

Université de Montréal

**Application des Fonctions des Protéines Vpu et Vpr du VIH-1 en
Thérapie Génique**

par

Gary Pignac-Kobinger

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophia Doctor (pH.D.)
en biologie moléculaire

Octobre 1998

© Gary Pignac-Kobinger, 1998



QH
506
U54
1999
V.003

Université de Montréal

Application des Fonctions des Protéases Vpn et Vpr du VIH-1 en
Thérapie Génique

par
Guy Pignac-Kobinger

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie Docteur (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Thèse en deux

Guy Pignac-Kobinger, 1999



Université de Montréal

Cette thèse intitulée

**"Application des Fonctions des Protéines Vpu et Vpr du VIH-1 en
Thérapie Génique"**

présentée par
Gary Pignac-Kobinger

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

_____ président-rapporteur
Dr. Rafick Sékaly

_____ directeur de recherche
Dr. Éric A. Cohen

_____ membre du jury
Dr. Bernard Massie

_____ examinateur externe
Dr. Alain Piché



*représentant du
doyen*

Thèse acceptée le 99.02.13

7

À la bine

8

SOMMAIRE

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), code pour deux protéines de régulation, Tat et Rev, et quatre protéines accessoires, Vif, Vpr, Vpu et Nef. La protéine Vpu du VIH-1 augmente le relâchement des particules virales à partir de la surface des cellules infectées. De plus, Vpu augmente la production virale d'autres rétrovirus tels que MoMuLV et VISNA. Actuellement, la majorité des transferts de gènes sont effectués à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés de MoMuLV. Un des problèmes majeur limitant l'utilisation des vecteurs rétroviraux en thérapie génique est la faible production des virus recombinants. La première partie de cette étude indique que Vpu augmente la production virale des lignées d'encapsulation rétrovirales. En effet, Vpu induit une augmentation de la production virale de 40 et 13 fois pour les lignées d'encapsulation Damp et ψ CRIP respectivement. Cette observation suggère que Vpu pourrait jouer un rôle important dans la génération de nouvelles lignées d'encapsulation en augmentant la production des vecteurs rétroviraux et donc l'efficacité du transfert de gènes.

La protéine Vpr possède plusieurs fonctions qui contribuent à la réplication du VIH-1 *in vitro* et *in vivo*. L'une des fonctions importante de Vpr pour la réplication optimale du VIH-1 est l'induction d'un arrêt en G2 du cycle cellulaire qui favorise la production des protéines virales. Cette fonction précoce nécessite la présence de Vpr dans la particule virale. En effet, Vpr est incorporé en grande quantité dans les virions probablement via une interaction directe avec le domaine p6 de Gag. Cette caractéristique de Vpr permet de cibler des séquences d'acides aminés exogène à l'intérieur du VIH-1 sous forme de protéines de fusion.

Une des application envisageable en thérapie génique serait de cibler des séquences protéiques en fusion avec Vpr capables d'interférer avec la réplication du virus. La deuxième partie de ce travail identifie les régions de Vpr comprenant les acides aminés 1 à 88 et 15 à 88 comme responsables de l'incorporation maximale de Vpr en fusion avec la chloramphénicol acétyle transférase (CAT). Les 88 premiers acides aminés de Vpr ont aussi été fusionnés aux 18 derniers acides aminés de Vpu pour générer la protéine de fusion VprIE. Lorsque produite constitutivement par des lymphocytes T CD4⁺ en culture de cellules, VprIE interfère efficacement avec la réplication du VIH-1. En effet, VprIE démontre un effet protecteur comparable à celui de la protéine anti-VIH-1 RevM10

actuellement en essais cliniques. Enfin, VprIE n'a pas permis l'apparition de souche résistante du VIH-1 capable de se répliquer en présence de la protéine de fusion. Ces résultats établissent les bases nécessaires à la génération de nouvelles protéines de fusion pouvant interférer plus efficacement avec la réplication du VIH-1. De plus, l'ensemble de ce travail indique qu'il est possible d'utiliser les fonctions des protéines Vpu et Vpr du VIH-1 pour des applications en thérapie génique.

REMERCIEMENTS

Bon, voilà la petite section qui ne concerne que moi, ceux qui me tiennent à coeur, ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse et les curieux. La première personne à qui je dois beaucoup et que je remercie avec tout mon amour est ma mère, Nicole. Non seulement, elle a participé directement à l'élaboration de cette thèse en corrigeant mon orthographe plutôt moyen mais surtout elle m'a donné son amour, son temps, son énergie et un environnement de croissance personnel tout simplement fabuleux. Il y a aussi ma soeur, Judith, avec qui les mots me manquent pour exprimer même une parcelle de la gratitude et de l'amour que j'éprouve chaque jour pour elle. Toutes deux ont été et continuent d'être pour moi la source principale de mes motivations. Je ne pourrais parler des amours de ma vie sans y inclure Chantal, que je dois remercier pour les milliards de traits d'humour et conséquemment de crampes abdominales. Évidemment et principalement, je la remercie et la remercierai toute ma vie pour nous avoir donné notre princesse Carolann à qui ce travail est dédié.

Je voudrais aussi remercier mon directeur de recherche, le Dr. Éric A. Cohen qui a rendu possible l'élaboration et la réalisation de cette thèse. Éric ne m'a pas seulement supervisé et conseillé mais surtout il a cru en mes capacités et m'a offert toutes les opportunités nécessaires à une formation académique de haut niveau. De plus, mon travail à ses côtés m'a permis de découvrir en lui un modèle et aussi un ami qui m'a dès le début frappé par la grandeur de son honnêteté.

OK "party", voilà le moment de remercier tous mes amis qui ont été essentiels au maintien de ma santé mentale et donc à la réalisation de cette thèse. Tout d'abord, ceux grâce à qui j'ai vécu des soirées dignes de Zeus et bon, enfin, quelques matins dignes du p'tit gars d'en bas. Je parle de Bourget, Clôd, Frad, Éric "qui chu" Laf., Big-Den, Jack le Danois, Turcôt, les Respect, Chant, Elsa, Miki, Julie, Nadine, Goin, Phil, Sonia, Gen et Nath. Je remercie aussi tous mes amis plus matures et tout aussi essentiels: Richard et Aline, Daniel et Yvon, Yannick, Valérie, Rock, Natacha, Malène, Gusy, Pat. et dans le labo, Nesrine, Serge, Nash, Isabelle, Johanne, Ramu, Yao, Janique, Florent, Luc, Béa, François, Martin, Sonia et un merci spécial à Katell et Karine pour leur lecture critique de ma discussion. Enfin, je remercie les bars de Montréal et Québec, légaux ou non, ainsi que leur personnels. Voilà, à tous je vous dis du fond de mon coeur: MARCI.

Avant-propos

Cette thèse a été écrite en accord avec la Procédure d'acceptation et guide de présentation des mémoires et des thèses de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal. La structure et le contenu de cette thèse par articles sont présentés conformément aux conditions de fond et de forme exigées par le département de biologie moléculaire et incluent une reproduction des articles publiés et de l'article soumis pour publication. Cette thèse comprend les chapitres ou sections suivantes: (1) un sommaire, (2) une table des matières, (3) une introduction qui établit clairement les hypothèses et objectifs de cette étude, (4) une revue générale de la littérature reliée à cette étude et (5) une discussion incluant les conclusions et perspectives issues de ce travail.

Deux articles publiés et un article soumis pour publication constituent trois chapitres différents de cette thèse. Les trois articles inclus dans cette thèse sont:

1. **Kobinger, P. G.**, A.J. Mouland, J-P. Lalonde, J. Forget and E. A. Cohen. 1997. Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 *vpu* gene. *Gene therapy*. 4:868-874.
2. Yao, X-J., **G. P. Kobinger**, S. Dandache, N. Rougeau and E.A. Cohen. 1998. HIV-1 VprCAT fusion proteins: sequence requirement for virion incorporation and analysis of antiviral effect. Soumis à *Gene Therapy*.
3. **Kobinger, P. G.**, A. Borsetti, Z. Nie, J. Mercier, N. Daniel, H. G. Göttlinger and E. A. Cohen. 1998. Virion-targeted viral inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins. *Journal of Virology*. 72:5441-5448.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Page titre	i
Identification du jury	ii
Dédicace	iii
Sommaire	iv
Remerciements	vi
Avant-propos	vii
Table des matières	viii
Liste des figures et tableaux	xi
Liste des abréviations	xiii
CHAPITRE 1	
REVUE DE LA LITTÉRATURE	
	1
1. Découverte et origine du VIH	
	2
2. Physiopathologie du SIDA	
	3
3. Structure virale et organisation génomique du VIH	
	5
3.1. Structure du virion.....	5
3.2. Organisation génomique	7
4. Cycle de réplication du VIH	
	8
4.1. Phases pré-intégration.....	9
4.1.1. Intéraction virus-cellule	9
4.1.2. Entrée et décapsidation.....	11
4.1.3. Rétrotranscription.....	11
4.1.4. Transport et intégration.....	14
4.2. Phases post-intégration	16
4.2.1. Expression de l'ARN et des protéines virales.....	16
4.2.2. Régulation de la transcription par les protéines cellulaires	17
4.2.1. Assemblage et bourgeonnement des particules virales	18

5. Gènes auxiliaires du VIH.....	21
5.1. Les gènes de régulation <i>tat</i> et <i>rev</i>	22
5.2. Les gènes accessoires	23
5.2.1. Nef	23
5.2.2. Vif	24
5.2.3. Vpu.....	25
5.2.4. Vpr	28
6. Propriétés cytopathiques du VIH	31
6.1. Déplétion de la population des cellules T CD4 ⁺	31
6.2. Mécanismes d'induction de la mort cellulaire	32
6.2.1. Formation de syncytium.....	32
6.2.2. Toxicité du virus et des protéines virales	33
6.2.3. Effets cytopathiques indirects	35
7. Traitement du SIDA.....	37
7.1. Thérapies antivirales.....	37
7.2. Restauration des défenses immunitaires.....	39
7.3. Développement de vaccins.....	41
8. La thérapie génique	42
8.1. Modes de transduction de gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules cibles	43
8.2. Les vecteurs rétroviraux	44
8.3. Stratégies de thérapie génique contre l'infection au VIH.....	46
9. Problématique.....	48

CHAPITRE 2

Kobinger, P. G., A.J. Mouland, J-P. Lalonde, J. Forget and E. A. Cohen. 1997.

Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 VPU gene. *Gene Therapy*. 4:868-874..... 56

CHAPITRE 3

Yao, X-J., P. G. Kobinger, S. Dandache, N. Rougeau and E.A. Cohen. 1998.

HIV-1 VprCAT fusion proteins: sequence requirement for virion incorporation and analysis of antiviral effect. Soumis à Gene Therapy.....	64
Summary	66
Introduction	67
Results	69
Discussion.....	75
Materials and Methods	78
Acknowledgments.....	81
Literature cited	82

CHAPITRE 4

Kobinger, P. G., A. Borsetti, Z. Nie, J. Mercier, N. Daniel, H. G. Göttlinger
and E. A. Cohen. 1998. Virion-targeted viral inactivation of the human
immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins.

Journal of Virology. 72:5441-5448	104
---	-----

CHAPITRE 5

1. Discussion, conclusions et perspectives	113
2. Bibliographie.....	125

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Page

Chapitre 1

Figure 1. Représentation schématique de la progression de l'infection par le VIH-1 ..	50
Figure 2. Modèles de l'organisation structurale et génomique du VIH-1.....	51
Figure 3. Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1	52
Figure 4. Mécanisme moléculaire de la transcription inverse des génomes rétroviraux	53
Figure 5. Représentation schématique du développement des molécules anti-VIH dans le temps.....	54
Figure 6. Modèle de la production de vecteurs recombinants à partir d'une lignée d'encapsidation rétrovirale.....	55

Chapitre 2

Figure 1. Tetracycline-inducible <i>vpu</i> expression system	48
Figure 2. Characterization of <i>vpu</i> expression in the Damp-Vpu cell line	50
Figure 3. Evaluation of viral release and <i>vpu</i> RNA expression.....	52
Figure 4. Effect of HIV-1 Vpu on retroviral titers.....	53
Table 1. Evaluation of virus production.....	51

Chapitre 3

Figure 1. Generation of different Vpr-CAT fusion proteins and analysis of their ability to incorporate into HIV particles	58
Figure 2. The effect of Vpr position in the fusion protein on virion incorporation	59
Figure 3. Requirement of the Gag p6 domain for virion incorporation	60
Figure 4. Specific processing of Vpr-CAT-pcs fusion proteins	61
Figure 5. Effect of Vpr-CAT fusion proteins on viral infectivity	61
Figure 6. Vpr-CAT-pcs fusion proteins inhibits HIV-1 Gag processing	61

Chapitre 4

Figure 1. Expression and incorporation of Vpr fusion proteins into HIV-1.....	67
Figure 2. Characterization of Jurkat cells expressing Vpr fusion proteins.....	68
Figure 3. HIV replication in transduced Jurkat cells	68
Figure 4. Replication of p6 ^{gag} HIV mutants in Jurkat-VprIE cells	69
Figure 5. Evaluation of viral infectivity.....	69

Liste des abréviations

aa	: acide aminé
ADN	: acide déoxyribonucléique
ADNc	: acide déoxyribonucléique complémentaire
Amp ^R	: gène de résistance à l'ampiciline
AP-1	: "activator protein-1"
ARN	: acide ribonucléique
ARN ^{lys3}	: acide ribonucléique de transfert de la lysine
α	: alpha
BSA	: "bovine serum albumin" ou albumine du sérum bovin
β	: beta
β-gal	: beta-galactosidase
°C	: degré celcius
¹⁴ C	: isotope 14 du carbone
CA	: protéine de la capside
CAT	: chloramphénicol acétyle transférase
Ci	: curie
CO ₂	: gaz carbonique
cpm	: coup par minute
dATP	: déoxyadénosine triphosphate
dCTP	: déoxycytidine triphosphate
DEPC	: "diethyl pyrocarbonate"
dGTP	: déoxyguanosine triphosphate
DMEM	: "Dulbecco's modified eagle medium"
DMSO	: sulfoxyde de diméthyle
dNTP	: déoxynucléoside triphosphate
DOC	: sel de l'acide déoxycholique
DTT	: dithiotréitol
dTTP	: déoxythymidine triphosphate
Δ	: delta
EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	: "ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether N,N,N',N',-teraacetic acid)"
Env	: enveloppe

FACS	: "fluorescence-activated cell sorter" (marque déposée de Becton Dickinson)
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine
GAPDH	: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
gp	: glycoprotéine
γ	: gamma
h.	: heure
hyg ^R	: gène de résistance à l'hygromycine
Ig	: immunoglobuline
I-kB	: inhibiteur de NF-kappaB
IN	: intégrase
kDa	: kiloDalton
KCl	: chlorure de potassium
κ	: kappa
LR	: "leucine/isoleucine rich region" ou région riche en leucines et isoleucines
LTR	: "long terminal repeat" ou longue terminaison répétées
M	: molaire
MA	: protéine de la matrice
MAGI	: "multinuclear activation of galactosidase indicator cells"
μg	: microgramme
MgCl_2	: chlorure de magnésium
MgSO_4	: sulfate de magnésium
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mmol	: millimole
M.O.I.	: "multiplicity of infection" ou multiplicité d'infection
MoMuLV	: virus Moloney de la leucémie murine
MOPS	: "3-(N-morpholino) propanesulfonic acid"
μ	: micro
μCi	: microcurie
μg	: microgramme
μl	: microlitre
μM	: micromolaire
NaCl	: chlorure de sodium

NaH ₂ PO ₄ :	phosphate de sodium monobasique
Na ₂ HPO ₄ :	phosphate de sodium dibasique
NaOAc	: acétate d'ammonium
Nef	: "negative regulatory factor"
neo ^R	: gène de résistance à la néomycine
ng	: nanogramme
nm	: nanomètre
nM	: nanomolaire
NC	: protéine de la nucléocapside
NF-1	: "nuclear factor-1"
NFAT-1	: "nuclear factor of activated T cells-1"
NF-kB	: "nuclear factor-kappa B"
NRE	: "negative regulatory elements" ou région de régulation négative
NSI	: "non-syncytium inducing" ou non-inductrice de syncytium
nt	: nucleotides
O.M.S.	: Organisation mondiale de la santé
³² P	: isotope 32 du phosphate
PAGE	: "polyacrylamide gel electrophoresis"
PBMC	: "peripheral blood mononuclear cells" ou cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	: "phosphate-buffered saline"
PCR	: "polymerase chain reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne
pH	: constante d'acidité
pmol	: picomole
P.P.T.	: "polypurine track" ou région riche en purines
Pol	: polymérase
poly(rA)-	
oligo(dT)	: "polyadenylic acid pentadecathymidylic acid"
Pr	: précurseur
PR	: protéase
%	: pourcent
Rev	: "regulator of expression of virion proteins"
RNase	: ribonucléase

rpm	: rotation par minute
RRE	: "Rev response element"
RSV	: "rous sarcoma virus" ou virus du sarcome de Rous
RT-PCR	: "reverse transcriptase polymerase chain reaction"
³⁵ S	: isotope 35 du soufre
SDS	: sulfate dodécyle de sodium
SI	: "syncitium inducing" ou inductrice de syncitium
SIDA	: syndrome d'immunodéficience acquise
SP1	: "stimulatory protein 1"
SU	: protéine de surface
TAR	: "trans-activation response element"
Tat	: "transactivator of transcription"
TBP	: "TATA binding protein"
Tc	: tétracycline
TCA	: acide trichloro acétique
TE	: tris-EDTA
tet ^R	: gène de résistance à la tétracycline
TM	: protéine transmembranaire
UV	: ultraviolet
VIB	: virus d'immunodéficience bovine
Vif	: "viral infectivity factor"
VIF	: virus d'immunodéficience féline
VIH	: virus d'immunodéficience humaine
VIS	: virus d'immunodéficience simienne
VLM	: virus de la leucémie murine
Vpr	: "viral protein r"
Vpu	: "viral protein u"
Vpx	: "viral protein x"
VSV	: virus de la stomatite vésiculaire

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Découverte et origine du VIH

Le premier indice suggérant qu'un rétrovirus pouvait être l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est apparu en 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Ce rétrovirus, alors appelé LAV pour "lymphadenopathy-associated virus", a aussi connu d'autres appellations comme HTLV-III et ARV lors de son isolation par deux autres groupes de recherche (Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984). L'isolation du virus responsable du SIDA faite par plusieurs équipes dans un laps de temps relativement court a permis de reconnaître ces trois prototypes viraux (LAV, HTLV-III et ARV) comme membres du même groupe de rétrovirus de la famille des *Lentivirinae*. En 1986, le Comité International de Taxonomie des virus a recommandé que le virus du SIDA porte l'appellation de virus de l'immunodéficience humaine ou VIH (Coffin *et al.*, 1986).

Le VIH a initialement été isolé à partir de ganglions lymphatiques de patients démontrant une immunodéficience sévère. Par la suite, plusieurs souches du VIH ont pu être isolées à partir du sang de patients montrant des signes d'immunodéficience et/ou de syndromes neurologiques associés au SIDA. De même, plusieurs souches du VIH ont pu être isolées à partir de PBMC issus de patients cliniquement sains ou asymptomatiques (Levy, 1988). Par conséquent, la transmission élargie du VIH a pu être constatée en association étroite avec les symptômes caractéristiques du SIDA supportant fortement son rôle comme agent étiologique de la maladie. Peu de temps après l'isolation du VIH (ou VIH-1), un autre sous-type, le VIH-2, a été identifié en Afrique de l'ouest (Clavel, 1986). Les deux sous-types du VIH mènent ultimement au SIDA bien que la pathogénèse associée au VIH-2 semble moins agressive. D'autres lentivirus apparentés ont subséquemment été découverts, notamment, chez le chat (virus de l'immunodéficience féline (VIF)), chez les bovins (virus de l'immunodéficience bovine (VIB)) et chez le singe (virus de l'immunodéficience simienne (VIS)).

L'origine exact du VIH demeure toujours inconnue. La première évidence documentée d'un être humain infecté par le VIH provient d'un sérum Africain prélevé en 1959 (Nahmias *et al.*, 1986). Ensuite, ce n'est qu'au milieu des années 1970 que d'autres sérums positifs pour le VIH ont été détectés. La phase épidémique du SIDA n'est devenue apparente qu'en 1981. Depuis, sa large distribution indique une progression rapide de l'épidémie considérant l'existence de plusieurs clades évoluant actuellement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), en juillet 1997, environ trente millions de personnes à travers le monde étaient infectées par l'un des deux sous-types du VIH. L'O.M.S. prévoit qu'en l'an 2000, quarante millions d'individus auront été infectés par le

VIH, dont 95%, dans les pays en voie de développement.

2. Physiopathologie du SIDA

Chez l'humain, la cinétique d'infection du VIH-1 peut-être divisée en trois phases: la primo-infection, la phase de latence clinique et la phase SIDA qui précède la mort (Figure 1). La primo-infection est cliniquement associée aux symptômes d'une mononucléose aiguë qui apparaissent approximativement 3 à 6 semaines après l'infection. La sévérité et la persistance des symptômes varient considérablement d'un individu à l'autre. Une baisse significative du nombre de lymphocytes T CD4⁺ du sang circulant apparaît dans les 2 à 8 semaines suivant l'infection (Gaines *et al.*, 1990). Ces niveaux peuvent remonter relativement haut lors de l'entrée en phase de latence clinique mais ils atteignent rarement sinon jamais les niveaux précédents l'infection. Le syndrome aigu associé à la primo-infection est accompagné d'une réplication virale intensive qui peut être détectée dans le sang, en moyenne, à partir de la troisième semaine post-infection (Figure 1) (Daar *et al.*, 1991). Durant cette période, les protéines virales ainsi que les particules virales infectieuses peuvent être détectées dans le plasma sanguin et dans les liquides cérébrospinaux. Dans le plasma sanguin, le nombre de virus peut atteindre 10⁶ à 10⁷ particules par millilitre (ml). Cependant, comme pour la majorité des rétrovirus, les particules infectieuses se rencontrent à une fréquence de 1 sur 3 000 à 1 sur 100 000 (Kimpton and Emerman, 1992; Layne *et al.*, 1992; Piatak *et al.*, 1993). Une réponse immunitaire dirigée contre le VIH peut être détectée approximativement 3 à 6 semaines après l'infection. Cette réponse immunitaire est principalement cellulaire et correspond à un déclin rapide de la virémie plasmatique et de la charge virale associée aux PBMC ("Peripheral Blood Monocytic Cells"). La baisse marquée des antigènes viraux est associée à une résolution des symptômes cliniques et à une stabilisation temporaire du nombre de cellules T CD4⁺.

Suite à l'induction de la réponse immunitaire, les antigènes viraux restent indétectables pour une période de temps variant de 8 à 12 ans (Lemp *et al.*, 1992). Cette période est caractérisée par l'absence de symptôme clinique pour la majorité des individus et, pour cette raison, est nommée période de latence clinique. Tout au long de cette période, un déclin progressif des lymphocytes T CD4⁺ est observé sauf pour les individus qualifiés de non-progresseurs à long terme. Bien que la phase asymptomatique soit appelée phase de latence clinique, plusieurs évidences démontrent qu'il y a une rapide et continue réplication virale tout au long de cette période. En effet, les ARNs viraux peuvent être

détectés par hybridation *in situ* à partir de ganglions lymphatiques et par PCR (Polymerase Chain Reaction) à partir de plasma sanguin à tous les stades de la maladie (primo-infection, asymptomatique et SIDA) (Pantaleo *et al.*, 1993; Piatak *et al.*, 1993). Ces données démontrent que la latence clinique n'implique pas nécessairement une latence au niveau de la réplication virale. Il semble plutôt que le virus se réplique continuellement durant la phase asymptomatique et que cette réplication virale est, pour un temps, contrôlée par le système immunitaire. L'étude du temps d'apparition de virus mutants, suite à l'utilisation d'inhibiteurs de la reverse transcriptase et de la protéase virale, a fourni des données essentielles concernant la dynamique de réplication du VIH *in vivo*. En effet, ces études associées à des modèles mathématiques ont permis d'établir à 6 heures la demi-vie du virus dans le sang et à environ 1.5 jours la demi-vie des cellules infectées (Ho, 1995; Perelson *et al.*, 1996). De plus, puisque le niveau de virus plasmatiques ainsi que le nombre de cellules infectées demeurent relativement constants durant la phase asymptomatique, il s'ensuit qu'un important nombre de virus et de cellules infectées sont produits et détruits chaque jour.

La phase de latence clinique permet aussi la dissémination généralisée du virus à travers l'hôte. En effet, un grand nombre de macrophages de monocytes et de cellules nerveuses seront infectées par le VIH durant cette période. Les macrophages sont particulièrement impliqués dans ce processus puisqu'ils favorise la transmission du virus au niveau du cerveau et des poumons. Aussi, les monocytes/macrophages représentent la plus forte population de cellules infectées dans les ganglions lymphatiques, le système nerveux central et les poumons. Le VIH n'est pas cytopatique et se réplique faiblement à l'intérieur de la population des macrophages par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ (Meltzer and Gendelman, 1992). Par conséquent, les macrophages ont une demi-vie plus longue (14 jours au lieu de 1.5 jours pour la majorité des lymphocytes T CD4⁺) et ils servent de cellules réservoirs ou de sanctuaires à la réplication du VIH (Cavert and Haase, 1998; Ho, 1998). Certains lymphocytes T CD4⁺ infectés par des particules virales défectives ou contenant un ADN viral latent intégré ou non-intégré dans leur génome constituent aussi des cellules réservoirs pour le VIH (Ho, 1998).

Pour la grande majorité des individus infectés, la phase asymptomatique mène à une chute prononcée du nombre de lymphocytes T CD4⁺ caractéristique de la phase SIDA. Des résultats récents démontrent que la vitesse de progression de la maladie est directement liée à l'importance de la charge virale et à la vitesse de réplication du virus (Mellors *et al.*, 1996). Les individus démontrant une charge virale relativement basse

progressent plus lentement au stade SIDA et sont moins sujets aux infections opportunistes associées à la maladie que les individus démontrant une charge virale élevée. Bien que les mécanismes indirectement associés à la charge virale soient importants, le niveau de virus se répliquant activement ainsi que le nombre de cellules infectées demeurent des variables critiques qui dirigent l'apparition de l'immunodéficience et la progression de la maladie. Après plusieurs mois ou plusieurs années d'une baisse continue bien que variable du nombre de lymphocytes T CD4⁺, le niveau de ces cellules passe du nombre normal de 600 à 1200 cellules par microlitre (µl) à moins de 500 cellules/µl. Les symptômes cliniques associés au SIDA peuvent être observés suite à ce passage à moins de 500 lymphocytes T CD4⁺/µl. Par contre, la troisième phase de la maladie, appelée SIDA, est définie par un nombre de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200 cellules/µl. Dans cette phase, l'individu infecté devient susceptible à toutes les infections opportunistes et néoplasmes associées au SIDA. Le virus circulant devient de nouveau apparent et l'augmentation de ces titres corrèle avec le stade avancé de la maladie (Figure 1) (Ho *et al.*, 1989). La progression de la maladie à partir de la phase aiguë de la primo-infection jusqu'aux complications associées à la phase SIDA est intimement reliée à la chute progressive du nombre de lymphocytes T CD4⁺. La corrélation entre la sévérité des symptômes et le nombre total de cellules T CD4⁺ est bien établie et représente toujours le critère par excellence de pronostic. Le mécanisme par lequel une répllication efficace du virus se produit en présence d'une forte réponse immunitaire constitue probablement la plus importante question encore non-résolue concernant la pathogénèse du VIH et des autres lentivirus.

3. Structure virale et organisation génomique du VIH

3.1. Structure du virion

Le VIH est un lentivirus cytopathique non-transformant. Observé par microscopie électronique ce virus mesure en moyenne 100 nm de diamètre avec, au centre, un core en forme de cône composé de la protéine Gag p24 (p25 pour HIV-2) (Figure 2). À l'intérieur de cette capsidite ou nucléoïde se trouve deux copies identiques de l'ARN génomiques virales de polarité positive. Les deux ARNs viraux sont étroitement associés à l'ARN polymérase ARN dépendante virale aussi appelée transcriptase inverse (RT) et aux protéines de la nucléocapsidite Gag NCp7 et NCp6. Les deux autres protéines enzymatiques virales, la protéase (PR) et l'intégrase H (IN), se retrouvent également à l'intérieur des virions. La partie interne de la membrane virale est tapissée par la protéine myristyllée Gag p17 qui forme la matrice (MA) virale (Figure 2) (Gelderblom *et al.*, 1987;

Gelderblom *et al.*, 1989). La protéine Gag p17 semble requise pour l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (Env) à la surface des virions (Bonyhadi *et al.*, 1993). De plus, une petite quantité de protéines p17, phosphorylées sur un résidu tyrosine, est retrouvée à l'intérieur du core et fait partie intégrante du complexe de préintégration (Gallay *et al.*, 1995).

Les protéines accessoires Vif et Nef sont aussi étroitement associées au core du virus (Camaur and Trono, 1996; Liu *et al.*, 1995; Welker *et al.*, 1996). De même, les protéines Vpr et Vpx pour le VIH-2 et le VIS sont présentes à l'intérieur des virions tout probablement entre le core et la matrice (Lu *et al.*, 1993a; Yu *et al.*, 1993c). Vif et Nef semblent être encapsidées en quantité équimolaire à Pol (7 à 20 molécules par virion) (Camaur and Trono, 1996; Welker *et al.*, 1996) alors que Vpr est incorporé à l'intérieur des particules virales en quantité presque équivalente à Gag (Lu *et al.*, 1993a; Yu *et al.*, 1993c). Des données récentes suggèrent que la protéine de régulation Tat est aussi encapsidée à l'intérieur des virions (Levy, 1998b). La présence de toutes ces protéines virales à l'intérieur des virions suggère qu'elles jouent un rôle précoce dans la réplication du VIH. Cependant, jusqu'à présent seules les protéines Vpr et Vpx ont démontré une importance fonctionnelle dans les stades précoces de l'infection. Plusieurs protéines du cytosquelette cellulaire tel l'actine, l'ezrine, la moesine et la cofline ont aussi été détectées à l'intérieur des virions (Ott *et al.*, 1996). Cependant, leur rôle dans l'infection du VIH est toujours inconnu.

L'enveloppe virale qui englobe le core est issue de la membrane cellulaire lors du bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées. Chaque membrane virale contient environ 72 trimères des glycoprotéines d'enveloppes (Earl *et al.*, 1990; Pinter *et al.*, 1989). En effet, les images obtenues par microscopie électronique et la récente cristallisation de l'ectodomaine de la gp41 suggèrent que les glycoprotéines d'enveloppes sont organisées en trimères (Chan *et al.*, 1997b; Weissenhorn *et al.*, 1997). Les protéines d'enveloppes sont issues d'un précurseur de 160 kDa, la gp160, lequel est clivé en gp120 exclusivement exposée à la surface externe du virus (SU) et en gp41 qui constitue la partie transmembranaire (TM) de l'enveloppe virale. La région centrale de la gp41 lie la gp120 de façon non-covalente, principalement par l'association de deux régions hydrophobiques à l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) et amino-terminale (N-terminale) de la gp120 (Helseth *et al.*, 1990). L'extrémité N-terminal et une partie de la région centrale de la gp41 sont exposées à l'extérieur du virus. En général, le virus contient 100 fois plus de protéines Gag p24 que de gp120 (Layne *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1990) et 10 fois plus

de p24 que de molécules de RT (Layne *et al.*, 1992). La gp120 contient les sites de liaisons au récepteur et aux co-récepteurs cellulaires ainsi que les domaines neutralisant majeurs. Cependant, la portion externe de la gp41 et une partie de la protéine p17 possèdent aussi des domaines sensibles aux anticorps neutralisants (Sarin *et al.*, 1986). L'anticorps neutralisant dirigé contre la p17 pourrait indiquer que certaines sections de la matrice virale sont en contact avec l'extérieur des virions ou des cellules infectées (Shang *et al.*, 1991).

Plusieurs protéines cellulaires membranaires telles que la β 2-microglobuline, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), les antigènes de fonctions des leukocytes (LFA-1) et la molécule d'adhésion ICAM-1 sont retrouvées à la surface du VIH (Henderson *et al.*, 1983; Meerloo *et al.*, 1992). La présence de molécules d'adhésion et celle d'autres protéines cellulaires à la surface virale suggère que le VIH peut utiliser ces molécules comme ligands pour l'adsorption et l'infection de cellules CD4 négatives. Des études récentes ont aussi démontré que la cyclophiline A, qui appartient à la famille des protéines liant l'immunosuppresseur cyclosporine A, interagit spécifiquement avec la protéine Gag pour être incorporée à l'intérieur du VIH-1. Cette interaction entre la cyclophiline A et la protéine Gag de certaines souches du VIH-1 est nécessaire à la formation de virus infectieux (Franke *et al.*, 1994; Luban *et al.*, 1993; Thali *et al.*, 1994). Enfin, comme d'autres rétrovirus, le VIH incorpore des domaines lipidiques spécifiques de la membrane cellulaire lors du bourgeonnement tel que reflété par le ratio molaire plus faible de cholestérol: phospholipides (Aloia *et al.*, 1993).

3.2. Organisation génomique

Le VIH-1 est caractérisé par une organisation génomique très complexe. En effet, le génome de 9.8 kb de ce rétrovirus code pour les protéines Gag, Pol et Env commun à tous les rétrovirus mais aussi pour six autres différentes protéines (Figure 2). Le transcrit primaire est un ARNm pleine longueur caractérisé par la présence de nombreuses structures secondaires. Certaines de ces structures secondaires, telles que la séquence de transactivation TAR (*trans*-Activation Responsive Region) situé en 5' de tous les ARNm viraux, la séquence d'encapsidation Psi (ψ) chevauchant le cadre de lecture de Gag et la séquence de régulation RRE (Rev Response Element) retrouvé dans le cadre de lecture de l'enveloppe, sont toutes des structures secondaires essentielles à la réplication du VIH. Comme tous les rétrovirus, l'ARN génomique du VIH comprend une partie des LTR dont la séquence répétée R, retrouvée aux deux extrémités (Figure 4).

La traduction de l'ARN virale pleine longueur génère la polyprotéine précurseur Gag de 55 kDa (p55) et la polyprotéine précurseur Gag-Pol de 160 kDa (p160). Les produits Gag et Gag-Pol sont synthétisés dans un ratio d'environ 20:1 suite à un changement de cadre de lecture -1 au début du domaine p6 de Gag (Oroszlan and Luftig, 1990). Le clivage protéolytique du précurseur Gag p55 donne les protéines de structures p24, p17, p7 et p6. De plus, la partie Pol du précurseur Gag-Pol est clivé pour donner les protéines enzymatiques: transcriptase inverse (RT), protéase (Pr) et intégrase (IN) (Figure 2). L'épissage de l'ARNm pleine longueur produit plusieurs ARNm sub-génomiques importants pour la synthèse des autres protéines virales. Les quantités relatives d'ARNm pleines longueurs versus les ARNm mono-épissés et multi-épissés sont déterminées par le produit du gène *rev* lui-même issu d'un ARNm multi-épissé (Feinberg *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986a). En effet, les ARNm sub-génomiques multi-épissés sont produits en absence de Rev et traduits pour produire les deux protéines de régulation Tat et Rev et la protéine accessoire Nef. Le précurseur gp160 qui donne les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 provient d'un ARNm mono-épissé dépendant de la présence de Rev tout comme les protéines Vif, Vpr/Vpx et Vpu.

Toutes ces protéines de régulation et accessoires influencent la réplication du VIH dans plusieurs types cellulaires. En effet, les caractéristiques moléculaires de ces protéines de régulation et de ces protéines accessoires orchestrent et régulent la réplication du VIH pour obtenir une forte ou une faible production virale ou même l'établissement d'une phase de latence virale (Peterlin, 1995). Par exemple, la production de Rev dans les phases tardives du cycle de réplication, peut causer une diminution de son propre niveau d'expression et du niveau d'expression de Tat et Nef, ayant comme conséquence de limiter le taux de réplication virale.

4. Cycle de réplication du VIH

L'infection des cellules cibles du VIH est initiée par l'interaction de la gp120 avec le récepteur cellulaire CD4 ("cluster determinant 4") et le co-récepteur approprié. Le récepteur CD4 est principalement exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; Maddon *et al.*, 1986). Le tropisme préférentiel du VIH pour les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages associés à son effet cytopathique résulte en l'apparition progressive de l'immunosuppression (Fauci, 1988). Le VIH est aussi capable d'infecter les cellules quiescentes, caractéristique unique

aux *Lentiviridea* (Lewis *et al.*, 1992). L'infection des cellules quiescentes est un point crucial de la pathogénèse induite par le VIH puisqu'elle permet la réplication du virus dans les macrophages retrouvés dans plusieurs tissus et organes incluant le système nerveux (Fauci, 1988; Poli *et al.*, 1993). Cette capacité reflète l'existence de déterminants capables de gouverner le transport actif du complexe de préintégration du cytoplasme au noyau (Bukrinsky *et al.*, 1992). De plus une caractéristique unique de l'infection au VIH est l'expression de nombreuses protéines associées à la régulation complexe du cycle viral. Le cycle viral du VIH peut être divisé en deux phases: 1) l'établissement de l'infection et 2) l'infection productive (Figure 3). L'établissement de l'infection comprend les phases pré-intégration d'adsorption, d'entrée et décapsidation, de rétrotranscription et d'intégration. L'infection productive est constituée des phases post-intégration qui débutent par l'expression de l'ARNm virale et subséquemment des protéines virales, de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales.

4.1. Phases pré-intégration

4.1.1. Interaction virus-cellule

Les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ sont les cibles préférentiels du VIH *in vivo* puisque le récepteur membranaire CD4 est présent à la surface de ces cellules (Dagleish *et al.*, 1984; Maddon *et al.*, 1986). L'attachement du virus à la surface des cellules CD4⁺ requière une interaction spécifique entre la glycoprotéine gp120 du virus et le récepteur CD4. La portion C4 de la gp120, près de l'extrémité carboxy-terminale, constitue la région majeure responsable de l'attachement du VIH à CD4. Pour ce qui est du récepteur cellulaire, le domaine D1 de la molécule CD4 est responsable de l'attachement du virus (Capon and Ward, 1991). Par ailleurs, l'interaction entre CD4 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) semble faire intervenir les mêmes régions du domaine D1 (Moebius *et al.*, 1992). Ce chevauchement, entre le CMH II et la gp120 a pour conséquence de compliquer l'utilisation de molécules capables d'inhiber l'interaction gp120:CD4. En effet, ces molécules inhibitrices pourraient aussi bloquer l'interaction CD4:CMH II, essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire. Bien que CD4 soit encore considéré comme le récepteur cellulaire majeur pour l'attachement du VIH aux cellules cibles, la présence d'autres récepteurs cellulaires est essentielle à l'entrée du virus. Par exemple, certaines lignées monocytaires exprimant de hauts niveaux de CD4 ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH (Chesebro *et al.*, 1990). De plus, plusieurs lignées cellulaires humaines n'exprimant pas CD4 sont susceptibles à l'infection par le VIH (Tateno *et al.*, 1989). Enfin, l'expression du

récepteur CD4 dans des cellules murines ne permet pas de conférer une susceptibilité à l'infection au VIH (Maddon *et al.*, 1986). Ces observations ont poussé plusieurs groupes de recherche à identifier d'autres récepteurs ou co-récepteurs cellulaires.

Le premier co-récepteur découvert fut CXCR-4 (Berger, 1997). La découverte de ce co-récepteur, et celle d'autres co-récepteurs, à notamment permis d'expliquer pourquoi certaines souches du VIH étaient capables d'infecter uniquement des lymphocytes T alors que d'autres souches infectaient seulement des macrophages. L'expression de CXCR-4 à la surface des cellules T CD4⁺ est essentielle pour l'infection des souches lymphocytes T-tropiques (T-tropique) du VIH-1 et est utilisé comme récepteur majeur de plusieurs souches du VIH-2 (Zhang *et al.*, 1996). Parmi les autres co-récepteurs, CXCR-5 constitue le co-récepteur majeur utilisé par les souches macrophages-tropiques (M-tropique) du VIH alors que CCR-2b est le co-récepteur utilisé par la plupart des souches dual-tropiques (capable d'infecter les lymphocytes T aussi bien que les macrophages) (Simmons *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). D'autres co-récepteurs sont utilisés spécifiquement par certaines souches M-tropiques du VIH tels que CCR-3, Bonzo et BOB (Deng *et al.*, 1997). Ces co-récepteurs sont tous des récepteurs de chimiokines (tel RANTES, MIP-1a et MIP-1B) et font partie de la super famille des molécules couplées à des protéines G (Gosling *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que les récepteurs cellulaires utilisés par les rétrovirus murins font aussi partie de cette super famille de molécules couplées à des protéines G (Miller, 1996). Cette donnée associée à la présence élargie des récepteurs de chimiokines aux cellules humaines suggèrent que la molécule CD4 constitue en fait le co-récepteur alors que les récepteurs de chimiokines sont les récepteurs cellulaires majeurs employés par le VIH. Cependant, l'entrée virale à l'intérieur des cellules CD4 négatives susceptibles à l'infection par le VIH est très inefficace et nécessite parfois une co-culture avec des PBMC infectés (Tateno *et al.*, 1989). La molécule CD4 faciliterait l'entrée virale en permettant une fusion plus efficace de la membrane virale avec la membrane cellulaire (Bachelder *et al.*, 1995).

D'autres molécules sont aussi capables de médier l'attachement du VIH aux cellules cibles. Le galactosyl céramide (GalC) permet au VIH d'infecter certaines cellules CD4 négatives du système nerveux ainsi que certaines cellules épithéliales du tractus vaginal (Yahi *et al.*, 1992). Le récepteur du complément et le récepteur Fc peuvent attacher le VIH lié au complément ou à des anticorps et lui permettre ainsi d'infecter des macrophages par opsonisation (Weiss, 1993). Enfin, plusieurs protéines cellulaires telles que le MHC II, LFA-1, ICAM-1, CD44 et la protéine de liaison au mannose sont retrouvées à la surface

du VIH et peuvent participer à accroître et à faciliter l'interaction virus:cellule (Arthur *et al.*, 1992; Hildreth and Orentas, 1989; Rizzuto and Sodroski, 1997).

4.1.2. Entrée et décapsidation

L'attachement du virus à une cellule cible via l'interaction CD4:co-récepteur:gp120 n'est pas synonyme d'entrée. L'attachement ou adsorption ne nécessite pas d'apport énergétique comme l'ATP et peut se produire à 4°C. Lors de la liaison du VIH à la cellule cible, la molécule CD4 déplace la gp120 qui ensuite est clivée par une enzyme cellulaire pour induire une altération supplémentaire à la glycoprotéine virale (Werner and Levy, 1993). Cette dernière altération libère de nouveaux sites de liaisons et permet l'association de la gp120 tronquée avec le co-récepteur approprié. Cependant, l'importance du clivage de l'enveloppe virale n'est pas claire puisque les glycoprotéines d'enveloppes de la plupart des souches M-tropiques du VIH ne sont pas clivées (Werner and Levy, 1993). La liaison de la gp120 au co-récepteur induit un changement conformationnel additionnel provoquant l'exposition de la région fusionogène retrouvée à l'intérieur de la gp41. La séquence fusionogène de la gp41, similaire à la séquence fusionogène des paramyxovirus (White, 1990), induit la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire. L'entrée du VIH à l'intérieur des cellules cibles est indépendante du pH (McClure *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1987). Cette observation suggère que le virus peut fusionner directement avec la cellule sans passer par une vésicule d'endocytose. Bien que l'entrée du virus se produise aussi par endocytose, une fraction de ces virus semblent incapables de compléter le cycle de réplication (Marechal *et al.*, 1998). Par contre, la phagocytose du virus peut mener à une infection productive (Goto *et al.*, 1988; Pauza and Price, 1988). Suite à la fusion virus:cellule, le nucléoïde ou la nucléocapside virale est décapsidé et pénètre à l'intérieur de la cellule. Par conséquent, l'adsorption, la fusion et la pénétration de la nucléocapside à l'intérieur des cellules cibles constituent l'étape d'entrée du VIH. Les rétrovirus tel MoMuLV et le VIH démontrent un taux de pénétration intracellulaire maximal entre une et deux heures après l'adsorption du virus sur la cellule (Morgan *et al.*, 1995). Toutes ces données indiquent la complexité et la promiscuité de l'interaction virus:cellule et donc que plusieurs approches thérapeutiques différentes seraient nécessaires pour bloquer l'infection du VIH au niveau de l'entrée.

