changements conformationnels de la gp120 libérant le domaine de fusion de la gp41. Plusieurs études ont montré que le changement conformationnel induit par l'interaction gp120-CD4 peut être facilité par l'interaction des deux partenaires avec le co-récepteur, au niveau de la boucle V3 pour la gp120 et des régions D1-D2 pour CD4. Les groupes de J. Sodroski et J. Moore (*Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, NY, USA*) ont ainsi montré que la molécule CD4 soluble induit l'interaction entre la gp120 et le CCR5; H. Golding *et al.* (FDA, Bethesda MD, USA) ont observé l'association entre CD4-gp120 et CXCR4 [13-15]. Il semble que la partie amino-terminale des récepteurs des chimiokines soit impliquée dans ces interactions, quoique de plus en plus de résultats montrent l'importance de la conformation globale de la protéine; par ailleurs, selon D. Littman, les boucles extracellulaires de CXCR4 qui interagissent avec la gp120 se trouveraient à l'extrémité carboxy-terminale. A la suite de ces interactions, le processus de fusion des membranes cellulaire et virale est déclenché. Le mécanisme par lequel la partie amino-terminale de la glycoprotéine transmembranaire virale gp41 déclenche le processus de fusion reste encore à déterminer; le changement conformationnel induit par la triple interaction entre gp120-CD4 et le co-récepteur serait responsable de la libération du domaine de fusion de la gp41 [13-15]. Enfin, malgré toutes ces observations, il demeure toujours possible que le VIH soit amené à utiliser d'autres récepteurs de chimiokines apparentés (*m/s n° 11, vol. 13, p. 1364*); en effet, le récepteur des β -chimiokines CCR3 semble pouvoir remplacer

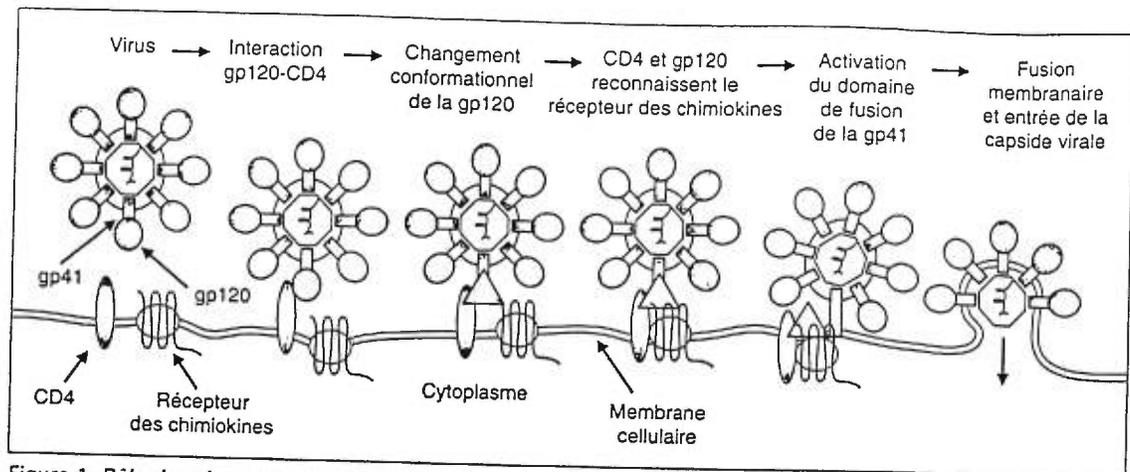


Figure 1. Rôle des récepteurs de chimiokines dans l'entrée du VIH dans la cellule. gp120: glycoprotéine de surface de l'enveloppe virale ; gp41: glycoprotéine transmembranaire de l'enveloppe virale.

CCR5 pour certaines souches virales (ADA, YU2, et particulièrement la souche bi-tropique 89.6, qui utilise aussi CCR2b) [16].

Une autre conséquence liée à l'utilisation des récepteurs de chimiokines par le virus provient de leur capacité intrinsèque (et du rôle biologique inhérent) de transmission des signaux. Bien que l'effet antiviral exercé par les chimiokines soit indépendant de leurs voies de transmission du signal, il demeure que l'interaction du virus avec ses co-récepteurs peut entraîner des effets directs sur la cellule. La transmission du signal, couplée aux protéines G hétérotrimériques, active la phospho-inositol 3-kinase et la protéine-kinase C, et aboutit, entre autres, à la polymérisation de l'actine, au réarrangement du cytosquelette et à l'augmentation de l'adhérence cellulaire. Ces derniers événements peuvent être directement impliqués dans les étapes d'entrée du virus ou mener à la fusion des membranes cellulaire et de l'enveloppe virale. Déjà, des lignées cellulaires exprimant constitutivement les co-récepteurs ont été établies pour poursuivre des recherches sur ces phénomènes [13]. Enfin, P. Jolicœur (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada) propose que des animaux transgéniques, exprimant les co-récepteurs et le CD4, servent de nouveaux modèles pour l'étude de la pathogénie du virus.

La synthèse de l'ADN proviral et les événements précédant l'intégration

Les premières étapes de la reconnaissance entre le virus et l'hôte terminées, le noyau viral doit pénétrer dans le cytoplasme de la cellule pour permettre la synthèse de l'ADN proviral. Il semble que la nucléoprotéine NCp7 recouvrant le génome viral chaperonne la transcriptase inverse (RT) lors de la synthèse d'ADN proviral à l'intérieur du noyau viral. Des mutations de la NCp7 provoquent des défauts de la rétrotranscription et une forte atténuation de l'infektivité du virus (L. Berthou, J.L. Darlix, École Normale Supérieure de Lyon, France) [17, 18]. D'autres mutations dans la NCp7, dans le domaine très conservé des doigts de zinc, semblent affecter les dernières étapes de la synthèse du provirus et également son intégration (V. Tanchou, J.L. Darlix, École Normale Supérieure de Lyon, France) [17, 18]. Des modifications biochimiques du noyau viral surviennent dans le cytoplasme de la cellule infectée et on sait qu'elles concernent, au minimum, la protéine de la matrice MAp17 qui est fortement phosphorylée. Ces phosphorylations sont requises pour que le noyau viral, appelé complexe de préintégration (CPI), migre vers le noyau de la cellule à la suite de l'entrée du virus. En effet, la translocation nucléaire active

du complexe de pré-intégration est nécessaire pour que le VIH puisse infecter les cellules quiescentes, telles que les macrophages et les cellules microgliales; ce processus semble spécifique des lentivirus puisque les oncornavirus n'ont pas la capacité d'infecter des cellules quiescentes ou très différenciées. En effet, contrairement aux lentivirus, les oncornavirus n'infectent que des cellules en prolifération car la dissolution de la membrane nucléaire lors de la division est nécessaire pour que leur CPI ait accès au génome cellulaire. Le développement d'agents thérapeutiques capables d'inhiber spécifiquement la translocation nucléaire active du CPI du VIH permettrait de prévenir l'infection d'un compartiment cellulaire (composé de macrophages, de lymphocytes quiescents, de cellules microgliales et de cellules dendritiques) qui contribue à la persistance et à la propagation de l'infection.

La MAp17 semble contenir deux signaux de transport intracellulaire de nature opposée: un signal de localisation nucléaire (SLN) impliquant des acides aminés basiques et un signal de transport membranaire constitué d'un acide myristique en position amino-terminale du précurseur Gag. Les mécanismes déterminant la sélection de ces signaux ont été discutés par M. Stevenson. Bien que les acides aminés impliqués dans la sélection de ces signaux de transport fassent encore l'objet de discus-

sions, on a rapporté la phosphorylation d'une tyrosine carboxy-terminale ainsi que de plusieurs résidus sérine et thréonine. Selon Stevenson, la phosphorylation de la MAP17 serait catalysée par une sérine/thréonine-kinase cellulaire à l'intérieur du virion. L'association de la protéine accessoire Nef à une sérine/thréonine-kinase pourrait permettre l'incorporation de cette activité enzymatique dans la particule virale. Si tel est le cas, seule la phosphorylation de sérines/thréonines serait impliquée dans l'activation du signal de transport nucléaire. Ainsi, à la suite de l'entrée du virus, une sous-population de MAP17 phosphorylée conférerait au complexe de préintégration un déterminant nucléophile (SLN) lui permettant d'être transporté activement vers le noyau et de mettre en route les étapes d'intégration de l'ADN proviral. La translocation nucléaire du complexe de préintégration peut également être modulée par un deuxième déterminant nucléophile présent sur la protéine accessoire Vpr [19, 20]. Récemment, un troisième signal aurait été identifié dans l'intégrase virale; en revanche, le rôle et la pertinence de ces signaux complémentaires de celui de la MAP17 restent à définir.