4.1.3. Rétrotranscription

Après l'internalisation, le core viral est rapidement relâché à l'intérieur du cytoplasme

où l'ARN viral débute sa conversion en ADN complémentaire. Encore plusieurs points restent obscurs concernant le mécanisme par lequel l'ARN viral est libéré des nucléoprotéines et autres protéines virales. Toutefois, il semble que la plupart de ces protéines restent en étroite association avec l'ARN viral pendant le processus de rétrotranscription, de transport du complexe de pré-intégration et d'intégration. La rétrotranscription débute rapidement après l'infection. En effet, l'ADN viral devient détectable par PCR seulement 4 heures après l'infection de cellules T en phase de réplication active et atteint un niveau maximal 12 heures post-infection (Kim *et al.*, 1989).

La transcriptase inverse, issue du clivage de Pol fait partie intégrante du nucléoïde et est responsable de la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral. Le caractère unique de cette enzyme provient de sa capacité à utiliser l'ARN et l'ADN comme matrice. La transcriptase inverse est un hétérodimère constitué d'une sous-unité de 51 kDa (p51) et d'une autre de 66 kDa (p66) qui possèdent la même extrémité amino-terminal. Les deux sous-unités participent à l'activité polymérase de l'enzyme mais seule la p66 possède l'activité RNase H qui permet la dégradation de l'ARN dans les hybrides ARN/ADN (Tisdale *et al.*, 1991). L'ARN viral est de polarité positive et, par conséquent, la rétrotranscription débute par la synthèse d'un brin d'ADN de polarité négative. L'enzyme commence la synthèse de l'ADN en 5' de l'ARN viral en utilisant l'extrémité 3'-OH d'un ARN de transfert lysine (ARNt Lys) comme amorce. L'ARNt Lys se lie sur le PBS ("priming binding site") de l'ARN viral au moment de l'assemblage des particules virales et constitue donc une composante du nucléoïde. La synthèse complète du premier brin d'ADN nécessite un transfert de brin de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' de l'ARN. L'activité RNase H est essentielle pour ce transfert de brin puisqu'elle permet de libérer l'extrémité nouvellement synthétisée du premier brin d'ADN. Une fois monocaténaire, l'ADN peut s'hybrider avec la région 3' de l'ARN viral du à la présence de la séquence répétée R, retrouvée en 5' et en 3' de l'ARN (Figure 4). Ce premier transfert de brin permet la synthèse complète du premier brin d'ADN complémentaire (Swanstrom *et al.*, 1981; Varmus and Swanstrom, 1982).

La synthèse du second brin d'ADN est initiée en 5' du premier brin d'ADN en utilisant la séquence PPT ("polypurine tract") comme amorce. L'activité RNase H de la transcriptase inverse induit la formation de cette amorce par digestion partielle de l'ARN viral associé au premier brin d'ADN. En effet, la transcriptase inverse dégrade moins efficacement la séquence PPT de l'ARN viral ce qui lui permet de débiter la synthèse du second brin d'ADN avant la dégradation complète de l'ARN (Finston and Champoux,

1984). La synthèse du second brin d'ADN nécessite un deuxième transfert de brin de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du premier brin. Le deuxième transfert est catalysé par l'hybridation de la séquence PBS du premier brin, synthétisée à partir du génome viral, à la séquence PBS du deuxième brin, synthétisée à partir de l'ARNt Lys (Das and Berkhout, 1995; Li *et al.*, 1994). Suite à la réalisation du second transfert, la transcriptase inverse termine l'élongation des deux brins pour former l'ADN complémentaire viral. Le produit final est un duplex d'ADN linéaire à bout franc caractérisé par la présence des deux séquences LTRs (long terminal repeat) en 5' et en 3' du génome viral (Figure 4) (Roth *et al.*, 1989). Les LTRs des rétrovirus proviennent de la nature même de la rétrotranscription associée à l'architecture de l'ARN génomique viral. En effet, la rétrotranscription génère un ADN double-brin complémentaire et aussi produit une duplication d'une partie des séquences retrouvées en 5' et en 3' de l'ARN génomique viral. L'arrangement de l'ARN viral pleine longueur est la suivante "R-U3-----ARN-----U5-R". Par contre, il y a formation de deux LTR complets après la reverse transcription et l'ADN génomique viral devient "U3-R-U5-----ADN-----U3-R-U5".

La raison pour laquelle deux copies de l'ARN viral sont encapsidées à l'intérieur des virions est longtemps demeurée obscure puisque seulement une copie d'ADN génomique virale est synthétisée par le virus. De par la nature de la rétrotranscription, plusieurs études se sont concentrées sur cette étape du cycle de réplication virale pour tenter de clarifier cette question. Les transferts de brins effectués par la RT constituent une étape critique dans le processus de réplication des rétrovirus. En théorie, une seule copie d'ARN viral est suffisante pour générer un ADN complémentaire entier. *In vitro*, la polarité du premier transfert de brin, c'est-à-dire s'il s'effectue de façon intra-moléculaire ou inter-moléculaire, est très controversée (Hu and Temin, 1990). À l'inverse, les recherches concernant le deuxième transfert de brin indiquent qu'il survient de façon intra-moléculaire (Jones *et al.*, 1993). Les données les plus récentes suggèrent que le premier transfert se produit aussi de façon intra-moléculaire (Jones *et al.*, 1994). Cependant, il semble que l'intégrité de l'ARN viral influence la polarité de ce transfert. En effet, un ARN intact favorise un premier transfert intra-moléculaire alors que si l'ARN est endommagé, le transfert peut être intra ou inter-moléculaire (Jones *et al.*, 1993). Par conséquent, la présence de deux copies de l'ARN viral augmente les chances d'obtenir un ADN génomique viral complet. De plus, ce mécanisme de rétrotranscription représente un avantage évolutif important puisqu'il favorise la recombinaison entre les deux ARNs génomiques viraux.

La rétrotranscription s'effectue en présence de plusieurs protéines virales (p17, NCp7, RT, IN, Vif et Vpr). Parmi celles-ci, la NCp7 semble favoriser le transfert de brins en augmentant la stabilité du complexe de rétrotranscription (Darlix *et al.*, 1993; Peliska *et al.*, 1994). La protéine accessoire Vif semble aussi augmenter la stabilité de ce complexe (Simon and Malim, 1996). De plus, bien que le mécanisme ne soit pas encore connu, des données récentes suggèrent que la protéine accessoire Vpr accroît la formation d'ADN génomique viral (Kim *et al.*, 1998).

4.1.4. Transport et intégration

La formation de l'ADN génomique viral se produit dans le cytoplasme en association avec les protéines virales nécessaires à la synthèse, à la stabilité, au transport et à l'intégration de l'ADN dans le génome de la cellule. Après la rétrotranscription, l'ensemble de ces protéines associées à l'ADN viral se nomme complexe de préintégration. Le complexe de préintégration, formé dans le cytoplasme, doit franchir la membrane nucléaire de la cellule pour pouvoir intégrer le génome cellulaire. Pour les rétrovirus oncogènes, cette transition s'effectue exclusivement à l'intérieur de cellules en division. Lors de la division cellulaire, la membrane nucléaire est rompue et permet à l'ADN viral d'atteindre le noyau de façon passive. À l'inverse, les lentivirus ne sont pas restreints à l'infection des cellules en division mais peuvent aussi se répliquer dans des cellules quiescentes (Roe *et al.*, 1993). Dans les cellules quiescentes, comme les macrophages, la protéine p17, l'intégrase et Vpr participent directement au transport actif du complexe de préintégration du cytoplasme au noyau (Bukrinsky *et al.*, 1993a; Heinzinger *et al.*, 1994). La tyrosine phosphorylée en carboxy-terminale de la p17 ainsi que l'alpha hélice située en amino-terminale de Vpr sont importantes pour le transport du complexe de préintégration (Gallay *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1993b; Yao *et al.*, 1995b). Des travaux récents indiquent que l'intégrase seule peut induire le transport du complexe de préintégration à l'intérieur du noyau (Naldini *et al.*, 1996; Reil *et al.*, 1998). Cependant, certaines mutations à l'intérieur de p17 et de Vpr diminuent fortement la réplication du VIH dans les macrophages suggérant plutôt une coopération entre p17, l'intégrase et Vpr. La p17 et l'intégrase interagissent avec une protéine de transport cellulaire de la famille des karyopherine- α . Les karyopherine- α sont des protéines de transport responsables de la transition, à travers la membrane nucléaire, de plusieurs protéines cellulaires. Par contre, le mécanisme par lequel Vpr favorise le transport du complexe de préintégration dans le noyau reste inconnu et fait l'objet de recherches actives par plusieurs groupes (Jenkins *et al.*, 1998; Popov *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998).

Suite au transport du complexe de préintégration à l'intérieur du noyau, l'intégrase catalyse l'intégration de l'ADN viral à l'intérieur du génome cellulaire. L'intégrase forme un dimère capable d'une forte multimérisation où la forme monomérique est de 31 kDa (Jonsson *et al.*, 1996). Partie intégrante du complexe de préintégration, l'intégrase est constituée de trois domaines distincts: le domaine HHCC contenant un doigt de zinc, le domaine central ou catalytique et le domaine de liaison à l'ADN, situé en C-terminal. Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine catalytique sont impliqués dans la liaison de l'ADN viral et de l'ADN cellulaire. Bien que trois conformations d'ADN viral se retrouvent sous une forme circulaire, l'intégrase lie préférentiellement la forme linéaire et catalyse uniquement l'intégration de cette forme dans le génome cellulaire (Bukrinsky *et al.*, 1993b; Farnet and Haseltine, 1991a; Farnet and Haseltine, 1991b). Les trois formes circulaires, soit à 1-LTR, à 2-LTR adjacents ou à 2-LTR opposés, semblent des artefacts produits par l'action d'une enzyme cellulaire suite à une erreur d'intégration (Roth *et al.*, 1990). L'ADN circulaire viral est exclusif au noyau et n'est pas retrouvé dans le cytoplasme de la cellule. L'amplification spécifique par PCR de ces formes circulaires d'ADN a permis d'étudier la cinétique et les déterminants moléculaires impliqués dans le transport du complexe de préintégration du cytoplasme au noyau.

Bien que l'intégration ne se fasse pas à des sites spécifiques du génome cellulaire, plusieurs évidences suggèrent que ce processus ne cible pas les sites d'intégration de façon complètement aléatoire (Bor *et al.*, 1996). Le processus d'intégration débute par le clivage et l'enlèvement de deux paires de bases aux extrémités 3' de l'ADN viral pour former des extrémités cohésives. L'ADN cellulaire est clivé à un seul endroit aussi, de façon à générer des extrémités cohésives qui seront liés à l'ADN viral. Le modèle actuel suggère que l'intégrase clive l'ADN viral et l'ADN cellulaire et catalyse leur liaison simultanément. Le clivage et la liaison séquentielle des deux molécules d'ADNs nécessiteraient la formation d'intermédiaires ADN-IN non-favorisés d'un point de vue physico-chimique (Engelman *et al.*, 1991). Le processus d'intégration résulte en la perte de deux paires de bases du génome viral et de la duplication de cinq paires de bases du génome cellulaire à chaque extrémité du site d'intégration (Goff, 1992). De plus, bien que l'intégrase puisse catalyser seule la liaison des deux molécules d'ADNs *in vitro*, d'autres protéines virales et cellulaires pourraient être nécessaires pour atteindre l'activité optimale de l'enzyme *in vivo*. Le seul exemple connu est la protéine cellulaire HMG 1(Y), impliquée dans l'architecture des chromosomes, qui semble essentielle à l'intégration de l'ADN viral à l'intérieur du génome cellulaire *in vivo* (Farnet and Bushman, 1997).

4.2. Phases post-intégration

4.2.1. Expression de l'ARN et des protéines virales

L'ADN viral, une fois intégré à l'intérieur du génome cellulaire, est nommé provirus. Suite à la formation du provirus, l'expression de l'ARNm et des protéines virales peut débiter pour mener à l'infection productive du cycle de réplication virale. La transcription de l'ARNm viral est effectuée par l'ARN polymérase II (ARN pol II) cellulaire. L'ARN pol II initie la transcription au début de la région R du LTR 5' et termine la synthèse de l'ARNm après le site de polyadénylation à la fin de la région R du LTR 3'. Le transcript pleine longueur de 9.8 kb, utilisé pour la synthèse des protéines Gag et Gag-Pol, constitue aussi l'ARN génomique encapsidé à l'intérieur des particules virales.

L'ARN viral, une fois synthétisé, est épissé pour générer principalement 3 classes d'ARNm différents qui seront ensuite traduits. L'épissage génère des ARNs mono-épissés de 4 kb codant pour les protéines Vif, Vpr/Vpx, Vpu et les deux glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41 et des ARNs multi-épissés de 2 kb codant pour les protéines Tat, Rev et Nef. Évidemment, la troisième classe d'ARN est formée par les ARNs génomiques pleines longueurs de 9.8 kb responsables de la synthèse des précurseurs Gag et Gag-Pol (Martin *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1990a). Les ARNs de 2 kb sont transportés du noyau au cytoplasme immédiatement après l'épissage. Les autres ARNm sont sujets à la régulation par la protéine virale Rev qui une fois synthétisée induit l'exportation de ces ARNs au cytoplasme. Par conséquent, Rev est essentiel à la production virale puisque cette protéine contrôle la disponibilité des protéines de structures, des protéines accessoires et de l'ARN génomique viral au niveau du cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les ARNm sont traduits en précurseurs protéiques ou polyprotéines et en protéines fonctionnelles. Les polyprotéines Gag, Gag-Pol et Env font intervenir les mécanismes de changement de cadre de lecture et/ou de clivages protéolytiques avant l'obtention des protéines fonctionnelles (Haseltine, 1991). La traduction du précurseur protéique Gag, synthétisé à partir de l'ARNm pleine longueur, se termine au codon de terminaison à la fin de p6. Le précurseur protéique Gag-Pol est traduit à partir du même ARNm où le ribosome effectue un changement de cadre de lecture -1 lors de son passage sur une séquence de glissement située au début du domaine p6. Conséquemment, les protéines p17, p24 et p7 peuvent être produites suite au clivage du précurseur Gag et Gag-Pol alors que la p6 est issue exclusivement du précurseur Gag.

4.2.2. Régulation de la transcription par les protéines cellulaires

La transcription du VIH est un procédé complexe qui implique plusieurs séquences de régulation présentes à l'intérieur du LTR viral ainsi que de nombreux facteurs de transcription cellulaire et virale. Les séquences promotrices du VIH et des autres rétrovirus se retrouvent essentiellement dans la région U3 du LTR. La boîte TATA, reconnue par le facteur de transcription TFIID, est située entre les positions -22 et -27 de la région U3 (Garcia *et al.*, 1987). Ce promoteur contient aussi trois séquences riches en GC servant de sites de liaison au facteur de transcription SP1, qui lorsque associé à l'ADN, augmente l'initiation de la transcription (Garcia *et al.*, 1987). Le LTR contient aussi un enhancer situé entre les nucléotides -120 et -57 capables de stimuler l'initiation de la transcription.

Cette région contient aussi deux séquences consensus de liaison au facteur de transcription NFκB dont la liaison a été démontrée *in vitro* (Nabel and Baltimore, 1987). NFκB est un facteur de transcription inductible qui détient un rôle important dans la réponse immunitaire et inflammatoire précoce en stimulant la transcription de plusieurs gènes. L'activation par NFκB est immédiate puisque qu'elle est indépendante d'une synthèse protéique *de novo*. La forme inactive de NFκB est retrouvée lorsqu'en association avec IκB dans le cytoplasme. Plusieurs stimuli extra- et intra-cellulaires, incluant la réplication virale et l'activation provenant de cytokines, provoquent une dissociation de IκB et le relâchement de la forme active de NFκB. NFκB est ensuite transloqué dans le noyau cellulaire et active les promoteurs contenant ses sites spécifiques de reconnaissance. Plusieurs études ont démontré que l'induction de NFκB, suite à la différenciation monocytique et à l'activation des cellules T CD4⁺, active la transcription du VIH-1 (Harrich *et al.*, 1990). De plus, le VIH peut lui-même stimuler, de façon constitutive, l'activité de NFκB selon un mécanisme encore mal compris (Roulston *et al.*, 1995).

Les séquences situées entre les positions -410 et -157 sont appelées éléments négatifs de régulation (NRE). La séquence NRE est reconnue par plusieurs facteurs de transcription cellulaires tels que les facteurs USF ("upstream binding factor"), NFAT-1 ("nuclear factor of activated T cells") et AP1 (Rosen *et al.*, 1985). La délétion de cette séquence a pour effet d'augmenter la transcription et conséquemment, la réplication virale (Rosen *et al.*, 1985). De plus, plusieurs protéines cellulaires incluant LBP-1 ("leading binding protein") et UBP-1 ("untranslated binding protein"), lient des régions en 3' du site

d'initiation de la transcription (Jones *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1988). Cependant, le rôle précis de ces deux facteurs de transcription dans la régulation de la transcription du VIH reste à déterminer. En plus d'être régulée par plusieurs protéines cellulaires, la transcription du VIH est aussi hautement régulée par l'interaction entre la séquence TAR ("Tat-responsive element") et le transactivateur viral Tat (Arya *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1985). De plus, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la protéine accessoire Vpr augmente l'activité basal du LTR possiblement suite à une interaction indirecte avec le facteur de transcription p300 et la protéine p53 (Hrimech *et al.*, 1998; Ranga *et al.*, 1997; Sawaya *et al.*, 1998).

4.2.3. Assemblage et bourgeonnement des particules virales

La synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol se produit sur des polysomes cytosoliques. En effet, l'ajout de brefeldine A ou monensine, qui inhibe le transport intracellulaire des protéines transitant par le réseau réticulum endoplasmique (RE) Golgie, n'empêche pas l'assemblage et le bourgeonnement du VIH. Cette donnée indique que les précurseurs Gag et Gag-Pol ne suivent pas la voie RE-Golgie pour se rendre à la surface cellulaire (Pal *et al.*, 1991). Le compartiment cellulaire où se produit la traduction de ces précurseurs ainsi que les déterminants impliqués dans leur ciblage au niveau de la membrane cellulaire sont toujours inconnus. Cependant, que les polysomes associés à l'ARNm pleine longueur soient libres dans le cytoplasme ou près du site d'assemblage, il semble que la traduction et le ciblage de Gag et Gag-Pol sont intimement reliés au cytosquelette (Rey *et al.*, 1996).

Durant leur synthèse, Gag et Gag-Pol sont modifiées par l'ajout d'un acide myristylique en N-terminal leur permettant de s'incruster au niveau interne de la membrane cytoplasmique (Zhou and Resh, 1996). La myristylation en N-terminal pourrait jouer un rôle important dans le ciblage de Gag et Gag-Pol à la membrane plasmique. En effet, la mutation de la glycine en position deux de ces précurseurs empêche la myristylation qui a pour effet d'abolir toute production virale extra- ou intra-cellulaire (Bryant and Ratner, 1990; Göttlinger *et al.*, 1989). Plusieurs résultats ont suggéré que l'acide myristylique, associé à Gag et Gag-Pol, interagissait avec un récepteur cellulaire spécifique capable d'entraîner les précurseurs au niveau de la membrane cellulaire (Wills and Craven, 1991). Par contre, un tel récepteur, bien qu'identifié pour la protéine myristyllée p60src de RSV (Rous sarcoma virus), n'a jamais pu être mis en évidence dans le cas de Gag et Gag-Pol du VIH. Outre le signal de myristylation, la p17 de Gag semble aussi impliquée dans la

localisation des précurseurs au site d'assemblage (Spearman *et al.*, 1994). En effet, la délétion des acides aminés 16 à 99 de la p17 redirige l'assemblage des particules virales au niveau du RE de la cellule (Facke *et al.*, 1993).

Le précurseur de l'enveloppe gp160 est traduit par des ribosomes en association avec la membrane du RE à partir d'un ARNm mono-épissé de 4 kb (Arrigo and Chen, 1991). La gp160 est transloquée à l'intérieur du RE durant la traduction mais reste associée à la membrane interne du RE et ensuite du Golgi pendant son transport au site d'assemblage. Le repliement adéquat ainsi que la multimérisation et la glycosylation de la gp160 se produisent durant son transit à l'intérieur du RE. Au niveau *cis* et *medial* du Golgi, le précurseur gp160 est clivé en gp120 et gp41 par une protéase de la famille des furines (Earl *et al.*, 1991; Hallenberger *et al.*, 1992; Stein and Englemann, 1990). Seulement 10 à 20% de la gp160 produite est clivée en gp120 et gp41. Le reste de la gp160 non-clivée est recircularisée pour être dégradée à l'intérieur de lysosomes (Willey *et al.*, 1988). Par conséquent, le clivage de la gp160 est essentielle à l'obtention de particules virales infectieuses. Enfin, une glycosylation secondaire par l'ajout d'acide sialique se produit au niveau *trans* du Golgi. Il semble que cette dernière modification, nécessaire à la maturation finale des glycoprotéines de l'enveloppe, se produise directement sur la gp120 et la gp41.

Les protéines de l'enveloppe, une fois synthétisées, suivent donc le trajet RE-Golgi. En effet, l'utilisation de brefeldine A ou monensine empêche la migration de l'enveloppe à la surface membranaire de la cellule (Einfeld, 1996). De plus, le domaine intracytoplasmique de la gp41 semble être responsable du ciblage de l'enveloppe et du recrutement de la machinerie d'assemblage au site de bourgeonnement viral. En effet, dans les cellules épithéliales, ce domaine de la gp41 est responsable du bourgeonnement basolatéral du VIH et de d'autres rétrovirus (Lodge *et al.*, 1997). D'ailleurs, il est probable que le domaine central de la p17 (a.a. 55 à 59) interagisse avec la gp41 et/ou le facteur cellulaire liant la gp41 lors du transport des glycoprotéines du Golgi à la membrane plasmique (Freed and Martin, 1995; Spearman *et al.*, 1994). Le ciblage des protéines virales au lieu d'assemblage pourrait être crucial pour obtenir un bourgeonnement optimal des particules virales. De plus, il paraît de plus en plus évident que le ciblage et le bourgeonnement des particules virales à un compartiment cellulaire précis, est déterminant en ce qui concerne la transmission et donc la propagation du VIH.

L'assemblage des particules virales requière le ciblage des protéines virales et de

l'ARN génomique pleine longueur au site de bourgeonnement. Les protéines virales interagissent alors entre elles et incorporent l'ARN viral à l'intérieur des particules virales en formation (Clavel and Grenstein, 1990; Hayashi *et al.*, 1992). L'encapsidation de l'ARN génomique à l'intérieur des virions s'effectue suite à l'interaction des motifs en doigt de zinc de la région NCp7 des précurseurs Gag et Gag-Pol et le signal d'encapsidation (ou séquence ψ) de l'ARN viral (Dorfman *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1996). Une partie essentielle de la séquence ψ est située entre le premier site donneur d'épissage et le codon d'initiation de la traduction du gène *gag*. Par conséquent, les ARNs viraux mono- ou multi-épissés ne contiennent pas la séquence ψ , ce qui permet l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique pleine longueur (Aldovini and Young, 1990; Clavel and Grenstein, 1990; Lever *et al.*, 1989).

L'assemblage induit la formation de particules virales immatures non-infectieuses. Ces pseudo-virions, situés généralement au niveau de la membrane plasmique, sont sphériques avec une couche dense aux électrons en périphérie de membrane virale (Gelderblom, 1991). Par ailleurs, l'expression unique du précurseur Gag résulte en la formation de sphères d'environ 100 nm. La polyprotéine Gagp55 constitue donc le déterminant minimum nécessaire à l'assemblage et au bourgeonnement de particules virales (Gheysen *et al.*, 1989; Shioda *et al.*, 1992). La formation de virus infectieux matures se produit suite au clivage des précurseurs protéiques par la protéase virale. En effet, l'inhibition de la protéase virale par l'induction de mutations ou l'emploi d'inhibiteurs chimiques résulte en la formation de particules virales non-infectieuses (Göttlinger *et al.*, 1989; Kohl *et al.*, 1988). La maturation débute par le clivage du précurseur Gag-Pol en MAp17, CAp24, NCp7, PRp10, RT p66, RTp51 et L'INp32. Le précurseur Gag est alors aussi clivé pour donner la MAp17, la CAp24, la NCp7 et la p6. La maturation se produit durant l'assemblage à la surface de la membrane cellulaire et/ou après le bourgeonnement des particules virales dans le milieu extra-cellulaire (Henderson *et al.*, 1992).

Durant l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du VIH, plusieurs composantes virales sont responsables de la morphogénèse, du relâchement et de l'infectivité des particules virales. Par exemple, des mutations dans le domaine N-terminal de la p17 diminuent la production virale. De même, des mutations ou délétions au niveau du domaine C-terminal de la p17 et central de la p24 affectent dramatiquement le potentiel infectieux des virus (Wang and Barklis, 1993; Yu *et al.*, 1992). La destruction des doigts de zinc de la NCp7 inhibe l'incorporation de l'ARN génomique virale et par conséquent

empêche l'établissement de cycles de répliquions subséquents (Aldovini and Young, 1990; Wang and Barklis, 1993). Enfin, la p6 semble importante pour obtenir un relâchement optimal des particules virales bien que ce phénomène soit dépendant de la lignée cellulaire employée (Yu *et al.*, 1995). Le domaine p6 est constituée d'un motif PXXP situé en N-terminal et d'un motif LXXLF situé en C-terminal qui sont hautement conservés à travers les différents isolats du VIH. Le motif LXXLF est responsable de l'incorporation de Vpr à l'intérieur des particules virales. Par ailleurs, les mutations du motif PXXP induisent la formation de particules virales plus grosses démontrant une morphologie altérée (Garnier *et al.*, 1998; Göttinger *et al.*, 1991). Par conséquent, l'intégrité de la p6 est probablement importante pour conserver aux particules virales une infectivité maximale. Le domaine p6, unique au lentivirus, semble jouer le même rôle que les protéines de la capsidie d'autres rétrovirus tels que RSV en modulant la morphologie et l'infectivité virales. Ces données indiquent que la polyprotéine Gag ainsi que ses constituants sont impliqués non seulement dans l'assemblage mais aussi dans des événements ultérieurs à l'assemblage et au bourgeonnement du VIH.

L'expression des glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41 n'est pas requise pour l'assemblage et le relâchement des particules virales. Cependant, leur incorporation au niveau de la membrane virale est essentiel à l'obtention de virus infectieux. La portion C-terminale de la gp41 contient le déterminant principal responsable de l'incorporation de l'enveloppe à la surface des virus. Cette région de la gp41 interagit avec la p17 qui tapisse la surface interne des virions (Cosson, 1996; Dorfman *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1993b).

5. Gènes auxiliaires du VIH

La caractéristique principale des lentivirus, qui codent comme tous les rétrovirus pour les gènes *gag*, *pol* et *env*, est la présence additionnelle de plusieurs cadres de lectures ouverts absents des rétrovirus simples. Ces cadres de lectures ouverts, appelés gènes auxiliaires, codent pour des protéines virales impliquées dans la modulation de la production et de l'infectivité du VIH. Le VIH-1 exprime les six protéines auxiliaires soit Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu et Nef. Le VIH-2 ne contient pas de cadre de lecture ouvert pour Vpu mais code pour Vpx, absent du génome du VIH-1. Les protéines auxiliaires de régulation Tat et Rev sont indispensables à la répliquion du VIH *in vitro* et *in vivo* (Fisher *et al.*, 1986). Par ailleurs, l'absence des protéines auxiliaires Vif, Vpr/Vpx, Vpu et Nef affecte mais n'empêche pas la répliquion du VIH *in vitro*. Pour cette raison, ces protéines

ont été nommées protéines accessoires. Malgré leur présence facultative *in vitro*, plusieurs résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* chez le singe, indiquent que la présence de ces protéines accessoires est essentielle à la réplication du VIH chez l'humain (Emerman and Malim, 1998; Subbramanian and Cohen, 1994).

5.1. Les gènes de régulation *tat* et *rev*

Les protéines Tat et Rev sont des protéines nucléaires dont la fonction est intimement reliée à leur capacité à lier des structures secondaires présentes sur l'ARN viral. En effet, les mécanismes par lesquels Tat et Rev régulent la réplication du VIH nécessitent la liaison à leurs séquences respectives TAR et RRE présentes sur les transcrits viraux (Karn *et al.*, 1991; Rosen, 1991). La protéine Tat est composée de 86 acides aminés dont la principale fonction est de transactiver l'expression des gènes du VIH (Sodroski *et al.*, 1985). Tat est essentielle à l'expression des protéines virales et donc à la réplication du VIH. Pour remplir sa fonction, Tat doit lier la région en forme d'épingle à cheveux de la séquence TAR présente en 5' de tous les ARNs viraux (Cullen, 1992; Selby *et al.*, 1989). L'attachement de Tat à la séquence TAR favorise l'élongation des ARNs viraux synthétisés lors de la transcription par l'ARN polymérase II. En effet, la stimulation de l'élongation est due à l'interaction de Tat avec la kinase TAK (Tat associated kinase) qui induit la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (Jones *et al.*, 1997).

Alors que Tat participe à la transcription des ARNs viraux, la fonction principale de Rev est de réguler leur transport du noyau au cytoplasme. La fonction de Rev est intimement reliée à la présence des séquences de répression agissant en *cis* (CRS) et de la séquence responsable de la liaison de Rev (RRE) présentes sur l'ARN viral. Les séquences CRS, qui chevauchent les séquences des protéines tardives, provoquent la rétention des ARNs complets et mono-épissés à l'intérieur du noyau cellulaire (Cochrane *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1991). La rétention nucléaire induit l'excision des séquences CRS suite à l'épissage complet de tous les ARNs viraux. Une fois les séquences CRS déléetées, les ARNs doublement épissés, faisant partie de la sous-famille des ARNs de 2 kb, sont exportés et traduits à l'intérieur du cytoplasme pour produire les protéines Tat, Rev et Nef (Cullen, 1993). L'expression de Rev provoque son accumulation et sa multimérisation à l'intérieur du noyau cellulaire. Lorsque la quantité de Rev atteint un certain niveau d'efficacité, les multimères lient la séquences RRE de l'ARN viral. La séquence RRE chevauche la séquence de l'enveloppe et se retrouve donc sur les ARNs

viraux complets (9.8 kb) et mono-épissés (4 kb) (Cullen, 1993; Pomerantz *et al.*, 1992). Rev agit alors comme transporteur et orchestre la translocation des ARNs de 9.8 et 4 kb du noyau au cytoplasme où ils seront traduits (Daefler *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1990). En effet, Rev contient une région NES qui interagit avec la machinerie cellulaire responsable du transport des protéines du noyau au cytoplasme (Emerman and Malim, 1998). Rev s'auto-régule lui-même puisque l'exportation de ces ARNs au cytoplasme diminue la quantité d'ARN disponible pour le double épissage et par conséquent, la quantité de Rev pouvant être synthétisée. L'induction par Rev de la synthèse des protéines tardives permet au VIH de passer de la phase de latence à la phase productive de son cycle de réplication. Conséquemment, la latence du VIH peut être vue comme un balancier contrôlé par Rev, qui oscille entre un bas niveau de transcription et la production virale (Pomerantz *et al.*, 1992). L'activation cellulaire augmente le niveau basal de transcription ce qui provoque une synthèse suffisante de Tat pour stimuler la production d'une quantité importante de transcrits (Haseltine, 1991; Rosen, 1991). Ces transcrits produiront d'abord Tat, Rev et Nef et l'accumulation de Rev induira la synthèse des protéines tardives qui mènera ultimement à une production virale massive (Cullen, 1992).

5.2. Les gènes accessoires

5.2.1. Nef

La présence de Nef semble essentielle à la réplication du VIH *in vivo*. En effet, des virus contenant des mutations qui empêchent l'expression de Nef révertent au phénotype sauvage lors de leur réplication chez le singe (Kestler *et al.*, 1991). Les singes chez qui les réversions n'ont pas lieu ne progressent pas jusqu'à la phase clinique de la maladie. D'ailleurs, des études sont actuellement en cours pour vérifier la possibilité d'utiliser des virus délaîtés pour Nef comme vaccins (Desrosiers, 1992; Mariani *et al.*, 1996). Nef est une protéine d'environ 26 kDa phosphorylée et myristyllée retrouvée au niveau interne de la membrane cytoplasmique (Bandres *et al.*, 1994; Wolber *et al.*, 1992). Tel que décrit précédemment, Nef est exprimée de façon Rev indépendante et constitue une portion importante des protéines virales synthétisées au début du cycle viral. Nef, signifiant facteur négatif, a initialement été identifié comme un régulateur négatif de la réplication virale (Ahmad and Venkatesan, 1985). Par contre, plusieurs travaux ont par la suite constaté que Nef influençait positivement la réplication du VIH (deRonde *et al.*, 1992; Zazopoulos and Haseltine, 1993). Nef, maintenant pour "numerous effect function", semble posséder deux fonctions distinctes, l'une provoquant l'augmentation de l'infectivité virale et l'autre induisant la régulation négative de l'expression du récepteur

CD4 à la surface des cellules infectées.

Les données actuelles suggèrent que l'augmentation de l'infectivité virale nécessite l'interaction de Nef avec les kinases cellulaires Src et/ou les kinases PAK capables de moduler le degré d'activation cellulaire (Collette *et al.*, 1997; Sawai *et al.*, 1997). L'activation des kinases induit la production de virus capables de synthétiser plus efficacement et/ou de stabiliser l'ADN complémentaire viral suite à l'infection *de novo* d'une cellule cible (Aiken and Trono, 1995). Il est possible que l'interaction entre Nef et les kinases cellulaires modifie le niveau de phosphorylation des molécules de p17 retrouvées à l'intérieur du nucléoïde viral. Ces protéines phosphorylées pourraient influencer l'infectivité virale puisqu'elles sont associées à l'ARN puis à l'ADN viral entre la décapsidation et l'intégration (Trono and Wang, 1997). Par ailleurs, la régulation négative de l'expression des molécules CD4 médiée par Nef se produit suite à l'endocytose et à la dégradation des récepteurs à l'intérieur de lysosomes. Le ciblage des molécules CD4 à l'intérieur des lysosomes nécessite la présence de Nef au niveau de la membrane cellulaire et semble faire intervenir une interaction directe entre le récepteur CD4 et Nef (Aiken *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1996). À ce titre, il est possible que Nef serve de pont entre CD4 et la machinerie d'endocytose. La modulation négative des récepteurs CD4 pourrait prévenir l'aggrégation et la surinfection des cellules déjà infectées et/ou provoquer le relâchement des kinases associées à CD4 ce qui par la suite contribuerait à stimuler la réplication virale (Cullen, 1994). De plus, cette modulation négative minimise la possible interaction gp120:CD4 au site de bourgeonnement et augmente donc le potentiel infectieux du VIH. Enfin, Nef est retrouvé en faible quantité à l'intérieur des particules virales (Pandori *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1996). Cependant, la présence de Nef à l'intérieur des virions n'a toujours pas pu être reliée aux fonctions relatives à l'infectivité virale et à la dégradation des récepteur CD4.

5.2.2. Vif

Vif est une protéine de 23 kDa qui comme les autres protéines accessoires Vpr, Vpx et Vpu est synthétisée tardivement dans le cycle de réplication virale (Arrigo and Chen, 1991). Vif est impliquée dans le niveau d'infectivité du VIH d'où son nom de facteur d'infectivité viral. En effet, les mutations qui empêchent la production de Vif provoquent une baisse du potentiel infectieux du VIH-1 d'environ 1000 fois (Sodroski *et al.*, 1986b). Cette fonction semble rendre Vif essentiel à la réplication du VIH *in vivo* puisque les virus n'exprimant pas Vif sont incapables de se répliquer dans les macrophages et les

lymphocytes T primaires (Gabuzda *et al.*, 1992). En absence de Vif, la perte importante du potentiel infectieux est due à une baisse du niveau de synthèse de l'ADN proviral et/ou de la stabilité du complexe de préintégration (Simon and Malim, 1996; Sova and Volsky, 1993). La fonction de Vif peut être complémentée en *trans* uniquement dans les cellules produisant le virus et non dans les cellules nouvellement infectées ce qui suggère que Vif influence l'infectivité du VIH lors de la production des particules virales (Gabuzda *et al.*, 1992).

Les virus produits en absence de Vif encapsident aussi bien l'ARN génomique viral que les virus sauvages (von Schwedler *et al.*, 1993). Par contre, ces particules virales démontrent une morphologie altérée en microscopie électronique. Le core viral est souvent hétérogène et se retrouve parfois accolé à la membrane externe du virus (Hoglund *et al.*, 1994). Bien que certaines études n'aient pas observé de problème majeur au niveau du clivage et de la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol (Bouyac *et al.*, 1997b; Fouchier *et al.*, 1996), Vif semble affecter l'activité de la protéase virale (Kotler *et al.*, 1997). Par conséquent, il est possible que, par son action sur la protéase, Vif permette un clivage séquentiel et une organisation adéquate des protéines virales pendant le bourgeonnement. D'ailleurs, quoi que retrouvé en faible quantité (3 à 20 molécules/virion), Vif est présent à l'intérieur des particules virales (Camaur and Trono, 1996; Fouchier *et al.*, 1996). Par contre, l'incorporation de Vif à l'intérieur des particules virales n'a toujours pas pu être corrélée avec son effet sur l'infectivité du VIH.

Vif est présent sous deux formes à l'intérieur des cellules infectées, une forme cytosolique libre et une forme liée au niveau interne de la membrane cytoplasmique (Goncalves *et al.*, 1995). Comme pour Nef, il est concevable que la fraction membranaire de Vif influence l'assemblage et la maturation virale et se retrouve par le fait même accidentellement incorporée à l'intérieur des virions. La fraction membranaire de Vif est importante pour permettre l'augmentation de l'infectivité virale (Goncalves *et al.*, 1995). De plus, il y a co-localisation de Vif et de Gag au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées (Simon *et al.*, 1997). Enfin, le précurseur Gag et plus spécifiquement la NCp7 et une région entre la p17 et la p24 interagissent directement avec Vif (Bouyac *et al.*, 1997a).

5.2.3. Vpu

Vpu est une phosphoprotéine de 16 kDa codée seulement par le VIH-1 et la souche

simienne VIScpz (Cohen *et al.*, 1988; Strebel *et al.*, 1988b). Les études d'imagerie par résonance magnétique prédisent que Vpu est formée d'une hélice transmembranaire située en N-terminal de la protéine. Cette hélice transmembranaire est suivie de deux hélices alpha séparées par une jonction contenant deux sérines phosphorylées en position 52 et 56 (Federau *et al.*, 1996; Willbold *et al.*, 1997). Des analyses biochimiques ont démontré que Vpu est une protéine membranaire de type 1 où l'hélice hydrophobe située en N-terminale sert de domaine d'encrage à la membrane. La portion C-terminale contenant les deux hélices alpha se retrouve dans le cytoplasme (Maldarelli *et al.*, 1993). Vpu est synthétisée de façon Rev-dépendante à partir d'un ARN bicistronique mono-épissé codant aussi pour les glycoprotéines de l'enveloppe (Arrigo and Chen, 1991; Schwartz *et al.*, 1990b). Des analyses par immunofluorescence indiquent que Vpu se localise principalement au niveau du réticulum endoplasmique (Kimura *et al.*, 1992). Cependant, certaines observations suggèrent que quelques molécules se retrouvent aussi associées avec la membrane cytoplasmique des cellules (Raja and Jabbar, 1996).

Le premier phénotype associé à Vpu est son effet sur le relâchement des particules virales. En effet, Vpu induit une augmentation de la quantité de virus relâchés dans le milieu extra-cellulaire lors de la phase productive du VIH (Strebel *et al.*, 1989; Terwilliger *et al.*, 1989). Il semble que Vpu n'augmente pas le niveau de synthèse et d'assemblage des protéines virales mais facilite le relâchement des virus à partir de la surface des cellules infectées. D'ailleurs, des études de microscopie électronique montrent une accumulation de virus attachés à la surface de la membrane cellulaire en absence de Vpu. De plus, dans cette situation, les particules virales sont aussi présentes à l'intérieur des endosomes intracellulaires. Sans Vpu, il est probable que l'excès de virus accrochés à la surface des cellules soit internalisés par endocytose (Klimkait *et al.*, 1990). Vpu pourrait aussi être impliqué dans la qualité de l'assemblage et de la maturation des virions. En effet, bien que relâchées plus efficacement, des structures virales aberrantes sont plus fréquemment observées en absence de Vpu (Klimkait *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 1993).

L'augmentation de la production virale varie selon la lignée cellulaire utilisée (Sakai *et al.*, 1995). Par exemple, Vpu est plus efficace à augmenter le relâchement des virus produits par les cellules HeLa que par les cellules Jurkat et MT4 (Terwilliger *et al.*, 1989; Yao *et al.*, 1992). De plus, l'expression en *cis* de Vpu provoque une augmentation de la production de particules virales constituées des protéines Gag d'autres rétrovirus tels que Visna et MoMuLV (Göttlinger *et al.*, 1993b). Cette donnée suggère que Vpu n'agit pas suite à une interaction spécifique avec les protéines de structures du VIH. L'expression de

Vpu en *trans* provoque aussi l'augmentation de l'exportation virale (Terwilliger *et al.*, 1989; Yao *et al.*, 1993). Par conséquent, l'utilisation de Vpu comme outil moléculaire pour induire une augmentation de la production de différents rétrovirus est envisageable. Vpu semble être la seule protéine accessoire qui n'est pas incorporée à l'intérieur des virions. Il est possible que Vpu modifie l'environnement de la cellule à partir d'un compartiment cellulaire tel que l'appareil de Golgi. Vpu forme des oligomères qui semblent se disposer de façon à former un canal pouvant servir au transport de différents ions. Plusieurs travaux indiquent que Vpu forme un canal ionique fonctionnel qui influence la polarité ionique de la cellule (Ewart *et al.*, 1996; Grice *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 1996). Cependant, l'activité du canal ionique induit par Vpu est controversée et n'a toujours pas pu être reliée à l'augmentation de l'exportation virale (Coady *et al.*, 1998; Lamb and Pinto, 1997b).

La deuxième fonction de Vpu est l'induction de la dégradation spécifique des molécules CD4 à l'intérieur du réticulum endoplasmique. La dégradation des récepteurs CD4 facilite le transport et la maturation de la gp160 en gp120 et gp41 au niveau de la membrane plasmique (Willey *et al.*, 1992). En effet, en présence de CD4, il y a formation de complexe gp160:CD4 qui sont retenus à l'intérieur du réticulum endoplasmique ce qui interfère avec le transport normal de la gp160 (Bour *et al.*, 1991; Crise *et al.*, 1990; Jabbar and Nayak, 1990). La dégradation de CD4 nécessite la co-localisation de Vpu et CD4 au niveau du même compartiment membranaire (Chen *et al.*, 1993; Schubert and Strebel, 1994). Plus spécifiquement, la première hélice alpha de Vpu interagit directement avec l'hélice proximale de la portion cytoplasmique de la molécule CD4 (Tiganos *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1995a). Pour remplir sa fonction, Vpu semble diriger le récepteur CD4 à travers la voie du protéasome qui est responsable de la dégradation de plusieurs protéines cellulaires mal repliées (Schubert *et al.*, 1998). En effet, une étude récente indique que Vpu interagit avec la protéine cellulaire β -TrCP laquelle provoque la dégradation de CD4 par l'intermédiaire du protéasome (Margottin *et al.*, 1998). Enfin, il est probable que Vpu prenne la relève de Nef et continue de minimiser l'interaction CD4:gp120 de façon tardive pour augmenter l'infectivité viral.

Plusieurs mutants de Vpu ont été générés pour déterminer si les deux fonctions pouvaient être attribuées à deux domaines différents de la protéine. La phosphorylation des deux sérines ainsi que certaines mutations au niveau de l'hélice intra-membranaire de Vpu diminuent le taux de dégradation de CD4 et le relâchement des virions. Par contre, d'autres mutants sont capables de remplir une seule des deux fonctions suggérant que Vpu

est constituée de deux domaines distincts (Friborg *et al.*, 1995; Schubert and Strebel, 1994; Tiganos *et al.*, 1997). Il est possible que la dégradation de CD4, induite par Vpu, influence positivement le relâchement des particules virales. En effet, l'absence de CD4 au niveau de la membrane plasmique de la cellule pourrait favoriser la présence de l'enveloppe au lieu d'assemblage et le bourgeonnement subséquent des particules virales. Conséquemment, l'exportation accrue des virions représenterait la fonction principale de Vpu. Plusieurs travaux sont actuellement en cours pour déterminer si il y a un lien entre les deux fonctions de Vpu. Sans contredit, l'augmentation de l'exportation virale est importante puisque le VIH-2 possède aussi un déterminant à l'intérieur de l'enveloppe, qui induit une production accrue des particules virales (Bour *et al.*, 1996). Il est donc possible que l'augmentation du relâchement des particules virales soit essentielle à la réplication et à la pathogénèse induites par le VIH *in vivo*. En effet, l'augmentation de la production virale pourrait être cruciale notamment au niveau des sanctuaires où la charge virale semble déterminante dans le processus d'apoptose et dans la transmission du virus.