La transcription

La régulation de l'expression des ARNm du VIH implique une interaction étroite entre des facteurs codés par le virus et des protéines d'origine cellulaire. Le transactivateur principal du virus, la protéine Tat, stimule l'expression de tous les gènes du VIH alors que la protéine Rev module le transport et l'expression dans le cytoplasme des ARNm codant pour les protéines de structure [21, 22]. Des travaux de P. Jalinet (École Normale Supérieure de Lyon, France) montrent une interaction de la protéine Tat avec le facteur de transcription TFIID. Ces observations suggèrent maintenant que, outre son rôle dans l'élongation des transcrits, Tat aurait également un rôle au niveau de la mise en route de la transcription. Joséphine Sire (Inserm, Pathogénie des infections à lentivirus, Marseille, France) a également rapporté que la protéine Vpr, qui est un transactivateur faible du promoteur du VIH, semble interagir avec TFIIB.

Les travaux de J. Hiscott (McGill University, Montréal, Québec, Canada) soulignent l'importance de l'apport des facteurs de transcription NFκB/IκB dans la transcription du LTR (*long terminal repeat*) du VIH [23]. En effet, le complexe cytoplasmique NFκB/IκB subit une dissociation lors de l'activation des cellules: tandis que la sous-unité IκB est phosphorylée et dégradée dans le protéasome par la voie dépendante de l'ubiquitine, la sous-unité NFκB est transportée dans le noyau où elle participe à l'activation du LTR viral. L'introduction de mutations dans la région amino-terminale de IκB la rend résistante à sa dégradation dans le protéasome. Les molécules IκB mutantes engendrées sont transdominantes négatives car elles inhibent plus efficacement l'effet transcriptionnel de NFκB que la protéine naturelle IκB.

Les glycoprotéines et les protéines accessoires Vpu et Nef

À l'opposé des protéines Gag et Gag-Pol, les glycoprotéines Env utilisent les voies du transport vésiculaire, comme les protéines membranaires cellulaires, pour se rendre à la surface cellulaire. Les glycoprotéines sont ciblées vers des domaines membranaires particuliers dans les tissus et cellules à surfaces polarisées, tels les épithéliums, et leur distribution à la surface cellulaire est influencée par l'endocytose. Le rôle potentiel de ces phénomènes dans la pathogénie du VIH reste à démontrer, mais la présence d'un signal de transport sur la gp41, responsable du bourgeonnement du virus à des régions distinctes de la surface cellulaire, peut donner des indices importants sur les mécanismes extrêmement efficaces impliqués dans la transmission du VIH de cellule à cellule; ce signal de transport a été identifié dans les laboratoires de E.A. Cohen et G. Lemay (Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). En effet, la surface membranaire basolatérale des épithéliums, lieu de bourgeonnement préférentiel du VIH, correspond fonctionnellement aux régions de contact

L'infection par le VIH entraîne une diminution de l'expression du récep-

teur CD4 à la surface cellulaire. La rétention dans le réticulum endoplasmique de complexes constitués des glycoprotéines virales et de CD4, la dégradation de la molécule CD4 par Vpu et l'effet de Nef sur l'endocytose de CD4 (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 732*) sont les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène [19, 24]. La protéine Nef, en stimulant l'endocytose, accentue alors le transport endosomique de CD4 et sa dégradation dans les lysosomes. La protéine Vpu interagirait directement avec le domaine intracytoplasmique de CD4 induisant un changement de conformation permettant le transport de la molécule vers les voies de dégradation jumelées aux protéines du réticulum endoplasmique. Enfin, les mécanismes utilisés par Vpu pour augmenter le bourgeonnement du virus à la surface cellulaire demeurent peu connus. Sur la base d'une analogie de structure entre Vpu et la protéine M2 du virus de l'influenza, il a été proposé que Vpu ait une activité de canal ionique. Cependant, des études électrophysiologiques effectuées dans les ovocytes ne semblent pas montrer d'activité de canal ionique dans ce système (M. Coady, J.Y. Lapointe et E.A. Cohen, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Selon des observations récentes, la partie intracytoplasmique des glycoprotéines du VIH-2, virus ne possédant pas de gène Vpu, aurait une activité Vpu sur le bourgeonnement des virus ce qui rend ces mécanismes d'autant plus énigmatiques (S. Bour, NIH, Bethesda, MD, USA).

La protéine Nef possède des fonctions additionnelles à celles impliquées dans la dégradation de CD4. En effet, l'association de cette protéine à des sérine/thréonine-kinases, aux molécules β-COP (*m/s n° 3, vol. 11, p. 478*) ainsi que l'observation récente de son incorporation à la particule virale démontrent les capacités multifonctionnelles de la protéine. Malgré cela, les protéines Nef du VIH et du VIS (le virus de l'immunodéficience simienne), quoique similaires, semblent utiliser des mécanismes spécifiques de leur hôte respectif; en effet, R. Desrosiers (*Harvard University, Boston, MA, USA*) a analysé les substitutions d'acides aminés produites dans Nef chez des animaux infectés avec un VIS chimère pour la protéine Nef

du VIH (Nef-VIH). Sur quatorze substitutions observées, sept équivalaient au rétablissement de l'acide aminé correspondant dans Nef-VIS, soulignant l'importance des facteurs cellulaires de l'hôte dans la fonction de Nef. M. Peterlin (UCSF, San Francisco, CA, USA) a ainsi rapporté le rôle de Nef dans les cascades d'activation de kinases, particulièrement par la voie de la kinase activant p21 (PAK), et R. Benarous (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, France) a confirmé l'interaction de la protéine β -COP et d'une thioestérase avec Nef. Enfin, l'interaction de la protéine avec β -COP pourrait peut-être impliquer Nef dans les transports vésiculaire ou endosomique cellulaires. L'identification et la caractérisation des partenaires cellulaires des protéines accessoires Vpu et Nef demeurent des objectifs importants pour comprendre le rôle et la fonction de ces facteurs dans la réplication du VIH et sa pathogénie.

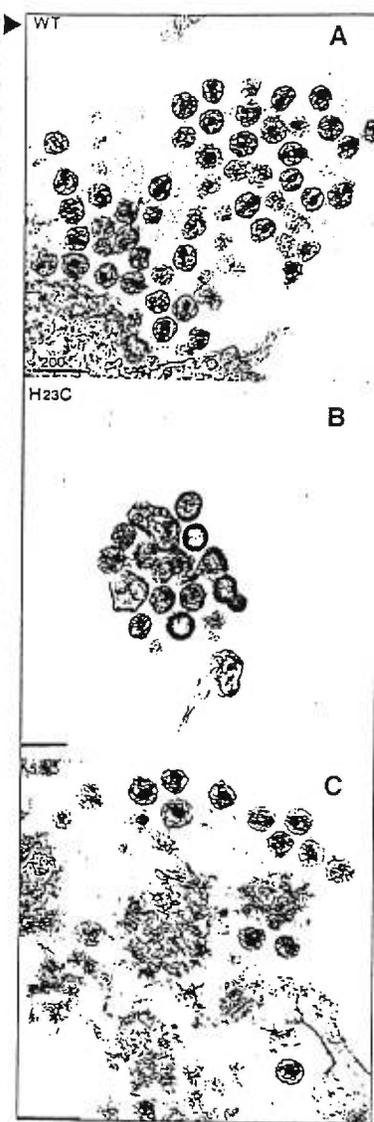
L'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale

Ce processus multi-étapes commence par le pilotage membranaire des protéines et enzymes virales, sous la forme de précurseurs polyprotéiques Gag et GagPol, grâce à la présence en position amino-terminale d'un myristate. Les interactions dimériques et trimériques Gag/Gag, GagPol/GagPol et Gag/GagPol contrôlent l'assemblage du cœur viral. On assiste simultanément à la sélection du génome viral, à sa dimérisation et à son encapsidation. Le rôle du domaine NCp7 lors de l'assemblage et de l'encapsidation du génome viral est essentiel. C'est au cours de l'assemblage que la protéase virale est activée, ce qui résulte en la maturation des précurseurs Gag et GagPol. Une étape complémentaire semble intervenir à ce stade et correspondre à la condensation du cœur viral pour donner le noyau du virus. Des mutations dans la NCp7, et précisément dans le domaine très conservé des doigts de zinc, semblent atténuer ce processus de condensation et aboutir à des particules virales présentant des défauts morphologiques [17, 18]. Bien que les précurseurs polyprotéiques Gag et GagPol de ces virus mutants mûrissent

normalement, ces virus sont complètement défectueux pour la réplication (figure 2) (C. Péchoux, J.L. Darlix, École Normale Supérieure de Lyon, France). Les raisons moléculaires de ces modifications structurales sont à l'heure actuelle mystérieuses. Enfin, des résultats récents indiquent que des interactions entre la MAP17 et les protéines de l'enveloppe virale (SUGp120 et TMgp41) permettraient le recrutement des glycoprotéines au niveau de l'enveloppe de la particule virale en formation qui bourgeonnera à la surface cellulaire.