5.2.4. Vpr

Toutes les souches du VIH contiennent un cadre de lecture ouvert codant pour la protéine viral R (Vpr). Le VIH-2 code aussi pour Vpx, une protéine apparentée à Vpr qui pourrait être apparue suite à une duplication ou à une acquisition de Vpr. La fonction de la protéine Vpr du VIH-2 est partiellement différente de la protéine Vpr du VIH-1 (Sharp *et al.*, 1996; Tristem *et al.*, 1992). En effet, les fonctions de Vpr et de Vpx du VIH-2 se retrouvent combinées dans la protéine Vpr du VIH-1. Vpr du VIH-1 est une protéine de 96 acides aminés et de 14 kDa exprimée de façon Rev-dépendante à partir d'un ARN messager mono-épissé. L'analyse informatique, largement renforcée par les analyses de mutagénèses dirigées, prédit que cette protéine est formée d'une hélice alpha en N-terminal, d'une deuxième hélice alpha dans la région centrale et d'un domaine riche en leucine situé en C-terminal (Mahalingam *et al.*, 1997; Roques *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1995c). L'hélice N-terminale, qui couvre approximativement les acides aminés 16 à 30, semble constituer le déterminant principal responsable de l'oligomérisation de Vpr en hexamères (Zhao *et al.*, 1994b). L'hélice centrale est séparée de l'hélice N-terminale par un tour bêta (acides aminés 30 à 52) et contient les acides aminés 53 à 74 (Luo *et al.*, 1998). Enfin les extrémités de la protéine comprenant les acides aminés 1 à 15 et 74 à 96 ne semblent pas avoir de structures ordonnées (Yao *et al.*, 1995c). Une étude *in vitro* montre que comme dans le cas de Vpu, la forme oligomérique de Vpr semble permettre l'induction d'une activité de transporteur d'ions (Piller *et al.*,

1996). Cependant, bien que Vpr puisse s'intégrer à l'intérieur des membranes cellulaires, le rôle fonctionnel relié à l'activité de canal ionique reste à déterminer (Lu *et al.*, 1993b; Piller *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1990).

Synthétisée tardivement, Vpr est encapsidée efficacement à l'intérieur des particules virales en formation. L'hélice N-terminale de Vpr constitue le déterminant essentiel et suffisant responsable de son incorporation à l'intérieur des virus (Mahalingam *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1995c). De plus, l'incorporation de Vpr est médiée principalement par le domaine p6 du précurseur Gag (Checroune *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1995; Paxton *et al.*, 1993). En effet, des mutations à la séquence LXXLF en C-terminal de la p6 inhibent complètement l'incorporation de Vpr à l'intérieur des particules virales (Kondo and Gottlinger, 1996; Li *et al.*, 1996). Aussi, le domaine p6 constitue l'élément majeur responsable du ciblage de Vpx à l'intérieur des particules virales (Wu *et al.*, 1994). Par ailleurs, la NCp7 et la p17 pourraient constituer des déterminants secondaires responsables de l'incorporation et/ou de la localisation de Vpr et Vpx dans les virions. En effet, les deux domaines de Gag NCp7 et p17 interagissent respectivement avec Vpr et Vpx suggérant leur implication dans l'incorporation et/ou la localisation virale de ces protéines (Li *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996). Suite à la maturation virale, Vpr se localise à l'intérieur du virus entre la p17 et la p24 alors que Vpx est retrouvée à l'intérieur du nucléoïde viral formé par la p24 (Kewalramani and Emerman, 1996; Liska *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1993c).

L'incorporation de Vpr et Vpx à l'intérieur des particules virales suggèrent que ces protéines jouent un rôle précoce dans le processus de réplication du VIH (Cohen *et al.*, 1990a). Tout d'abord, Vpr semble stabiliser le complexe formé des protéines et de l'ARN virales puisque les niveaux d'ADN complémentaires obtenus sont plus élevés en présence de Vpr (Kim *et al.*, 1998). Lors de la production virale, Vpr est localisée au site d'assemblage en étroite association avec le précurseur Gag. Par ailleurs, des expériences d'immunoflorescences effectuées en absence de Gag situent la protéine Vpr du VIH-1 à l'intérieur du noyau cellulaire. L'hélice N-terminale et l'hélice centrale de Vpr sont importantes pour la localisation nucléaire de la protéine (Mahalingam *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1995c; Zhao *et al.*, 1994a). Le ciblage nucléaire en absence du précurseur Gag suggère que Vpr subit une translocation à l'intérieur du noyau suite à l'entrée et à la décapsidation virale. Par ailleurs, plusieurs études démontrent que Vpr détient une fonction importante dans l'infection des cellules quiescentes telles que les macrophages. Vpr fait partie intégrante du complexe de

préintégration et, en association avec la p17 et l'intégrase, contribuent à la localisation intra-nucléaire de l'ADN génomique viral (Emerman, 1996b; Stevenson *et al.*, 1995; Trono, 1995). En effet, par un mécanisme dont les détails sont encore mal connus, Vpr participe au transport et à la translocation du complexe de préintégration du cytoplasme au noyau. Vpr, par l'entremise de son hélice centrale, semble agir comme une karyophérine- β en permettant le positionnement du complexe de pré-intégration au niveau des pores nucléaires suite à des interactions avec des protéines de transports cellulaires (Fouchier *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 1998; Popov *et al.*, 1998; Subbramanian *et al.*, 1998a; Vodicka *et al.*, 1998).

Une autre fonction importante de Vpr est sa capacité à induire un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire (Rogel *et al.*, 1995). Cette fonction, principalement reliée à l'extrémité C-terminal de Vpr, résulte en l'inactivation par hyperphosphorylation de la kinase cdc2 qui régule la transition de la phase G2 à la mitose (He *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Pour remplir sa fonction, Vpr semble activer la phosphatase 2A qui provoque, par l'intermédiaire de kinases, la phosphorylation de cdc2 (Tung *et al.*, 1997). La phase G2 du cycle cellulaire favorise la synthèse des protéines. Par conséquent, l'arrêt du cycle cellulaire en G2 induit par Vpr provoque une synthèse accrue des protéines virales et donc l'augmentation de la production virale (Chun Goh *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998b). De plus, Vpr peut transactiver le LTR du VIH ainsi que d'autres promoteurs hétérologues favorisant d'autant la production virale (Cohen *et al.*, 1990b; Forget *et al.*, 1998). À ce titre, l'activité combinée de Vpr et Vpu apparaît comme l'outil par excellence de la production virale alors que l'activité de Vif et Nef apparaît comme l'outil favorisant l'assemblage et l'infectivité optimales des particules virales. Ultimement, l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire provoquée par Vpr mène à la mort cellulaire par apoptose (Hrimech *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998b). *In vivo*, Vpr semble aussi essentiel à la réplication du VIH puisque les animaux infectés par une souche n'exprimant pas Vpr ne développent pas d'immunodéficience alors que le retour à l'état sauvage du virus induit la maladie (Gibbs *et al.*, 1995; Hoch *et al.*, 1995; Wooley *et al.*, 1997).

Vpr est la deuxième protéine virale la plus abondante à l'intérieur du VIH-1 après Gag. Il semble que chaque précurseur Gag incorpore par l'intermédiaire du domaine p6 une molécule de Vpr à l'intérieur des virions (Cohen *et al.*, 1990a; Yu *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1990). Par conséquent, comme le précurseur Gag-Pol ne contient pas de domaine p6 et compte pour 10 à 20% du total des protéines Gag, la quantité de Vpr présente à l'intérieur des virus est d'environ 80 à 90% des protéines Gag. De plus, puisque environ

2000 molécules de Gag sont retrouvées à l'intérieur du VIH-1, ces données suggèrent que de 1600 à 1800 molécules de Vpr sont incorporées dans les particules virales. De ce fait, Vpr constitue la seule protéine du VIH-1 à être encapsidée en grande quantité à l'intérieure des virions sous forme mature. Vpx est aussi incorporée efficacement à l'intérieur du VIH-2. Par conséquent, Vpr et Vpx constituent d'excellents candidats pour cibler des séquences protéiques exogènes à l'intérieur du VIH (Boeke and Hahn, 1996; Matsuda *et al.*, 1993). En effet, l'enzyme de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) fusionnée à Vpr ou à Vpx peut être efficacement incorporée à l'intérieure du VIH (Park and Sodroski, 1996; Wu *et al.*, 1995). De plus, deux séquences protéiques pouvant potentiellement interférer avec la réplication du VIH ont été ciblées efficacement dans les particules virales. Ces partenaires de fusion comprennent la nucléase SN, une RNase capable de dégrader l'ARN virale et un mutant *trans*-dominant négatif de la protéase du VIH-1 (Pr*) (Wu *et al.*, 1996a; Wu *et al.*, 1996b; Wu *et al.*, 1995). La nucléase SN diminue le potentiel infectieux du virus de la leucémie murine (MLV) lorsqu'en fusion avec l'extrémité C-terminale du précurseur Gag de ce rétrovirus (Natsoulis *et al.*, 1995; Schumann *et al.*, 1997; Schumann *et al.*, 1996). En effet, l'incorporation spécifique de la nucléase SN via le précurseur Gag de MLV induit une dégradation spécifique de l'ARN virale. Par contre, le partenaire le plus efficace dans le cas du VIH s'est avéré être la protéine de fusion Vpr-Pr* qui diminue de 25 fois le potentiel infectieux du virus (Wu *et al.*, 1996a). Ces données indiquent que Vpr peut cibler à l'intérieure du VIH-1 des molécules inhibitrices pouvant interférer avec la réplication virale. Outre l'inhibition de la réplication du VIH, les protéines de fusion formées à partir de Vpr ou Vpx peuvent aussi être utilisées pour l'étude fonctionnel des protéines Gag ou Pol (Fletcher *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). En effet, l'utilisation de Vpr fusionnée à l'intégrase du VIH-1 a permis de démontrer *in vivo* la dimérisation de cette enzyme (Fletcher *et al.*, 1997).

6. Propriétés cytopathiques du VIH

6.1. Déplétion de la population des cellules T CD4⁺

La déplétion de la population des lymphocytes T CD4⁺ de type "helper/inducer" constitue le premier indicatif de l'altération du système immunitaire des individus infectés par le VIH. La capacité du VIH à se répliquer à l'intérieur des lymphocytes T CD4⁺ et d'induire des effets cytopathiques contribue de façon importante à l'immunodéficience sévère observée chez les sidéens (Tersmette *et al.*, 1989). La relation de cause à effet entre la réplication du VIH et la mort des cellules hôtes a rapidement été observée en laboratoire. En effet, la mort des cellules T CD4⁺, comme résultat direct de la réplication

du VIH, a pu être démontré aisément *in vitro* (Lifson *et al.*, 1986b). *In vivo*, le taux élevé de répliquions continuelles du VIH-1, même pendant la phase de latence clinique, induit une mort et un renouvellement rapide des lymphocytes T CD4⁺ (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages sont les deux types cellulaires les plus susceptibles à l'infection par le VIH. Par contre, contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ les monocytes/macrophages sont relativement résistants aux effets cytopathiques induits par le VIH (Gendelman *et al.*, 1989). Le modèle actuel propose que les monocytes/macrophages servent de réservoir de production au VIH et propagent le virus dans plusieurs organes du corps pour atteindre et détruire les lymphocytes T CD4⁺.

La déplétion des cellules T CD4⁺ est due aux effets cytopathiques directs et indirects induits par le VIH. Les effets cytopathiques directs tels que la formation de cellules multinuclées ou syncytiums et la lyse cellulaire impliquent une répliquion virale active à l'intérieur des cellules cibles. Les effets cytopathiques indirects comme l'apoptose ou l'autoimmunité peuvent être la conséquence d'une répliquion virale à distance et concernent donc la mort de cellules non-infectées (Levy, 1993). La contribution relative de chacun de ces mécanismes responsables de la perte progressive des cellules T CD4⁺ demeure difficile à déterminer avec précision. Cependant, il semble que les effets cytopathiques indirects soient responsables de la mort d'un nombre plus important de cellules cibles que les effets cytopathiques directs. Par exemple, à l'intérieur des ganglions lymphatiques, pour chaque lymphocytes T CD4⁺ subissant une infection productive et donc susceptible à une mort cellulaire directe, plus de 2000 cellules T CD4⁺ non-infectées meurent par apoptoses.

6.2. Mécanismes d'induction de la mort cellulaire

6.2.1. Formation de syncytium

La mort des cellules cibles du VIH peut être causée par la formation de cellules multinuclées, la nécrose et l'apoptose. La formation de cellules multinuclées, aussi appelées syncytiums, résulte de la fusion membranaire entre cellules infectées et cellules saines. Le procédé de fusion membranaire est lié à la cytopathicité et à la mort cellulaire induite par le VIH. Par conséquent, il semble directement impliqué dans la déplétion des cellules T CD4⁺ lors de la répliquion du VIH (Haseltine, 1988). Dans le cas de la pathogénèse associée au SIDA, la formation de syncytiums fut pour la première fois décrite suite à la culture *in vitro* de cellules T CD4⁺ infectées par le VIH-1. En effet, des syncytiums apparaissent seulement 2 à 3 jours après l'infection de PBMC *in vitro*. Ce

phénomène constitue la première manifestation cytopathique de l'infection par le VIH. La mort cellulaire peut être provoquée par la lyse immédiate des cellules, lors de la fusion d'une cellule infectée à une cellule saine mais possiblement aussi par la lyse des syncytiums. La formation importante de syncytiums *in vivo* demeure hypothétique puisque ces derniers n'ont été observés qu'au niveau du cerveau des individus séropositifs (Pang *et al.*, 1990).

La fusion cellulaire est dépendante de la température et implique les glycolipides et hydrates de carbones des membranes cellulaires (Dragic *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 1987). La molécule CD4 ainsi que les glycoprotéines d'enveloppes gp120 et gp41 jouent un rôle certain dans le processus de fusion cellulaire. L'attachement CD4:gp120 lors de la fusion implique la liaison de régions différentes entre ces molécules par rapport à la liaison du virus à la cellule dans le cas de l'infection virale. En effet, la formation de syncytiums peut être reliée spécifiquement à des régions de la gp120 différentes des régions impliquées dans l'attachement du virus à la cellule cible (Andeweg *et al.*, 1993; Lifson *et al.*, 1991). La gp41 contient aussi un ou plusieurs déterminants impliqués dans la fusion membranaire entre une cellule infectée et une cellule saine (Freed *et al.*, 1992; Steffy and Wong-Staal, 1991). De plus, outre la molécule CD4, plusieurs autres protéines membranaires telles que les co-récepteurs, LFA-1 et CD7 participent à la fusion membranaire puisque l'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines bloque la formation de syncytiums (Hildreth and Orentas, 1989). La fusion entre cellules CD4⁺ infectées et cellules CD4⁺ saines peut mener à une lyse cellulaire rapide et donc survenant avant la formation de syncytiums. Plusieurs études suggèrent que cette lyse cellulaire est déclenchée suite à l'induction du processus de nécrose (Cao *et al.*, 1996; Heinkelein *et al.*, 1995). Cependant, étant donné la présence abondante des protéines virales nécessaires à la formation de syncytiums, l'association directe de cette lyse cellulaire à la fusion membranaire ainsi que son importance relative en terme de pathogénèse induite par le VIH reste à déterminer.

6.2.2. Toxicité du virus et des protéines virales

Plusieurs observations relient la mort cellulaire à une toxicité directe induite par le virus et les protéines du VIH (Garry, 1989). L'accumulation intra-cellulaire d'ADN génomique viral peut être toxique et induit la mort cellulaire *in vitro*. *In vivo*, des dommages neurologiques ont été associés à la présence de niveaux élevés d'ADN viral non-intégré à l'intérieur des cellules neurales (Pang *et al.*, 1990). Cependant, la toxicité

associée à l'accumulation d'ADN dans les lymphocytes CD4⁺ ou les monocytes/macrophages n'a jamais pu être observée *in vivo*. Par conséquent, l'importance de ce phénomène dans la pathogénèse du VIH reste à déterminer. Par ailleurs, la cytopathicité induite par le VIH-1 est largement associée aux glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41. En effet, la toxicité observée suite à la mise en contact de virus irradiés à des cellules CD4⁺ est présumément due aux glycoprotéines de l'enveloppe virale (Rasheed *et al.*, 1986). La quantité relative ainsi que l'étendue de la glycosylation de la gp120 produite par les cellules infectées déterminent l'importance de la toxicité associée à cette protéine (Lifson *et al.*, 1986a). La gp120 est libérée ou relarguée par les particules virales ainsi que par les cellules infectées pour se retrouver libre dans le milieu extracellulaire. Pour cette raison, plusieurs études ont reproduit cette situation pour constater que la gp120 pouvait altérer les cellules même à distance. Par exemple, l'addition de gp120 à des PBMC ou à des cellules neurales en culture cause la mort cellulaire de façon dose-dépendante (Kaiser *et al.*, 1990). De plus, plusieurs études suggèrent que la présence de gp120 à la surface de cellules CD4⁺ infectées ou non-infectées peut activer le complément qui par la suite induit la lyse cellulaire (Susal *et al.*, 1994). La production de gp41 est aussi toxique pour les cellules infectées (Miller *et al.*, 1991). La gp41 peut seule induire la fusion membranaire qui accompagne la mort cellulaire. Il semble que la gp 120 et la gp41 causent plusieurs perturbations au niveau de la perméabilité membranaire. Ces perturbations comme l'influx incontrôlable des cations mono- ou divalents déstabilisent le potentiel électrique de la cellule et compromettent plusieurs fonctions cellulaires (Voss *et al.*, 1996). Enfin, l'accumulation du précurseur gp160 sans la sécrétion des produits de clivage gp120 et gp41 induit la mort cellulaire par apoptose (Lu *et al.*, 1994).

Plusieurs autres protéines virales sont impliquées dans la toxicité menant à la mort cellulaire. Le transactivateur Tat comme la gp41 contiennent des domaines démontrant une forte homologie avec la famille des neurotoxines. Aussi, Tat cause la mort des cellules neurales et induit l'apoptose des cellules CD4⁺ (Li *et al.*, 1995; Sabatier *et al.*, 1991). Par ailleurs, la protéine Nef modifie aussi le potentiel membranaire lorsque mise en contact avec des cellules en culture. De plus l'expression de Nef et sa localisation au niveau de la membrane cellulaire peut provoquer la mort de cellules CD4⁺ saines seulement par contact cellule:cellule (Fujii *et al.*, 1996). Le gène *vif* est aussi lié à la cytopathologie du VIH probablement en augmentant l'infectivité et donc la réplication du virus (Sakai *et al.*, 1991). Vpu et Vpr forment potentiellement des canaux ioniques et pourraient induire, tout comme Nef et les glycoprotéines de l'enveloppe, des perturbations

dans l'homéostasie électrique de la cellule menant à la mort cellulaire (Lamb and Pinto, 1997a). De plus, l'arrêt du cycle cellulaire en G2 résultant de l'expression de Vpr ou de la gp120 provoque la mort cellulaire par apoptose (Kolesnitchenko *et al.*, 1995; Poon *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998b).

6.2.3. Effets cytopathiques indirects

Parmi les effets cytopathiques indirects induits par le VIH, l'autoimmunité et plus particulièrement l'apoptose semble détenir une importante responsabilité dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺. La mort massive par apoptose de cellules non-infectées pourrait constituer une caractéristique essentielle de la pathogénèse du VIH qui mène à la destruction du système immunitaire. En effet, les chimpanzés infectés par le VIH-1 qui possèdent une population mixte de cellules CD4⁺ infectées et non-infectées résistantes à la mort cellulaire par apoptose, même suite à l'ajout d'un inducteur tel que Tat, ne développent pas d'immunodéficience sévère (Gougeon, 1997; Gougeon *et al.*, 1993). Par contre, l'apoptose des cellules CD4⁺ peut être observée à partir de macaques infectés par le VIS qui développent le syndrome d'immunodéficience acquise (Gougeon *et al.*, 1993).

L'apoptose n'est pas uniquement induite par le VIH mais constitue avec la nécrose un mécanisme général de mort cellulaire. Le phénomène d'apoptose se produit normalement durant l'embriogénèse, la maturation thymique et au cours d'autres procédés de différenciation cellulaire. La mort cellulaire par apoptose peut aussi résulter d'autres stimuli incluant l'infection virale. Notamment, le virus Epstein-Barr (EBV), le virus de la choriomeningite lymphocytaire et le VIH sont parmi les virus capables de provoquer la mort cellulaire par apoptose (Tian *et al.*, 1996). L'apoptose requiert l'activation cellulaire, la synthèse de protéines *de novo*, et une endonucléase endogène dépendante du calcium capable de cliver l'ADN génomique de la cellule. Suite à un stimulus, la présence de ces conditions provoquent une fragmentation de l'ADN cellulaire et une condensation de la chromatine à l'intérieur du noyau. La cellule se sépare ensuite en plusieurs macrovésicules appelées corps apoptotiques que les macrophages ingèrent par phagocytose. Bien que toujours hypothétique, la mort par apoptose d'une cellule infectée et l'ingestion subséquente des corps apoptotiques par les macrophages pourraient contribuer à la propagation du VIH.

L'apoptose est reliée à une réplication active du VIH et à la progression de la maladie. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ peuvent mourir par apoptose chez les individus infectés

par le VIH bien que la déplétion par ce mécanisme soit plus importante pour les lymphocytes CD4⁺ (Gougeon *et al.*, 1996). L'induction de l'apoptose peut être le résultat de l'interaction de cytokines avec leur récepteur (par exemple la liaison de Fas et Fas-ligand) et/ou de l'expression de protéines virales tel que Tat, Vpr, la gp120 et la gp41. Chez les individus infectés par le VIH, l'augmentation du phénomène d'apoptose semble correspondre à une hyper-sensibilisation des lymphocytes suite à une stimulation par Fas (Estaquier *et al.*, 1996; Silvestri *et al.*, 1996). De plus, tel que décrit précédemment, les glycoprotéines de l'enveloppe gp120 et gp41 peuvent induire l'apoptose, notamment suite à la formation de complexes gp120:gp41:CD4. Les cellules CD4⁺ exprimant Vpr sont bloquées en phase G2 du cycle cellulaire et meurent ultimement par apoptose (Chun Goh *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998b). Tat détient un double rôle et semble agir comme régulateur de la mort cellulaire par apoptose. D'abord, Tat prévient l'apoptose des cellules qui l'expriment. Cette donnée pourrait expliquer l'absence d'apoptose chez les cellules infectées retrouvées dans les tissus lymphoïdes ainsi qu'au niveau du cerveau (McCloskey *et al.*, 1997). Par contre, Tat induit l'apoptose des lymphocytes normaux non-infectés en association avec l'activation d'une kinase dépendante des cyclines (Li *et al.*, 1995). De plus, Tat augmente la mort par apoptose des cellules T sensibilisées au préalable par Fas, le TNF- α ou l'anticorps anti-CD3 (McCloskey *et al.*, 1997). La double activité de Tat sur l'apoptose est intéressante étant donnée la présence de cette protéine virale dans le milieu extra-cellulaire et sa capacité d'entrer et de stimuler les cellules non-infectées (Caputo *et al.*, 1995). Par conséquent, il est possible que Tat, seul ou en association avec d'autres facteurs cellulaires ou virales, induise la mort des cellules saines environnantes tout en protégeant les cellules infectées leur permettant ainsi de produire un maximum de virus.

Les superantigènes semblent aussi impliqués dans la perte de cellules T lors d'infections rétrovirales. Les superantigènes lient la chaîne alpha du CMH II en même temps que la chaîne beta du TCR ("T-cell receptor") et provoque une stimulation non-spécifique pouvant mener à une mort cellulaire par apoptose. L'action des superantigènes provoque donc un débalancement du répertoire des cellules T en créant plusieurs expansions et délétions oligoclonales pouvant compromettre la réponse immunitaire. Plusieurs études ont démontré des variations importantes au niveau du répertoire V β des cellules T chez les individus infectés par le VIH (Imberti *et al.*, 1991; Rebai *et al.*, 1994). De plus, une anergie touchant spécifiquement certains clones V β a été observée dans des populations de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ (Dadaglio *et al.*, 1994). Toutefois, ces études, qui semblent dépendre de la cohorte de patients examinés ou d'autres facteurs

environnementaux, sont controversées puisque des résultats inverses ont aussi été obtenus (Cossarizza, 1997; Westby *et al.*, 1996). Certains rétrovirus, tel que le virus MMTV ("murine mammary tumor virus"), pourraient produire une protéine agissant comme superantigène menant à l'apoptose. L'apoptose provoquée par un superantigène viral a aussi été proposée pour expliquer la déplétion massive des lymphocytes B dans le modèle murin du SIDA (Coffin, 1992). Dans le cas du VIH cependant, l'implication et l'identification d'un antigène viral capable d'agir comme superantigène n'ont toujours pas pu être mises en évidence.

7. Traitement du SIDA

Depuis les dernières décennies, la propagation du VIH a atteint des niveaux pandémiques et continue de s'étendre actuellement, notamment dans les pays en voie de développement. La diminution significative de la propagation du VIH à des niveaux contrôlables dépend de notre capacité à enrayer la morbidité associée au SIDA et ce à l'échelle planétaire. Plusieurs traitements prometteurs ont été générés et sont actuellement à l'étude tant en laboratoires qu'en clinique chez les individus infectés. Le développement d'une quantité impressionnante de stratégies anti-virales permet de croire que l'augmentation constante du nombre de décès relié au SIDA prendra fin d'ici les dix prochaines années (Figure 5). Actuellement, les inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase virale constituent les molécules anti-VIH les mieux connues et les plus utilisées en clinique pour contrer l'évolution de la maladie. De plus, le développement de mécanismes capables de provoquer la reconstitution efficace du système immunitaire chez les individus immunosupprimés demeure une priorité. Cependant, même avec un contrôle efficace de la réplication virale *in vivo* et la restauration du système immunitaire, prévenir l'infection des individus sains et donc la propagation du SIDA reste le but ultime et sûrement le plus grand défi.

7.1. Thérapies antivirales.

La reconnaissance du VIH comme agent étiologique du SIDA a forcé le développement d'inhibiteurs capables de bloquer la réplication du virus. L'AZT, un inhibiteur de la transcriptase inverse, est la première molécule à avoir démontré un effet thérapeutique bénéfique en clinique (Mitsuya and Broder, 1989). L'AZT semble inhiber les étapes terminales de la rétrotranscription de l'ADN génomique virale en compétitionnant avec les nucléosides utilisés par la RT. Bien qu'au début de la

l'AZT diminue les symptômes cliniques du SIDA, l'émergence de souches virales résistantes est rapidement observée lorsque ce médicament est administré en monothérapie (Gao *et al.*, 1992; Richman, 1992). De plus, la toxicité de l'AZT est responsable de l'apparition d'effets secondaires non-négligeables comme des problèmes de digestion et une importante toxicité au niveau de la moelle osseuse.

Néanmoins, l'efficacité relative de l'AZT a poussé le développement de plusieurs autres analogues de nucléosides moins toxiques tels que le ddi, le ddC, le d4T et le 3TC (Browne *et al.*, 1993). Malheureusement, comme l'AZT, l'effet antiviral de ces molécules peut être rapidement contrées suite à l'apparition de souches virales résistantes. De nombreuses études ont donc évalué par la suite l'importance de l'effet potentiellement synergique lors de l'utilisation de ces composés en combinaison (Eron *et al.*, 1995; Spruance *et al.*, 1997). L'utilisation de ces molécules en combinaison selon les différentes possibilités a permis d'identifier l'AZT et le 3TC comme l'association la plus efficace capable d'inhiber la réplication du VIH-1. En effet, la mutation de la méthionine à la position 184 de la RT qui confère la résistance du VIH-1 au 3TC restaure la sensibilité du virus à l'AZT (Eron *et al.*, 1995).

La protéase est la deuxième enzyme virale sur laquelle s'est concentrée le plus d'efforts pour générer des molécules pouvant inhiber la réplication du VIH-1. Tel que mentionné plus haut, la protéase est essentielle à la maturation du virus et donc à l'obtention de particules virales infectieuses. Cependant, l'effet des quatre candidats approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) américaine (sequinavir, ritonavir, indinavir et nelfinavir) bien que très efficace, est aussi rapidement annulé par l'émergence de virus résistants. Par conséquent, certains des anti-protéases sont actuellement donnés en triple-combinaison avec l'AZT et le 3TC. Les premières études publiées suite à l'administration de la trithérapie sont prometteuses et indiquent un contrôle persistant de la réplication du VIH et la restauration de la phase clinique asymptomatique. En effet, la trithérapie (ou HAART pour "highly active antiretroviral therapy") permet de baisser la quantité de virus libres dans le plasma sanguin à des niveaux inférieurs au seuil de détection permis par le RT-PCR. De plus, les données récentes indiquent que la trithérapie est responsable du déclin du taux de mortalité des individus sidéens avec moins de 100 cellules CD4⁺/µl et d'une remontée de leur nombre de cellules CD4⁺ (Hogg *et al.*, 1997). Bien que la trithérapie cause des nausées, de la fatigue et la diarrhée, dans la plupart des cas cette médication n'induit pas de toxicité majeure compromettant la durée du traitement. Cependant, pour éviter l'émergence de souches résistantes, la trithérapie

nécessite l'ingestion de plusieurs comprimés par jour selon un horaire stricte et exigeant. Pour cette raison, les utilisateurs de drogues injectables (UDI) atteints du SIDA sont majoritairement exclus de ce protocole.

Plusieurs autres stratégies sont aussi actuellement à l'étude. La troisième enzyme de Pol, l'intégrase, constitue notamment une cible importante étant donné son rôle essentiel dans le cycle de réplication du VIH. D'autres molécules comme le PMPA et la BEA-005 sont capables d'inhiber complètement la réplication du VIH en culture de cellules et chez les singes infectés (Bottiger *et al.*, 1997). Bien que l'apparition de virus résistants complique leur utilisation chez des individus infectés, leur efficacité demeure très prometteuse pour le traitement des individus victimes d'un accident impliquant du matériel biologique contaminé par le VIH. Aussi, parmi les thérapies antivirales envisagées on compte l'utilisation de bloqueurs des co-récepteurs pour bloquer l'entrée virale (Baba *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 1992), d'interférons pour inhiber la réplication virale (Meylan *et al.*, 1993), de protéines virales transdominantes négatives ou de molécules capables d'interférer avec certaines des protéines virales (gp120, gp41, Gagp55, MAp17, NCp7, Tat, Rev) (Chan *et al.*, 1997a; de Vreese *et al.*, 1996; Massiah *et al.*, 1994; O'Brien *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 1995), de ribozymes capables de cliver l'ARN viral ou d'anti-sens pour bloquer la traduction (Bridges and Sarver, 1995), de séquences en tandem d'ARN (TAR, RRE) pouvant séquestrer Tat ou Rev (Arrigo *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 1993) et d'autres approches ciblant les cellules infectées par le VIH (Laurence, 1990).

7.2. Restauration des défenses immunitaires

Jusqu'à présent, les stratégies thérapeutiques visent principalement à inhiber la réplication du VIH avec comme résultante la reconstitution automatique du système immunitaire. Une remontée du nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ a d'ailleurs été observée chez les patients suivant le protocole de trithérapie. En effet, plusieurs études présument que la diminution de la charge virale fournit un environnement favorable au renouvellement du système immunitaire. Notamment, la production d'anticorps et d'interleukine-2 (IL-2) augmente de même que l'activité CTL ("cytotoxic T-lymphocyte) et l'activité non-cytolytique des cellules CD8⁺ en réponse à une stimulation par les antigènes du VIH (Dadaglio *et al.*, 1992; Kelleher *et al.*, 1997; Mackewicz *et al.*, 1994). Cependant, le nombre plus élevé de cellules CD4⁺ présent chez un individu sous médication ne correspond pas nécessairement à une protection équivalente par rapport au moment où le nombre de cellules CD4⁺ était similaire au cours de l'histoire naturelle de

l'infection. Basée sur l'étude de la longueur des télomères, l'augmentation du nombre de cellules CD4⁺ semble résulter d'une redistribution des cellules à partir de différents sanctuaires plutôt que de l'apparition de nouvelles cellules naïves (Effros *et al.*, 1996; Wolthers *et al.*, 1996). De plus, même dans le cas de la trithérapie où les niveaux d'ARN viraux restent indétectables dans le plasma sanguin, le nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ ne remonte jamais aux niveaux qui précédaient l'infection. Avec des augmentations de cellules CD4⁺ limitées autour de 100 à 150 cellules/ μ l, une amélioration complète des fonctions immunitaires ne peut être obtenue, du moins à court terme. Pour atteindre cet objectif, l'approche immunitaire semble prometteuse (Kelleher *et al.*, 1997; Pantaleo, 1997). En effet, jusqu'à ce que de nouvelles avenues permettent d'obtenir une inhibition virale combinée à une stimulation efficace du système immunitaire, l'inhibition virale devra être suivie d'une restauration du système immunitaire par immunothérapie.

L'administration d'IL-2 seul ou en combinaison avec de l'IFN- ∞ constitue une stratégie d'immunothérapie capable d'augmenter le nombre de cellules CD4⁺ tout en diminuant le taux de réplication du VIH (Schnittman and Fauci, 1994; Schnittman and Fox, 1997). L'utilisation de pentoxifylline, de thalidomide ou d'anticorps anti-TNF- ∞ destinés à bloquer la fonction du TNF- ∞ donne des résultats préliminaires encourageants, notamment contre la perte de poids. L'IL-12 est aussi actuellement à l'étude puisque cette cytokine favorise la différenciation des cellules CD4⁺ de TH0 en TH1. Les cellules CD4⁺ de type TH1 augmentent l'immunité de type cellulaire qui contribue à un meilleur contrôle de la réplication du VIH par rapport à l'immunité de type humorale induite par les cellules TH2 (Clerici and Shearer, 1994). D'autres approches immunologiques incluent l'utilisation de thymopentine et d'INF- ∞ tous deux capables de diminuer la réplication du VIH bien que l'apparition de souches résistantes a été notée dans le cas de l'INF- ∞ (Merigan *et al.*, 1996). Au niveau cellulaire, l'expansion *ex vivo* suivie de la réinjection *in vivo* des cellules CD8⁺ peut diminuer l'apparition des signes cliniques associée au SIDA sans engendrer d'effet toxique important. D'ailleurs, l'administration de cellules CD8⁺ modifiées génétiquement pour produire de l'IL-2 ou simplement en combinaison avec de l'IL-2 semble une voie d'immunothérapie prometteuse (Pardoll, 1992).

Toutes ces stratégies visent principalement à stimuler directement ou indirectement la prolifération des cellules du système immunitaire déjà existantes. La possibilité de restaurer les fonctions immunitaires complètes chez les patients suivant un protocole de trithérapie reste à déterminer. Il est possible que, chez les individus infectés, le processus de déplétion de la population des cellules naïves soit difficile voire impossible à inverser.

La reconstitution adéquate de la population des cellules T naïves devrait faire appel à l'activité résiduel du thymus ou d'autres organes susceptibles de participer à la régénération des cellules T (McCune, 1998). En ce sens, l'oncostatin M, un membre de la sous-famille de l'IL-6, peut stimuler l'accumulation de cellules T immatures à partir de cellules hématopoïétiques. De plus, l'utilisation d'implants thymiques ou de thérapies visant les cellules souches de la moelle osseuse mérite d'être considérée (Gaulton, 1998).

7.3. Développement de vaccins

Aucune thérapie antivirale n'est encore capable d'inhiber complètement la réplication du VIH et de ramener aux sidéens une qualité de vie comparable à celle précédant l'infection. Malgré tout, l'avancement au niveau des thérapies antivirales est de loin supérieur à l'évolution du développement d'un vaccin pouvant inhiber la transmission du virus. Les vaccins sont séparés en trois catégories: les vaccins sous-unitaires, les vaccins atténués et les vaccins vivants ("live vaccine"). Les vaccins sous-unitaires consistent en l'injection d'une ou de plusieurs protéines virales qui stimule le système immunitaire. Cette stratégie est très peu efficace dans le cas du VIH étant donné la forte variation génétique du virus et conséquemment l'apparition rapide de souches résistantes. L'injection de virus atténués suite à un traitement chimique ou physique à des individus sains ne peut être envisagée puisque la transmission d'un seul virus infectieux pourrait suffire à l'établissement de l'infection. Enfin, l'utilisation de vaccins vivants c'est-à-dire de virus délétés pour un ou plusieurs gènes demeure une voie intéressante et activement étudiée bien que l'apparition de virus recombinants capable de se répliquer reste possible. Même après dix ans de recherche, la vaccination contre le VIH est toujours loin d'être acquise. Jusqu'à présent, plus de connaissances ont été obtenues concernant les raisons pour lesquels les vaccins ne fonctionnent pas plutôt que de connaissances sur les nouvelles stratégies de vaccinations. Cependant, bien que très peu d'expériences ont montrés des résultats concluant en indiquant une protection contre l'infection, certaines études ont fourni des résultats intéressants. Par exemple, l'injection de poxvirus recombinant exprimant la gp120 ainsi que Gag-Pol du VIH-2, associé à un rappel, provoque une protection à long terme chez les singes Rhésus même face à une seconde infection (Franchini *et al.*, 1995). Malheureusement, ces résultats n'ont pas pu être reproduits avec le VIS mettant en doute l'efficacité de cette approche concernant le VIH-1.

Les approches les plus efficaces impliquent une première immunisation avec une souche atténuée de l'ADN viral ou un vecteur tel que le poxvirus, l'adénovirus, le

poliovirus ou le Salmonelle. La première immunisation doit être suivie d'un ou de plusieurs rappels avec une protéine virale telle que la gp160 ou la gp120 (Myagkikh *et al.*, 1996; Robinson, 1997). Plusieurs raisons favorisent l'utilisation d'ADN viral comme vaccin. L'ADN est extrêmement stable, peu coûteux à générer même en grandes quantités et il induit l'expression des protéines virales dans le contexte des molécules du CHM I et du CMH II (Whalen, 1996). Le point important dans la mise au point d'un vaccin anti-VIH est de reconnaître que la transmission du virus se produit très efficacement par le biais des cellules infectées qui entrent à l'intérieur d'un individu sain. Par conséquent, la destruction de ces cellules infectées, avant que la transmission ne se produise, requière l'élaboration de nouveaux concepts pour la mise au point d'un vaccin capable d'empêcher l'établissement de l'infection (Levy, 1995).

8. La thérapie génique

La trithérapie constitue, à ce jour, le traitement antiviral le plus efficace à diminuer la réplication du VIH et les symptômes cliniques associés. Par contre, cette médication n'enraye pas complètement la réplication du virus chez les individus infectés, ce qui suscite de nombreuses interrogations concernant son applicabilité à long terme. En effet, le retour d'un haut niveau de réplication virale est observé suite à l'arrêt de la trithérapie. Cette donnée suggère la présence d'un ou plusieurs réservoirs contenant des cellules infectées qui sont faiblement susceptibles à l'effet de cette thérapie antivirale (Pantaleo, 1997). De plus, un traitement à long terme utilisant cette médication pourrait être faiblement toléré par les patients et favoriser le développement de souches virales résistantes. D'ailleurs, des études indiquent déjà un taux élevé d'échec dans le contrôle de la réplication du VIH chez les patients suivant un protocole de trithérapie ou d'inhibiteur de la protéase. En effet, de 30 à 50% des individus prenant la trithérapie (HAART) subissent les conséquences néfastes de l'apparition de virus résistants (Perrin and Telenti, 1998). De plus, les enfants, les utilisateurs de drogues injectables et les individus vivant dans des pays en voie de développement n'ont pas accès à la trithérapie pour des raisons de toxicité, de compliance ou de coût. En fait, il semble que la trithérapie est accessible à moins de 4% des individus infectés par le VIH en phase symptomatique. C'est pourquoi plusieurs autres stratégies thérapeutiques visant l'inhibition de la réplication du VIH sont encore actuellement en développement.

Dans ce cadre, la thérapie génique apparaît comme un palliatif thérapeutique prometteur. La thérapie génique consiste au transfert d'un ou plusieurs gènes thérapeutiques à

l'intérieur de cellules cibles d'un individu avec l'intention de produire un effet thérapeutique bénéfique (Anderson, 1992; Baltimore, 1988). Les approches de thérapie génique concernant les maladies infectieuses peuvent être séparées en trois catégories. Premièrement, les stratégies basées sur les acides nucléiques incluant les ADNs ou les ARNs anti-sens, les ARNs catalytiques ("ribozyme") et les ARNs leurres ("RNA decoys"). Deuxièmement les approches utilisant les protéines telles que les protéines transdominantes négatives et les anticorps mono-caténaire. Enfin, troisièmement, il y a les approches immunothérapeutiques impliquant l'utilisation de vaccins génétiques ou de lymphocytes spécifiques de pathogènes (Bunnell and Morgan, 1998). Un des avantages important de la thérapie génique est le choix d'obtenir, selon le vecteur utilisé, une expression stable ou transitoire du transgène à l'intérieur de la cellule cible. Dans le cas du SIDA, une expression stable est préférable puisqu'elle est alors une avenue thérapeutique de longue durée en plus de devenir une méthode d'immunisation. D'ailleurs, aussi appelé immunisation intra-cellulaire, la thérapie génique vise idéalement l'inhibition de la réplication du VIH et la protection active des cellules saines.

8.1 Modes de transduction de gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules cibles

Le niveau d'efficacité de la thérapie génique comme outil thérapeutique contre les maladies infectieuses telles que le SIDA dépend de plusieurs facteurs. D'abord de la sélection des cellules ou du tissu approprié qui seront ciblés par le transfert de gène. Ensuite, de l'efficacité du système de transfert de gènes responsable d'insérer le ou les gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules cibles. Enfin, de l'efficacité de l'effet inhibiteur sur la réplication du pathogène, obtenu suite à l'expression adéquate du transgène (Bunnell and Morgan, 1998).

Plusieurs systèmes de transfert de gènes sont actuellement disponibles et permettent l'expression du gène thérapeutique à l'intérieur des cellules cibles. Deux approches peuvent être utilisées pour le transfert de gènes ou la transduction des cellules cibles. Les cellules cibles peuvent être récoltées et modifiées *ex vivo* en culture de cellules avant d'être réimplantées chez l'individu ou elles peuvent être traitées directement *in vivo* suite à l'injection directe du vecteur. Bien que l'identification du gène thérapeutique et des cellules cibles appropriées est important, l'étape limitante demeure toujours l'efficacité avec laquelle le gène thérapeutique est introduit à l'intérieur des cellules cibles (Bunnell and Morgan, 1998; Robbins *et al.*, 1998). Les deux types de vecteurs utilisés pour les

applications de thérapie géniques sont d'origine virale ou non-virale. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont dérivés des rétrovirus, de l'adénovirus, du virus associés à l'adénovirus (AAV "adeno-associated virus") et des virus herpes-simplex. Les vecteurs non-viraux comprennent les liposomes et l'ADN conjugué ou non à des molécules chimiques qui améliore la stabilité et/ou le transfert de l'ADN à l'intérieur des cellules cibles. Ces derniers ont l'avantage de minimiser la réponse immunitaire pouvant être dirigée contre les cellules nouvellement transduites. Par contre, bien qu'ils soient potentiellement moins pathogènes, les vecteurs non-viraux démontrent une faible efficacité de transduction. En effet, la majorité des vecteurs viraux transfère les gènes thérapeutiques plus efficacement que les vecteurs non-viraux (Tani *et al.*, 1995; Woffendin *et al.*, 1994).

Il est important de noter que chacun des véhicules de transfert de gènes possède ses propres avantages et inconvénients. Par exemple, les adénovirus sont très efficaces en terme de transfert de gènes mais induisent une réponse immunitaire de type cellulaire et humorale qui diminue la durée d'expression du transgène (Yang *et al.*, 1996; Yang and Wilson, 1995). Par ailleurs, les vecteurs rétroviraux ne provoquent pas de réponse immunitaire importante mais transduisent moins efficacement les cellules cibles par rapport aux vecteurs adénoviraux (Tani *et al.*, 1995). L'environnement dans lequel doit s'effectuer le transfert, la taille et l'expression désirées du gène thérapeutique ainsi que la nature du tissu ciblé sont des variables cruciales à considérer avant de sélectionner la méthode de transfert de gènes. Conséquemment, l'amélioration de toutes les méthodes de transfert de gènes ainsi que le développement de nouvelles stratégies demeurent une priorité pour permettre un maximum d'efficacité thérapeutique indépendamment de la cible et de l'effet anticipés.

8.2 Les vecteurs rétroviraux

La majorité des transferts de gènes marqueurs/thérapeutiques à l'intérieur des cellules cibles du VIH ont été faits en utilisant les vecteurs rétroviraux comme véhicule de transfert. Tel que mentionné précédemment, les vecteurs rétroviraux ont le double avantages de permettre une expression stable du transgène tout en minimisant l'induction de la réponse immunitaire dirigée contre les cellules transduites. De plus, l'absence de pathogénéicité associée à leur utilisation ainsi que le maintien du gène thérapeutique à l'intérieur de la cellule cible et de la progéniture cellulaire a favorisé leur application en clinique. En effet, les vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la leucémie murine (MLV)

sont devenus les véhicules de transfert de gène les plus utilisés chez l'humain pour les applications cliniques de thérapie génique contre le VIH-1 (Bunnell and Morgan, 1998). L'infection de ces rétrovirus recombinants provoque l'intégration stable du matériel génétique d'intérêt à l'intérieur du génome cellulaire. Une fois intégré, le transgène peut être exprimé jusqu'à la mort de la cellule et/ou de sa progéniture.

Le virus MLV sauvage code pour les protéines Gag, Pol et Env comme tous les rétrovirus. L'utilisation des rétrovirus comme vecteurs provient de la possibilité de fournir en *trans* le produit des gènes *gag pol* et *env* pour former des particules rétrovirales capables d'entrer et de délivrer le matériel génétique voulu à l'intérieur des cellules cibles. En effet, la co-expression de ces protéines modifiées et de l'ARN rétroviral contenant le gène d'intérêt produit un virus infectieux incapable de se répliquer ultérieurement. Dans ce système, l'ARN codant pour le ou les gènes d'intérêts est encapsidé à l'intérieur des particules virales suite à la présence du signal d'encapsidation ψ , lequel est absent de l'ARN codant pour les gènes *gag pol* et *env* (Figure 6). Les rétrovirus recombinants peuvent être produits de façon stable ou transitoirement par transfection. Les lignées exprimant constitutivement le produit des gènes *gag pol* et *env* sont nommées lignées d'encapsidation et produisent en général une plus grande quantité de virus recombinants que les lignées transitoirement transfectées.

L'un des désavantages des vecteurs rétroviraux dérivés du virus MLV est leur incapacité à intégrer leur information génétique à l'intérieur des cellules quiescentes. En effet, les rétrovirus murin, contrairement aux lentivirus, requière la division cellulaire pour se répliquer. Pour cette raison, des vecteurs basés sur les lentivirus tel que le VIH, le VIS et le virus de l'anémie équine (EIAV) ont été développés. Cette nouvelle catégorie de vecteurs rétroviraux rend maintenant possible le transfert de gènes à l'intérieur de cellules quiescentes incluant les neurones, les îlots et les cellules musculaires (Blomer *et al.*, 1996; Naldini *et al.*, 1996). Cependant, ces nouveaux vecteurs posent toujours un problème de biosécurité étant donné la possibilité de créer des rétrovirus recombinants de nature inconnue et potentiellement léthales. Par ailleurs, la plus importante limitation associée à l'utilisation des vecteurs rétroviraux est probablement la production relativement faible de virus recombinants. Actuellement, les lignées d'encapsidation les plus performantes produisent jusqu'à 10^7 particules virales infectieuses par ml, ce qui, dans bien des cas, résulte en un transfert inefficace du gène d'intérêt. Par exemple, l'infection de PBMC en utilisant 10^7 particules virales/ml résulte en une efficacité de transduction moyenne variant entre 1 et 30% *ex vivo* (Tani *et al.*, 1995). Une fois réimplantées chez l'individu, les

cellules contenant le gène d'intérêt sont de nouveaux diluées pour atteindre environ 0.0001% du nombre total de PBMC (Kohn, 1997). Dans ces conditions, même un transgène pouvant inhiber complètement la réplication du VIH serait probablement incapable d'induire un bénéfice thérapeutique observable chez l'individu. Par conséquent, l'augmentation des titres rétroviraux associés aux lignées d'encapsulation constitue un objectif important en vue d'améliorer les niveaux de transduction inhérents à cette méthode. Jusqu'à présent, plusieurs stratégies ont été développées pour accroître le nombre de particules virales recombinantes infectieuses par ml. Notamment, le pseudotypage des particules recombinantes avec l'enveloppe du virus de la stomatis vésiculaire (VSV-G) a permis d'obtenir des titres viraux de 10^9 /ml après concentration par ultracentrifugation (Cosset and Russell, 1996). Aussi, l'optimisation des conditions de transduction, la sélection de clones cellulaires exprimant de hauts niveaux de virus et la concentration des particules virales par filtration améliore l'efficacité de transduction des cellules cibles (Bunnell *et al.*, 1995; Kotani *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 1993; Wirth *et al.*, 1994).

8.3 Stratégies de thérapie génique contre l'infection au VIH

Le traitement et la prévention de maladies génétiques ou acquises par thérapie génique constitue un champ de recherche en pleine évolution. La dernière décennie a vu la mise au point en laboratoire de plusieurs stratégies de thérapie génique rapidement transférées et évaluées en essais cliniques chez l'humain. Bien que la majorité des essais cliniques soient actuellement en phase 1, des effets bénéfiques ont déjà été observés concernant certaines stratégies élaborées plutôt pour observer la faisabilité que l'efficacité de l'approche (Bunnell and Morgan, 1998; Robbins *et al.*, 1998). Par ailleurs, jusqu'à présent, aucun bénéfice thérapeutique n'a pu être observé chez les patients suivant l'un des 17 protocoles cliniques de thérapie génique visant l'inhibition de la réplication du VIH. Seulement trois de ces études sont complétées mais déjà la possibilité qu'aucun bénéfice ne puisse être constaté suggère que certains protocoles de thérapie génique ont peut-être transités trop rapidement du laboratoire à la clinique. Pour cette raison, le retour en laboratoire pour continuer le développement et l'amélioration de stratégies anti-VIH est important. Aussi, plusieurs aspects concernant le transfert de gène doivent être améliorés, particulièrement l'efficacité de transduction des gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules cibles.

L'élaboration de plusieurs stratégies efficaces capables d'inhiber complètement ou sur une longue période de temps la réplication du VIH *in vitro* permet de croire qu'une ou

plusieurs d'entre elles pourront inhiber le VIH *in vivo*. Parmi les stratégies basées sur les anti-sens, celles dirigées contre les séquences des gènes *tat* et/ou *rev* donnent les meilleurs niveaux d'inhibition de la réplication du VIH dans les PBL ("peripheral blood lymphocytes") (Vandendriessche *et al.*, 1995). L'avantage principal des anti-sens est, comme la majorité des approches basées sur les acides nucléiques (ARNs catalytiques et ARNs leurres), l'absence d'immunogénéité. Par contre, les anti-sens doivent être exprimés à haut niveau et sur une longue période de temps pour optimiser leur effet inhibiteur, un objectif encore difficile à réaliser *in vivo*. Les ribozymes capables de cliver l'extrémité 5' non-traduite commune à tous les ARNs viraux ont aussi démontré une excellente efficacité contre la réplication du VIH dans les PBL humains (Leavitt *et al.*, 1994). L'expression constitutive de ces ribozymes peut aussi inactiver l'ARN génomique viral immédiatement après la décapsidation et donc avant l'intégration, permettant ainsi aux cellules saines de devenir résistantes au VIH-1 (Dropulic and Jeang, 1994; Yu *et al.*, 1993a). De plus, la fusion du signal d'encapsidation ψ aux ribozymes permet à ces derniers d'être ciblés à l'intérieur des virions et donc d'augmenter leur habilité à inhiber la réplication virale (Sullenger and Cech, 1993). Comme dans le cas des anti-sens, plusieurs ARNs leurres ont été générés et sont capables d'interférer avec la réplication du VIH. Les plus efficaces sont formés par des séquences TAR et/ou RRE en tandem (Lee *et al.*, 1992; Lisziewicz *et al.*, 1993). L'avantage principal des ARNs leurres est que l'émergence de virus résistants est improbable puisque la perte d'affinité avec le leurre doit aussi résulter en la perte d'affinité avec l'ARN viral. Des mutations co-évolutives, apparaissant par exemple dans la séquence TAR et en même temps dans le gène *tat*, pourraient produire des virus résistants. Par contre, ce type de mutations coordonnées n'a encore jamais été décrit. Le désavantage des ARNs leurres est qu'ils fonctionnent souvent en séquestrant des facteurs cellulaires qui peuvent être essentiels au maintien de l'homéostasie cellulaire (Lee *et al.*, 1994).

Une autre classe importante de molécules thérapeutiques dirigées contre la réplication du VIH comprend les protéines transdominantes négatives. La plus connue et l'une des plus efficace est la protéine RevM10 qui contient deux mutations à la position 78 et 79 à l'intérieur du domaine catalytique de la protéine. Ces mutations permettent la multimérisation de RevM10 avec lui-même et avec les protéines Rev de type sauvage mais induisent une perte de l'activité fonctionnelle du multimère (Malim *et al.*, 1989). Par conséquent, les ARNs viraux pleine longueur et mono-épissés ne sont pas transportés dans le cytoplasme mais sont plutôt dégradés dans le noyau provoquant une inhibition importante de la réplication du VIH (Bahner *et al.*, 1993; Ragheb *et al.*, 1995; Woffendin

et al., 1994). Les anticorps mono-caténaire font aussi partie de la classe des protéines détenant un potentiel inhibiteur sur la réplication du VIH. Jusqu'à présent, le plus performant semble être l'anticorps mono-caténaire dirigé contre le transactivateur Tat qui peut bloquer la réplication du VIH *in vitro* (Maciejewski *et al.*, 1995). Enfin, les fusions de Vpr avec la protéase virale *trans* dominante négative et avec l'anticorps monocaténaire dirigé contre l'intégrase diminuent le potentiel infectieux du VIH-1 d'environ 25 et 1000 fois respectivement (Wu *et al.*, 1996a).

Toutes les molécules mentionnées ci-haut retardent la réplication du VIH-1 avec une efficacité inversement proportionnelle à la charge virale employée lors de l'infection. Ces molécules, qui constituent les meilleurs candidats de chaque approche, semblent affecter la réplication du VIH-1 avec une efficacité comparable. Évidemment, plusieurs variables compliquent et rendent difficile la comparaison du potentiel inhibiteur de chacune de ces molécules. Par contre, la majorité de ces stratégies sont testées ultimement dans les cellules CD4⁺ primaires (PBL) humaines transduites par un vecteur d'expression comparable et infectées avec une charge virale équivalente. Cette similarité au niveau des conditions expérimentales permet une comparaison approximative des différents effets inhibiteurs observés. À efficacité égale, les stratégies privilégiées seront probablement celles qui ne favorisent pas l'émergence de virus résistants. Malgré que l'effet inhibiteur relié à la majorité de ces approches soit susceptible d'être contourné par l'apparition de souches résistantes, très peu d'études ont été faites à ce sujet. Plusieurs travaux mentionnent la possibilité que des virus résistants émergent et ce pour la plupart des stratégies de thérapie génique destinées à inhiber le VIH. Cependant, encore aucune étude n'a été effectuée dans le but de démontrer *in vitro* l'apparition de virus résistants capables de se répliquer même en présence du transgène. Parmi les études cliniques actuellement en cours contre l'infection au VIH, trois emploient les ribozymes, deux les anticorps mono-caténaire, une les ARNs leurres, une la protéine RevM10 et une dernière emploie un autre mutant transdominant négatif de Rev associé à un anti-sens anti-Tat (Bunnell and Morgan, 1998). La compilation des résultats concernant ces études cliniques amènera plusieurs nouvelles données sur l'inhibition de la réplication du VIH *in vivo* et donc sur le potentiel thérapeutique de la thérapie génique destinée à combattre le SIDA.

9. Problématique

Les protéines accessoires Vpu et Vpr du VIH-1 détiennent plusieurs fonctions décrites dans la section précédente. Parmi ces fonctions, Vpu induit une augmentation de

la relâche des particules virales de plusieurs types cellulaires infectés par le VIH-1. De plus, Vpu provoque l'augmentation de la production des particules virales d'autres rétrovirus tel que MoMuLV et VISNA. Cependant, aucune étude ne démontre la possibilité d'utiliser cette fonction spécifique de Vpu pour augmenter les titres viraux associés aux lignées d'encapsulation rétrovirales.

Par ailleurs, Vpr est spécifiquement incorporé à l'intérieur du VIH-1 probablement via une interaction entre son hélice N-terminal et le motif LXXLF du domaine p6 de Gag. Quelques travaux indiquent que Vpr peut incorporer différentes séquences d'acides aminés à l'intérieur du VIH-1 dans le contexte d'une protéine de fusion et ainsi diminuer le potentiel infectieux du virus. Par contre, le domaine minimal de Vpr responsable de l'incorporation de ces protéines de fusion à l'intérieur des virions est inconnu. Aussi, l'effet inhibiteur sur la réplication du VIH-1 en culture de cellules suite à l'incorporation intravirale de ces protéines de fusion reste à déterminer. Enfin, aucune évidence ne permet actuellement de croire que cette stratégie pourrait être efficace devant l'immense diversité génétique du VIH-1 et ainsi empêcher l'apparition de souches virales résistantes.

Les objectifs de cette étude sont:

- 1) Déterminer si l'expression de Vpu dans des lignées d'encapsulation rétrovirales peut induire une augmentation significative de la production virale des vecteurs recombinants.
- 2) Identifier le domaine minimal de Vpr capable de cibler efficacement des partenaires de fusion à l'intérieur du VIH-1.
- 3) Caractériser l'effet de ces protéines de fusion sur la réplication du VIH-1 suite à leur expression dans des lymphocytes T CD4⁺ en culture cellulaire.
- 4) Vérifier si cette approche permet l'apparition de virus résistants pouvant se répliquer efficacement en présence des protéines de fusion.
- 5) Établir les bases nécessaires à la production d'une deuxième génération de protéines de fusion capables d'inhiber plus efficacement la réplication du VIH-1.

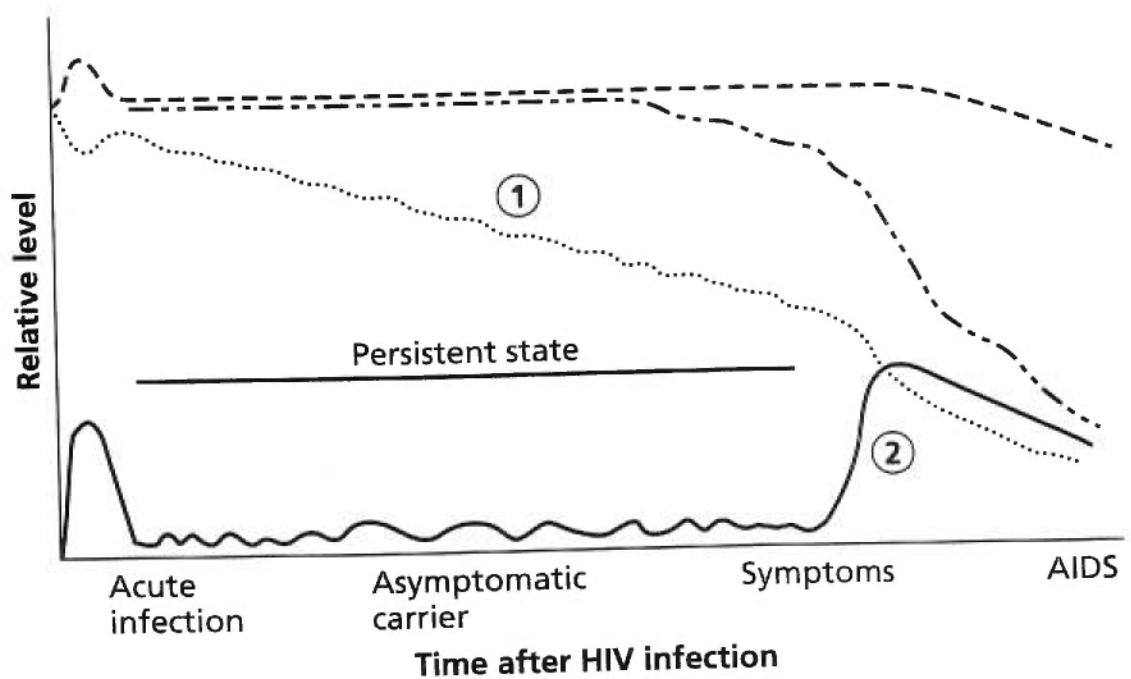


Figure 1: Représentation schématique de la progression de l'infection induite par le VIH-1 (adapté de Jay A. Levy dans "HIV and the pathogenesis of AIDS", deuxième édition, page 318, 1998). La ligne pleine (____) représente la charge virale, les pointillés (.....) le nombre relatif de cellules CD4+, le trait suivie des deux points (-.-.-.-) nombre relatif de cellules CD8+ et les traits pointillés (-----) la réponse immunitaire.

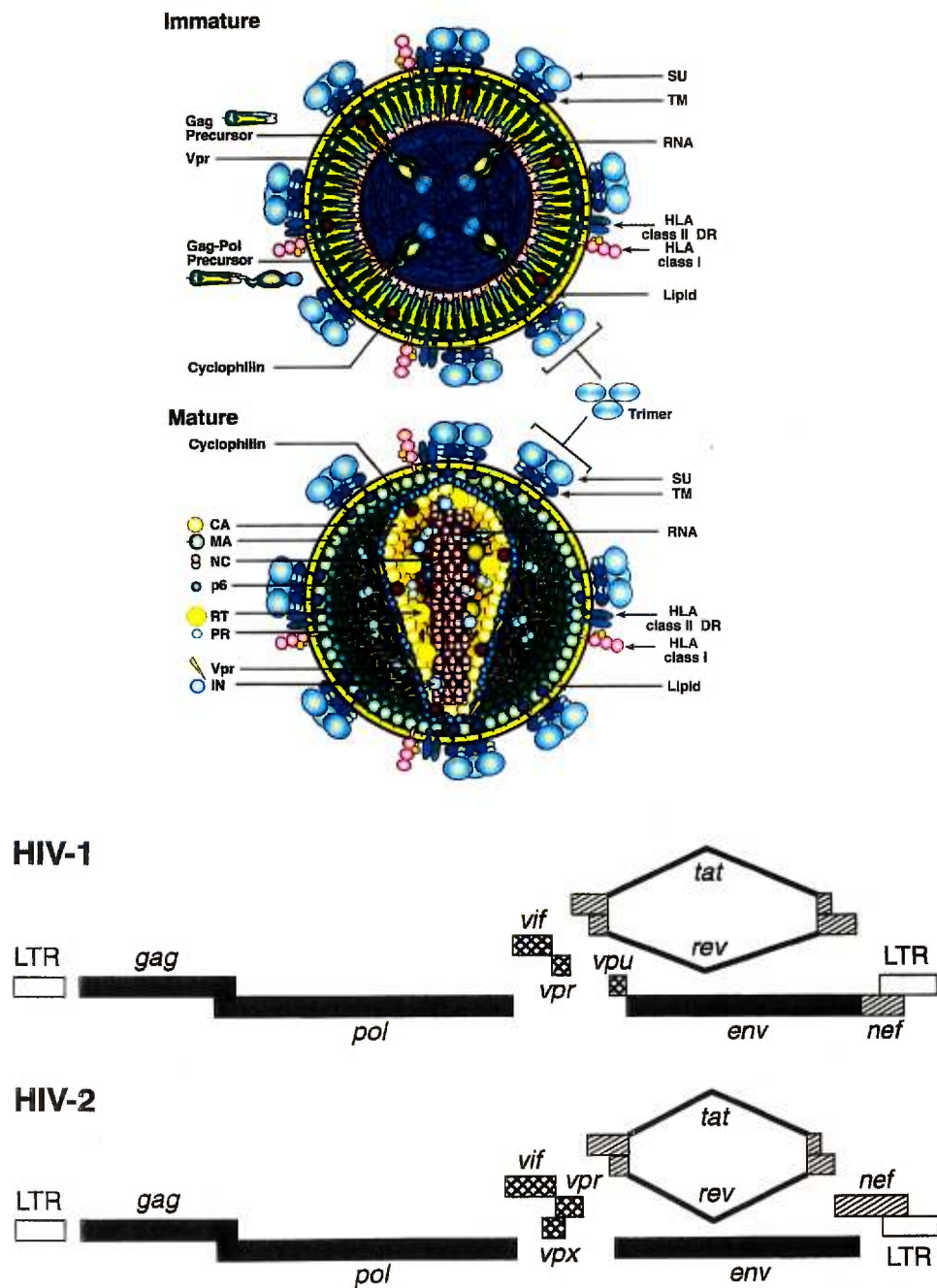


Figure 2: Modèles de l'organisation structurale et génomique du VIH-1 (adapté de Jay A. Levy dans "HIV and the pathogenesis of AIDS", deuxième édition, page 11, 1998 et de Coffin J. M. *et coll.* dans "Retroviruses", page 34, 1998).

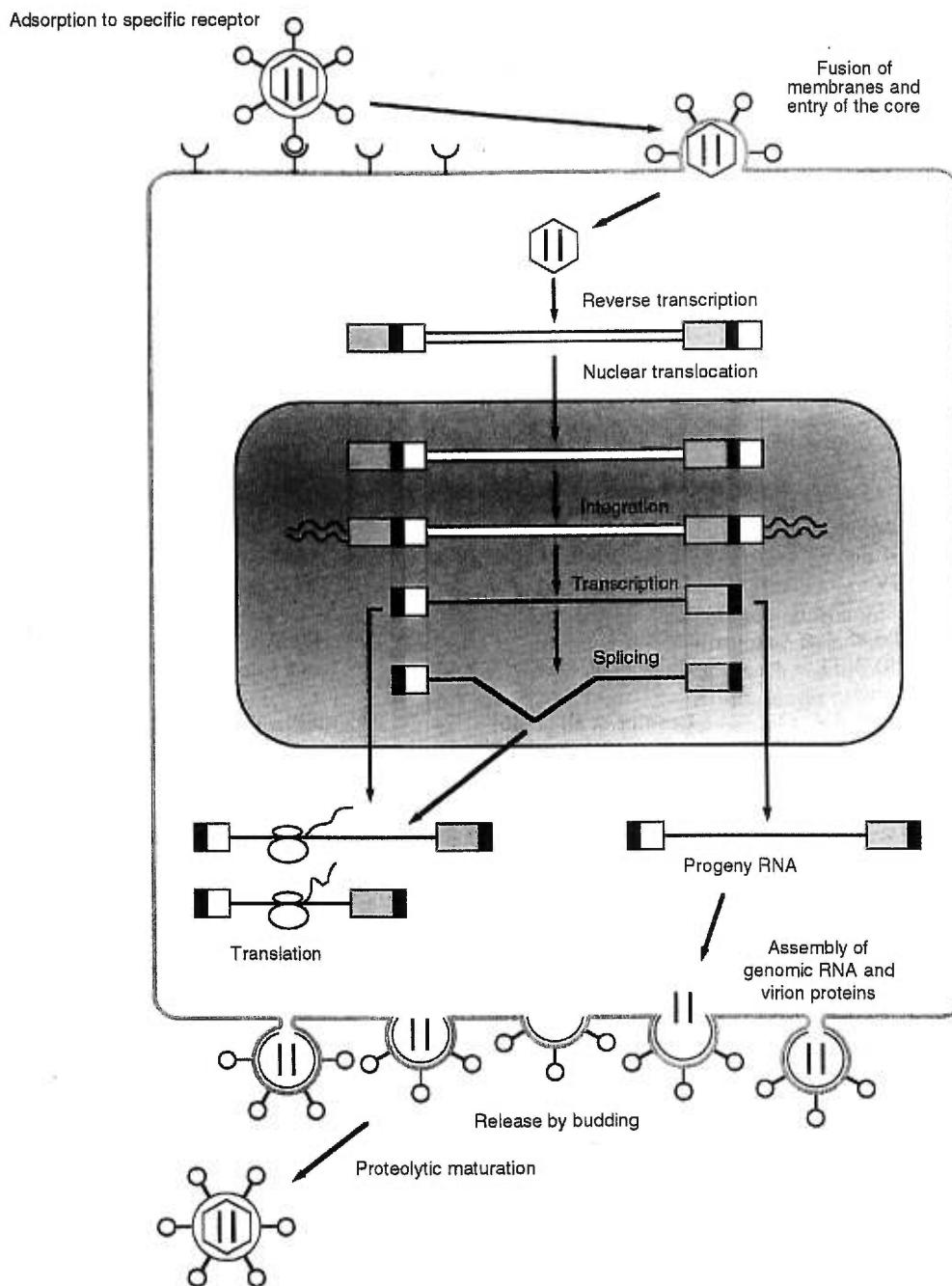


Figure 3: Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1 (adapté de Coffin J. M. *et coll.* dans "Retroviruses", page 8, 1998).

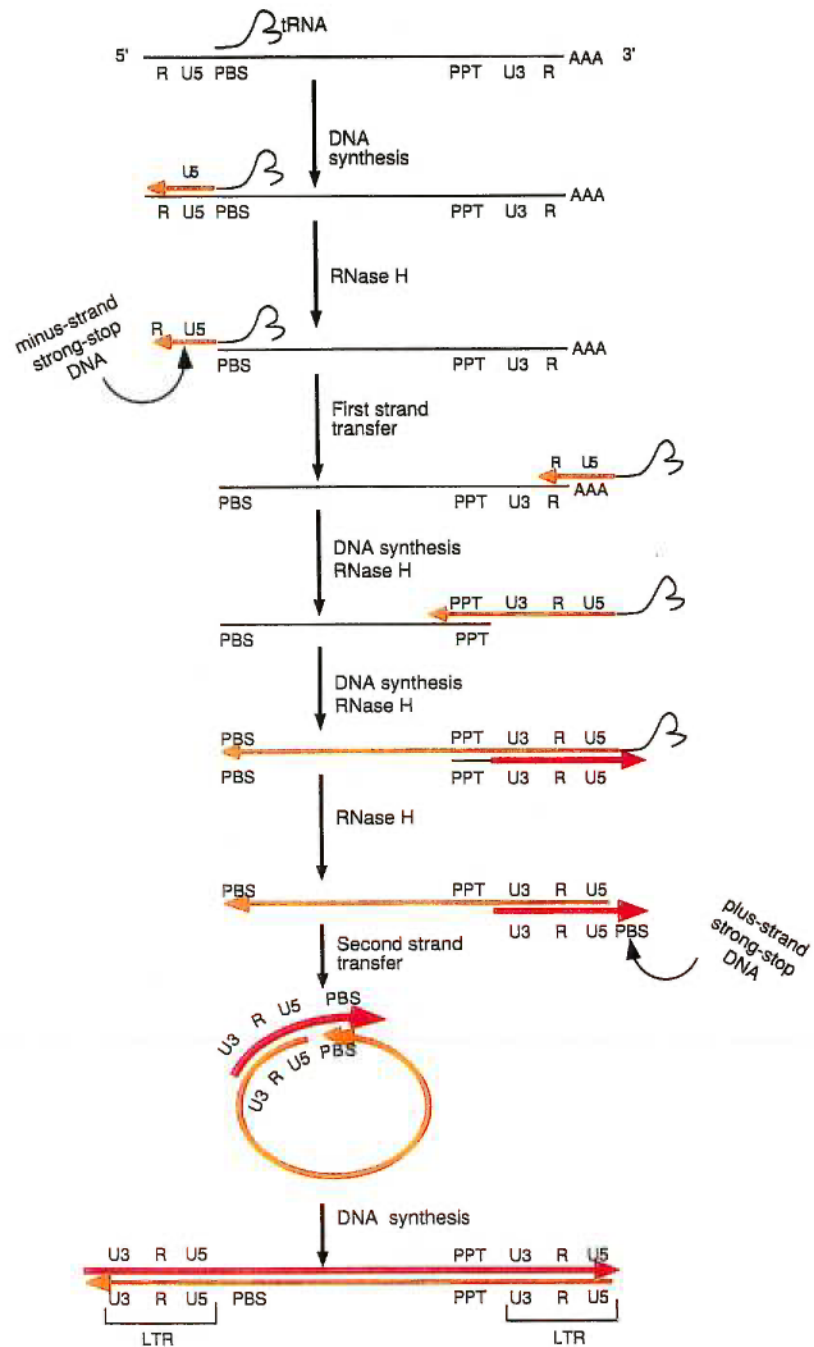


Figure 4: Mécanisme moléculaire de la transcription inverse des génomes rétroviraux (adapté de Coffin J. M. *et coll.* dans "Retroviruses", page 123, 1998).

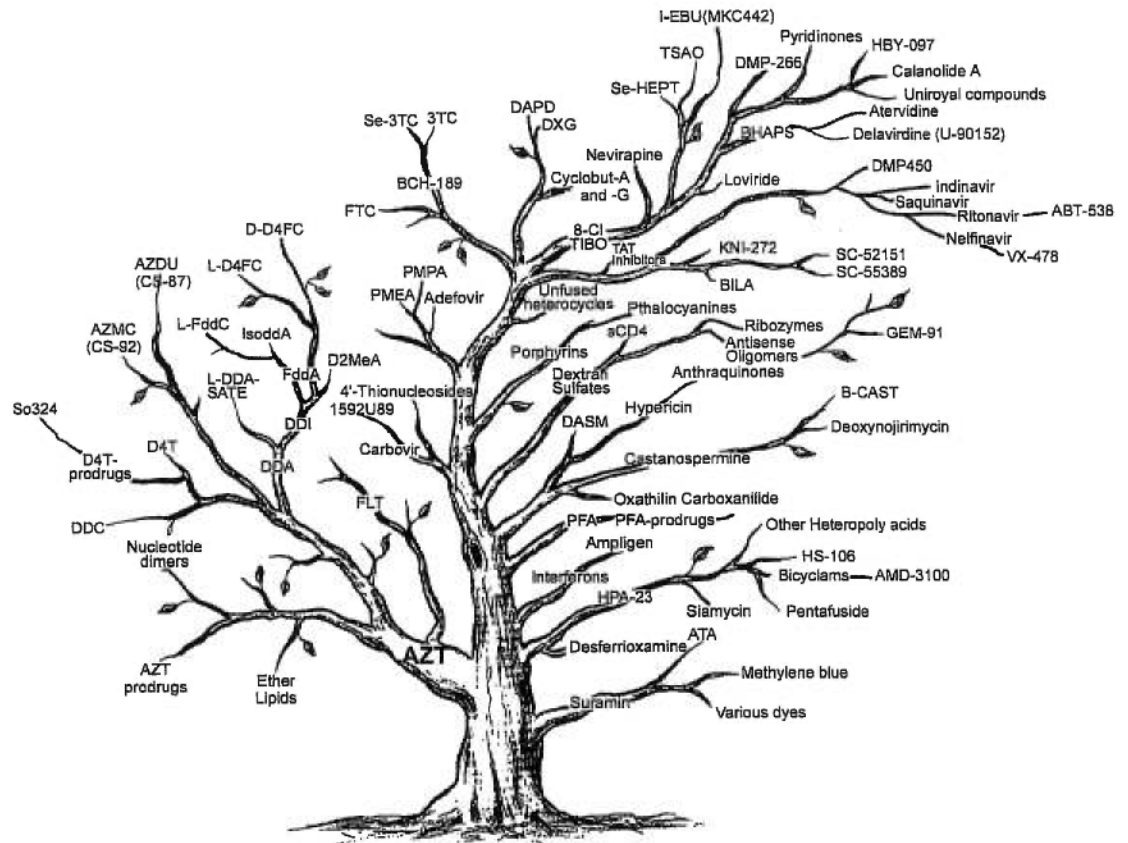


Figure 5: Représentation schématique du développement des molécules anti-VIH dans le temps (adapté de Jay A. Levy dans "HIV and the pathogenesis of AIDS", deuxième édition, page 340, 1998).

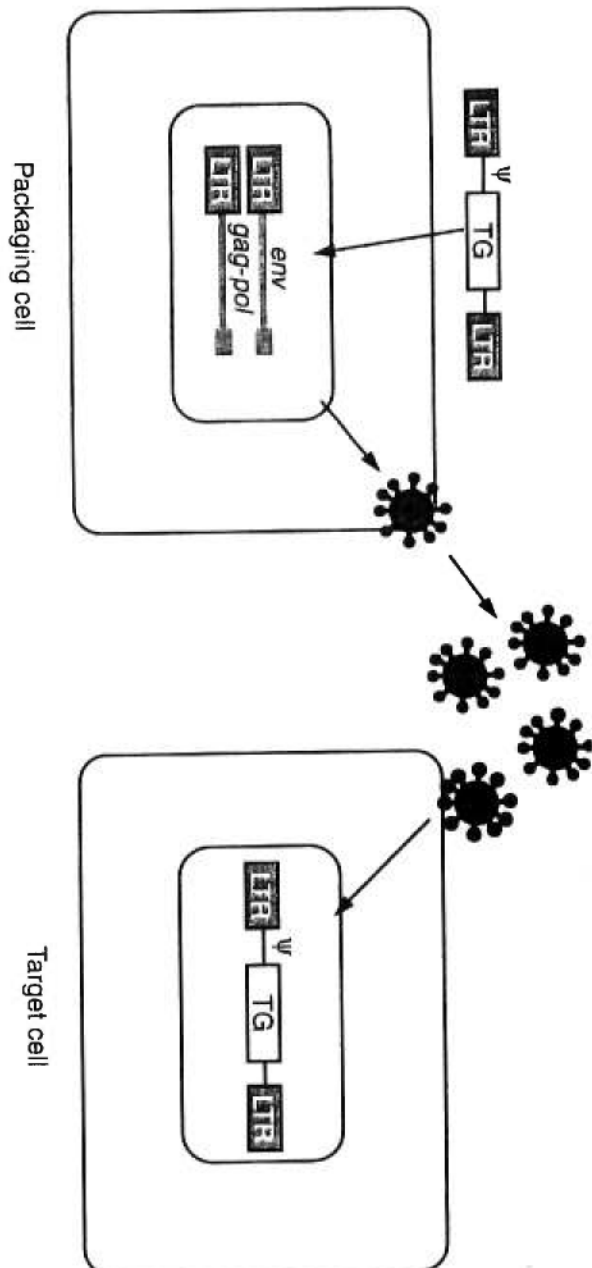


Figure 6: Modèle de la production de vecteurs recombinants à partir d'une lignée d'encapsulation rétrovirale (adapté de Robbins et coll. dans "Trends in microbiology", Vol. 16, page 36, 1998).

CHAPITRE 2

Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 *vpu* gene

Kobinger, P. G., A.J. Mouland, J-P. Lalonde, J. Forget and E. A. Cohen. 1997. Gene therapy. 4:868-874.



BRIEF COMMUNICATION

Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 Vpu gene

GP Kobinger, AJ Mouland, J-P Lalonde, J Forget and ÉA Cohen

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

The HIV-1 Vpu protein stimulates virus production by enhancing the release of viral particles from infected cells. Interestingly, Vpu was also shown to enhance the release of capsids produced by gag gene constructs of other retroviruses that lack a Vpu-like activity. To investigate the effect of Vpu expression on viral particle production in retroviral packaging cell line, we developed the Damp-VpuP cell line in which vpu expression is under the control of the tetracycline-responsive promoter. Retroviral production was measured by dosage of virion-associated reverse transcriptase activity, by capsid protein immunodetection in cell-free supernatants and by evaluating the transfer of antibiotic resistance to target cells. Induction of

the Damp-VpuP cell line caused a 40-fold increase in the titer of infectious virus-like particles when compared with control cell lines. This increase in viral titer was not the result of a clonal effect nor was it a consequence of high selective pressure but rather the effect of a Vpu-mediated enhancement of viral particle production. Similar results using the third generation ΨCRIP packaging cell line confirmed these findings. Constitutive expression of vpu caused a 13-fold increase in viral titer in this packaging cell line. These results indicate that the expression of HIV-1 vpu in retroviral packaging cell lines can significantly improve the titers of infectious retroviral particles.

Keywords: packaging cell line; Vpu; retroviral production

The ability of retroviral vectors to integrate into the genome of target cells makes them effective gene transfer vehicles for the introduction of foreign genes into a broad range of cell lines. The delivery of therapeutic gene(s) into target cells using retroviral vectors has been achieved in cultured cells and more recently *ex vivo* in clinical settings.¹ The efficiency with which genes can be introduced and expressed using retroviral vectors combined with their defined mechanism of integration have contributed to their popularity.²⁻⁴ One of the limitations of retroviral vectors however, when they are compared with other virus-based gene delivery systems, is the relative low level of recombinant viral production. Indeed, even though titers of 10^6 to 10^7 c.f.u. per milliliter of culture have recently been achieved using third generation packaging cell lines such as ΨCRIP,⁵ these titers remain low to efficiently transduce human cells such as T lymphocytes and hematopoietic stem cells.⁵⁻⁷

Several approaches have recently been developed to improve retroviral titers. For example, Bodine *et al*⁸ have developed an amphotropic producer clone that generates $>10^{10}$ c.f.u. per ml upon cocultivation with an ecotropic retroviral packaging cell line. However, this so-called 'ping-pong' method produces replication-competent viruses at rates as high as 10^4 c.f.u./ml making it poten-

tially unsuitable in clinical settings. Other approaches include: (1) the development of optimized conditions of retroviral production and transduction;^{9,10} (2) concentration of retrovirus particles from cell-free supernatant using hollow-fiber filtration technology;¹¹ and (3) screening of retroviral packaging cell lines using high selection pressure.¹² These methods rely on the original amount of retroviral particles produced, however. It is therefore a major goal to enhance the amount of viral particles produced from retroviral packaging cell lines to achieve greater efficiencies of gene transfer.

We and others have reported that the 16 kDa HIV-1 Vpu protein can facilitate viral particle release in HIV-1 infected CD4⁺ MT4 and Jurkat T cell lines.^{13,14} Interestingly, this effect of Vpu is more pronounced in HeLa cells and could be achieved *in trans*.¹⁵ Furthermore, Vpu can stimulate particle production by Gag proteins from retroviruses that lack a Vpu-like activity, such as Visna and Moloney murine leukemia virus (MoMLV), suggesting that the Vpu-mediated enhancement of virion release is not likely to be mediated through specific interactions with HIV-1 Gag protein, but by modifying a cellular pathway that is used by several retroviruses.¹⁶ We report here that the expression of Vpu in retroviral packaging cell lines can significantly enhance viral particle production. The development of retroviral packaging cell lines expressing HIV-1 *vpu* will improve the production of high titer recombinant retroviruses required for gene therapy.

Correspondence: EA Cohen

Received 22 January 1997; accepted 24 March 1997

To investigate the effect of Vpu on viral export from a packaging cell line, we initially selected the canine Damp (dog amphotropic cells) retroviral packaging cell line.^{17,18} The Damp line is a MoMLV-based retroviral packaging cell line generated by insertion of the Ψ-minus pPAM packaging vector¹⁹ into canine DI7 cells.¹⁸ Since the effect of Vpu on cell viability and growth is poorly defined, we expressed *vpu* in an inducible fashion to increase the probability of obtaining long-term viable cell lines. Furthermore, expressing *vpu* in an inducible manner allows for the evaluation of viral production in the presence or absence of Vpu in the same cellular clone. The inducible system selected for these studies uses the tetracycline (Tc)-responsive promoter system developed by Gossen and Bujard.²⁰ A 292-bp DNA fragment encompassing nucleotide 5637 to 5929 (+1 = transcription initiation site) and encoding the complete 81 amino acid Vpu protein of the HXBH10-*vpu*+¹⁴ infectious molecular clone was cloned downstream of a cytomegalovirus (CMV) minimal promoter fused to *tet* operator sequences in pRep9 to generate p9CMVpu (Figure 1). To obtain a packaging cell line that inducibly expresses Vpu, Damp cells were cotransfected with 10 μg of ptTA, a pRep4-based plasmid expressing a chimeric transactivator (tTA) which contains the *tet* repressor fused to the activation domain of the herpes simplex VP16 carboxyl terminus,²⁰ and 10 μg of p9CMVpu by the standard calcium phosphate coprecipitation transfection method.²¹ Cells were then selected with medium containing 200 μg/ml of hygromycin, 1

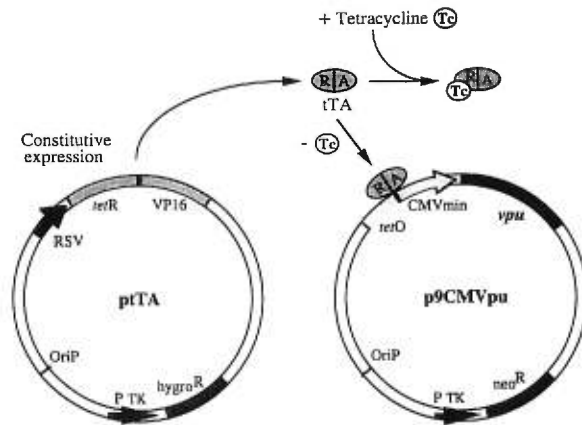


Figure 1 Tetracycline-inducible *vpu* expression system. Damp cells were cotransfected with 10 μg of the ptTA plasmid (conferring hygromycin resistance (*hygroR*) and constitutively expressing the *tetR*-VP16 chimeric protein) and 10 μg of the inducible p9CMVpu plasmid (conferring neomycin resistance (*neoR*)). Clones were selected for their ability to grow in 200 μg/ml of hygromycin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and 1 mg/ml of G418 (GIBCO BRL, Burlington, Ontario, Canada) containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum and with 1 μg/ml of tetracycline (Tc; Sigma, St Louis, MO, USA) to prevent *vpu* expression. Upon transfection and selection of stable cell lines, the pRep plasmids (Invitrogen, San Diego, CA, USA) are maintained in an episomal form since they contain an Epstein-Barr virus (EBV) origin of replication (*oriP*) and encode the EBV EBNA-1 nuclear antigen. RSV, CMVmin, *tetO*, and PTK indicate respectively: Rous sarcoma virus long terminal repeat, cytomegalovirus immediate-early minimal promoter, Tn10 tetracycline operator and herpes simplex virus thymidine kinase promoter. The tTA chimeric transactivator contains the *tet* repressor (R) fused to the activation domain of the herpes simplex VP16 carboxyl terminus (A).

mg/ml of G-418 and 1 μg/ml of Tc and 13 resistant clones were isolated. Vpu synthesis was evaluated 36 h after removal of Tc from the medium by immunofluorescence using a rabbit anti-Vpu peptide serum.^{22,23} All 13 clones analyzed were found to express *vpu* (data not shown). Although the levels of Vpu were not generally high, one clone (designated Damp-Vpu) exhibited a markedly higher expression level, as well as a suppression in the presence of 1.0 μg/ml Tc (Figure 2a). To evaluate dose dependent *vpu* expression of this system, Damp-Vpu cells were metabolically labeled with 50 μCi/ml of 35S-methionine for 12 h in the absence or in the presence of increasing amounts of Tc (0.0–1.0 μg/ml). Vpu was immunoprecipitated using an anti-Vpu peptide serum at 36 h after induction.²³ As shown in Figure 2b, increasing levels of Vpu correlated with the presence of decreasing amounts of Tc in the culture medium. Indeed, in the presence of 0.1 μg/ml Tc in the culture medium, a low level of Vpu was still detectable, but when 1.0 μg/ml Tc was applied, Vpu synthesis was undetectable as determined by immunofluorescence and immunoprecipitation analyses (Figure 2a and b). PhosphorImager quantification of the 16 kDa Vpu band indicated that in the absence of Tc, Damp-Vpu cells exhibited at least a 100-fold increase in Vpu synthesis relative to the background obtained with cells exposed to 1 μg/ml Tc (Figure 2B lanes 1 and 7). Our results indicate that Vpu protein synthesis can be modulated in the Damp packaging cell line using this system. Moreover, the growth kinetic and viability of the Damp-Vpu cell clones in the presence or absence of Tc did not significantly differ from that of the parental Damp cell line as assessed by trypan blue exclusion assay (data not shown). This observation suggests that neither Vpu nor Tc influences cell growth.