Perspectives

En conclusion, l'administration d'antiviraux (la tri-thérapie repose actuellement sur la base de deux antitranscriptase inverse et d'une antiprotéase) pourrait se faire lors de la primo-infection afin de limiter considérablement la réplication du VIH, et de ce fait diminuer de façon radicale la charge virale. Par exemple, le développement de nouveaux agents antirétroviraux dirigés contre les protéines précoces, bloquant les premières étapes de la transcription inverse, représente beaucoup d'intérêt pour limiter la dissémination du virus. L'exemple d'inhibiteurs dirigés contre les structures très conservées en doigt de zinc de la protéine NCp7 est particulièrement intéressant à cet égard. L'importance de ces structures à la



fois aux étapes précoce (rôle dans la rétrotranscription) et tardive (incorporation de l'ARN génomique) du cycle viral [17] en fait des cibles d'antiviraux potentiels; déjà, W.G. Rice *et al.* (NCI-Frederick Cancer Center, Frederick, MD, USA) ont développé des inhibiteurs spécifiques de ces structures, directement toxiques pour le virus. Ces inhibiteurs semblent affecter les virus de manière analogue aux agents antiprotéase et antitranscriptase inverse.

C'est en approfondissant notre connaissance des mécanismes de régulation de l'expression du virus, ainsi que des relations structure-fonction des protéines et des enzymes du VIH, que nous pourrions mieux comprendre les étapes importantes de son cycle répliatif et mieux suivre l'évolution des différentes phases de cette maladie virale. Mieux connaître la pathogénie du virus permet ainsi le développement logique de nouveaux agents thérapeutiques, et la possibilité de cibler les périodes les plus critiques du cycle de réplication du virus ou de choisir les moments les plus opportuns pour l'administration d'antiviraux. La découverte de nouveaux co-récepteurs du virus a suscité un très vif intérêt pour développer de nouveaux antiviraux puissants bloquant l'entrée du VIH dans les cellules. La modulation des protéines virales, telles que les protéines de régulation Vpr, Vif, Vpu et Nef, pourrait aussi être utilisée pour le développement de virus atténués, stables, et servir à la mise au point de vaccins ■

RÉFÉRENCES

- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6.
- Bour S, Gelezianus R, Wainberg MA. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* 1995; 59: 63-93.
- Matthews TJ, Wild C, Chen CH, Bolognesi DP, Greenberg ML. Structural rearrangements in the transmembrane glycoprotein after receptor binding. *Immunol Rev* 1994; 140: 93-104.
- Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996; 2: 1174-8.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry co-factor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-7.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85: 1135-48.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Litman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381: 661-6.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cavanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CCR-5. *Nature* 1996; 381: 667-73.
- Alkhaib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC-CCR5: a Rantes, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-8.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clarklewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant sdf-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-33.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clarklewis I, Legler DF, Loescher M, Baggiolini M, Moser B. The CXCR chemokine sdf-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T cell-line adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-5.
- Wu LJ, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardins E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. *Nature* 1996; 384: 179-83.
- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Chengmayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. CD4-independent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384: 184-7.
- Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 1996; 274: 602-5.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85: 1149-58.
- Darlix JL, Lapadat-Tapolsky M, de Rocquigny H, Roques BP. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* 1995; 254: 523-37.
- Darlix J, Yu C, Berthou X, Ottmann M, Jullian N, Roques B. La nucléocapside du VIH : un paradigme pour la recherche et ses applications médicales. *Med Sci* 1995; 11: 420-9.
- Trono D. HIV accessory proteins - leading roles for the supporting cast. *Cell* 1995; 82: 189-92.
- Stevenson M. Portals of entry - uncovering HIV nuclear transport pathways. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 9-15.
- Cullen BR. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 375-94.
- Diaz J, Duc Dodon M, Schaerer-Uthurralt N, Simonin D, Kindbeiter K, Gazzolo L, Madjar J. Une protéine du virus de l'herpès simplex active, à la place de Rex et de Rex, le transport nucléocytoplasmique des messagers qui codent pour les glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus humains. *Med Sci* 1996; 12: 499-502.
- Hiscott J, Roulston A, D'Addario M, Lacoste J, Cohen L. La régulation de l'expression de VIH-1 et l'activation des gènes de cytokines. *Med Sci* 1992; 8: 346-51.
- Cohen EA, Subramanian RA, Göttinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 214: 219-35.