To evaluate the effect of Vpu on viral titer produced from the Damp packaging cell line, we transfected the pBabepuro retroviral vector into the parental Damp and Damp-Vpu cells. The pBabepuro vector contains MoMLV long terminal repeats and a Simian virus 40 (SV40) early promoter-driven puromycin resistance gene.²⁴ Following transfection of Damp and Damp-Vpu cells with 10 μg of pBabepuro and selection in the presence of 1.5 μg/ml puromycin, 30 to 40 puromycin-resistant clones from each transfection were pooled and respectively renamed DampP and Damp-VpuP cell lines. To evaluate retroviral production from these packaging cell lines, viral release was determined by dosage of reverse transcriptase (RT) activity from pelleted virus, Western blot analysis of purified viral particles using an antibody directed against the capsid (CA) protein of MoMLV (anti-p30) and by evaluation of transduction efficiency. Supernatants from DampP or Damp-VpuP cells were first analyzed for the presence of infectious retroviral particles by evaluating the transfer of puromycin resistance upon infection of Madin Darby canine kidney (MDCK) cells. Antibiotic resistance of transduced MDCK cells was measured by selection in the presence of 2.5 μg/ml puromycin. MDCK cells were used since they are of canine origin and more importantly because in our hands resistant colonies appear in as few as 3–4 days. Viral titers obtained with the Damp-VpuP cells were 40-fold higher than titers produced from the DampP packaging cell line (Table 1). When viral titers from Damp-VpuP cells cultured in the presence of 1 μg/ml Tc or in absence of Tc were compared however, the difference was not as marked. Under

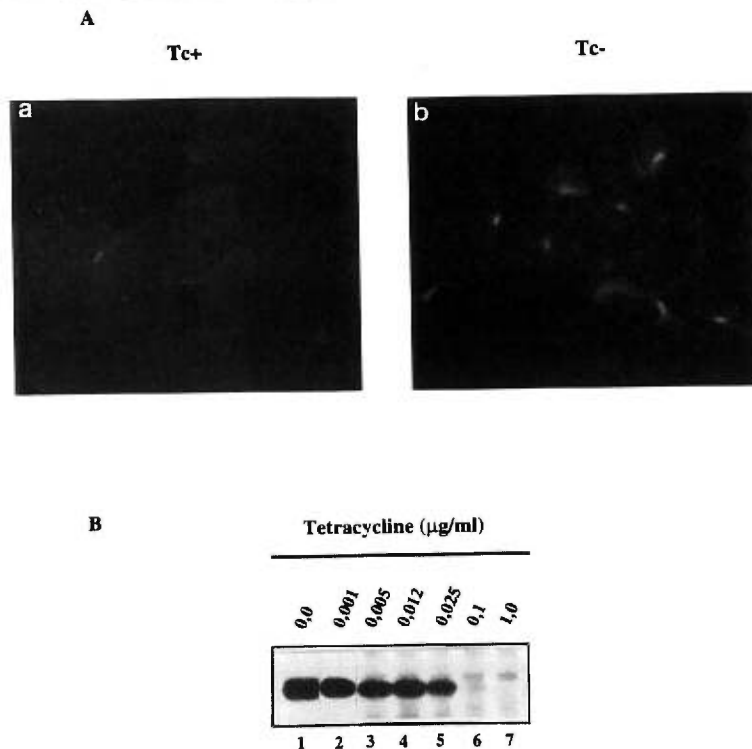


Figure 2 Characterization of *vpu* expression in the Damp-Vpu cell line. (A) Evaluation of Vpu protein expression by immunofluorescence. Thirty-six hours after induction Damp-Vpu cells were fixed for 30 min in ethanol:acetone (4:1) and incubated with a rabbit anti-Vpu peptide serum directed against the C-terminal region of the Vpu protein (HAPWDVDDL)²² as described previously.²⁶ (a) Cells grown in media containing 1 µg/ml of tetracycline. (b) Cells grown in the absence of tetracycline. (B) For metabolic labeling, 1.2×10^6 Damp cells were seeded in 100 mm Petri dishes. Sixteen hours later, repression or induction of *vpu* expression was achieved respectively by culturing cells in complete DMEM medium without Tc (lane 1) or with increasing amounts of tetracycline (0.001–1.0 µg/ml; lanes 2 to 7). Subsequently, cells were metabolically labeled with 50 µCi/ml of ³⁵S-methionine for 12 h in the presence or in the absence of Tc. Labeled cells were lysed and Vpu was immunoprecipitated with a rabbit anti-Vpu peptide serum as previously described.²³ The labeled immunoprecipitates were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Quantitative analysis of immunoprecipitated proteins was performed by densitometric scanning using a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) with the ImageQuant software version 3.22.

the same conditions, quantification of viral production by dosage of RT activity and Western blot analysis of p30 in pelleted viral particles confirmed the results obtained by evaluation of viral titers (data not shown).

The modest increase in viral titers observed upon removal of Tc could be due to an undetectable expression of *vpu* in the presence of 1 µg/ml Tc, and/or alternatively the strong selection pressure applied to the Damp-VpuP cell line as this can also enhance retroviral production,¹² and/or the isolation of a high producer clone during the selection of the Damp-Vpu cell line. We systematically investigated each of the three possibilities in order to ensure that the enhanced viral production observed was indeed Vpu-mediated. To address the first possibility, we analyzed retroviral production in the presence of higher Tc concentrations. As reported by Gossen *et al*²⁰ the tetracycline-responsive promoter is leaky since there is detectable expression of the regulated gene in the presence of high concentrations of Tc. Thus, even though Vpu was undetectable in Tc-treated cells by immunofluorescence and immunoprecipitation analyses, a low but sufficient level of Vpu in cells maintained in 1 µg/ml Tc could explain the enhanced viral release exhibited by the

Damp-VpuP cell line as compared to DampP cells. Consequently, we attempted to use more stringent repression conditions and treated Damp-VpuP cells with 2 µg/ml Tc (toxicity appearing at concentrations >2 µg/ml). As shown in Table 1, addition of 2 µg/ml Tc resulted in an almost two-fold difference in viral titer between the induced and uninduced Damp-VpuP cells. Moreover, evaluation of viral release by Western blot analysis of virion-associated p30 showed that Damp-VpuP cells produced significantly more viral particles than DampP cells (Figure 3a). This enhancement of viral particle release was more marked in the absence of Tc (Figure 3a; compare Damp-VpuP (Tc+) with Damp-VpuP (Tc-)), reflecting the results obtained by evaluation of transduction efficiency and dosage of reverse transcriptase activity (Table 1). The difference in viral titer observed when Damp-VpuP cells are treated with either 1 or 2 µg/ml Tc suggests that complete suppression can not be achieved with this inducible system, and this allows for a weak expression of Vpu, which is in itself sufficient to enhance viral titer. To address the question whether *vpu* RNA is expressed in the presence of 2 µg/ml Tc, RT-PCR was performed on total RNA

Table 1 Evaluation of virus production by determination of virus titers and reverse transcriptase (RT) activity in Damp, DampP, Damp-Vpu and Damp-VpuP packaging cell line supernatants

Cell lines	Titer (c.f.u. × 10 ³ /ml) ^a	Fold increase ^b	RT activity (c.p.m. × 10 ³ /ml) ^c
Damp	NA	NA	7.2
DampP	1.2 ± 0.1	1	8.4
Damp-upVP	2.4 ± 0.9	2 ± 0.8	16.4
Damp-VpuP			
1 µg/ml Tc	38 ± 3.9	32 ± 3	270
2 µg/ml Tc	29 ± 4.5	24 ± 4	200
without Tc	48 ± 5.9	40 ± 5	330
Damp-Vpu clone ^d			
1	—	29 ± 3	240
2	—	18 ± 2	150
3	—	30 ± 4	250
4	—	38 ± 5	320
5	—	27 ± 1	230
6	—	17 ± 2	140
7	—	17 ± 1	140
8	—	23 ± 3	190
9	—	31 ± 3	260
10	—	19 ± 1	160
11	—	26 ± 3	220
12	—	30 ± 2	250
13	—	21 ± 1	180

^apBabepuro-derived recombinant virus titers were determined by puromycin resistance selection in MDCK cells. Briefly, 1.2 × 10⁶ Damp cells producing pBabepuro virus were seeded on a 100-mm Petri dish. The medium was removed 16 h later and the cells washed thoroughly with PBS. To induce (-Tc) or repress Vpu (+Tc), fresh culture medium (8 ml) prepared with or without tetracycline was subsequently added. The medium was removed 36 h after induction and 4 ml of fresh medium either with or without Tc was then added and the virus-containing supernatant was harvested by centrifugation 16 h later. Cell-free supernatants supplemented with 8 µg of polybrene per ml were filtered through a 0.45-µm membrane and 3 ml of different dilutions were applied to 2 × 10⁶ MDCK cells on a 100-mm dish for 4 h before the addition of 8 ml of fresh medium. Forty-eight hours after infection, cells were split 1:10 in puromycin (Sigma, St Louis, MO, USA) containing medium and cultured for 10 days. Culture medium was changed every 3 days. The number of resistant colonies obtained, divided by four (reflecting the two rounds of cell division occurring in the first 48 h), represented the titer in colony-forming units (c.f.u.) per ml of the diluted stock used for the infection. The results presented are derived from three different experiments, and the standard deviation of the mean is indicated.

^bThe values represent fold increase of c.f.u./ml or RT activity relative to the parental DampP cells.

^cVirus-like particles were produced from subconfluent cells in the presence or absence of Tc as indicated. Cell-free supernatants containing virus were then pelleted by ultracentrifugation for 2 h at 204 000 g in a Beckman Ti60 rotor (Beckman Instruments, Mississauga, Ontario, Canada) and resuspended in 200 µl of sterile water. RT activity was determined as previously described.³⁰ Values are means of two different experiments and the results varied by no more than 12% from the mean.

^dCell lines isolated from individual G-418 and hygromycin-resistant Damp-Vpu cell clones. NA, not applicable.

extracted from DampP, and Damp-VpuP cells cultured in the absence or in the presence of different Tc concentrations, as described in the legend of Figure 3b. Figure 3b shows that increasing levels of Tc correlated with decreasing amounts of *vpu* RNA expressed in Damp-VpuP cells. However, *vpu* RNA was still detectable in Damp-VpuP cells even when cultured with 2 µg/ml Tc (Figure 3b, lane 6). *GAPDH* RNA was used to control for the amount of RNA in each reaction (Figure 3b). These results suggest that *vpu* continues to be expressed in the presence of 2 µg/ml Tc and we can assume that Vpu protein is synthesized albeit at an undetectable level.

Because retroviral production from packaging cell lines can be significantly enhanced by application of high selection pressure,¹² we also investigated whether the application of G418, hygromycin and puromycin selection contributed to the enhanced viral release observed in the antibiotic-treated cells. Toward this goal, we generated a Damp cell line containing the two plasmids of the inducible system but in which *vpu* was cloned in the opposite orientation (Damp-upV cells). As it was not possible to select a cell clone on the basis of protein

expression in the Damp-upV cell line, we isolated the total population of resistant cells after selection with hygromycin and G-418. After transfection of pBabepuro and selection with puromycin, the Damp-upVP cell line was maintained with the same drug concentration as that used with the Damp-VpuP cells. The addition of Tc in the culture medium had no effect on the viral titers obtained from Damp-upVP cells (data not shown). Evaluation of viral titers generated by these cell lines cultured without Tc revealed that Damp-VpuP cells still produced 20- to 40-fold more infectious viral particles than the Damp-upVP cells (Table 1). These results indicate that high antibiotic selection pressure used to select Damp-VpuP cells is not sufficient to explain the large increase in viral release obtained with this packaging cell line.

All the producer packaging Damp cell lines containing pBabepuro represent total populations of puromycin-resistant clones. Although we never screened for individual high producer clones following the transfection with pBabepuro, it is possible that the Damp-Vpu cells, which were initially selected for tight control of Vpu expression, may constitute a high producer clone. In order to investi-

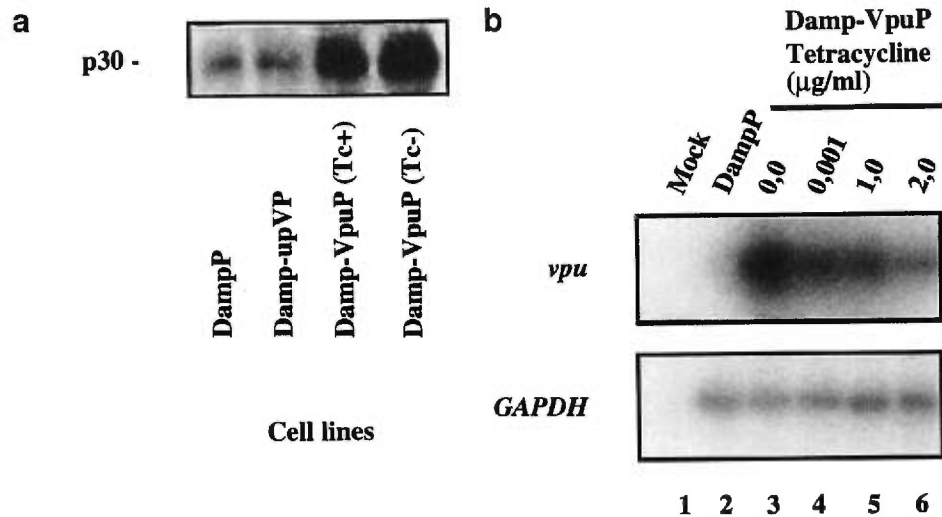


Figure 3 (a) Evaluation of viral release by Western blot analysis. Western blot analysis was performed on viral pellets obtained from cell-free supernatants harvested from subconfluent DampP, Damp-upV or Damp-VpuP cultured with or without Tc. Ten milliliters of cell-free supernatant was ultracentrifuged through a 20% sucrose cushion 2 h at 153 000 g in a Beckman Ti50.4 rotor. Virus pellets were lysed as described previously.²³ Following electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose (0.45 µm pore size; Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA) by electroblotting overnight at 20 V in a Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada) Trans Blot Cell. Blots were incubated 1 h in blocking buffer (Tris-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween-20 and 2% nonfat dry milk) and incubated with the goat polyclonal antibody against the MoMLV CA p30 (No. 79S000804, Quality Biotech, NCI/3cr repository, Camden, NJ, USA) for 1 h at a dilution of 1:5000. Bound antibodies were then probed with horseradish peroxidase-linked anti-goat immunoglobulin (used at 1:1500), washed extensively and developed by using a sensitive enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit; Amersham, Oakville, Ontario, Canada). (b) Determination of vpu RNA expression by RT-PCR and Southern blot analysis. Total RNA were isolated from 5×10^6 DampP or Damp-VpuP cultured in the presence of different Tc concentrations using the TRIzol reagent as described by the manufacturer (GIBCO BRL). The first strand cDNA was synthesized from 2.5 µg of total RNA as described previously.²⁷ Vpu- and GAPDH- (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) specific cDNA fragments were amplified by PCR from template using the following sets of primers: vpu (sense: 5' CACTCTAG AGTACATGTAATGCAACCT 3'; antisense: 5' AGCACTAGAGCTCATCAACAT 3'), GAPDH (sense: 5' CCTGATGCCCCATGTTCTGT 3'; antisense: 5' CAAAGGTGGAGGAGTGGGTGT 3'). PCR reactions were performed for 30 cycles with an annealing temperature of 62°C in a Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, USA) DNA thermal cycler. Amplified DNAs were resolved on a 1% agarose gel and transferred on to a nitrocellulose membrane (Nytran, Bio-Rad) DNA thermal cycler. Amplified DNAs were resolved on a 1% agarose gel and transferred on to a nitrocellulose membrane (Nytran, Bio-Rad). The vpu and GAPDH probes were generated by BamHI and PstI digestion of pBabeVpu and pGemGAPDH,²⁸ respectively. DNA fragments purified by agarose gel electrophoresis were then labeled with α -³²P-dCTP using a random-priming DNA labeling system (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Southern blot was performed as described.²⁹ The membrane was then exposed with Kodak (Rochester, NY, USA) XAR-5 film for 60 min at -80°C.

to evaluate this possibility, we selected 17 DampP clones and screened for their ability to produce virus stocks with high titers. As determined by puromycin resistance selection in transduced MDCK cells, all the isolated DampP clones were found to produce varying levels of viral particles. Indeed, titers ranging from 1.0×10^2 to 3.8×10^3 c.f.u./ml were obtained with the 17 DampP clones (data not shown). However, none of these clones was able to produce viral titers of 4.8×10^4 or 2.9×10^4 c.f.u./ml as was obtained respectively with the induced or uninduced Damp-VpuP cell line (Table 1). Viral particles produced from the DampP cell line had a titer of 1.1×10^3 c.f.u./ml, which was within the range of the viral titers obtained with the individual clones. These results suggest that clonal effect can not explain the noteworthy increase of viral titer observed in the Damp-VpuP cells. Furthermore, retroviral production from the initial 13 Damp-Vpu cell clones was determined by measuring RT activity in cell-free supernatants. In the absence of Tc, all 12 Damp-Vpu clones showed RT values 20- to 35-fold higher than the parental or control Damp cell lines (Table 1). Moreover, RT values were found to correlate with Vpu expression levels as determined by immunofluorescence analysis (data not shown). As expected, the highest RT activity was obtained with the selected Damp-Vpu cells

that expressed the highest level of Vpu (Table 1, clone No. 4). These results indicate that all Damp cells expressing vpu produce greater amounts of retroviral particles when compared with the parental Damp cell line. Taken together, these results strongly suggest that the HIV-1 Vpu protein can significantly increase retroviral titers from the Damp packaging cell line.

As a proof of principle experiment, we analyzed the effect of HIV-1 Vpu on the enhancement of retrovirus production from the Damp packaging cell line using the tetracycline inducible system.²⁰ Our results indicate that Vpu expression enhances retroviral titers from this cell line by increasing retroviral export as established by RT activity and Western blot analysis (Table 1 and Figure 3a). This effect appears to require expression of only minute amounts of Vpu since we observed an increased viral titer even when the Damp-VpuP packaging cell line was in a repressed state using a high concentration of Tc. Although we employed a high Tc concentration, vpu expression was still detectable by RT-PCR but not by our other methods, indicating that the enhanced viral titers produced from the Damp-VpuP cell line were due to Vpu protein expression rather than to selective pressure, clonal effects or the appearance of replication-competent retrovirus (data not shown), which are known factors

that positively influence viral production from packaging cell lines.

To address the question whether Vpu could enhance virus production from a more efficient packaging cell line originating from a different species, murine ΨCRIP cell lines constitutively expressing *vpu* were produced. The ΨCRIP packaging cell line contains two MoMLV-derived proviral genomes carrying complementary mutations in the *gag-pol* or *env* regions and additional alterations at the 3' end of the proviruses. This third generation packaging cell line produces high titers (10^6 c.f.u./ml) of recombinant retroviruses and has an amphotropic host range.⁵ The *vpu* gene was cloned into the *Bam*HI restriction site of the retroviral vector pBabepuro to generate pBabeVpu. Both the *vpu* and *puromycin resistance* gene are expressed from this vector and transduction efficiency can be readily evaluated by puromycin selection. To generate ΨCRIP cell lines constitutively expressing *vpu*, we transfected these cells with pBabeVpu. pBabepuro and pBabepuro containing *vpu* in the opposite orientation (pBabeupV) were also transfected in parallel to generate control cell lines. Upon puromycin selection, total populations of resistant cell clones were isolated and respectively designated ΨCRIP-pBabe, ΨCRIP-pBabeVpu and ΨCRIP-pBabeupV. To analyze *vpu* expression, subconfluent ΨCRIP-pBabe, ΨCRIP-pBabeVpu and ΨCRIP-pBabeupV cell lines were metabolically labeled with 50 μCi/ml of 35S-methionine for 12 h in 100 mm Petri dishes and Vpu was immunoprecipitated using an anti-Vpu peptide serum, as described above. Figure 4b shows that Vpu was only detected in the ΨCRIP-pBabeVpu cell line. In contrast to the Damp-VpuP cell line described above, the ΨCRIP-pBabeVpu cell population expresses Vpu constitutively from the MoMLV LTR. The growth kinetics and viability of these cell populations were similar to the parental ΨCRIP cell line (data not shown). The cell populations were then analyzed for their capacity to produce infectious retroviral particles using the same protocol as described above for the Damp-VpuP cell lines. As shown in Figure 4a, the ΨCRIP-pBabe and ΨCRIP-pBabeupV cell populations produced titers of approximately 0.7×10^6 c.f.u./ml. In contrast, a mean of 8.9×10^6 c.f.u./ml representing a 12.7-fold increase of the viral titer was obtained with the ΨCRIP-pBabeVpu cell population (Figure 4a). These results demonstrate that the Vpu-mediated increase in titer is not as pronounced in ΨCRIP as it is in Damp cells, thus confirming reports that indicate the Vpu-mediated enhancement of viral release is cell line-dependent. Indeed, among the different cell lines tested in one study,²⁵ NIH-3T3 cells (from which the ΨCRIP are derived) were the least sensitive to the effect of Vpu on viral particle release.

In the study performed with ΨCRIP cells presented here, whole cell populations that expressed Vpu constitutively were used. Selection of a ΨCRIP-pBabeVpu clone that expresses a high level of Vpu would create a homogeneous ΨCRIP packaging cell line able to produce virus stocks with titers potentially greater than 8.9×10^6 c.f.u. per ml. Experiments aimed at evaluating the Vpu-mediated enhancement of viral release in other highly efficient retroviral packaging cell lines derived from different cell types and originating from distinct species are currently underway. The development of highly efficient HIV-1 Vpu expressing packaging cell lines could play a major role in the area of gene therapy.

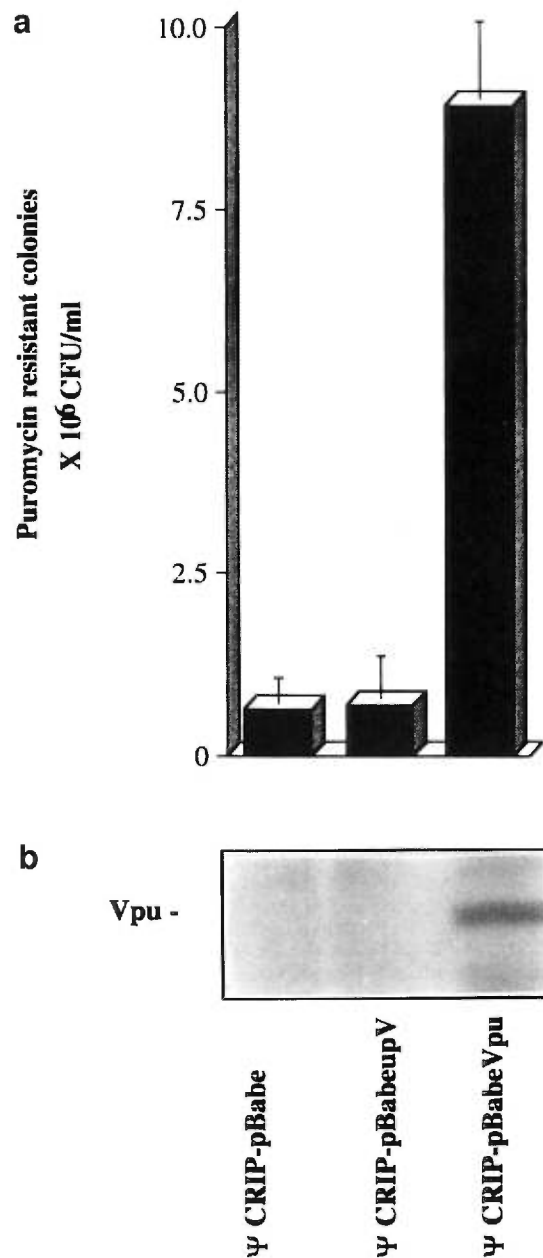


Figure 4 Effect of HIV-1 Vpu on retroviral titers produced from the ΨCRIP packaging cell line. (a) The viral titer of supernatants collected from ΨCRIP-pBabe, ΨCRIP-pBabeupV and ΨCRIP-pBabeVpu cell lines was evaluated as described in Figure 3. The results shown represent the mean and the standard deviation of the mean is indicated. (b) Detection of Vpu in the ΨCRIP-pBabeVpu cell line by immunoprecipitation. 8×10^6 Cells were pulsed with 50 μCi/ml of 35S-methionine for 12 h. Labeled cell lysates were immunoprecipitated with the anti-Vpu peptide serum and analyzed as described in Figure 2. ΨCRIP-pBabe and ΨCRIP-pBabeupV were included as negative controls.

Acknowledgements

We thank Drs Alan Cochrane and André Veillette for providing the Δ pRep-9CMV, pRep-4tTa and pBabepuro constructs, respectively. We also thank Dr Brian Seed and Dr Richard Mulligan for respectively the Damp and the Ψ CRIP packaging cell lines. We thank Dr Guy Lemay for helpful discussions. GPK and JF are recipients of a studentship and AJM is recipient of a postdoctoral fellowship, from the National Health Research and Development Program (NHRDP) of Canada. EAC is recipient of a National Health Research Scholar award from NHRDP. This work was supported by grants from NHRDP and FCAR to EAC.

References

- 1 Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995; **270**: 404–410.
- 2 Salmons B, Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 129–141.
- 3 Gordon EM, Anderson WF. Gene therapy using retroviral vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1994; **5**: 611–616.
- 4 Goff SP. Integration of retroviral DNA into the genome of the infected cell. *Cancer Cells* 1990; **2**: 172–178.
- 5 Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6460–6464.
- 6 Dunbar CE, Emmons RV. Gene transfer into hematopoietic progenitor and stem cells: progress and problems. *Stem Cells* 1994; **12**: 563–576.
- 7 Nienhuis AW. Gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood Cells* 1994; **20**: 141–147.
- 8 Bodine DM, McDonagh KT, Seidel NE, Nienhuis AW. Development of a high-titer retrovirus producer cell line and strategies for retrovirus-mediated gene transfer into rhesus monkey hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1990; **612**: 415–426.
- 9 Bunnell BA et al. High-efficiency retrovirus-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7739–7743.
- 10 Kotani H et al. Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 19–28.
- 11 Paul RW et al. Increased viral titer through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 609–615.
- 12 Wirth M, Grannemann R, Klehr D, Hauser H. Screening retroviral packaging cells for highly efficient virus production by using a combined selection procedure. *J Virol* 1994; **68**: 566–569.
- 13 Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, Vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 1988; **241**: 1221–1223.
- 14 Terwilliger EF et al. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5163–5167.
- 15 Yao XJ, Göttinger H, Haseltine WA, Cohen EA. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated HIV-1 capsid export. *J Virol* 1992; **66**: 5119–5126.
- 16 Göttinger HG, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 7381–7385.
- 17 Peterson A, Seed B. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* 1988; **54**: 65–72.
- 18 Peterson A. Genetic analysis of CD2/LFA3 and CD4/HIV interactions. PhD. thesis, Harvard University, Boston, MA, USA, 1988.
- 19 Miller DA, Law MF, Verma IM. Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 431–437.
- 20 Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5547–5551.
- 21 Cullen BR. Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Meth Enzymol* 1987; **152**: 684–704.
- 22 Friberg J et al. Mutational analysis of the HIV-1 Vpu protein. *Leukemia* 1994; **8**: 156–162.
- 23 Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JC, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* 1988; **334**: 532–534.
- 24 Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 3587–3596.
- 25 Sakai H, Tokunaga K, Kawamura M, Adachi A. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J Gen Virol* 1995; **76**: 2717–2722.
- 26 Yao XJ et al. The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation. *J Acq Imm Def Syn* 1993; **6**: 135–141.
- 27 Vogan K et al. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res* 1993; **53**: 5269–5273.
- 28 Fort P, Marty L, Blanchard J. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res* 1985; **13**: 1431–1442.
- 29 Treco D. Preparation of genomic DNA. In: Ausubel F, Brent R (eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley: Brooklyn, NY, USA 1989, pp 292–299.
- 30 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.

CHAPITRE 3

HIV-1 VprCAT fusion proteins: sequence requirement for virion incorporation and analysis of antiviral effect

Yao, X-J., G. P. Kobinger, S. Dandache, N. Rougeau and E.A. Cohen. 1998. Soumis à Gene Therapy.

**HIV-1 Vpr-chloramphenicol acetyltransferase fusion proteins:
sequence requirement for virion incorporation
and analysis of antiviral effect**

Xiao-Jian Yao, Gary P. Kobinger, Serge Dandache,
Nicole Rougeau, and Eric A. Cohen*

Laboratoire de rétrovirologie humaine,
Département de microbiologie et immunologie,
Faculté médecine, Université de Montréal,
Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

* To whom correspondence should be addressed:

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

E. mail: cohenea @ere.umontreal.ca.

Summary

The human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a virion-associated protein that is incorporated *in trans* into viral particles, presumably via an interaction with the p6 domain of the Gag polyprotein precursor. Recently, several studies have demonstrated that Vpr fusion proteins could be used as intravirion inactivating agents. In this study, we compared different Vpr-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fusion proteins for their virion incorporation ability and their effect on the infectivity of HIV viruses. Our deletion analysis indicates that both the N-terminal alpha-helical domain and the leucine/isoleucine rich (LR) domain located in the middle region of Vpr are required for optimal virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins. The C-terminal basic region, associated with Vpr's ability to mediate cell cycle arrest in G2, was not required for virion incorporation, thus allowing the development of Vpr-based chimeric proteins devoid of any effect on cell growth. The fusion of Vpr at the N- or C-terminus of CAT targeted with equal efficiency the chimeric protein into virions. While the virion incorporation of most Vpr-CAT fusion proteins tested in this study was dependent on the presence of an intact p6 domain, fusion proteins containing only the N-terminal alpha-helical domain of Vpr (amino acid 1 to 42) were incorporated into virions in a p6-independent manner. Virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins was shown to decrease viral infectivity. Moreover, the insertion of HIV protease-cleavage sites between Vpr and CAT not only efficiently delivered and released the cleaved CAT product into HIV viral particles, but also greatly potentiated the inhibition of progeny virion infectivity. Overall, our study: 1) defines the Vpr sequence requirement and configuration necessary for the specific and optimal incorporation of Vpr fusion protein into HIV particles; 2) shows that Vpr fusion proteins have the ability to suppress HIV infectivity by targeting multiple steps of viral morphogenesis.

Keywords: HIV-1; Vpr-chloramphenicol acetyltransferase fusion protein; HIV-1 protease cleavage site; virion incorporation; antiviral effect

Introduction

The assembly of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particles is a complex multistep process that is presumed to be initiated by the interaction of Gag polyprotein precursors. In addition to structural Gag, Pol and Env products, HIV-1 virions were shown to contain the accessory protein Vpr. Indeed, several studies reported that Vpr could be efficiently incorporated *in trans* into HIV virions at molar quantities equivalent to those of Gag proteins.^{1,2} This incorporation of Vpr into progeny virions has long been thought to play an important role in the early events of viral replication before viral gene expression occurs. Studies by Heinzinger *et al* have demonstrated that, together with p17^{gag}, Vpr actively mediated the nuclear transport of HIV-1 proviral DNA in nondividing target cells.³ More recently, a second biological activity was specifically associated to Vpr expression: growth arrest of cells at the G2 stage of the cell cycle.⁴⁻⁷ Interestingly, this cell-cycle modulating activity of Vpr was recently shown to optimize HIV viral expression and production in dividing T cells as well as in macrophages.⁸⁻¹⁰

In an attempt to understand the mechanism(s) underlying Vpr incorporation into HIV virus, some studies have shown that a predicted alpha helical domain located near the N-terminus of Vpr plays a critical role in the virion incorporation of the protein.^{11,12} Conversely, mutagenic studies on HIV Gag revealed that Vpr virion incorporation was mediated through an interaction of Vpr with the p6 domain of the HIV Pr55^{gag} precursor.¹³⁻¹⁷ A conserved LXXLF sequence in the C-terminal region of the p6 domain appears to play a critical role for Vpr incorporation into HIV virions.^{18,19} However, up to now, evidence for a direct interaction between Vpr and p6 is still missing. More recently, several studies have shown that an interaction between Vpr and the nucleocapsid protein p7 (NCp7) occurs *in vitro* by a recognition mechanism requiring the zinc fingers of NCp7.^{20,21} Thus, the molecular mechanism(s) involved in Vpr virion incorporation remains to be defined.

The efficient incorporation of Vpr into viral particles makes it possible to deliver heterologous proteins as Vpr fusion proteins into HIV-1 virions. Using this strategy, two recent studies reported that Vpr-mediated virion-delivery of HIV reverse transcriptase (RT) or integrase (IN) can *trans*-complement RT- or IN-defective HIV viruses.^{22,23} In addition, this Vpr-mediated virion incorporation of heterologous proteins represents a therapeutic approach to interfere with the infectivity of HIV viruses. Indeed, several reports recently indicated that Vpr or Vpx can efficiently deliver heterologous proteins, including enzymatic or *trans*-dominant proteins, into HIV virions.²⁴⁻²⁸ Vpr-mediated *trans*-incorporation of these fusion molecules into viral particles provoked a substantial

inhibition of HIV replication and/or infectivity.^{27,28} More recently, Kobinger *et al* showed the feasibility and effectiveness of this strategy using stable cell lines expressing Vpr-fusion proteins, hence demonstrating the possible application of such a strategy for HIV gene therapy.²⁸

In the present study, we performed a systematic analysis of this Vpr-based virion targeting system. Several Vpr-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fusion proteins were generated to investigate: 1) the minimal Vpr amino acid sequence and its positioning within the fusion protein for efficient and specific virion incorporation; 2) the effect of HIV protease-cleavage site inserted between Vpr and CAT on the release of heterologous proteins into HIV virions; 3) whether the presence of HIV protein cleavage sites in Vpr-CAT fusion protein potentiate their effect on viral infectivity.

Results

HIV virion-incorporation of different Vpr-CAT fusion proteins

To delineate the minimal region of Vpr required for efficient virion incorporation of Vpr-fusion proteins, we constructed a series of Vpr-CAT chimeric proteins by fusing different fragments of Vpr to the N- or C-terminus of CAT (Fig. 1A), as described in Materials and Methods. Several structural domains of Vpr have been shown to be involved in different activities of the protein. A N-terminal putative alpha-helical domain and a previously identified leucine/isoleucine rich region (LR-domain) in the middle region of Vpr have respectively been shown to be important for Vpr virion incorporation and nuclear localization, whereas the arginine-rich C-terminal domain was shown to be required for Vpr cell-cycle arrest activity (Fig. 1A).^{11,12,29-31} Different Vpr segments encompassing each of these functional domains were generated to test their ability to mediate the incorporation of Vpr-CAT fusion proteins into HIV virions.

To evaluate the virion incorporation efficiency of each Vpr-CAT fusion protein, we cotransfected COS-7 cells with plasmid expressors encoding each Vpr-CAT fusion protein and an HIV-1 proviral construct (HxBRUR⁻) which does not express Vpr.¹² Forty-eight hours post-transfection, [³⁵S]methionine-labeled cells and pelleted virions were first immunoprecipitated with a mix of anti-Vpr and anti-CAT antibodies and subsequently with an HIV-1 positive human serum. Results reveal that abundant HIV-1 viral structural proteins (p24^{gag}) were detected in all transfected cells and viral lysates (Fig. 1B, lower panel). In addition, wild type Vpr, CAT and all Vpr-CAT fusion proteins, including R1-42CAT, R1-62CAT, R1-80CAT, R1-88CAT, and R14-88CAT, were specifically detected in the corresponding cell lysates (Fig. 1B, upper left panel, lanes 1-7). Some samples exhibited fast-migrating bands (Fig. 1B, upper left panel), that are likely to be non-specific degradation products that are produced during the immunoprecipitation process since their levels decreased substantially when protease inhibitors were added to the lysis buffer (data not shown). Analysis of viral lysates indicates that Vpr-CAT fusion proteins R1-42CAT, R1-80CAT, R1-88CAT, and R14-88CAT are packaged into virions at various levels as compared to the wild type Vpr (Fig. 1B, upper right panel, lanes 10 and 11; 13 to 15). In contrast, the CAT protein and the fusion protein R1-62CAT were not detected in the virions even though they were well expressed in COS-7 cells, indicating that they do not have the ability to be incorporated into virions (Fig. 1B, upper panel, lanes 9 and 12). To rule out the possibility that the protein stability may affect the levels of Vpr-CAT fusion protein virion incorporation, the expression of each Vpr-CAT protein was evaluated by pulse-chase labeling and immunoprecipitation, as described in

Materials and Methods. Results reveal that, like the wild type Vpr, all the Vpr-CAT fusion proteins analyzed in this study were stable for up to 7 hours (data not shown).

To further evaluate the incorporation efficiency of each Vpr-CAT fusion protein, levels of Vpr and Vpr-CAT detected in virions were quantified by densitometric scanning analysis of the autoradiograms presented in Fig. 1B. Virion-associated Vpr or Vpr-CAT levels were calculated as a ratio of virion-associated Vpr or Vpr-CAT protein over the total amount of Vpr or Vpr-CAT fusion protein expression. This ratio was also adjusted relatively to the levels of virion-associated p24^{gag} protein, which was taken as an internal control. The calculated ratios reveal that R14-88CAT and R1-88CAT were incorporated into HIV as well as the wild type Vpr, whereas R1-42CAT and R1-80CAT appeared to be less efficiently incorporated (Fig. 1C).

To clearly demonstrate that the Vpr-CAT fusion proteins were incorporated into viral particles, we purified HIV virions by sucrose gradient sedimentation technique and probed virions for the presence of fusion protein by immunoprecipitation, as described in Materials and Methods. Figure 1D shows the results obtained with R14-88CAT since its virion incorporation was as efficient as the wild type Vpr. Immunoprecipitation of the sucrose gradient fractions with a monoclonal anti-HIV p24^{gag} or anti-CAT antibodies reveals that peak amounts of R14-88CAT and HIV-1 p24^{gag} are detected in the same fractions (Fractions 5 to 7), thus strongly indicating that R14-88CAT is packaged into HIV-1 viral particles. Similar results were obtained with R1-42CAT, R1-80CAT and R1-88CAT fusion proteins (data not shown).

The effect of Vpr position within the fusion protein on virion incorporation

To test whether the position of the Vpr segment relative to CAT had an effect on the fusion protein virion incorporation, we generated constructs where the Vpr segments, R14-88 or R1-42, were fused at the C-terminus of CAT, as shown in Fig. 1A. Plasmids encoding R14-88CAT, CATR14-88, R1-42CAT and CATR3-42 were each cotransfected with the Vpr⁻ provirus plasmid HxBRUR⁻ in COS-7 cells. Radiolabeled transfected cells and pelleted viruses were then immunoprecipitated with a mix of anti-CAT and anti-HIV antibodies. Results reveal that R14-88CAT and CATR14-88 (Fig. 2, right panel, lanes 5 and 6) as well as R1-42CAT and CATR3-42 (Fig. 3B, right panel, lanes 8 and 10) were incorporated into virions with similar efficiencies. These results clearly indicate that the fusion of Vpr segment at either the N- or C-terminus of CAT can efficiently deliver the fusion protein into HIV viral particles.

Requirement of the Pr55^{gag} p6 domain for Vpr-CAT fusion protein virion-incorporation

Several studies have demonstrated that Vpr virion incorporation requires the presence of an intact p6 domain in the HIV Gag precursor.¹³⁻¹⁹ To verify whether the incorporation of the different Vpr-CAT fusion proteins was also p6-dependent, we cotransfected COS-7 cells with the Vpr-CAT expressors and either the HxBRUR⁻ or a p6-defective HIV-1 provirus (HxBRUR⁻/p6⁻) and analyzed the incorporation of the Vpr-CAT fusion protein into viral particles. Our results show that abundant viral proteins were detected in both HxBRUR⁻ and HxBRUR⁻/p6⁻ transfected cells and in pelleted viruses (Fig. 3A and B). The faster migration of the pr55^{gag} polyprotein precursor encoded by the HxBRUR⁻/p6⁻ provirus reflects the C-terminal deletion of p6.³² Even though similar amounts of each Vpr-CAT fusion proteins were detected in both HxBRUR⁻ and HxBRUR⁻/p6⁻ cotransfected cells (Fig. 3A and B, left panels), R1-80CAT, R1-88CAT, R14-88CAT and CATR3-96 were only detected in the HxBRUR⁻ viral particles (Fig. 3A, lanes 10, 12, 14, and 16), but not in HxBRUR⁻/p6⁻ viruses (Fig. 3A, lanes 11, 13, 15, and 17). In contrast, fusion proteins R1-42CAT and CATR3-42 were detected in both HxBRUR⁻ and HxBRUR⁻/p6⁻ viral particles (Fig. 3B, lanes 8 to 11). These results clearly indicate that virion incorporation of R1-80CAT, R1-88CAT, R14-88CAT, and CATR3-96 requires the presence of an intact HIV Gag p6 domain, whereas virion incorporation of R1-42CAT and CATR3-42 occurs even in the absence of p6.

Analysis of the processing of virion-associated Vpr-CAT fusion proteins containing HIV-1 protease cleavage sites

The possibility of releasing Vpr fusion partners in their native forms into viral particles is highly desirable since some fusion partners may lose their biological activity in the context of a fusion protein. Toward this goal, we inserted the HIV protease-cleavage amino acid sequences: SQNY/PIV or ARVL/AEA between the Vpr segment R14-88 and CAT and generated the R14-88CAT-pcs2 and R14-88CAT-pcs3 expression plasmids (Fig. 4A). These amino acid sequences correspond respectively to the processing sites located between HIV p17^{gag} and p24^{gag}, and between p24^{gag} and p2^{gag}. Previous studies have shown that these amino acid sequences are efficiently cleaved by the HIV protease *in vitro*.³³

To determine whether the R14-88CAT-pcs fusion proteins could be non-specifically cleaved in host cells in the absence of HIV infection, we first expressed R14-88CAT-pcs2, R14-88CAT-pcs3 or R14-88CAT proteins in COS-7 cells and performed pulse-chase labeling experiments. Detection of the Vpr fusion proteins by immunoprecipitation using rabbit anti-CAT antibodies revealed that, like R14-88CAT, both R14-88CAT-pcs2 and R14-88CAT-pcs3 were relatively stable for up to 5 h and no cleaved CAT products

were detected in the cell lysates (Fig. 4B). These results indicate that Vpr-fusion proteins containing HIV protease-cleavage sites did not undergo non-specific proteolytic cleavage in COS-7 cells.

To test whether these Vpr-fusion proteins can be efficiently incorporated and subsequently processed in HIV-1 viral particles, each of the Vpr-CAT-pcs expressors was cotransfected in COS-7 cells with either HxBRUR⁻ or a protease-defective provirus (SVC-p2).³⁴ Following radiolabeling, viral particles were pelleted, lysed and immunoprecipitated first with anti-CAT antibodies and subsequently with the HIV positive human serum. The SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates reveals that HIV protease-cleaved products, including p24^{gag} and p66^{RT}, are clearly present in the wild type virions (Fig 4C, lower panel, lanes 1, 2 and 4), whereas in HIV protease-defective viral particles, only uncleaved pr55^{gag} precursor is primarily detected (Fig. 4C, lower panel, lanes 3 and 5). In parallel, anti-CAT immunoprecipitations clearly show that each of the three Vpr-fusion proteins is clearly detected in released viral particles (Fig. 4C, upper panel, lanes 1 to 5). Interestingly, in addition to the intact fusion proteins R14-88CAT-pcs2 or R14-88CAT-pcs3, large amount of cleaved CAT products are detected in wild type HIV viral particles (Fig. 4C, upper panel, lanes 2 and 4). However, no such cleaved CAT products were detected in protease-defective virions (Fig. 4C, upper panel, lanes 3 and 5). As expected, no cleaved CAT products were detected in wild type viral particles containing R14-88CAT proteins. (Fig. 4C, upper panel, lane 1). This indicates that the presence of an HIV protease processing site in Vpr-CAT fusion proteins allows the specific cleavage of the fusion partner by the HIV protease in the viral particles.

To evaluate the cleavage efficiency of the Vpr-CAT-pcs fusion proteins in virus particles, the levels of intact R14-88CAT, R14-88CAT-pcs2, R14-88CAT-pcs3 fusion proteins and cleaved CAT product found in each virus sample were evaluated by densitometric analysis of the autoradiograms presented in Fig. 4C. The cleavage efficiency of each fusion protein was calculated as the ratio of virion-associated CAT relative to the corresponding Vpr-CAT fusion protein. The results indicate that, in the context of R14-88CAT, the SQNY/PIV cleavage site (in R14-88CAT-pcs2) is more efficiently cleaved by the HIV-1 protease than the ARVL/AEA site (in R14-88CAT-pcs3) (Fig. 4D).

Effect of Vpr-CAT fusion proteins on HIV-1 infectivity

We next tested whether the presence of Vpr-CAT proteins may affect the infectivity of progeny virions. Vpr-CAT fusion proteins were incorporated *in trans* into HIV virions by cotransfection of COS-7 cells with HxBRUR⁻ and Vpr-CAT (Fig. 5A) or Vpr-CAT-pcs

expressors (Fig. 5B). Viruses collected from COS-7 cells cotransfected with HxBRUR⁻ and a plasmid, SVCMVVPR⁻, which encodes a non-functional Vpr gene (initiation codon ATG-mutant), were used as a control. The infectivity of the progeny viruses derived from these cotransfected cultures was evaluated by MAGI assay.³⁵ Briefly, HeLa-CD4-b-Gal cells were infected for 2 hours with equal amounts of virus as determined by virion-associated reverse transcriptase (RT) activity. After 2 days, the number of infected cells (b-Galactosidase positive cells) in each infected culture was determined. Results of Figure 5A reveal that expression of R1-42CAT, R1-80CAT, R1-88CAT, R14-88CAT, CATR3-42 and CATR3-96 fusion proteins reduced viral infectivity (40 to 70%), as compared to the control virus (100%). Interestingly, the R1-62CAT fusion protein, that lost the ability to be incorporated into virions, did not affect viral infectivity (Fig. 5A). These results indicate that the incorporation of Vpr-CAT fusion proteins into HIV virus impairs viral infectivity albeit to different degrees.

We also compared the infectivity of viruses containing either R14-88CAT or R14-88CAT-pcs fusion proteins by MAGI assay. Surprisingly, the presence of R14-88CAT-pcs2 or R14-88CAT-pcs3 in the virions resulted in a drastic decrease of viral infectivity (25 to 30%), as compared to the wild type viruses (100%) or to viruses containing the corresponding fusion protein (R14-88CAT) without a protease cleavage site (70%) (Fig. 5B). These results clearly indicate that the insertion of HIV protease-cleavage sites in Vpr-CAT fusion proteins achieves an additional inhibitory effect on HIV infectivity.

To test whether this more potent inhibition of viral infectivity by Vpr-CAT-pcs fusion proteins is due to an interference of HIV Gag precursor processing, we cotransfected COS-7 cells with HxBRUR⁻ and each of the R14-88CAT, R14-88CAT-pcs2 or R14-88CAT-pcs3 expressors. Following a pulse-labeling with [³⁵S]-methionine for 20 min and chase for different time point, equal amounts of cells were lysed, immunoprecipitated with the human anti-HIV serum and analyzed by electrophoresis. To determine the processing rate of HIV Gag precursor in each cotransfected cell culture, the levels of p24^{gag} product and Pr55^{gag} precursor at each time points were evaluated by densitometric analysis of the autoradiograms. As a control, the levels of HIV gp120 glycoprotein and envelope precursor gp160 were also measured. Results from Fig. 6A indicate that, in the presence of R14-88CAT, the ratio of p24^{gag}/Pr55^{gag} reached respectively 1.6 and 2.1 at 3 and 5 h after pulse-labeling, whereas, in the presence of R14-88CAT-pcs2 or R14-88CAT-pcs3, the ratio of p24^{gag}/pr55^{gag} was only approximately 1 and 1.3 respectively (Fig. 6A). In contrast, no difference in the HIV envelope glycoproteins was observed (Fig. 6B). These results suggest that the presence of protease-cleavage site in Vpr-CAT-pcs fusion proteins interferes specifically with the processing of HIV Gag precursor and

consequently affect the infectivity of virions.

Discussion

In this study, we systematically investigated the use of Vpr as a signal to incorporate heterologous proteins into HIV virions. Using the CAT protein as a fusion partner, we first carried out a deletion analysis of Vpr to determine the minimal domain necessary for virion incorporation. Our results indicate that a Vpr segment encompassing amino acid 14 to 88 which contains the N-terminal helical domain and the LR domain optimally delivers Vpr fusion proteins into HIV virions, while having no cell cycle arrest activity (data not shown). Fusion of Vpr at the N- or C-terminus of CAT equally targeted fusion proteins into viral particles. Insertion of HIV protease-cleavage sites between Vpr and CAT can efficiently deliver and subsequently release the CAT protein into HIV particles. Moreover, our results indicate that virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins impairs the infectivity of progeny viruses. Interestingly, this antiviral effect was potentiated by the presence of HIV protease cleavage sites within the Vpr-CAT fusion proteins.

Several functional domains in HIV-1 Vpr have been identified and shown to be involved in different activities of the protein.^{1,3-7,36} Among them, the N-terminal putative alpha-helical domain was shown to play a critical role in Vpr's ability to be incorporated into HIV virions.^{11,12,31} Surprisingly, our deletion analysis indicates that the LR domain of Vpr is also required for efficient virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins. The removal of a stretch of amino acids containing the LR domain (amino acid 63 to 80) abolishes the virion incorporation capacity of the fusion protein, as shown for R1-62CAT (Fig. 1B). Sato *et al* also obtained similar results when a Vpr segment containing the first 63 amino acids of Vpr was fused 3' to CAT.²⁴ This is obviously not due to the protein instability since the R1-62CAT fusion protein was shown to be stable (Fig. 1B). The involvement of the LR domain in Vpr virion incorporation is still not clear. Several studies, including ours, that used substitution mutagenic analysis, did not implicate this region in Vpr virion-targeting function.^{11,12,31} These apparent conflicting results are likely due to the different type of experimental approaches used. In one case, substitution mutagenic analysis was performed on the native Vpr protein, whereas the present study used a deletion analysis in the context of a Vpr-CAT fusion protein. In addition, our study reveals that, while the virion incorporation of R1-80CAT, R1-88CAT, R14-88CAT, and CATR3-96, which contain the LR domain, is efficient and p6-dependent, both R1-42CAT and CATR3-42 fusion proteins, which contain only the N-terminal alpha-helical region of Vpr, are incorporated into virions through a p6-independent process. These results provide evidence indicating that the middle region of Vpr encompassing amino acids 43 to

80, including the LR domain, may be necessary for efficient and p6-dependent virion incorporation. Indeed, the presence of the LR domain may be necessary for the maintenance and corrective exposure of the N-terminal helical domain for an interaction with the Gag polyprotein precursor.

The fusion of Vpr at either the N- or the C-terminus of a heterologous protein could differentially affect the biological activity of the heterologous protein. Therefore, we investigated the effect of positioning of Vpr at the N- or C-terminus of the fusion partner on the virion incorporation. Results indicate that the position of Vpr segment R14-88 at the N- or C-terminus of the CAT protein equally targeted the fusion protein into HIV virions. Moreover, our results indicate that the expression of either R14-88CAT or CATR14-88 fusion protein does not affect cell growth (data not shown). These results provide valuable information for the design of Vpr fusion proteins containing fusion partners that are still biologically active.

One important issue of the Vpr-mediated virion incorporation system is the possibility of releasing heterologous proteins, such as enzymatic or toxic molecules, from the Vpr fusion proteins after incorporation into virions. Moreover, in some instances, such fusion proteins should be kept in an inactive form when expressed in cells. To achieve these goals, we specifically inserted HIV protease-cleavage sites into Vpr-CAT fusion proteins. These fusion proteins were shown to be resistant to cellular proteases and remained as intact fusion proteins in host cells. However, in the HIV-transfected cells, these Vpr-CAT fusion proteins were efficiently incorporated and cleaved by the HIV protease during viral morphogenesis (Fig. 4). Thus, this strategy provides a specific and efficient way to deliver enzymatic or toxic molecules into HIV viral particles since the cleavage of fusion proteins depends upon the activation of the HIV protease which occurs late in the viral morphogenesis. Interestingly, two recent reports demonstrated that reverse transcriptase (RT)- or integrase (IN)-defective HIV viruses could be rescued *in trans* by exogenous Vpr-RT or Vpr-IN fusion proteins, which contained natural HIV protease cleavage sites between the Vpr and the enzymatic segments.^{22,23}

Previous studies have shown that virion incorporation of Vpr fusion proteins such as Vpr-HIV protease mutant, Vpr-polypeptide derived from the C-terminus of HIV-1 Vpu, Vpr-CAT and Vpr-staphylococcal nuclease impaired HIV infectivity.²⁶⁻²⁸ In the present study, using different Vpr-CAT fusion proteins, we clearly correlated the suppressive effect on viral infectivity with virion incorporation ability of the fusion proteins. Indeed, the R1-62CAT fusion protein that lost the ability to be incorporated into virions had no effect on the viral infectivity.

A recent study by Serio *et al.* demonstrated that the insertion of HIV protease-

cleavage sites in the Vpr gene, in the context of proviral constructs, impaired the infectivity of HIV viruses.³⁷ In the present study, we confirm and expand these results by showing that the insertion of an HIV protease-cleavage site in Vpr-CAT fusion protein (termed as Vpr-CAT-pcs) not only release cleaved CAT molecules into HIV viral particles, but also potentiate the antiviral effect mediated by the fusion proteins (Fig. 5B). Since, in our study, the Vpr-CAT-pcs fusion protein was supplied *in trans*, the inhibitory effect on viral infectivity could not result from a possible *cis*-acting negative effect. Earlier biochemical analyses have shown that the HIV-1 and HIV-2 particles contain approximately 2500 Gag molecules³⁸. Since Vpr and Vpx proteins are present in viral particles in molar amounts equivalent to Gag protein,^{1,2,39,40} it is likely that the presence of large number of pseudo-substrates, such as R14-88CAT-pcs2 or R14-88CAT-pcs3, in viral particles may saturate the viral protease and consequently interfere with the processing of viral precursor protein leading to maturation defects. Indeed, our pulse-chase data reveals that the presence of R14-88CAT-pcs2 and R14-88CAT-pcs3 inhibits the processing of HIV Gag precursors during viral assembly (Fig. 6).

Overall, this study presents a systematic analysis of a Vpr-based delivery system for targeting foreign proteins into HIV-1 viral particles. Our data provide a model system for the development of Vpr fusion proteins that could be used: 1) as gene therapeutic agents to combat HIV infection *in vivo*; 2) as research reagents to understand HIV enzyme function independent of the Gag-Pol precursor as well as basic process of retroviral assembly and maturation.

Materials and methods

Cell lines, antibodies and HIV-1 proviruses

COS-7, an African green monkey kidney cell line, and human embryonic kidney 293T cells were propagated in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The HeLa-CD4-b-Gal cell line was obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. The purified rabbit anti-CAT antibodies were purchased from 5'prime-3'prime, Inc. (Boulder, CO, USA). The HIV-1 positive human serum 162 and the rabbit anti-Vpr serum have been previously described.¹⁵ The monoclonal anti-HIV p24^{gag} antibody was purchased from INTRACEL Inc (Cambridge, MA, USA). The HIV-1 proviral molecular clone HxBRUR⁻ is a hybrid between two closely related HIV proviruses HxBc2 and BRU/LAI.¹² HxBRUR⁻/p6⁻ was constructed by replacing an *ApaI*-*BclI* (nt 1556 to 2011, +1= start of initiation of transcription of HxBRU) fragment of HxBRUR⁻ with a corresponding fragment from HxBc2/p6⁻(S17/s), in which the codon specifying for serine residue 17 in the p6 domain of HIV Gag was changed to a stop codon TGA, as described previously.³² The protease-defective HIV provirus SVC-p2 was a gift from Dr. Göttlinger.³⁴ The wild type Vpr expressor SVCMVVPR⁺ and the negative control plasmid SVCMVVPR⁻ that encodes a non-functional Vpr gene (initiation codon ATG-mutant), were previously described.¹²

Construction of Vpr-CAT expression plasmids

Most of Vpr-CAT expression plasmids were derived from an intermediate plasmid SVCMVCAT-ATG⁻, that was constructed by inserting a PCR-amplified CAT cDNA with a mutated ATG codon and flanking *XbaI* and *SacI* sites (at 5' and 3' end of cDNA) into an eukaryotic expression vector SVCMVexpa containing a cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter.¹² The primers used for amplification of the CAT cDNA are the following: 5' oligo: 5'-AAG GAA GCT TCT AGA GAG AAA AAA A-3'; and 3' oligo: 5'-TTA AAA AAA CTA GTG AGC TCC CTG CCA CT-3'. To construct Vpr-CAT fusion protein expressors, different fragments of the Vpr gene were amplified by PCR using a 5'-primer located before the initiation codon (ATG) of Vpr and 3'-primers that ended at amino acid (aa) position 42, 62, 80, or 88 respectively in the Vpr gene. *XbaI* sites flanking each side of the PCR-amplified Vpr fragment were introduced. The 5' oligo is 5'-ACTTCTAGAGGATAGATGGAACAAGCC-3'. The different 3' oligos used are the following; R1-42, 5'-ATAGATATGTCTAGATAAGCCATGG-3'; R1-62, 5'-CAGAATTCTAGATATGGCTTCC-3'; R1-80, 5'-

GCCTATTCTAGAATGTCGACAC-3'; R1-88, 5'-GGCTCCATTTCTAGATCTCCTCTG-3'. After digestion with *Xba*I, each of these Vpr fragments was inserted into the *Xba*I site of SVCMVCAT-ATG⁺ in frame with the CAT gene. The plasmid R14-88CAT was generated in a similar way by inserting a PCR-amplified cDNA encoding Vpr amino acid sequence from aa residue 14 to aa residue 88 into SVCMVCAT-ATG⁺. In this R14-88 cDNA, 13 aa from the N-terminus of Vpr were removed and an initiation codon (ATG) preceded by an *Xba*I site was created at aa position 13 (5' oligo is 5'-ACTTCTAGAGGATAGATGCCACACAATGAA-3'). A similar construction strategy was also used to construct R14-88CAT-pcs2 and R14-88CAT-pcs3 expressors, in which each of the sequences encoding different HIV protease-cleavage sites were inserted between the Vpr and the CAT genes by PCR using 3' oligos (3' oligo for SQNY/PIV, 5'-ATCTAGATACGATCGGATAATTCTGGCTTACTCTCCTCTG-3'; 3' oligo for ARVL/AEA, 5'-ATCTAGAAGCCTCTGCGAGTACTCTAGCTCTCCTCTGT-3'). In addition, three other plasmids CATR3-42, CATR14-88 and CATR3-96 expressors were made by fusing each of PCR-amplified Vpr cDNA (R3-42, R14-88 or R3-96) in frame at the 3' end of a functional CAT gene in the plasmid expressor SVCMVCAT-ATG⁺.

Transfection and HIV Infection

To test the virion incorporation of Vpr and Vpr-CAT fusion proteins, COS-7 cells (1×10^6) were cotransfected with 10 mg of different HIV-1 proviral constructs and 20 mg of the different Vpr-CAT expressors using a standard calcium-phosphate method. The transfected cells were then washed, maintained in DMEM containing 10% FCS for 48 to 72 h and used for different experiments.

For viral infectivity determination, supernatants were collected from COS-7 cells 72 hours post-transfection and filtrated through 0.45- μ m membrane filters. The titer of virions in supernatants was determined by measurement of reverse transcriptase (RT) activity.⁴¹ To analyze the effect of virion-incorporated Vpr fusion proteins on viral infectivity, a MAGI assay was performed as follow: HeLa-CD4-b-Gal cells were infected with the equal amounts of virus (300,000 cpm of RT activity), for 2 hours. After 48 hours of culture, cells were fixed and the number of HIV-infected cells (b-Gal positive cells) was determined, as previously described.³⁵

Cell labeling and Radioimmunoprecipitation

Forty-eight to sixty-two hours post-transfection, COS-7 cells were labeled with 200 μ Ci/ml of [³⁵S]methionine (Trans³⁵S-Label; ICN, Irvine, CA) for 12 h. After labeling,

supernatants were first filtered through a 0.45- μ m membrane filter and virions in supernatants were pelleted through a 20% sucrose cushion by ultracentrifugation with a Beckman Ti61 rotor at 32,000 rpm for 2 h. Both cells and pelleted viruses were lysed in RIPA buffer and immunoprecipitated with rabbit anti-CAT antibodies and/or rabbit anti-Vpr serum or the human HIV-1 positive serum as described previously.¹² Immunoprecipitates were then run on a SDS-12.5% polyacrylamide gel and subsequently analyzed by autoradiography.

For pulse-chase labeling, transfected COS-7 cells were first starved 48 h post-transfection, in methionine-free DMEM medium for 15 min and scraped off the petri dish during the starvation. Cells were then pulse-labeled with 300 μ Ci of [³⁵S]methionine in 0.5 ml of medium for 20 to 30 min and washed with complete DMEM containing 10% FCS. Following several washes, labeled cells were resuspended in 2 to 3 ml of complete DMEM containing 10 % FCS and incubated at 37°C. At different time points, equal amounts of cells were collected, lysed and immunoprecipitated with different antibodies, as described previously¹². Densitometric analysis of autoradiograms was performed with a Molecular Dynamics Personal densitometer using an ImageQuant™ software version 3.22.

Sucrose gradient ultracentrifugation

The virions in supernatants were first pelleted through a 20% sucrose cushion by ultracentrifugation at 32,000 rpm as described above and resuspended in TNE buffer (10 mM Tris, pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Virion preparations were then sedimented through a linear 20% to 60% sucrose gradient by ultracentrifugation at 32,400 rpm for 16 h with a Beckman SW41 rotor. After ultracentrifugation, different fractions were collected and analyzed by immunoprecipitation with the monoclonal anti-HIV p24^{gag} or the anti-CAT antibodies, as described previously.²⁶

Acknowledgments

We would like to thank Drs. Dominique Bergeron, Andrew J Mouland and Ramu A Subbramanian for helpful discussions. We thank Dr Göttlinger for supplying plasmids SV-p2 and HxBc2/p6⁺(S17/s). G.P. Kobinger is a recipient of a studentship from the National Health Research and Development Program (NHRDP) of Canada. S. Dandache is a recipient of a studentship from the Natural Sciences & Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Theratechnologies Inc. EA Cohen is a recipient of career awards from NHRDP and the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). This work was supported by grants from MRC, Theratechnologies Inc and FCAR to EA Cohen.

References

1. Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus Vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* 1990; **64**:3097-3099.
2. Yu X-F, Matsuda M, Essex M, Lee TH. Open reading frame Vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J Virol* 1990; **64**:5688-5693.
3. Heinzinger NK *et al.* The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7311-7315.
4. Levy DN, Fernandes LS, Williams WV, Weiner DB. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 Vpr. *Cell* 1993; **72**: 541-550.
5. Rogel ME, Wu LI, Emerman M. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 1995; **69**:882-888.
6. He J *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 1995; **69**:6705-6711.
7. Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 1995; **69**:6859-6864.
8. Goh WC *et al.* HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nature Medicine* 1998; **4**: 65-71.
9. Subbramanian RA *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *J Exp Med* 1998; **187**: 1103-1111.
10. Yao X-J *et al.* Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1 infected dividing Jurkat T cells. *J Virol* 1998; **72**: 4686-4693.
11. Mahalingam S *et al.* Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. **92**:3794-3798.
12. Yao X-J *et al.* 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* 1995; **69**:7032-7044.
13. Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of Gag and mutational analysis. *J Virol* 1993; **67**: 7229-7237.

14. Lu YL, Spearman P, Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 1993; **67**: 6542-50
15. Lavallée C *et al.* Requirement of the Pr55^{gag} precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency type 1 viral particles. *J Virol* 1994; **68**: 1926-1934.
16. Kondo E, Mammano F, Cohen EA, and Göttlinger HG. The p6^{gag} domain of human immunodeficiency type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol* 1995; **69**: 6304-6313.
17. Checroune F *et al.* Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the p6 domain of Pr55^{gag}. *J AIDS Hum Retrovirol* 1995; **10**: 1-7.
18. Lu YL *et al.* A leucine triplet repeat sequence (LXX)₄ in p6^{gag} is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 1995; **69**: 6873-6879.
19. Kondo E, and Göttlinger HG. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6^{gag} required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 1996; **70**: 159-164
20. Li M-S *et al.* The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to nucleocapsid protein p7 *in vitro*. 1996; *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 352-355.
21. de Rocquigny H *et al.* The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interaction with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem* 1997; **273**: 30753-30759.
22. Wu X-Y *et al.* Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *EMBO J.* 1997; **16**: 5113-5122.
23. Fletcher TM *et al.* Complementation of integrase function in HIV-1 virions. *EMBO J* 1997; **16**: 5123-5138.
24. Sato A *et al.* Targeting of chloramphenicol acetyltransferase to human immunodeficiency virus particles via Vpr and Vpx. *Microbiol Immunol* 1995; **39**: 1015-1019.
25. Park I-W, Sodroski J. Targeting a foreign protein into virion particles by fusion with the Vpx protein of simian immunodeficiency virus. *J AIDS Hum Retrovirol* 1995; **11**: 341-350.
26. Wu X-Y *et al.* Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx. *J Virol* 1995; **69**: 3389-3398.
27. Wu X-Y *et al.* Inhibition of human and simian immunodeficiency virus type protease function by targeting Vpx-protease-mutant fusion protein into viral particles. *J Virol* 1996; **70**: 3378-3384.

28. Kobinger GP *et al.* Virion-targeted viral inactivation against the human immunodeficiency type 1 using Vpr fusion proteins. *J Virol* 1998; **72**: 5441-5448.
29. Zhao LJ, Mukherjee S, Narayan O. Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15577-15582.
30. Di Marzio P *et al.* Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 1995; **69**: 7909-7916.
31. Mahalingam S *et al.* Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 1997; **71**:6339-6347
32. Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on Human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3195-3199.
33. Darke PL *et al.* HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 297-303.
34. Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of Human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5781-5785.
35. Kimpton J, and Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated b-galactosidase gene. *J Virol* 1992; **66**: 2232-2239.
36. Cohen EA *et al.* Identification of HIV-1 Vpr product and function. *J Acquired Immune. Defic Syndr* 1990; **1**:11-18.
37. Serio D *et al.* Development of a novel anti-HIV-1 agent from within: effect of chimeric Vpr-containing protease cleavage site residues on virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3346-3351.
38. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997. pp27-69.
39. Henderson LE *et al.* Isolation and characterization of a novel protein (x-orf product) from SIV and HIV-2. *Science* 1988; **241**:199-201
40. Matsuda Z *et al.* A virion-specific inhibitory molecule with therapeutic potential for human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3544-3548
41. Lee MH, Sano K, Morales FE, Imagawa DT. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J Clin Microbio* 1987; **25**: 1717-1721.

Figure legends

Figure 1 Generation of different Vpr-CAT fusion proteins and analysis of their ability to incorporate into HIV particles. **A.** The amino acid sequence and functional domains of Vpr are shown at the top of the panel. The bottom of the panel shows the amino acid sequences of Vpr fused at the N- or C-terminus of the CAT protein. **B.** COS-7 cells were cotransfected with each Vpr-CAT expressor and an HIV-1 provirus HxBRUR⁻, as indicated. Following radio-labeling, both cells and pelleted viruses were lysed, immunoprecipitated with a mix of anti-Vpr and anti-CAT antibodies (upper panel) and subsequently with an HIV-1 positive human serum (lower panel). The positions of viral protein p24^{gag}, Vpr and CAT are indicated. **C.** Quantification of virion incorporated Vpr-CAT proteins. Levels of virion-incorporated Vpr-CAT fusion proteins were calculated as a ratio of virion-associated Vpr-CAT over the total amount of Vpr-CAT protein. This ratio was also adjusted relatively to the levels of virion-associated p24^{gag} protein. The level of virion-associated wild type Vpr was arbitrarily set as 100%. **D.** Sucrose gradient analysis. HIV particles containing R14-88CAT fusion proteins were layered onto a 20 to 60% continuous sucrose gradient and ultracentrifuged. Different fractions were then analyzed for the presence of the R14-88CAT fusion protein (upper panel) and HIV p24^{gag} proteins (lower panel) by immunoprecipitation. The amount of R14-88CAT in each fraction was quantified by densitometry. The signal detected in the first fraction was arbitrarily set as 1.

Figure 2 The effect of Vpr position within the fusion protein on virion incorporation. COS-7 cells were cotransfected with HxBRUR⁻ and R14-88CAT or CATR14-88 expressor plasmids. Forty eight hours post-transfection, labeled cells and pelleted virions were lysed and immunoprecipitated with a mix of the HIV-1 positive human serum and anti-CAT antibodies. The positions of viral proteins, R14-88CAT and CATR14-88 are indicated.

Figure 3 Requirement of the Gag p6 domain for virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins. COS-7 cells were cotransfected with HxBRUR⁻ or HxBRUR⁻/p6⁻ and Vpr-CAT expression plasmids. Panel A: R1-80CAT, R1-88CAT, R14-88CAT, CATR3-96; Panel B: R1-42CAT, CATR3-42. At 48 h post-transfection, labeled cells (left panel) and pelleted virions (right panel) were then lysed and immunoprecipitated with an HIV-1 positive human serum mixed with anti-CAT antibodies. The positions of HIV specific proteins and Vpr-CAT fusion proteins are indicated.

Figure 4 Specific processing of Vpr-CAT-pcs fusion proteins containing different HIV-1 protease-cleavage sites. **A.** Generation of constructs encoding Vpr-CAT-pcs fusion proteins. Each of HIV protease-cleavage sites was inserted between Vpr segment R14-88 and CAT, as described in Materials and Methods. The amino acid sequence and the position of each cleavage site are indicated. (pcs: protease cleavage site). **B.** Stability of Vpr-CAT-pcs proteins. COS-7 cells transfected with each R14-88CAT-pcs expressors, as indicated, were pulse radio-labeled for 30 min and chased for different time points. Cell samples were then lysed and immunoprecipitated with anti-CAT antibodies. **C.** Cleavage of Vpr-CAT-pcs fusion proteins by the HIV protease in the viral particles. The wild type and protease-defective HIV viral particles containing each of Vpr-CAT or Vpr-CAT-pcs proteins were lysed, immunoprecipitated with anti-CAT antibodies (upper panel), and subsequently with an HIV positive human serum (low panel). The positions of Vpr-CAT fusion proteins and cleaved CAT product are indicated. **D.** Quantification of the cleavage efficiency of each Vpr fusion proteins. Cleavage efficiency for each Vpr-CAT-pcs protein was calculated as a ratio of virion-associated cleaved CAT product relative to the corresponding Vpr-CAT-pcs fusion protein. Similar values were obtained in two independent experiments.

Figure 5 Effect of Vpr-CAT fusion proteins on viral infectivity. HeLa-CD4-b-Gal cells were infected with equal amounts of viruses (as determined by RT measurement) derived from COS-7 cells cotransfected with HxBRUR⁻ and either different Vpr-CAT (A) or Vpr-CAT-pcs expressors (B). The wild type viruses were derived from COS-7 cells cotransfected with HxBRUR⁻ and SVCMVVPR⁻. At 2 days post-infection, the number of infected cells (b-Gal positive cells) was determined by MAGI assay.³⁵ The infectivity (% infectivity) of each virus was calculated as the ratio of the number of b-Gal positive cells relative to the number of b-Gal positive cells obtained in the wild-type virus infection (HxBRUR⁻), which was set at 100%. Means (+/- standard errors) from three independent experiments are presented.

Figure 6 The presence of Vpr-CAT-pcs fusion proteins inhibits HIV-1 Gag processing. Co-transfected COS-7 cells were pulse-chased for different time intervals. HIV viral proteins in the cell lysates were then immunoprecipitated with the HIV positive human serum, separated on SDS-PAGE and detected by autoradiography. The processing rate of HIV Gag and Env precursors was then analyzed by densitometric analysis of the autoradiograms. The processing of Gag and Env precursors at each time point was

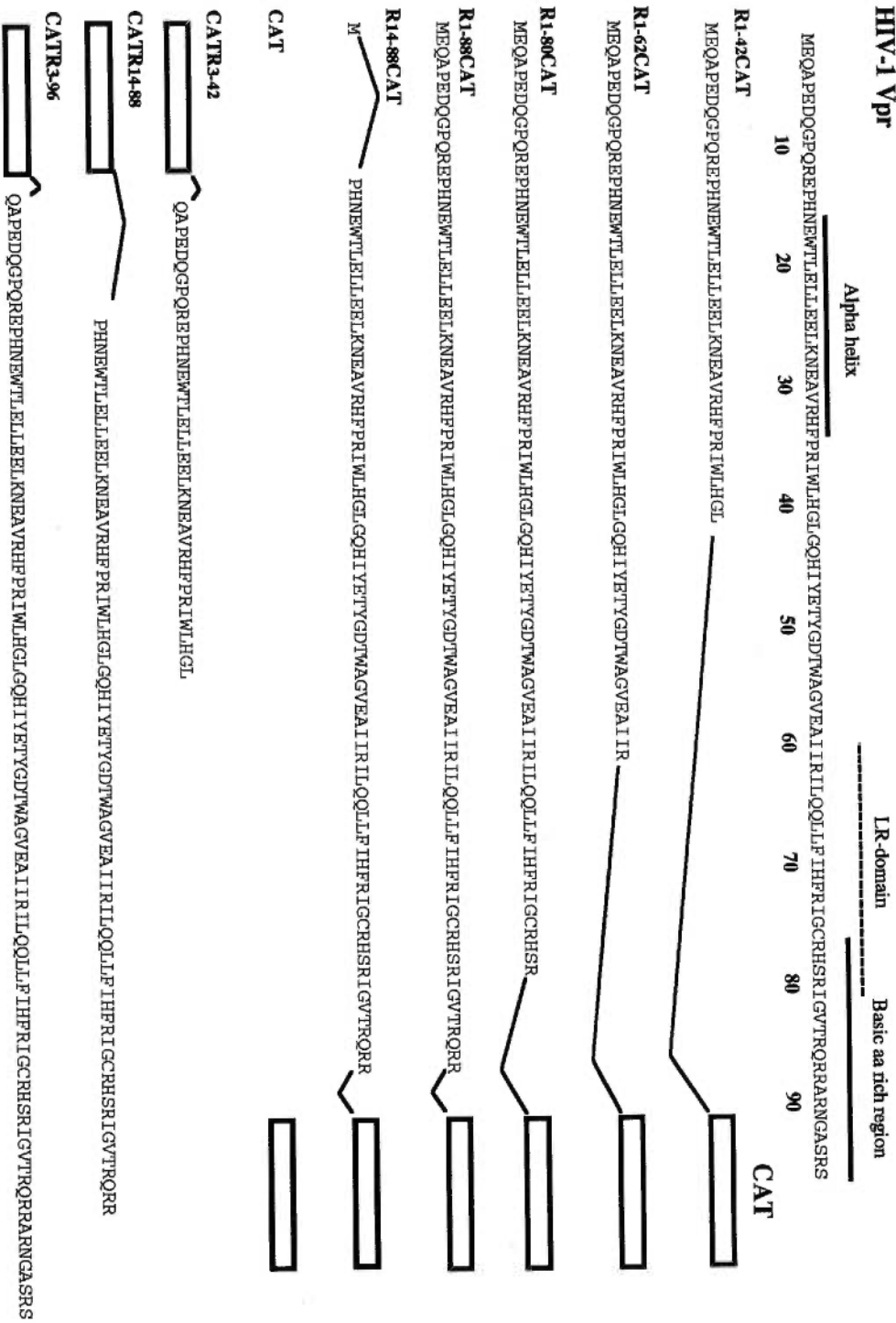
calculated as the ratio of p24^{gag} relative to the Pr55^{gag} precursor (A) or as the ratio of gp120 relative to the envelope precursor gp160 (B). These values are representative data from two independent experiments with standard deviation of less than 5%.

Figure 1

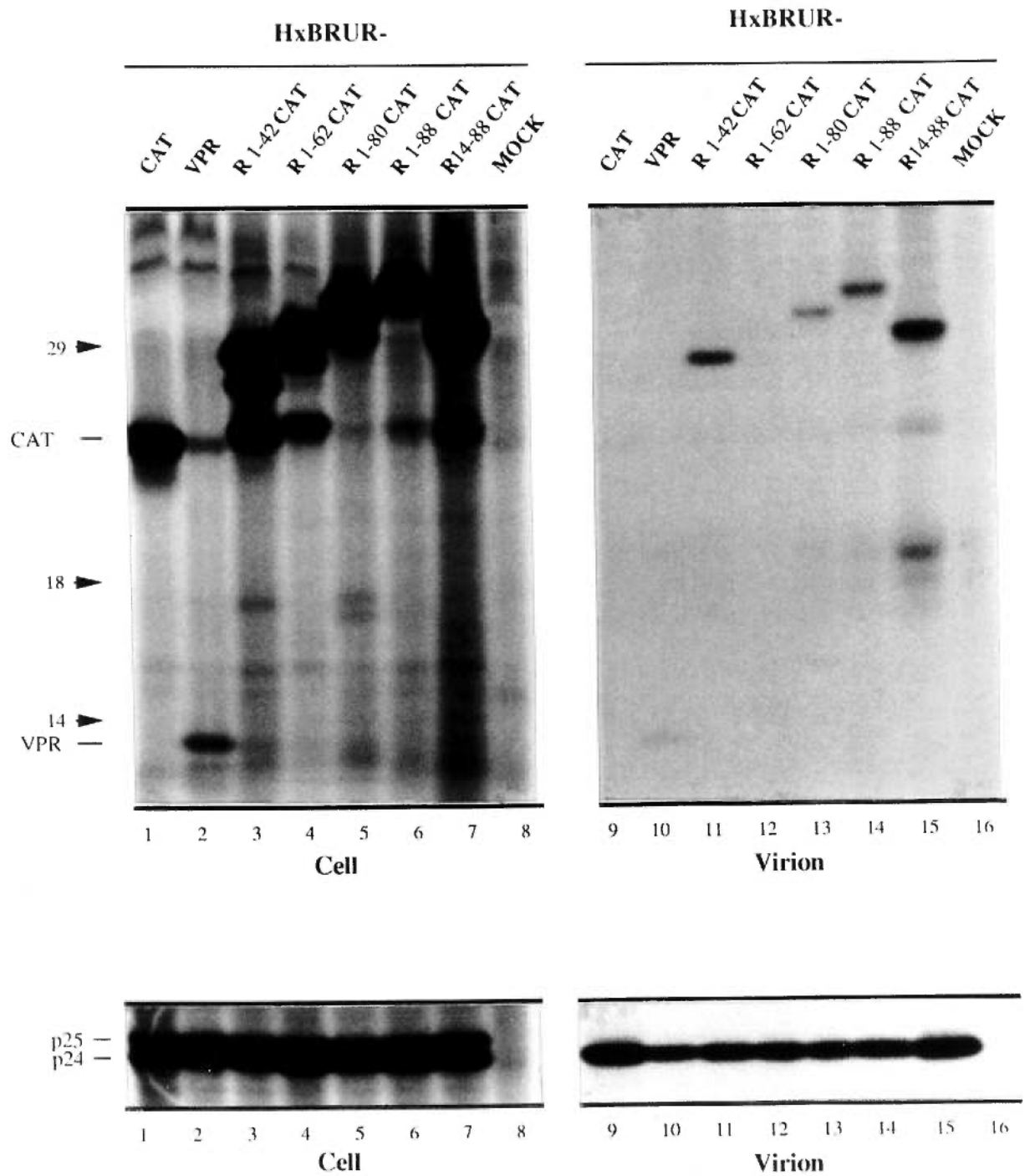
Generation of different Vpr-CAT fusion proteins and analysis of their ability to incorporate into HIV particles

A.

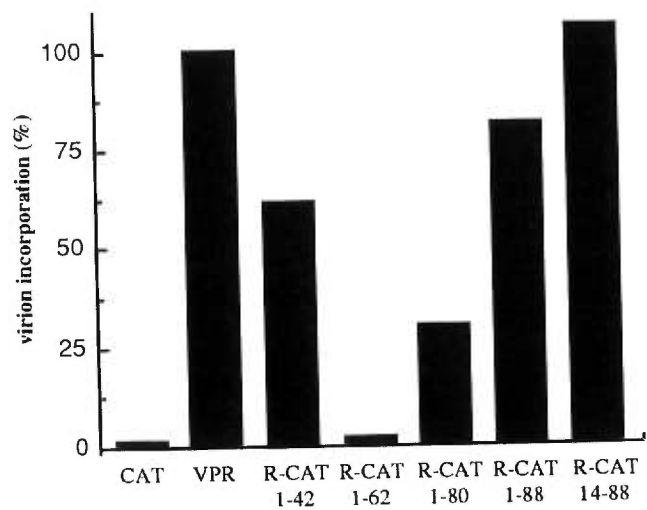
HIV-1 Vpr



B.



C.



D.

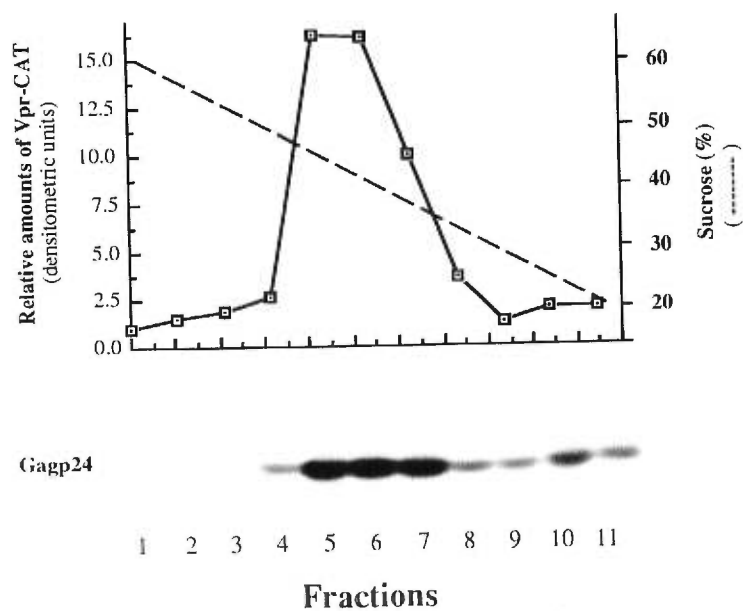


Figure 2

Effect of Vpr position within the fusion protein on virion incorporation

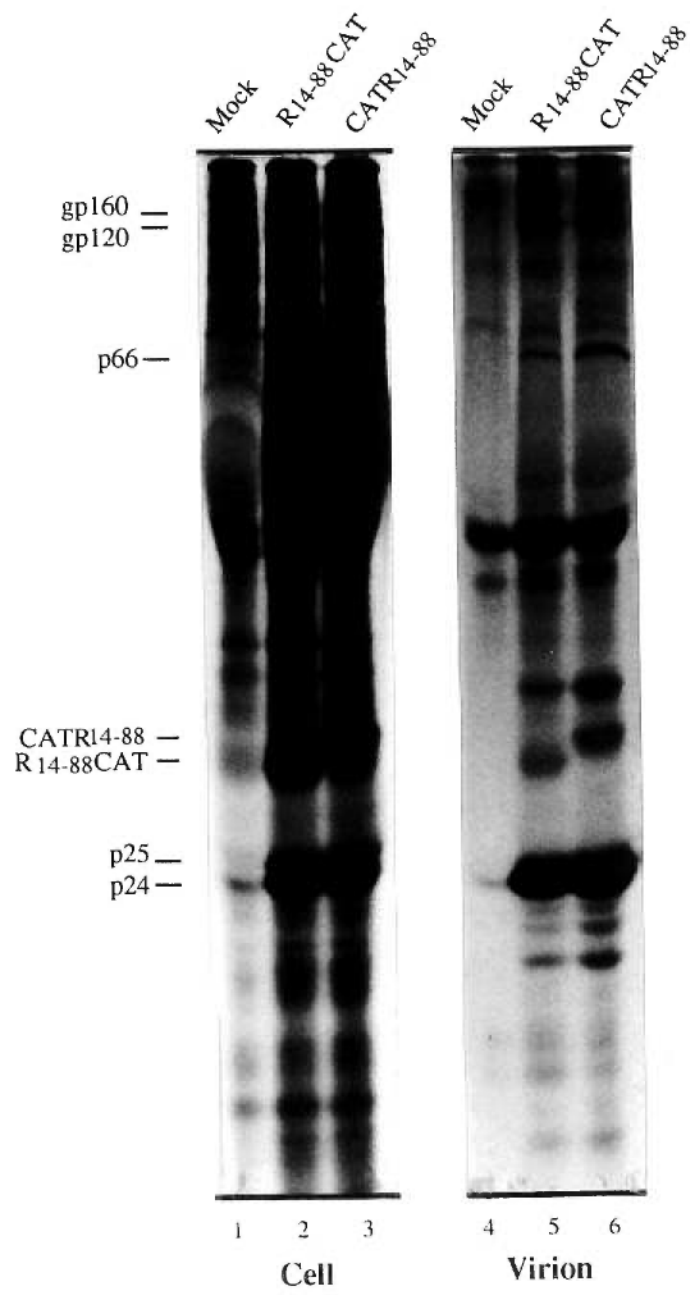
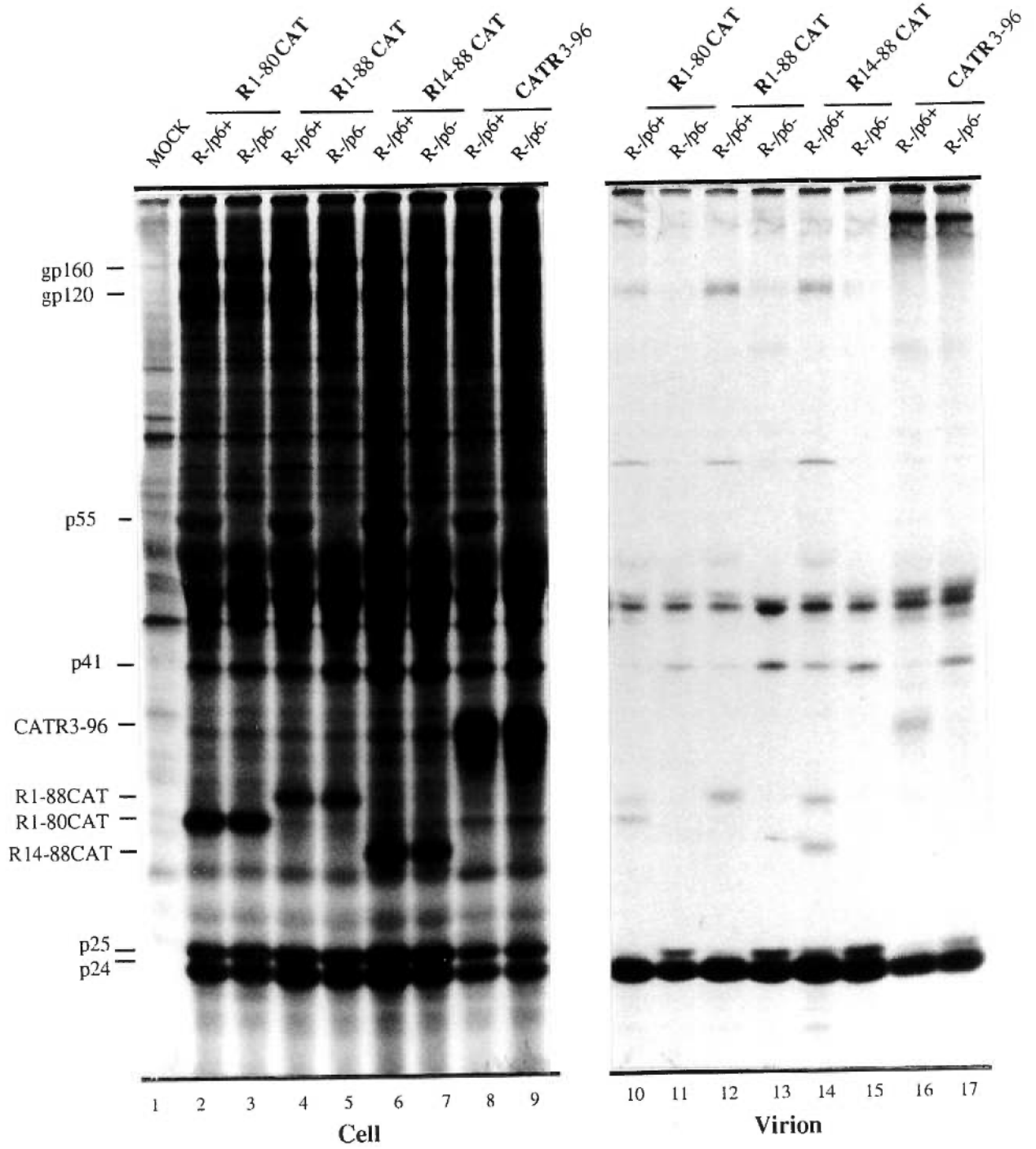


Figure 3

Requirement of the Gag p6 domain for virion incorporation of Vpr-CAT fusion proteins

A.



B.