TIRÉS À PART

R.E. Lodge.



RETROUVEZ LES REVUES MASSON SUR INTERNET

<http://www.masson.fr>

e-mail : revues@masson.fr

Summary

HIV infection: the viral factors

Although many discoveries have led to the development of treatments, AIDS still remains irrevocably a lethal disease. Virus resistance to antiviral agents is a major hurdle to overcome in the search for an efficient therapeutic intervention. Viral population turnover dynamics in the host has revealed that some infected latent non-dividing cells become sanctuaries of viral replication. Opposite to productively infected cells, that contribute to the replenishment of the viral population, these chronically infected cells are not easily accessible to current treatments. The recent finding that chemokine receptors act as the enigmatic HIV viral co-receptors for viral entry has opened the way to possible new antiviral products. Comprehension of the key mechanisms of viral membrane fusion has now been greatly enhanced by the discovery of CXCR4 and CCR-5 as major factors in viral replication and tropism. Although preliminary results on the specific regions of co-receptors implicated in their various functions have been investigated, it remains uncertain if such regions can be clearly defined. Possible effects of chemokine receptor use by HIV on signal transduction are also being studied. Following the translocation of the viral core into the cytoplasm, several events are potential targets for antiviral intervention. The active transport of the pre-integration complex to the nucleus is a landmark event in HIV replication. Inhibition of such a phenomenon could directly prevent the infection of non-dividing cells (such as macrophages), and contribute to the elimination of the latently infected «sanctuary» cells. The best known AIDS antiviral therapy remains against reverse transcription. Insights into the role of viral nucleoprotein NCp7 in efficient RT action and infectious particle formation have proposed new, broader multi-target intervention, based on inhibiting the multifunctional NCp7 protein. Finally, the role of the accessory proteins Vpu and Nef is currently under investigation. The understanding of the mechanisms behind the effect of these two proteins on viral infectivity, release and budding, specifically through interactions with CD4 or with other cellular partners, will give clues to possible development of stable, attenuated viruses for use as anti-HIV vaccines.



VI^e Congrès International Francophone de Gérontologie

19-22 avril 1998
Palexpo Genève

Le VI^e Congrès International Francophone de Gérontologie se tiendra à Genève, du 19 au 22 avril 1998, à Palexpo. Cette manifestation – qui a lieu tous les quatre ans – a une importance considérable compte tenu du thème *Âge, cerveau et autonomie*, qui est d'actualité et concerne une population à laquelle nous appartenons tous un jour. Elle réunira des professionnels de la santé venant des pays francophones. Elle est organisée avec le soutien de la Société Suisse de Gérontologie, des Hôpitaux Universitaires de Genève et de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Département de gériatrie
Route de Mon-Idée CH 1226 Thônex/Genève
Tél. ++41 22 305 61 11 - Fax ++41 22 305 61 15

HUG 
Hôpitaux Universitaires de Genève
Belle-Idée

ACIDES GRAS et NUTRITION



RENNES
14-15 mai 1998

**École Nationale Supérieure
Agronomique**

Session 1

Acquisitions récentes sur la biosynthèse des acides gras saturés et insaturés
H. SPRECHER (University of Columbus, USA)

Session 2

Acides gras et métabolisme des lipoprotéines
B. BIHAIN (Inserm U. 391, Rennes)

Session 3

Régulation génique par les acides gras
P. BESNARD (Ensbana, Dijon)

Session 4

Rôle physiologique des acides gras conjugués
D. KRITCHEVSKY (Wistar Institute
Philadelphie, USA)

Session 5

Importance physiologique de la position de l'acide gras sur le triglycéride
R. VERGER (Cnrs Marseille)
S. RENAUD (Inserm, Bordeaux)

Session 6

Physiologie et besoin en acides gras
G. DURAND (Inra Jouy-en-Josas)
S. RENAUD (Inserm, Bordeaux)

Pour tous renseignements

Pr Philippe LEGRAND
ENSA-Inra Laboratoire de Biochimie
65, rue de Saint-Brieuc
35042 RENNES Cedex, France
Tél. : 02 99 28 75 47
Fax : 02 99 28 75 50
email: legrand@ep.roazhon.inra.fr