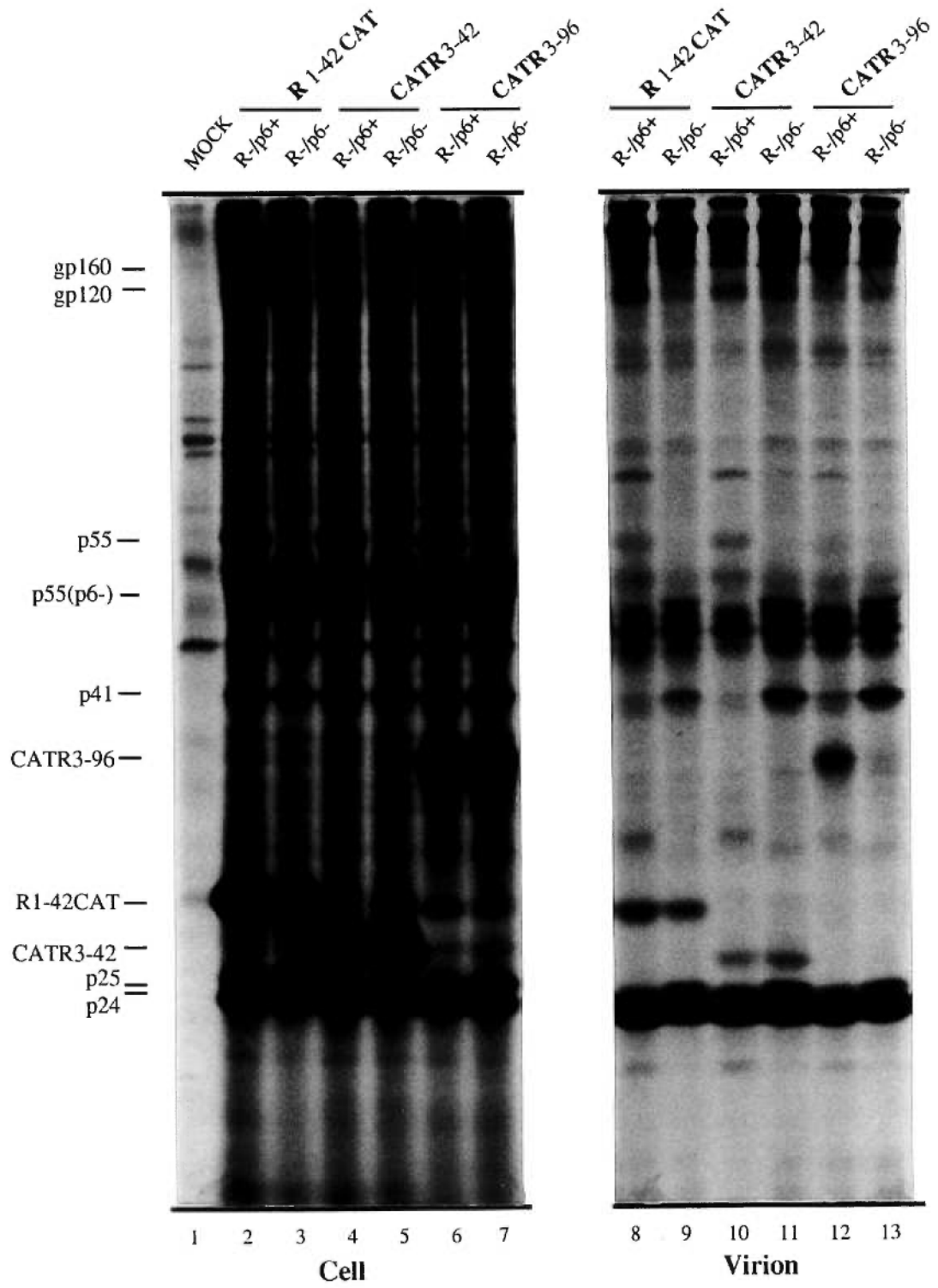
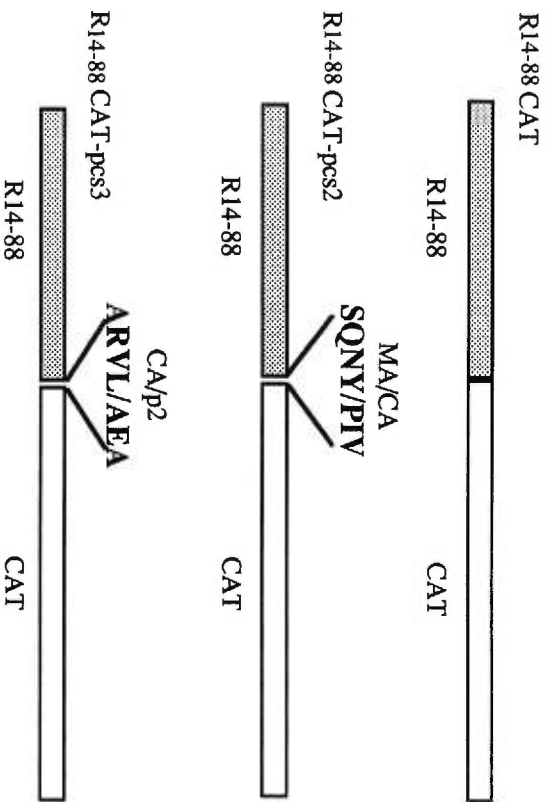


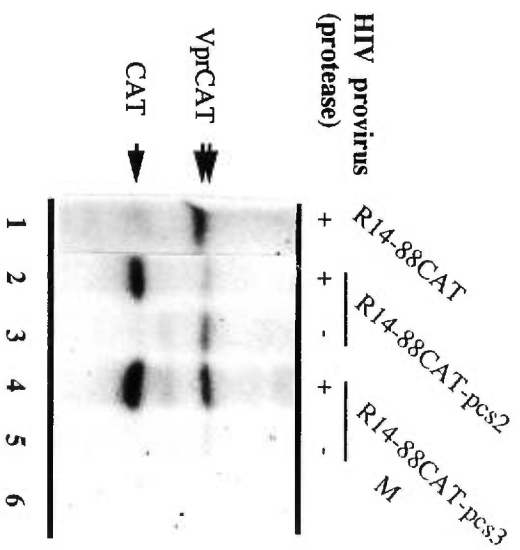
Figure 4

**Specific processing of Vpr-CAT-pcs fusion proteins containing different
HIV-1 protease-cleavage sites**

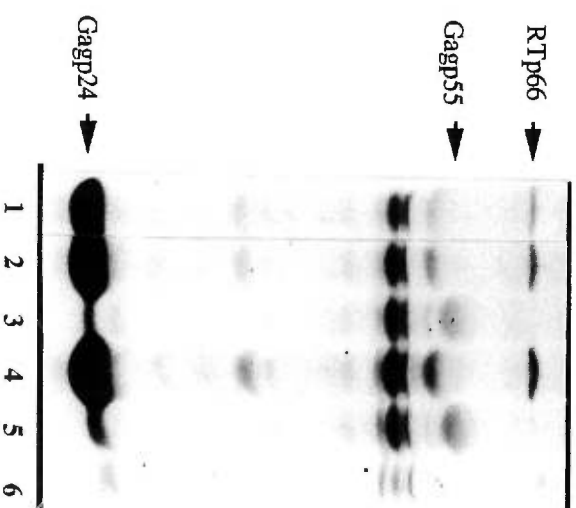
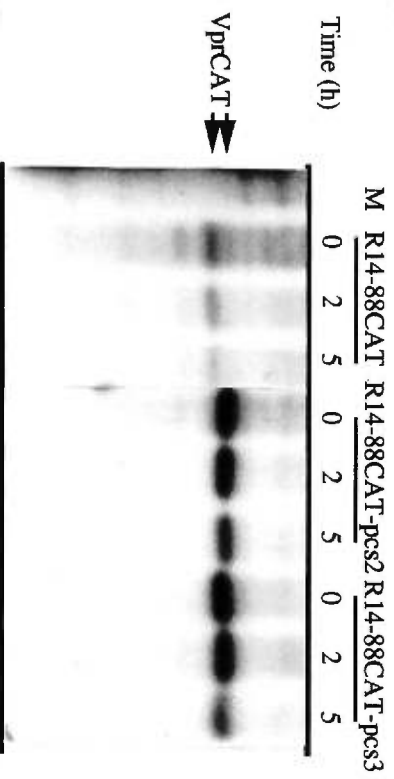
A.



C.



B.



D.

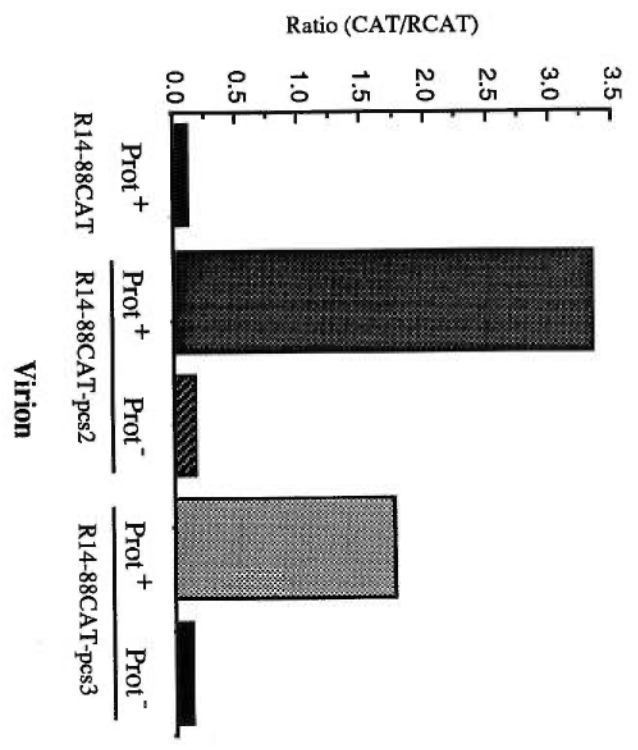
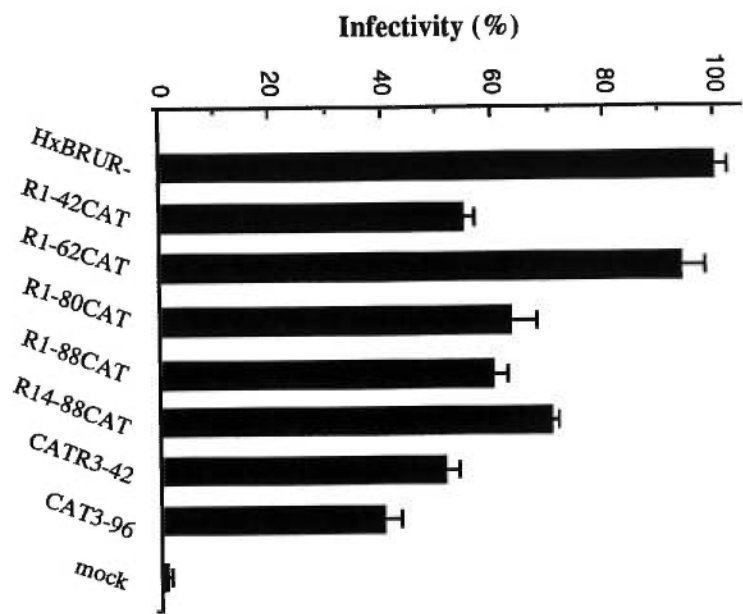


Figure 5**Effect of Vpr-CAT fusion proteins on viral infectivity**

A.



B.

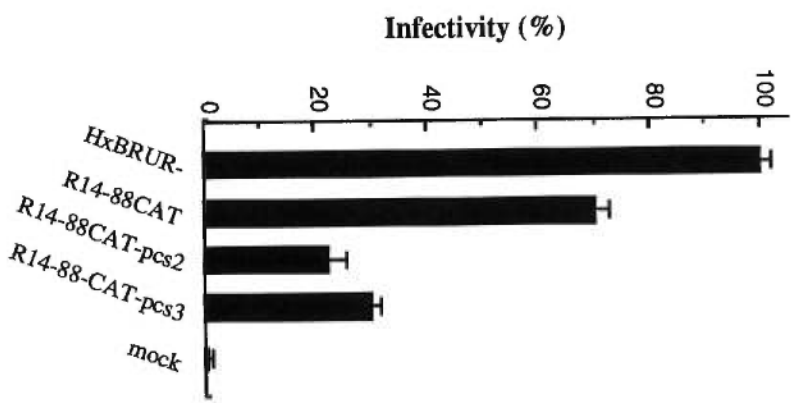
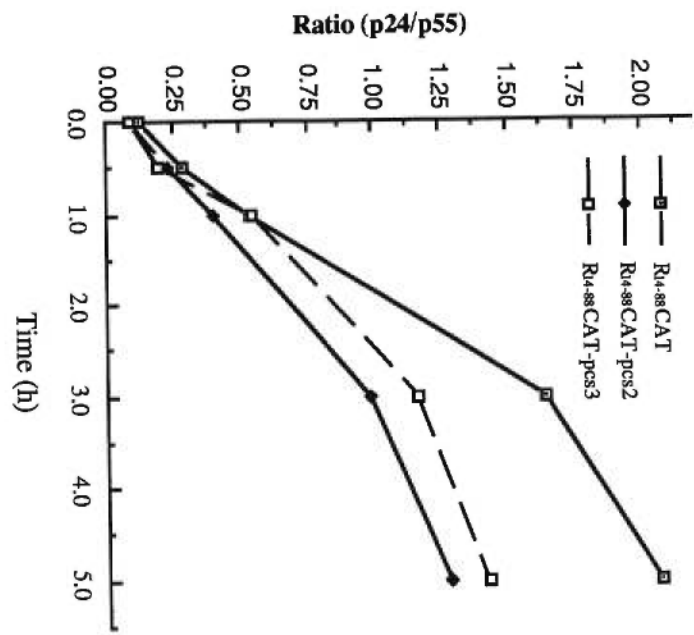


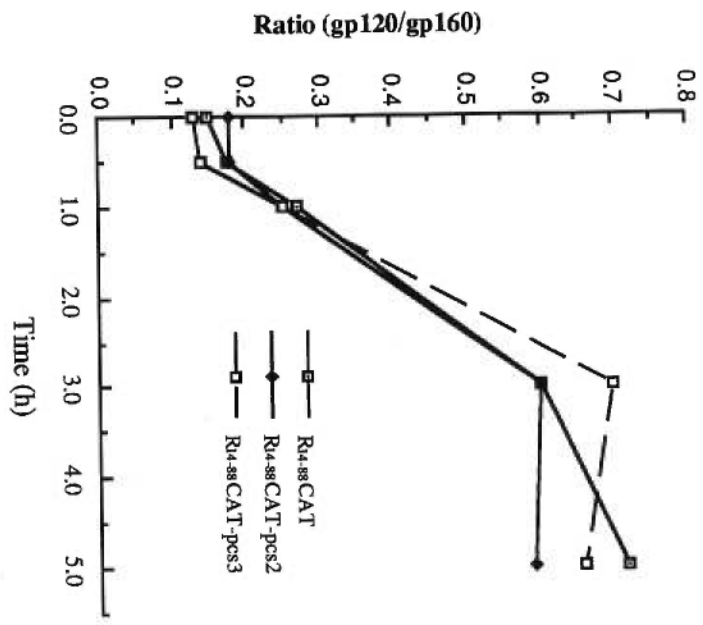
Figure 6

The presence of Vpr-CAT-pcs fusion proteins inhibits HIV-1 Gag processing

A.



B.



CHAPITRE 4

Virion-targeted viral inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 by using
Vpr fusion proteins

Kobinger, P. G., A. Borsetti, Z. Nie, J. Mercier, N. Daniel, H. G. Göttlinger and E. A.
Cohen. 1998. *Journal of Virology*. 72:5441-5448

Virion-Targeted Viral Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Using Vpr Fusion Proteins

GARY P. KOBINGER,¹ ALESSANDRA BORSETTI,² ZILIN NIE,¹ JOHANNE MERCIER,¹
NESRINE DANIEL,¹ HEINRICH G. GÖTTLINGER,² AND ÉRIC A. COHEN^{1*}

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7,¹ and
Division of Human Retrovirology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School,
Boston, Massachusetts 02115²

Received 8 December 1997/Accepted 25 March 1998

Inactivation of progeny virions with chimeric virion-associated proteins represents a novel therapeutic approach against human immunodeficiency virus (HIV) replication. The HIV type 1 (HIV-1) Vpr gene product, which is packaged into virions, is an attractive candidate for such a strategy. In this study, we developed Vpr-based fusion proteins that could be specifically targeted into mature HIV-1 virions to affect their structural organization and/or functional integrity. Two Vpr fusion proteins were constructed by fusing to the first 88 amino acids of HIV-1 Vpr the chloramphenicol acetyltransferase enzyme (VprCAT) or the last 18 C-terminal amino acids of the HIV-1 Vpu protein (VprIE). These Vpr fusion proteins were initially designed to quantify their efficiency of incorporation into HIV-1 virions when produced in *cis* from the provirus. Subsequently, CD4⁺ Jurkat T-cell lines constitutively expressing the VprCAT or the VprIE fusion protein were generated with retroviral vectors. Expression of the VprCAT or the VprIE fusion protein in CD4⁺ Jurkat T cells did not interfere with cellular viability or growth but conferred substantial resistance to HIV replication. The resistance to HIV replication was more pronounced in Jurkat-VprIE cells than in Jurkat-VprCAT cells. Moreover, the antiviral effect mediated by VprIE was dependent on an intact p6 ^{Gag} domain, indicating that the impairment of HIV-1 replication required the specific incorporation of Vpr fusion protein into virions. Gene expression, assembly, or release was not affected upon expression of these Vpr fusion proteins. Indeed, the VprIE and VprCAT fusion proteins were shown to affect the infectivity of progeny virus, since HIV virions containing the VprCAT or the VprIE fusion proteins were, respectively, 2 to 3 times and 10 to 30 times less infectious than the wild-type virus. Overall, this study demonstrated the successful transfer of resistance to HIV replication in tissue cultures by use of Vpr-based antiviral genes.

The assembly and maturation of human immunodeficiency virus (HIV) particles constitute a complex process in which the structural *gag*, *pol*, and *env* gene products are expressed in the form of polyprotein precursors. The production of infectious viral particles requires incorporation of the Env glycoproteins gp120 and gp41 during viral budding and processing of the Gag and Gag-Pol polyproteins by the viral protease (12, 34). In addition to *gag*, *pol*, and *env* gene products, HIV type 1 (HIV-1) virions have been shown to contain several accessory proteins, including Vpr (7), Vif (15), and Nef (35). Vpr, a 14-kDa, 96-amino-acid nuclear protein, is packaged into HIV virions in amounts similar to those of Gag, while Vif and Nef appear to be incorporated in quantities comparable to that of Pol (5, 6, 35). The HIV-1 Vpr protein is incorporated in *trans* into viral particles through an interaction with the p6 domain of the Gag polyprotein precursors (20, 23).

The resistance of AIDS to traditional drug therapy has prompted a search for alternative treatments for this disease. One potential approach, termed intracellular inhibition or immunization, is designed to render cells resistant to viral replication and to limit the spread of virus in a cell culture or an individual (1, 14). Inhibition of HIV replication by such a strategy has now been established with different antiviral genes, including those directed at a nucleic acid or protein

target (14). Virus-targeted inactivation represents a novel genetic approach to interfering with HIV replication. In this strategy, a deleterious amino acid sequence or sequence with enzymatic activity is fused to a virion-associated component to prevent the production of infectious viral particles and the subsequent spread of *de novo* infection (3). Several studies have demonstrated the efficient packaging of Vpr fused with a polypeptide sequence. The incorporation of Vpr fused to integrase (VprIN), reverse transcriptase (RT) (VprRT), enzymatically active staphylococcal nuclease, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), and a *trans*-dominant negative mutant of the HIV-1 protease into HIV particles has been demonstrated (3, 13, 31, 37–39). Moreover, the expression of Vpr proteins fused to HIV-1 protease cleavage sites was recently shown to affect HIV-1 replication (33). However, the possibility that the stable transfer of genes encoding Vpr fusion proteins in HIV target cells could provide genetic resistance to viral replication remains to be demonstrated. In this paper, we report that a reporter enzyme (CAT) or a short peptide sequence derived from the HIV-1 Vpu protein fused to the carboxyl terminus of Vpr can be targeted specifically and efficiently into HIV particles. Using retroviral vectors, we demonstrate that the stable expression of these Vpr fusion proteins in CD4⁺ T cells can confer substantial resistance to HIV-1 replication by affecting the infectivity of progeny virions.

MATERIALS AND METHODS

Site-directed mutagenesis and plasmid DNA constructions. HxBRU (long terminal repeat [LTR]-*gag*⁺ *pol*⁺ *vif*⁺ *vpr*⁺ *tat*⁺ *rev*⁺ *vpu*⁻ *env*⁺ *nef*⁻-LTR) and HxBRU-R- (LTR-*gag*⁺ *pol*⁺ *vif*⁺ *vpr*⁻ *tat*⁺ *rev*⁺ *vpu*⁻ *env*⁺ *nef*⁻-LTR) are two

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Rétrovirologie Humaine, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-5967. Fax: (514) 343-5995. E-mail: cohenea@ere.umontreal.ca.

isogenic infectious molecular clones of HIV-1 that differ only in their ability to express Vpr (22). A unique *Xba*I site was inserted at position 5410 (position 1 is the site of transcription initiation of the HxBRU molecular clone) in HxBRU by use of two-step PCR-based mutagenesis as previously described (22). The nucleotide sequence of the sense mutagenic oligonucleotide was as follows: 5'-CAG AGG AGA TCT AGA AAT GGA GCC-3'. The resulting HxBRUXbaI mutant construct was confirmed by sequencing with a Sequenase kit (United States Biochemical Co.).

To generate a molecular clone of HIV-1 containing Vpr fusion proteins, an *Xba*I-*Xba*I fragment carrying the last 18 amino acids of the HIV-1 Vpu protein (IE) or the CAT enzyme from amino acids 2 to 219 was generated by PCR with, as a template, the previously described HxBH10 molecular clone of HIV-1 (40) or the SL3CAT expression plasmid (7). The *Xba*I primers used to perform the amplification step were as follows: IE, sense A, 5'-TCA TCT AGA GTG GAG ATG GGG-3'; IE, antisense B, 5'-CAT TCT AGA ATT ATA TCC TCA-3'; CAT, sense A, 5'-AAG GAA GCT TCT AGA GAG AAA AAA-3'; CAT, antisense B, 5'-TTA AGG GCA TCT AGA ACT GCC TTA-3'. Insertion of the PCR-generated *Xba*I fragment carrying IE or CAT into the newly created *Xba*I site in HxBRUXbaI yielded, respectively, HxBRU-VprIE and HxBRU-VprCAT.

To obtain the HxB89-R provirus, the *env* gene sequence of HxBH10 (41) from nucleotides 6350 to 8470 was replaced by the corresponding region from proviral clone 89.6 (9) (nucleotides 6346 to 8468). The HxB89-R-*vpr* gene contains a single-base insertion at position 5773 which generates a frameshift in the *vpr* coding sequence and yields a truncated, 72-amino-acid protein. Double-amino-acid-substitution mutations in the p6 coding region of HxB89-R were introduced by site-directed mutagenesis. The following oligonucleotide was used for the construction of mutant clone LF44,45PS: 5'-CTC AGA TCA CCC TCT GGC AAC GAC-3'. The presence of the mutations in the final proviral construct was confirmed by DNA sequence analysis.

To construct retroviral vectors and pCEP-4 (Invitrogen) expression vectors containing the fusion proteins, *vprIE*, *vprCAT*, or control *vpr* genes were PCR amplified with specific *Bam*HI oligonucleotide primers surrounding *vpr* or *vpr* fusion protein sequences (sense primer A, 5'-GAA ACT GAC AGG ATC CAG ATG GAA C-3'; antisense primer B, 5'-GGA TGC TTC CAG GAT CCT AGT CTA GGA-3') and HxBRU, HxBRU-R-, HxBRU-VprIE, or HxBRU-VprCAT as templates. The resulting fragments were cloned into the *Bam*HI restriction site of pBabepuro (30) or pCEP4 to generate pBabepuro-VprIE, pBabepuro-VprCAT, pCEPVpr, pCEPVpr-R-, pCEPVprIE, and pCEPVprCAT. For pBabepuro-RevM10, RevM10 was PCR amplified from pM10 (26) with specific *Sall* oligonucleotide primers (sense primer A, 5'-CGA AGC TAG TCG ACT AGG CAT CTC C-3'; antisense primer B, 5'-CCT ATC TGT CGA CTC AGC TAC TGC-3') and cloned into the *Sall* restriction site of pBabepuro.

Cells and DNA transfection. MT4, Jurkat, COS-7, and 293T cells (all from the American Type Culture Collection) and HeLa-CD4-LTR/ β -Gal indicator cells were maintained as described previously (18, 22). MT4 (5×10^6) and Jurkat (1×10^7) cells were transfected with 10 μ g of plasmid DNA by the DEAE-dextran transfection method as described previously (22). COS-7 cells (10^6) were transfected with 20 μ g of proviral DNA and 293T cells (10^6) were transfected with 20 μ g of pCEP expression vectors by the calcium phosphate method as described previously (22).

Cell transduction and infection. In order to generate Jurkat cell lines expressing Vpr fusion proteins or RevM10, retroviral vector technology was used. The Ψ CRIP packaging cell line was cultured as described previously (10). Aliquots (10 μ g) of pBabepuro, pBabepuro-VprIE, pBabepuro-VprCAT, or pBabepuro-RevM10 vectors were transfected into Ψ CRIP packaging cells by the calcium phosphate method (22). Ψ CRIP cells that stably produced amphotropically packaged pBabepuro, pBabepuro-VprIE, pBabepuro-VprCAT, or pBabepuro-RevM10 vectors were obtained by selection with 1.2 μ g of puromycin (Calbiochem) per ml, generating Ψ CRIP-puro, Ψ CRIP-VprIE, Ψ CRIP-VprCAT, or Ψ CRIP-RevM10 cell lines, respectively. Transduction of Jurkat cells was performed as described previously (36). Puromycin-resistant Jurkat cell populations were isolated, characterized, and subsequently challenged with HIV-1. Infections were performed as follows: 3×10^6 parental, control, or transduced Jurkat cells were absorbed for 2 h with different amounts of HIV in 1 ml of RPMI medium plus 10% fetal calf serum. Following infection, the culture medium was changed every 3 days and cells were resuspended in 10 ml of fresh RPMI medium plus 10% fetal calf serum at densities of 5×10^5 viable cells per ml.

Metabolic labeling, immunoprecipitation, and CAT activity measurement. At 72 h posttransfection, COS-7 cells were starved in methionine-free Dulbecco modified Eagle medium for 30 min. The cells were then metabolically labeled with 50 μ Ci of [35 S]methionine per ml for 16 h. For each sample, viral particles were pelleted by ultracentrifugation of an equal volume of supernatant fluid through a 20% sucrose cushion at 35,000 rpm for 2 h at 4°C in a Beckman 55.2 Ti rotor. The labeled pelleted virus and cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer and immunoprecipitated as previously described (22) with an HIV-1-positive human serum combined with either a rabbit anti-Vpr polyclonal serum (22), a rabbit anti-Vpu peptide serum (8), or a rabbit anti-CAT polyclonal serum (5' Prime 3' Prime) in a 1:1 ratio. HIV-associated proteins were separated on a sodium dodecyl sulfate-12.5% polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Quantitative analysis of immunoprecipitated proteins was performed by densitometric scanning of the autoradiographic signals on a Personal Densitometer (Molecular Dynamics) with ImageQuant software, version 3.22. In

order to evaluate the level of VprCAT expressed in cells and incorporated into virions, CAT assays were performed (16). Cells and virus pelleted through a 20% sucrose cushion (see above) (virus was produced from HxBRU-VprCAT-transfected COS-7 cells) were harvested with 250 mM Tris-HCl (pH 7.4) and processed as previously described (16).

RNA extraction and Northern blot analysis. Cytoplasmic and nuclear RNAs were isolated from 10^7 parental or transduced Jurkat cells with TRIzol reagent as described by the manufacturer (GIBCO/BRL). Poly(A) RNA was then purified with a QuickPrep Micro mRNA purification kit as instructed by the manufacturer (Pharmacia). RNA was resolved on a 1% agarose gel containing formaldehyde and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The Vpr probe was generated by PCR amplification with *Bam*HI primers (see above) and pNL4.3 as a template. The purified DNA fragment was labeled with [α - 32 P]dCTP by use of a random-primer DNA-labeling system (Pharmacia). Prehybridization and hybridization were performed as previously described (21).

RESULTS

Construction of Vpr fusion proteins. Recent studies reported that the expression of the HIV-1 Vpr protein induced the accumulation of cells in the G₂ phase of the cell cycle (17, 32). Mutational analysis revealed that the highly charged carboxy-terminal domain appears to be critical for Vpr stability and cell cycle arrest, while the integrity of the N-terminal amphipathic alpha helix is required for virion incorporation and nuclear localization (11, 24, 25). Since the expression of therapeutic molecules should not affect cell homeostasis in vitro and more importantly in vivo, we constructed Vpr fusion proteins by fusing antigens to the carboxyl-terminal end of a truncated Vpr mutant (88 amino acids). Two Vpr fusion proteins were initially generated to explore the possibility of targeting a sequence with enzymatic activity or an epitope tag into HIV-1 virions. For the first fusion partner, we used the C-terminal 18 amino acids of the Vpu protein, thus generating the VprIE protein. We selected this amino acid sequence because it contains an immunodominant epitope (IE) well recognized by a rabbit anti-Vpu peptide serum (8). Moreover, in order to study the efficiency of incorporation of larger proteins and to investigate whether an enzyme could be active in virions, we used the CAT protein as the second fusion partner (VprCAT). DNA fragments encoding the two Vpr fusion proteins were generated and subsequently cloned into the HxBRU infectious molecular clones as well as into the pBabepuro retroviral vector and the pCEP4 expression vector as described in Materials and Methods.

Protein expression and replication potential of HIV-1 virions carrying VprCAT and VprIE fusion proteins. To test the expression and incorporation of the Vpr fusion proteins into HIV-1 virions, HxBRU-VprIE, HxBRU-VprCAT and, as a control, HxBRU were transfected into COS-7 cells. At 72 h posttransfection, labeled cell lysates and pelleted virus were immunoprecipitated with an HIV-1-positive human serum combined with specific anti-Vpr, anti-Vpu, or anti-CAT antibodies. Results indicated that antibodies directed against Vpr or Vpu immunoprecipitated the predicted 18-kDa VprIE protein from virions and cell lysates (Fig. 1, lanes 3, 4, 9, and 10). Similarly, antibodies directed against Vpr or CAT detected the predicted 35-kDa VprCAT protein in virions and cell lysates (Fig. 1, lanes 5, 6, 11, and 12). This result indicates that VprIE and VprCAT fusion proteins are expressed from recombinant proviruses in transfected COS-7 cells. We observed with HxBRU-VprIE a second band corresponding to the molecular mass of the 16-kDa Vpr protein. This Vpr-related product appears to result from a deletion of the Vpu-derived sequences, possibly by recombination rearrangement in COS-7 cells, since the product comigrated with Vpr and was immunoprecipitated with the anti-Vpr antibody but not with the anti-Vpu antibody (Fig. 1, lanes 9 and 10). Under our conditions, low-molecular-mass products derived from VprCAT

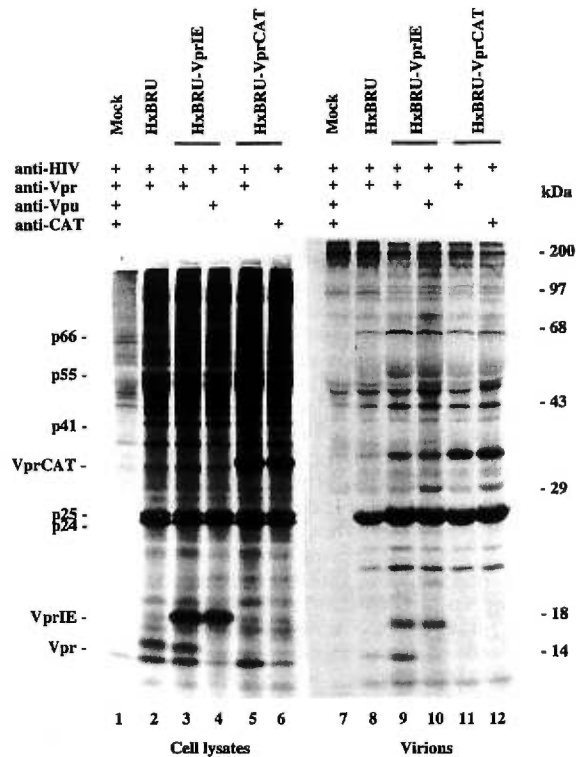


FIG. 1. Expression and incorporation of Vpr fusion proteins into HIV-1 virions. HxBRU, HxBRU-VprIE, and HxBRU-VprCAT were transfected into COS-7 cells. At 72 h later, cell lysates and pelleted virions were analyzed by radioimmunoprecipitation. Samples were probed with an HIV-1-positive human serum combined with either anti-Vpr, anti-Vpu, or anti-CAT antibodies as indicated.

were not detected in significant amounts (Fig. 1, lanes 11 and 12).

Figure 1 also demonstrates that VprIE and VprCAT can be incorporated into HIV-1 virions (lanes 9 to 12). The efficiency of incorporation of the Vpr fusion proteins was evaluated by densitometric scanning of the virion-associated Vpr and p6 RT product bands. The levels of Vpr or Vpr fusion proteins normalized to the number of methionines and to the amount of p66 RT protein detected in viral particles were found to be similar. This result indicates that when expressed in *cis*, both VprCAT and VprIE fusion proteins were packaged with the same efficiency as wild-type Vpr. Interestingly, the production of virus from HxBRU-VprIE- or HxBRU-VprCAT-transfected COS-7 cells was found to be consistently higher than that from HxBRU-transfected cells (Fig. 1). It is likely that the cell cycle arrest resulting from sustained Vpr expression affected the number of transfected cells after 72 h and consequently diminished the amount of virus produced in the culture. In addition, CAT activity was detected in both cell lysates and virions, indicating that the VprCAT fusion protein with amino acids 1 to 88 of Vpr remained enzymatically active even in HIV-1 particles (data not shown). Overall, these data strongly suggest that in the context of the provirus, the Vpr protein with amino acids 1 to 88 is sufficient to specifically target an 18-amino-acid peptide and a 218-amino-acid protein into virions with an efficiency comparable to that of wild-type Vpr.

To further analyze the effects of Vpr fusion proteins on viral replication, we initially tested the ability of virus stocks produced from HxBRU-VprIE- and HxBRU-VprCAT-transfected COS-7 cells to infect CD4⁺ T-cell lines. In Jurkat and MT4 cell lines, replication of HxBRU-VprIE and HxBRU-VprCAT was severely impaired compared to that of the control HxBRU virus (data not shown). Impairment of viral replication was found to result in part from the introduction of additional DNA sequences between the Tat splice acceptor and the Tat initiation codon rather than from the expression of the Vpr fusion proteins only. Indeed, transfection of HxBRU-VprIE or HxBRU-VprCAT in Jurkat cells constitutively expressing Tat revealed that the replication impairment of these viruses could be corrected in part by the expression of Tat (data not shown). Since the effect of VprIE and VprCAT expression on HIV replication could not be precisely evaluated in the context of a replicating virus, Jurkat CD4⁺ T-cell lines expressing VprIE or VprCAT *in trans* were generated by retroviral vector technology.

Generation and characterization of Jurkat CD4⁺ T-cell lines expressing Vpr fusion proteins. Amphotropic murine retroviruses carrying pBabepuro, pBabepuro-VprIE, and pBabepuro-VprCAT were used to transduce Jurkat cells. Following puromycin selection, populations of cells consisting of a pool of, respectively, Jurkat-puro, Jurkat-VprIE, and Jurkat-VprCAT puromycin-resistant cell clones were isolated and amplified. To evaluate the level of VprIE or VprCAT gene expression in transduced Jurkat cell lines, we performed Northern blot analysis of purified total mRNAs by using a *vpr*-specific probe as described in Materials and Methods. Figure 2A shows the expected 2.5- and 2.6-kb *vprIE*- and *vprCAT*-specific mRNAs, detected only in Jurkat-VprIE and Jurkat-VprCAT cell lines, respectively (lanes 2 and 3). All attempts to detect VprIE and VprCAT protein expression by immunoprecipitation or Western blot analysis were unsuccessful, indicating that the level of expression of both Vpr fusion proteins in transduced Jurkat cells was low. We also attempted to demonstrate the expression and virion incorporation of the VprCAT fusion protein in HIV-1-infected Jurkat-VprCAT cell lines by CAT activity measurements. Briefly, 3×10^6 parental or Jurkat-VprCAT cells were infected with equivalent amounts (10^6 cpm of RT activity) of HxBRU and HxBRU-R-. At 6 days postinfection, cells and virus-containing supernatants were collected, and virions were pelleted by ultracentrifugation through a 20% sucrose cushion. CAT activity was undetectable in infected and uninfected Jurkat-VprCAT cells (data not shown). In contrast, CAT activity associated with Vpr⁺ and Vpr⁻ HIV-1 virions was detected (Fig. 2B), indirectly indicating that VprCAT proteins were expressed in Jurkat-VprCAT cells. These results also suggest that *trans* incorporation concentrated VprCAT in the virions to detectable levels. Importantly, virion incorporation of VprCAT appeared less efficient in HxBRU than in HxBRU-R-, since the level of CAT activity associated with the Vpr⁺ virus was lower than the level of CAT activity associated with the Vpr⁻ virus. This result suggests that competition for virion incorporation occurred between the virus-expressed Vpr and the VprCAT fusion protein.

The expression of Vpr was shown by many groups to arrest cells at the G₂ phase of the cell cycle (17, 32). To investigate whether the expression of VprIE and VprCAT influences cell physiology, we analyzed the growth of Jurkat-puro, Jurkat-VprIE, and Jurkat-VprCAT cells. All transduced Jurkat cell lines were shown to grow at rates similar to that of the parental Jurkat cell line (data not shown). Moreover, VprIE and VprCAT expression in human fibroblast 293T cells did not affect cell division. Indeed, 293T cells transfected with

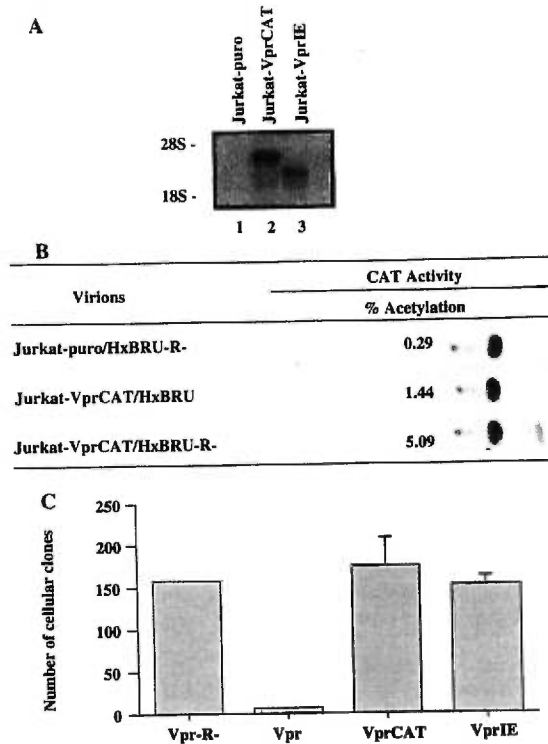


FIG. 2. Characterization of Jurkat cells expressing Vpr fusion proteins. (A) Analysis of *vprIE*- and *vprCAT*-specific mRNA expression in transduced Jurkat cells by Northern blotting with a *vpr*-specific probe. (B) CAT activity associated with HIV-1 virions produced from Jurkat-puro or Jurkat-VprCAT cell lines. CAT assays were performed with 20% sucrose cushion-purified virus isolated from Jurkat-VprCAT cells infected with HxBRU (Vpr^+) or HxBRU-R- (Vpr^-). (C) Effect of Vpr fusion protein expression on cell division. 293T cells were transfected with pCEPVpr, pCEPVpr-R-, pCEPVprIE, or pCEPVprCAT expression vectors and cultured in the presence of G-418 for 10 days. The number of G-418-resistant cell clones was then established. Error bars indicate standard deviations of three independent experiments.

pCEPVprIE, pCEPVprCAT, or the control pCEPVpr-R- and cultured in the presence of G-418 produced more than 150 cellular clones 12 days posttransfection (Fig. 2C). In contrast, fewer than five clones were obtained when 293T cells transfected with pCEPVpr were cultured under the same conditions. Detection of VprIE and VprCAT by radioimmunoprecipitation with an anti-Vpr antibody confirmed that these proteins were expressed in 293T cells (data not shown). These results strongly indicate that the expression of the fusion proteins does not mediate cell cycle arrest and does not appear to be toxic for the cells.

Effect of Vpr fusion protein expression on HIV-1 replication.

We next evaluated the ability of HIV-1 to replicate in Jurkat-VprIE and Jurkat-VprCAT cell lines. The Jurkat-puro cell line was used as a control. The replication kinetics were analyzed by monitoring viral production in the culture supernatant (determined by RT activity measurements) every 3 days over time. Briefly, each Jurkat cell line was infected with increasing amounts (25,000, 100,000, and 300,000 cpm, as determined by RT activity) of HxBRU and HxBRU-R- viruses produced from transfected MT4 cells. Figure 3A shows the replication kinetics obtained when Jurkat-VprCAT and Jurkat-puro cells were infected with 100,000 cpm of HxBRU or HxBRU-R-. Maximum

replication of HxBRU and HxBRU-R- was delayed by 2 to 3 days in Jurkat-VprCAT cells relative to control cells. Interestingly, in the same experiment, when Jurkat-VprIE cells were infected with 100,000 cpm of virus, a more pronounced delay of viral replication was observed (Fig. 3B). Peak viral replication was detected at day 15 in control cells infected with both HxBRU and HxBRU-R-. In contrast, maximum replication in Jurkat-VprIE cells was detected between days 21 and 24 for HxBRU and at approximately day 27 for HxBRU-R- (Fig. 3B). This result reveals that the replication of HxBRU and HxBRU-R- was delayed by 6 and 12 days, respectively, in Jurkat-VprIE cells relative to control cells. This result also indicates that HxBRU-R-, which does not express a native Vpr protein, replicates less efficiently than HxBRU in Jurkat-VprIE cells. The delay in the replication of HxBRU-R- in Jurkat-VprIE cultures also varied according to the input virus. Figure 3C and D show the replication kinetics obtained when Jurkat-VprIE and control cells were infected with 300,000 (Fig. 3C) or 25,000 (Fig. 3D) cpm of HxBRU or HxBRU-R-. When cells were infected with 300,000 cpm of virus, maximum replication of HxBRU and HxBRU-R- was delayed, respectively, by 6 and 9 days (Fig. 3C). However, when cells were infected with 25,000 cpm of virus, delays of approximately 6 and 18 days, respectively, were observed with HxBRU and HxBRU-R- (Fig. 3D). The appearance of virus-associated cytotoxic effects was also delayed in Jurkat cells expressing Vpr fusion proteins relative to control cells (data not shown). These results demonstrate that Jurkat-VprIE cells were less permissive for HIV-1 replication than Jurkat-puro control cells. They also exhibited a higher degree of resistance to cell killing mediated by HxBRU and HxBRU-R- than control cells.

The antiviral effect of VprIE was also compared to that obtained with RevM10, a *trans*-dominant mutant form of HIV-1 Rev that has been shown to delay HIV-1 replication in transduced cell lines, primary T cells, and CD34-enriched hematopoietic progenitor stem cells (2, 4, 27). Jurkat cells were transduced with pBabepuro-RevM10, and the resulting puromycin-resistant population, Jurkat-RevM10 cells, was infected with 100,000 cpm of HxBRU or HxBRU-R-. Figure 3E shows that maximum replication of HxBRU was delayed by 6 days in both Jurkat-VprIE and Jurkat-RevM10 cells relative to control Jurkat-puro cells. In contrast, peak HxBRU-R- replication was delayed by 6 and 12 days in Jurkat-RevM10 and Jurkat-VprIE cells, respectively, relative to control cells. This result indicates that in Jurkat cells, VprIE impaired the replication of a *vpr*⁺ virus (HxBRU) with an efficiency comparable to RevM10. Interestingly, VprIE inhibited the replication of a *vpr*⁻ virus (HxBRU-R-) more effectively than RevM10.

Impairment of HIV-1 replication by VprIE is dependent on an intact p6^{gag} domain. Several studies have shown that Vpr is incorporated into HIV-1 particles through a specific interaction with the p6^{gag} domain (20, 23). Mutational analysis of the p6^{gag} domain demonstrated that the integrity of the LXXLF motif at the carboxy terminus of p6 was essential for Vpr incorporation into virions (19). To determine whether the delayed HIV-1 replication in transduced Jurkat cells was due to the specific incorporation of Vpr fusion proteins into virions, Jurkat-VprIE cells were challenged with p6^{gag} mutants that do not incorporate Vpr. Two mutations targeting the LXXLF motif of p6^{gag}, L44P and F45S, were introduced into the *vpr*⁻ HIV-1 infectious molecular clone HxB89-R-, generating HxB89LF-PS-R-, as described in Materials and Methods. Cotransfection of HxB89LF-PS-R- and pCEPVpr into COS-7 cells revealed that Vpr was highly expressed in cells but not incorporated into virions (data not shown). Stocks of HxB89LF-PS-R- and the isogenic p6 wild-type counterpart

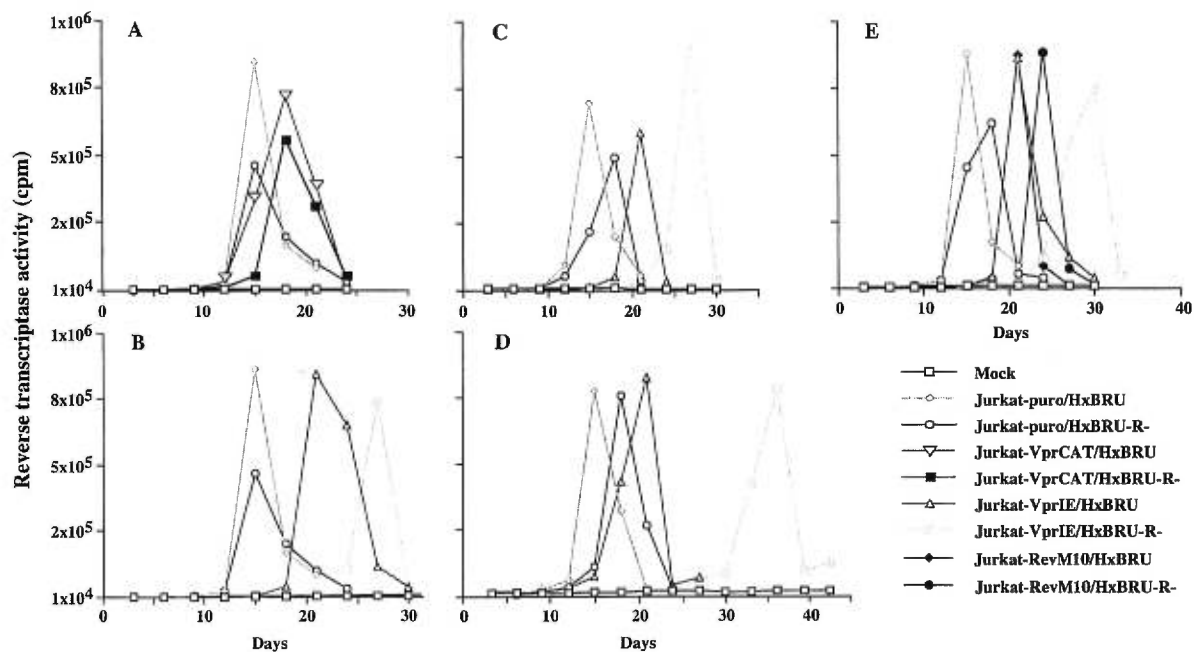


FIG. 3. HIV replication in transduced Jurkat cells. Jurkat-puro, Jurkat-VprIE, and Jurkat-VprCAT cell lines were challenged with HxBRU (Vpr^+) and HxBRU-R- (Vpr^-) (100,000 cpm of RT activity) to assess their susceptibility to viral infection. The infection kinetics were monitored by measuring viral production as RT activity in the supernatant over time for Jurkat-VprCAT cells (A), Jurkat-VprIE cells (B), Jurkat-VprIE cells upon infection with 300,000 cpm (C) or 25,000 cpm (D), and Jurkat-VprIE and Jurkat-RevM10 cells upon infection with 100,000 cpm (E). The experiments presented here were performed two or three times and were found to be highly reproducible.

HxB89-R- were generated by transfection into MT4 cells, and 300,000 cpm was used to infect Jurkat-puro or Jurkat-VprIE cell lines. As shown in Fig. 4, peak viral production appeared at approximately day 17 for HxB89FS-PS-R- in both Jurkat-puro and Jurkat-VprIE cell lines, indicating that the replication of this virus, which had lost its ability to incorporate Vpr, was not affected by VprIE expression. In contrast, the replication of HxB89-R- was delayed by approximately 9 days in Jurkat-VprIE cells relative to Jurkat-puro cells (Fig. 4). These results indicate that the antiviral effect of VprIE is mediated by the incorporation of the fusion protein into HIV-1 virions.

Incorporation of VprIE and VprCAT into HIV virions impairs viral infectivity but not viral production. The results presented above indicate that VprIE and, to a lesser extent, VprCAT interfere with viral replication by affecting viral production and/or infectivity. To evaluate whether VprCAT or VprIE expression affected viral production, Jurkat-VprCAT and Jurkat-VprIE cell lines were transfected with HxBRU or HxBRU-R- infectious molecular clones. Measurements of viral production were obtained with a p24 enzyme-linked immunosorbent assay 24 h posttransfection to detect mainly viruses resulting from the first round of replication. The levels of p24 antigen were found to be similar in all samples (data not shown), indicating that there was no impairment at the levels of viral gene expression, assembly, and release of viral particles. This result suggests that the infectivity potential of the released viral particles that incorporated Vpr fusion molecules might be affected. To evaluate the infectious potential of HIV-1 virions containing VprCAT or VprIE fusion proteins, we performed multinuclear activation of galactosidase indicator cell (MAGI) assays (18). Viruses containing Vpr fusion proteins or control virus produced from infected transduced

Jurkat cells (Fig. 3A and B) was harvested at the peak of viral production and titrated by RT activity measurements. In three experiments performed with three different virus stocks, MAGI cells were infected with 300,000 cpm of each virus. Figure 5 shows that HIV-1 released from Jurkat-VprCAT cells (HxBRU/VprCAT and HxBRU-R-/VprCAT) was two to three times less infectious than control vpr^+ or vpr^- virus produced from Jurkat-puro cells. However, HIV-1 released from Jurkat-VprIE cells (HxBRU/VprIE and HxBRU-R-/VprIE) was 10 to 30 times less infectious than control virus produced from Jurkat-puro cells (Fig. 5). Furthermore, HxBRU-R-/VprCAT or HxBRU-R-/VprIE viruses exhibited a larger impairment of viral infectivity than HxBRU/VprCAT or HxBRU/VprIE viruses, again suggesting that competition between HIV-1-encoded Vpr and Vpr fusion proteins for virion incorporation occurred. Although less quantitative, the negative effect of Vpr fusion proteins on viral infectivity was also observed in transient experiments. Indeed, virus produced by transient cotransfection of pCEPVprCAT or pCEPVprIE and HxBRU-R- in COS-7 cells exhibited two- and fourfold inhibition of infectivity in a MAGI cell assay, respectively (data not shown). Overall, these results strongly suggest that the impairment of viral infectivity is the consequence of Vpr fusion protein incorporation into HIV-1 virions.

DISCUSSION

Recent progress in our understanding of the structural and functional domains of Vpr makes the design of very efficient Vpr-based antiviral genes possible. To address the question of whether Vpr could be used as a shuttle to target foreign amino acid sequences of different sizes into HIV-1 virions, an *Xba*I

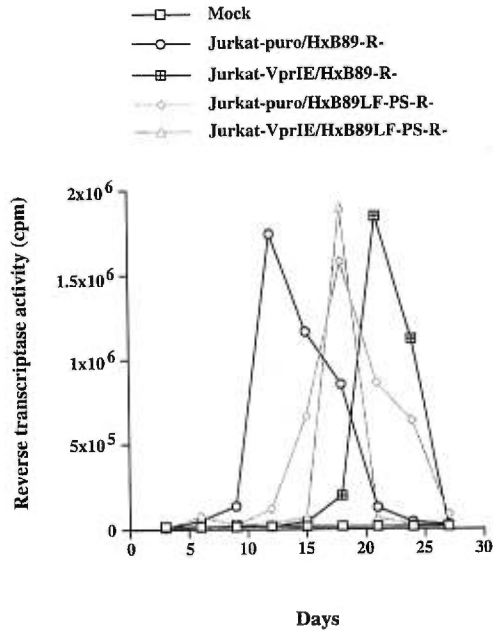


FIG. 4. Replication of p6^{gag} HIV mutants in Jurkat-VprIE cells. Jurkat-VprIE or control Jurkat-puro cells were infected with 300,000 cpm of p6^{gag} mutant HxB89LF-PS-R- or with 300,000 cpm of wild-type p6 isogenic virus HxB89-R-. Viral production was monitored over time by measurement of RT activity in the supernatant. The experiments presented here were performed three times and were found to be highly reproducible.

restriction site was inserted at the 3' end of *vpr* in the infectious molecular clone HxBRU (22). The resulting construct, which replicates as efficiently as wild-type HxBRU (unpublished data), had the advantage of providing a simple means to screen several Vpr fusion proteins for their ability to be packaged into HIV-1 virions. Moreover, HxBRUXbaI provided a quantitative and physiological assay for Vpr fusion protein incorporation into HIV particles. Indeed, our results revealed that the first 88 amino acids of Vpr were sufficient to incorporate the 18-amino-acid Vpu C-terminal immunodominant epitope and the 218-amino-acid CAT enzyme into HIV-1 virions. Importantly, the packaging efficiency of the VprCAT and VprIE fusion proteins was comparable to that obtained with wild-type Vpr (Fig. 1).

Previous studies reported that Vpr fusion proteins could severely impair HIV replication in CD4⁺ T cells when expressed *in cis* from the provirus (28, 33). All of our attempts to express Vpr fusion proteins in the context of the HxBRUXbaI proviral construct revealed that this biological system was not reliable for the evaluation of the viral replication potential. Indeed, we found that the introduction of foreign DNA sequences between the Tat splice acceptor site and the Tat initiation codon had a *cis*-acting negative effect on HIV protein expression (data not shown). On the other hand, transient expression experiments in which a *vpr*⁺ or *vpr*⁻ provirus was cotransfected with a Vpr fusion protein expressor did not allow for the sensitive measurement of antiviral activity, since the different transfection efficiencies of the two plasmids gave highly variable results. For quantitative measurement of antiviral activity, T-cell lines that express Vpr fusion proteins constitute a more reliable system. In addition, the stable expression of therapeutic genes in cell lines is essential to evaluate

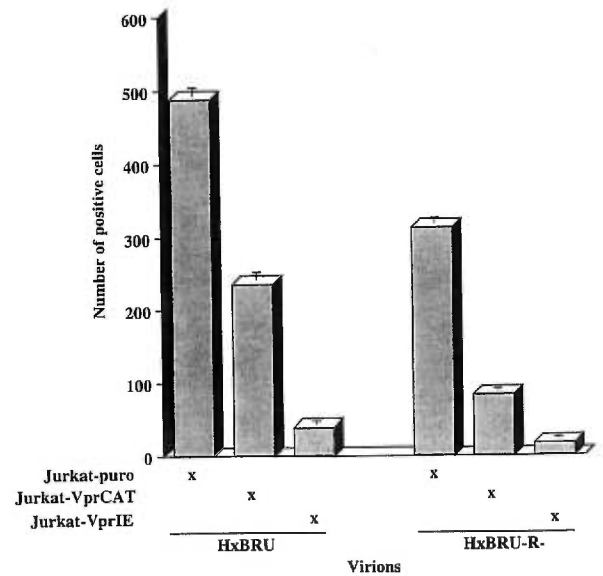


FIG. 5. Evaluation of viral infectivity. The infectious potential of HIV virions containing Vpr fusion proteins was analyzed by a MAGI cell assay. Briefly, HeLa-CD4-LTR/ β -Gal indicator cells were infected with equivalent amounts of virus produced from Jurkat cells or Jurkat-VprCAT and Jurkat-VprIE cells infected with HxBRU (Vpr⁺) and HxBRU-R- (Vpr⁻). At 24 h postinfection, the number of blue colonies was evaluated. The experiment was performed in triplicate with three different virus stocks, and the standard deviations are indicated.

their possible effect on cell homeostasis as well as their effectiveness in a gene therapy approach.

Consequently, we generated CD4⁺ Jurkat cell populations constitutively expressing Vpr fusion proteins by using retroviral vectors. This system provided a reliable method to evaluate the effect of Vpr fusion proteins on viral replication and spread *in vitro*, since the ideal situation, in which 100% of HIV-1 target cells carried the therapeutic gene, was achieved. We first investigated the expression of VprIE and VprCAT in selected transduced Jurkat cell populations. The expression of *vprIE*- and *vprCAT*-specific mRNAs was demonstrated by Northern blot analysis (Fig. 2B). Moreover, CAT enzymatic activity associated with the VprCAT fusion protein was efficiently incorporated *in trans* into HIV-1 virions (Fig. 2C). However, we failed to detect the expression of the transgenes by immunoprecipitation and Western blot analysis. It has been shown that proteins are poorly expressed from the Moloney murine leukemia virus LTR in human-derived CD4⁺ T-cell lines (29).

The effect of VprCAT and VprIE fusion proteins on cell division was quantitatively evaluated with 293T cells. The results indicated that cells expressing VprCAT or VprIE fusion proteins proliferated and formed colonies with the same efficiency as the pCEPVpr-R- positive control, which did not express Vpr (Fig. 2C). The first 88 amino acids of Vpr therefore appeared sufficient to achieve Vpr fusion protein incorporation without any negative effect on cellular growth. This finding allowed us to isolate Jurkat-puromycin-resistant clones that expressed Vpr fusion proteins and that were later pooled to obtain a stable cell population representative of the parental Jurkat cell line. Infection of transduced Jurkat-VprCAT or Jurkat-VprIE cell lines resulted in partial inhibition of HIV-1 replication compared to that for control cells (Fig. 3A and B). To confirm that the delays in viral replication

observed when we challenged the different Jurkat cell lines were not an artifact arising from cell line selection, we analyzed CD4 expression at the cell surface. Fluorescence-activated cell sorter analysis demonstrated that CD4 expression at the plasma membrane of both Jurkat-VprCAT and Jurkat-VprIE cells was similar to that of parental Jurkat cells (data not shown). Moreover, a p6^{gag} mutant of HIV-1 that did not incorporate Vpr replicated as efficiently in Jurkat-VprIE cells as in Jurkat-puro control cells (Fig. 4), indicating that the impairment of viral replication in Jurkat-VprIE cells was the consequence of VprIE fusion protein incorporation into virions. Overall, these results argue strongly against a clonal effect resulting from cell population selection as a major contributor to the impairment of viral replication.

Virion infectivity has been shown to correlate with proper viral assembly and maturation (12, 34). The presence of a nonrelevant amino acid sequence fused to Vpr during assembly and budding may affect viral morphogenesis, resulting in the production of virus with a drastically reduced infectivity potential. Indeed, as shown in Fig. 3B, the introduction of 18 amino acids derived from HIV-1 Vpu at the C-terminal end of Vpr affected considerably the replication of HIV-1 in tissue cultures. This antiviral effect of VprIE was shown to be as efficient as that exerted by a transdominant mutant of Rev, the RevM10 protein, which inhibits HIV-1 replication through a distinct mechanism (Fig. 3E). In contrast, the 35-kDa VprCAT fusion protein delayed HIV-1 replication less efficiently (Fig. 3A). Analysis of virus produced from transduced Jurkat cells revealed that virus released from Jurkat-VprCAT cells was two to three times less infectious than the control virus, whereas virus produced from Jurkat-VprIE cells exhibited a 10- to 30-fold decrease in viral infectivity (Fig. 5). We currently assume that the highly hydrophilic Vpu sequence fused to Vpr may provoke an important steric hindrance, which in turn affects normal viral morphogenesis. Indeed, electron microscopy revealed a strong morphological alteration of virions containing VprIE fusion proteins (unpublished data). However, at this point we cannot rule out the possibility that early events following the entry of wild-type virus into VprIE-expressing cells may be affected.

From a therapeutic point of view, an efficient Vpr fusion protein should impair the replication of a large range of HIV isolates, which could be *vpr*⁺ or *vpr*⁻. Figure 2B shows that the *vpr*⁺ HxBRU virus incorporated less VprCAT fusion protein than the *vpr*⁻ HxBRU-R- virus. Moreover, HxBRU-R- was less infectious than HxBRU when produced in Jurkat-VprIE or Jurkat-VprCAT cell lines (Fig. 5). These results suggest competition for virion incorporation between wild-type Vpr expressed from HxBRU and Vpr fusion proteins provided in *trans* by the transduced cell lines. Consequently, it was not surprising to observe a greater delay in viral replication in Jurkat-VprIE cells infected with HxBRU-R- than in Jurkat-VprIE cells infected with HxBRU (Fig. 3B, C, and D). No such difference was observed in Jurkat-VprCAT cells. This finding likely reflects the weak antiviral effect of VprCAT on HIV replication (Fig. 3A). The competition for virion incorporation between Vpr fusion proteins and wild-type Vpr expressed by the virus remains a critical point. Indeed, an increased delay in viral replication was observed with decreasing amounts of HxBRU-R- virus in Jurkat-VprIE cells, an effect that was not observed with the HxBRU virus (compare Fig. 3B, C, and D). Therefore, the development of Vpr fusion proteins that could target both HIV-1 production and infectivity and that could efficiently compete with wild-type Vpr for virion incorporation remains an essential and promising goal.

This report presents, for the first time, proof of principal

experiments showing that virion-targeted viral inactivation with Vpr fusion proteins can delay HIV-1 replication in transduced CD4⁺ T cells. Therefore, the development of more efficient Vpr-based fusion proteins represents a promising approach that may contribute to efficient strategies against HIV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Richard Mulligan for the ΨCRIP packaging cell line, Bryan Cullen for the pM10 construct (containing RevM10), and Andrew J. Mouland for critical reading of the manuscript.

G.P.K. is the recipient of a studentship from the National Health Research and Development Program (NHRDP) of Canada. E.A.C. is the recipient of a National Health Research Scholar award from NHRDP. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada, and Theratechnologies Inc. to E.A.C.

REFERENCES

- Baltimore, D. 1988. Intracellular immunization. *Nature (London)* **335**:395-396.
- Bevec, D., M. Dobrovnik, J. Hauber, and E. Böhnlein. 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9870-9874.
- Boeke, J. D., and B. Hahn. 1996. Destroying retroviruses from within. *Trends Microbiol.* **4**:421-426.
- Bonyhadi, M. L., K. Moss, A. Voytovich, J. Auten, C. Kalfoglou, I. Plavec, S. Forestell, L. Su, E. Böhnlein, and H. Kaneshima. 1997. RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **71**:4707-4716.
- Camaur, D., and D. Trono. 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **70**:6106-6111.
- Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Human immunodeficiency virus *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Identification of HIV-1 *vpr* product and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **3**:11-18.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1988. Identification of a protein encoded by the *vpr* gene of HIV-1. *Nature (London)* **334**:532-534.
- Collman, R., J. W. Balliet, S. A. Gregory, H. Friedman, D. L. Kolson, N. Nathanson, and A. Srinivasan. 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **66**:7517-7521.
- Danos, O., and R. C. Mulligan. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6460-6464.
- Di Marzio, P., S. Choe, M. Ebright, R. Knoblauch, and N. R. Landau. 1995. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization, and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 *vpr*. *J. Virol.* **69**:7909-7916.
- Einfeld, D. 1996. Maturation and assembly of retroviral glycoproteins, p. 133-176. *In* H.-G. Kräusslich (ed.), *Morphogenesis and maturation of retroviruses*, vol. 214. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Fletcher, M. T., M. A. Soares, S. McPhearson, H. Hui, M. Wiskerchen, M. A. Muesing, G. M. Shaw, A. D. Leavitt, J. D. Boeke, and B. H. Hahn. 1997. Complementation of integrase function in HIV-1 virions. *EMBO J.* **16**:5123-5138.
- Gilboa, E., and C. Smith. 1994. Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model. *Trends Genet.* **10**:139-144.
- Goncalves, J., B. Shi, X. Yang, and D. Gabuzda. 1995. Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains. *J. Virol.* **69**:7196-7204.
- 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.
- He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan, and N. R. Landau. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34-cdc2 activity. *J. Virol.* **69**:6705-6711.
- Kimpton, J., and M. Emerman. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line based on activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**:2232-2239.
- Kondo, E., and H. G. Göttinger. 1996. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immu-

- odeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* **70**:159–164.
20. Kondo, E., F. Mammano, E. A. Cohen, and H. G. Göttlinger. 1995. The P6^{gag} domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* **69**:2759–2764.
 21. Krumlauf, R. 1996. Northern blot analysis. *Methods Mol. Biol.* **58**:113–128.
 22. Lavallée, C., X. J. Yao, A. Ladha, H. Göttlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen. 1994. Requirement of the Pr55^{gag} precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* **68**:1926–1934.
 23. Lu, Y.-L., R. P. Bennett, J. W. Wills, R. Gorelick, and L. Ratner. 1995. A leucine triple repeat sequence (LXX)₄ in p6^{gag} is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **69**:6873–6879.
 24. Mahalingam, S., V. Ayyavoo, M. Patel, T. Kieber-Emmons, and D. B. Weiner. 1997. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* **71**:6339–6347.
 25. Mahalingam, S., M. Patel, R. G. Collman, and A. Srinivasan. 1995. The carboxy-terminal domain is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virology* **214**:647–652.
 26. Malim, M. H., S. Bohnlein, A. J. Hauber, and B. R. Cullen. 1989. Functional dissection of the HIV-1 *rev* *trans*-activator: derivation of the *trans*-dominant repressor of *Rev* function. *Cell* **58**:205–214.
 27. Malim, M. H., W. W. Freimuth, J. Liu, T. J. Boyle, H. K. Lyerly, B. R. Cullen, and G. J. Nabel. 1992. Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J. Exp. Med.* **176**:1197–1201.
 28. Matsuda, Z., X. Yu, Q.-C. Yu, T.-H. Lee, and M. Essex. 1993. A virion inhibitory molecule with therapeutic potential for human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3544–3548.
 29. Miller, A. D. 1992. Human gene therapy comes of age. *Nature (London)* **357**:455–460.
 30. Morgenstern, J. P., and H. Land. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18**:3587–3596.
 31. Park, I. W., and J. Sodroski. 1996. Targeting a foreign protein into virion particles by fusion with the Vpx protein of simian immunodeficiency virus. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **11**:341–350.
 32. Re, F., D. Braaten, E. K. Franke, and J. Luban. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G₂ by inhibiting the activation of p34-cdc2-cyclin B. *J. Virol.* **69**:6859–6864.
 33. Serio, D., T. A. Rizvi, M. Cartas, V. S. Kalyanaraman, I. T. Weber, H. Koprowski, and A. Srinivasan. 1997. Development of a novel anti-HIV-1 agent from within: effect of chimeric Vpr-containing protease cleavage site residues on virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3346–3351.
 34. Vogt, V. M. 1996. Proteolytic processing and particle maturation, p. 95–131. *In* H.-G. Kräusslich (ed.), *Morphogenesis and maturation of retroviruses*, vol. 214. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
 35. Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, and H.-G. Kräusslich. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into the virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* **219**:228–236.
 36. Woffendin, C., Z. Y. Yang, Udaykumar, L. Xu, N. S. Yang, M. J. Sheehy, and G. J. Nabel. 1994. Nonviral and viral delivery of a human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11581–11585.
 37. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hunter, and J. C. Kappes. 1997. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *EMBO J.* **16**:5113–5122.
 38. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, and J. C. Kappes. 1996. Inhibition of human and simian immunodeficiency virus protease function by targeting Vpx-protease-mutant fusion protein into viral particles. *J. Virol.* **70**:3378–3384.
 39. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, and J. C. Kappes. 1996. Proteolytic activity of human immunodeficiency virus Vpr- and Vpx-protease fusion proteins. *Virology* **219**:307–313.
 40. Yao, X.-J., J. Friborg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R. P. Sékaly, and E. A. Cohen. 1995. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* **209**:615–623.
 41. Yao, X. J., H. Göttlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen. 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of *vpu*-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* **66**:5119–5126.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Malgré les progrès remarquables qui ont marqué la recherche sur le VIH depuis le début des années 1980, le SIDA demeure une maladie mortelle. La survie des individus séropositifs atteints par la maladie et démontrant les symptômes associés au SIDA repose actuellement sur l'utilisation de traitements antirétroviraux. L'association d'inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase, deux enzymes-clés du cycle de réplication du VIH, demeure de nos jours la thérapie ou trithérapie anti-VIH la plus efficace. Malheureusement, les récents rapports concernant la trithérapie suggèrent que l'amélioration de la condition des individus en traitement ne pourrait être que temporaire (Ho, 1998; Perrin and Telenti, 1998). En effet, des souches virales résistantes peuvent apparaître chez les individus qui suivent un protocole de trithérapie. Ces virus mutants semblent résulter de l'incapacité des drogues à éradiquer la réplication virale dans tous les compartiments du corps humain. Ces compartiments formés de cellules réservoirs servent de sanctuaires au VIH qui reste inaccessible à l'effet des drogues (Ho, 1998). Aussi, la trithérapie engendre des effets secondaires importants tel que des vomissements, des maux de tête, des calculs rénaux, la perte d'appétit, la lipodystrophie, la cathepsie ainsi que des douleurs abdominales. Enfin, le coût élevé et la prescription excessivement rigoureuse qui sont inhérents à la trithérapie en limitent fortement l'accessibilité. En effet, suivre un protocole de trithérapie coûte environ 20 000 dollars américains par année par personne et nécessite la prise de plusieurs comprimés six fois par jour à des heures strictes par cycle de 24 heures (Levy, 1998a). En conséquence, la trithérapie n'est actuellement accessible qu'à environ seulement 4% de l'ensemble des individus infectés par le VIH.

Ainsi, la caractérisation approfondie des interactions moléculaires entre l'ensemble des facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la maladie demeure cruciale. En effet, le cycle de réplication du VIH comporte plusieurs étapes au cours desquelles une intervention thérapeutique efficace pourrait être entreprise. Aussi, la modification de l'environnement cellulaire associé à la dissémination du virus et à la progression du SIDA *in vivo* demeure prioritaire pour le développement de nouvelles approches antivirales (Champagne *et al.*, 1998; Lodge *et al.*, 1998). Ces considérations continuent de stimuler la recherche concernant plusieurs approches prometteuses telles que la thérapie génique, la stimulation et la restauration du système immunitaire ainsi que le développement de vaccins et de nouvelles molécules antivirales.

La thérapie génique constitue à elle seule une approche très vaste parmi les possibilités d'intervention thérapeutique. En effet, la thérapie génique, qui consiste en la

modification du patrimoine génétique d'une cellule, n'est que le moyen utilisé pour corriger un dérèglement cellulaire ou pour protéger un organisme d'un agresseur potentiel. Dans le cas des maladies infectieuses, la thérapie génique est donc un outil pouvant accommoder une multitude de stratégies élaborées dans le but de contrôler et ultimement d'éradiquer un pathogène de l'hôte. La thérapie génique constitue un traitement alternatif pour un grand nombre de maladies qui ne peuvent être efficacement soignées par les méthodes cliniques conventionnelles. Bien que cette approche en soit encore à ses premiers pas, plus de 1500 individus suivent actuellement un des 17 protocoles de thérapie génique destinés à combattre une maladie infectieuse (Bunnell and Morgan, 1998). Ainsi, des effets bénéfiques encourageant ont déjà été enregistrés concernant les enfants déficients pour l'adénosine désaminase (ADA) suite au transfert du gène correcteur (Knoell and Yiu, 1998).

Le succès de la thérapie génique repose sur l'efficacité thérapeutique du gène correcteur mais aussi sur le rendement de la méthode sélectionnée pour le transfert de gène. Les méthodes les mieux caractérisées comprennent les vecteurs rétroviraux, les vecteurs adénoviraux, les vecteurs associés à l'adénovirus (AAV "adeno-associated virus"), les liposomes et l'injection directe d'ADN. Parmi ces méthodes, les vecteurs rétroviraux sont utilisés dans 70% des études cliniques de thérapie génique actuellement en cours. Cette méthode de transfert de gène représente donc l'application favorisée pour le traitement du plus grand nombre de maladies. La popularité des vecteurs rétroviraux est due en partie à leur versatilité puisqu'ils peuvent infecter un très grand nombre de types cellulaires. Aussi, l'emploi de cette méthode de transfert de gène est sécuritaire et aucun effet secondaire relié à cette stratégie n'a encore été rapporté. Cependant, l'efficacité du transfert de gène des vecteurs rétroviraux reste faible et est souvent insuffisante pour induire un bénéfice clinique notable même avec un gène thérapeutique parfaitement fonctionnel (Marshall, 1995; Verma and Somia, 1997). En effet, les titres rétroviraux de 10^7 particules infectieuses/ml sont faibles et peu efficaces en comparaison, par exemple, aux titres de 10^{12} particules infectieuses/ml obtenues avec les vecteurs adénoviraux. De plus, la très grande majorité des vecteurs rétroviraux actuellement disponibles ne peuvent pas transduire de cellules quiescentes puisqu'ils sont dérivés d'oncorétrovirus tel que MoMuLV. Par conséquent, l'amélioration de l'efficacité avec laquelle les gènes sont introduits à l'intérieur du génome des cellules cibles via des vecteurs rétroviraux représente un objectif important.

Les virus et en particulier les lentivirus se répliquent avec une efficacité et à un taux

excessivement élevés en utilisant un minimum d'information génétique. En effet, le VIH-1, dont le génome ne fait que 9.8 kb, produit seulement 13 protéines pour se répliquer et provoquer la mort de l'hôte. Par conséquent, il est facile de concevoir que l'évolution a permis de maximiser l'efficacité avec laquelle chacune de ces protéines virales interagit avec l'hôte pour induire une réplication optimale du virus. Les nombreuses études faites dans le domaine de la virologie ont permis d'identifier la ou les fonctions d'un très grand nombre de protéines virales. Une fois caractérisée, il est possible d'utiliser à profit la fonction d'une protéine virale comme outil thérapeutique. D'ailleurs, l'utilisation des virus ou d'autres microorganismes à des fins thérapeutiques est un concept qui a fait ses preuves notamment dans le développement de vaccins. Les études effectuées sur le VIH ont mené à l'identification de plusieurs fonctions associées aux différentes protéines virales. Bien que plusieurs fonctions restent à clarifier et que d'autres restent à découvrir, certaines fonctions des protéines du VIH sont bien documentées.

Certaines de ces études démontrent que la protéine Vpu du VIH-1 est responsable d'une production accrue des virions à partir des cellules infectées (Strebel *et al.*, 1988a; Terwilliger *et al.*, 1989). De plus, Vpu peut stimuler la production d'autres rétrovirus tel que le virus Visna et le virus Moloney de la leucémie murine (MoMuLV) (Göttlinger *et al.*, 1993a). Cette dernière étude suggère que l'augmentation de la production virale induite par Vpu n'implique pas une interaction spécifique et unique entre Vpu et une ou plusieurs autres protéines du VIH-1. Plutôt, il semble vraisemblable que Vpu interagisse avec une voie cellulaire utilisée aussi par plusieurs autres rétrovirus. L'utilisation de Vpu pour augmenter la production virale des lignées d'encapsidation rétrovirales est donc une hypothèse importante à vérifier. En effet, les faibles titres associés aux lignées d'encapsidation constituent le problème majeur des vecteurs rétroviraux et sont responsables de leur faibles taux de transfert génique dans plusieurs tissus cellulaires (Dunbar and Emmons, 1994; Nienhuis, 1994).

Le chapitre 2 démontre que la protéine Vpu du VIH-1 augmente les titres viraux associés aux lignées d'encapsidation Damp et ψ CRIP d'un facteur de 40 et 13 fois respectivement. La différence entre l'augmentation de la production virale de 40 fois pour les cellules Damp et de 13 fois pour les cellules ψ CRIP semble être causée par la variabilité de l'effet de Vpu selon le type cellulaire employé. En effet, une étude démontre que l'effet de Vpu sur l'exportation virale est minimal dans les cellules NIH-3T3 utilisées pour générer la lignée d'encapsidation ψ CRIP (Sakai *et al.*, 1995). L'augmentation de la production virale pour ces deux lignées d'encapsidation est due à l'expression de Vpu. En

effet, les facteurs capables d'augmenter les titres viraux tel que l'effet clonal, l'apparition de rétrovirus mutants capables de se répliquer ou la forte pression de sélection employée pour générer ces lignées cellulaires exprimant Vpu n'ont pas été mis en évidence (Kobinger *et al.*, 1997). Par conséquent, la fonction spécifique de Vpu sur le relâchement du VIH-1 pourrait être utilisée comme outil de thérapie génique pour augmenter la production de vecteurs rétroviraux recombinants. Cette conclusion est importante pour plusieurs maladies tel que l'hypercholestérolémie familiale, le SIDA, les lymphomes et autres tumeurs solides. Les sept essais cliniques de thérapie génique concernant l'une ou l'autre de ces maladies ont donné des résultats très peu concluants d'un point de vue thérapeutique. La faible efficacité du transfert de gène des vecteurs rétroviraux due à des titres viraux trop bas fût la principale raison responsable de cet échec (Marshall, 1995; Miller, 1992). Cette étude a donc permis d'établir une preuve de principe qui indique que l'utilisation de Vpu pourrait être bénéfique en relation avec les systèmes de production de vecteurs rétroviraux de dernières générations. En effet, l'augmentation des titres viraux de un log permet de transduire dix fois plus de cellules précurseuses hématopoïétiques CD34⁺ *ex vivo* (Akkina, 1996). Par conséquent, l'augmentation des titres viraux de plus d'un log induite par Vpu pourrait améliorer significativement l'efficacité de transduction des vecteurs rétroviraux dans plusieurs types cellulaires et ainsi produire des effets thérapeutiques bénéfiques chez l'humain.

Actuellement, les vecteurs rétroviraux recombinants sont de plus en plus produits de façon transitoire par triple transfection du matériel génétique viral et du gène d'intérêt à l'intérieur des cellules humaines 293T (Soneoka *et al.*, 1995). Dans ce système, l'emploi de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) qui permet la concentration des rétrovirus d'un facteur de 1000 après ultracentrifugation est fréquent. L'effet de Vpu sur l'exportation virale reste inconnu pour les cellules 293T transfectées avec ce système transitoire à trois plasmides. Analyser la capacité de Vpu à augmenter les titres viraux associés aux cellules 293T transfectées par ce système serait très intéressant. Aussi, l'emploi des protéines accessoires Vif et Nef, toutes deux capables d'augmenter l'infectivité du VIH-1, pourrait être testée dans le contexte des vecteurs rétroviraux recombinants. Pour ces raisons et pour palier au problème inhérent aux vecteurs rétroviraux basés sur MoMuLV concernant leur impossibilité de transduire des cellules quiescentes, les vecteurs lentiviraux basés sur le VIH-1 ont été développés.

La protéine Vpr du VIH-1 est une autre protéine relativement bien caractérisée dont les principales fonctions sont connues. Tôt dans le cycle de réplication viral, Vpr stimule

le transport du complexe de préintégration du cytoplasme au noyau (Emerman, 1996a; Stevenson *et al.*, 1995; Trono, 1995). Vpr induit aussi un arrêt du cycle cellulaire en G2 qui favorise la synthèse des protéines virales (Chun Goh *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998b). En manipulant le cycle cellulaire, Vpr augmente la transcription du LTR viral et d'autres promoteurs (Cohen *et al.*, 1990b; Forget *et al.*, 1998; Hrimech *et al.*, 1998). Enfin, Vpr est incorporé efficacement à l'intérieur des virions au site d'assemblage, vraisemblablement à la suite d'une interaction avec le domaine p6 de Gag (Cohen *et al.*, 1990a; Kondo *et al.*, 1995).

La participation de Vpr au transport du complexe de préintégration semble cruciale pour la réplication du VIH-1 *in vivo*. En effet, cette fonction permet l'infection des cellules quiescentes telles que les macrophages qui servent de réservoir au VIH et ainsi disséminent l'infection dans l'hôte (Stevenson, 1996; Subbramanian *et al.*, 1998a). La plupart des rétrovirus profitent de la division cellulaire, qui occasionne la rupture de la membrane nucléaire, pour transférer leur matériel génétique à l'intérieur du noyau de la cellule. Ainsi, ces rétrovirus, dont fait partie le virus MoMuLV, peuvent se répliquer uniquement dans les cellules en division. Pour cette raison, le deuxième problème majeur des vecteurs rétroviraux dérivés de MoMuLV est qu'ils ne peuvent pas être utilisés pour le transfert de gène à l'intérieur des cellules quiescentes. Les vecteurs lentiviraux, dérivés du VIH, ont été générés pour palier à cette restriction et sont capable d'introduire efficacement un ou plusieurs transgènes dans le génome de cellules quiescentes (Verma and Somia, 1997). Cependant, les vecteurs lentiviraux posent encore un problème de biosécurité puisque des recombinaisons pourraient théoriquement recréer le VIH et même d'autres pathogènes viraux inconnus. Bien que les vecteurs lentiviraux soient de plus en plus sécuritaires, utiliser la fonction du transport du complexe de préintégration de Vpr dans le contexte de MoMuLV constituerait une autre possibilité. En effet, rendre Vpr capable d'induire la translocation du complexe de préintégration de MoMuLV dans le noyau de cellules quiescentes donnerait naissance à une nouvelle génération de vecteurs rétroviraux. Ces vecteurs pourraient transduire les cellules quiescentes avec toute la sécurité associée aux vecteurs rétroviraux.

L'incorporation de Vpr à l'intérieur des particules virales constitue une autre caractéristique de cette protéine qui peut être mise à profit. En effet, Vpr, sous forme de protéine de fusion, peut servir de transporteur pour cibler des séquences d'acides aminés à l'intérieur du VIH (Boeke and Hahn, 1996). Par exemple, Vpr peut être fusionné à un enzyme viral tel que l'intégrase pour étudier la fonction de cet enzyme dans un cadre

extérieur au précurseur Gag-Pol. Cette stratégie a apporté la première évidence indiquant que l'intégrase existe sous forme de multimères *in vivo* (Fletcher *et al.*, 1997). Par ailleurs, le ciblage indépendant de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase en fusion avec Vpr rendrait beaucoup plus sécuritaires les lignées d'encapsulation basées sur le VIH. Effectivement, ces nouvelles lignées nécessiteraient un événement quintuple de recombinaison pour recréer un virus à réplication compétente, un phénomène encore jamais observé *in vivo*. Enfin, Vpr peut être utilisé comme cheval de Troie et cibler à l'intérieur du VIH des séquences d'acides aminés destinées à inhiber la réplication du virus.

La protéine Vpr complète, de 96 acides aminés, peut efficacement incorporer des partenaires de fusion de différentes longueurs tels que la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) et l'intégrase du VIH-1 (Fletcher *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1995). Cependant, la mutagenèse dirigée révèle que l'hélice alpha située en N-terminal de Vpr constitue le déterminant majeur responsable de l'incorporation de Vpr à l'intérieur des virions (Yao *et al.*, 1995b; Zhao *et al.*, 1994b). Identifier la séquence minimale de Vpr capable de cibler des partenaires de fusion avec un maximum d'efficacité est important pour minimiser les effets toxiques de Vpr tel que l'arrêt en G2 du cycle cellulaire. Évidemment, un gène thérapeutique ne devrait pas être toxique ni même néfaste au maintien de l'homéostasie cellulaire. Le chapitre 3 indique que les acides aminés de 1 à 88 et de 15 à 88 constituent les deux domaines minimaux capables d'incorporer la protéine CAT à l'intérieur des virions avec une efficacité comparable à celle de la protéine Vpr native. La principale caractéristique de ces deux domaines est la perte de la queue C-terminale de Vpr qui est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire (Re *et al.*, 1995). En effet, les protéines de fusion issues de l'un de ces deux domaines de Vpr n'affectent pas la croissance et la morphologie cellulaires (Kobinger *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998a). De plus, le ciblage des protéines de fusion constituées de l'un de ces deux domaines de Vpr est dépendant de la présence du domaine p6 du précurseur p55, indiquant la spécificité de l'incorporation. Enfin, les expériences effectuées par cotransfection transitoire des ADN codant pour le VIH-1 et les protéines de fusion indiquent que l'incorporation des protéines de fusion 1-88VprCAT et 15-88VprCAT à l'intérieur du virus provoque une diminution de l'infectivité virale. Des résultats différents obtenus par le groupe de Kappes *et al.* indiquent que l'incorporation intravirale des 96 acides aminés de Vpr fusionnés à CAT n'affecte pas l'infectivité du VIH-1 possiblement suite à la dégradation de la protéine de fusion (Wu *et al.*, 1995). L'utilisation des séquences d'acides aminés de Vpr inférieures à 96 pourrait contribuer à l'obtention de protéines de fusion plus stables et notamment

moins susceptibles au clivage induit par la protéase du VIH. En effet, aucune des différentes protéines de fusion VprCAT ou VprIE n'ont démontré de sensibilité importante à la dégradation provoquée par la protéase virale ou par les protéases cellulaires.

Ces données ont permis de générer la protéine de fusion VprIE faite des 88 premiers acides aminés de Vpr fusionnés au 18 derniers acides aminés de la protéine Vpu du VIH-1 (chapitre 4). Les 18 derniers acides aminés de Vpu (IE) représentent le domaine immunodominant de la protéine et ont été sélectionnés à cause de la forte hydrophilicité de ce domaine. L'hypothèse de départ propose que l'hydrophilicité de ce peptide en association avec Vpr puisse déstabiliser l'intégrité fonctionnelle des particules virales. Les protocoles de thérapie génique destinés à inhiber la réplication du VIH *in vivo* nécessitent dans un premier temps le transfert du gène thérapeutique à l'intérieur des lymphocytes T CD4⁺, la cible principale du virus (Nabel, 1994). Des lignées de lymphocytes T CD4⁺ transformées, Jurkat, ont donc été transduites avec les gènes codants pour les protéines de fusion VprCAT et VprIE en utilisant la technologie des vecteurs rétroviraux. Le chapitre 4 démontre que la réplication du VIH-1 est retardée dans les cellules Jurkat exprimant constitutivement VprCAT ou VprIE. En fait, ce modèle a permis de démontrer que l'effet protecteur de VprIE est au moins équivalent à celui obtenu avec la protéine thérapeutique RevM10 actuellement en étude clinique (Nabel, 1994; Woffendin *et al.*, 1996). En effet, VprIE, comme RevM10, retarde la réplication de l'isolat de laboratoire du VIH-1 HxBRU (*vpr+*) de six jours lorsque leurs niveaux d'expression respectifs sont similaires (Kobinger & Cohen, résultats non-publiés). La protéine RevM10 et la protéine de fusion VprIE sont exprimées faiblement dans les cellules Jurkat puisque seulement l'ARN codant pour ces protéines a pu être détecté. Ces résultats suggèrent que même une faible expression de ces protéines thérapeutiques est suffisante pour protéger substantiellement les cellules Jurkat contre la réplication du VIH-1. Par conséquent, il est probable que le mécanisme d'inhibition induit par la protéine de fusion VprIE soit spécifique et hautement efficace tout comme celui de RevM10 bien que celui-ci cible une étape différente de la réplication virale. Aussi, le niveau de protection contre la réplication du VIH-1 induit par VprIE est directement proportionnel à son niveau d'expression. L'utilisation d'un promoteur inductible a permis de produire des niveaux de VprIE détectables par immunoprécipitation capables de retarder la réplication de la souche HxBRU de neuf jours plutôt que de six jours dans des cellules Jurkat (Kobinger & Cohen, résultats non-publiés). Bien que du domaine de la spéculation, il est aussi fort probable qu'une quantité croissante de RevM10 augmente l'effet protecteur de cette protéine thérapeutique face à la propagation du VIH-1.

La protéine de fusion VprIE provoque une baisse importante du potentiel infectieux du VIH-1. La baisse de l'infectivité virale induite par VprIE semble être provoquée par la déstabilisation au niveau de l'architecture du virus. En effet, les analyses biochimiques et les images de microscopie électronique montrent que VprIE affecte la morphologie du VIH-1 (Kobinger *et al.*, manuscrit en préparation). Les virus produits par les Jurkat-VprIE présentent une morphologie plus hétérogène, les particules virales sont plus grosses et le nucléoïde démontre souvent une organisation structurale aberrante. VprIE, en déstabilisant la morphologie virale, n'affecte pas l'entrée du virus dans la cellule cible tel que démontré par mesure de la quantité de p24 intracellulaire 5 heures post-infection. Par contre, VprIE diminue l'efficacité de la transcriptase inverse et/ou rend le complexe de préintégration plus susceptible d'être dégradé par les nucléases cellulaires. En effet, l'infection des cellules Jurkat avec des virus générés en présence de VprIE aboutit à une production inefficace d'ADN viral présumément associé au complexe de préintégration tel que quantifié par la méthode de PCR semi-quantitative.

Les chapitres 3 et 4 démontrent que l'incorporation et conséquemment l'effet antiviral des protéines de fusion VprCAT et VprIE dépendent de la présence d'un domaine p6 intact. Plus spécifiquement, le chapitre 4 confirme l'importance du domaine LXXLF situé en C-terminal de la p6 dans l'effet antiviral induit par les protéines de fusion. Le domaine LXXLF de la p6 est très conservé à travers les différentes souches du VIH-1. Des mutations à l'intérieur de ce motif inhibent l'incorporation de Vpr dans les virions et diminuent dramatiquement l'infectivité du VIH-1 (Kondo and Gottlinger, 1996). En relation avec l'effet des protéines de fusion sur l'infectivité du virus, ces données sont très intéressantes. Effectivement, il est probable qu'une mutation pouvant bloquer l'incorporation des protéines de fusion induise une perte substantielle de l'infectivité virale. Par conséquent, la stratégie d'utiliser Vpr comme cheval de Troie est avantageuse du point de vue thérapeutique puisqu'elle ne devrait pas être contrée par l'apparition de virus résistants. D'ailleurs, aucun virus résistant n'a pu être isolé suite aux passages successifs d'isolats cliniques du VIH-1 dans les cellules Jurkat-VprIE. Par contre, en utilisant la même approche, les cellules Jurkat exprimant la protéine RevM10 ont développé des souches résistantes du VIH-1 capables de se répliquer efficacement (Kobinger *et al.*, manuscrit en préparation). Cette observation confirme des résultats récents démontrant que l'effet thérapeutique de la protéine RevM10 peut être contré suite à l'apparition de souches résistantes du VIH-1 (Hamm *et al.*, 1997). L'apparition de souches résistantes du VIH-1 pouvant se répliquer en présence d'un agent antiviral

représente certainement la plus importante limitation des agents anti-VIH actuellement disponibles. À ce jour, l'utilisation de Vpr pour cibler des molécules thérapeutiques à l'intérieur des virions constitue la première stratégie capable de contrer l'énorme diversité génétique du VIH-1 en culture de cellules. Cette caractéristique constitue certainement un avantage de taille sur les autres voies thérapeutiques plus conventionnelles et aussi sur d'autres stratégies de thérapie génique telles que les ribozymes et certains anticorps intracellulaires. En effet, à l'exception des antisenses, toutes les approches thérapeutiques sont, d'un point de vue théorique, susceptibles à être neutraliser par l'apparition de souches résistantes. Évidemment, la stratégie ici décrite n'est pas exempte de désavantages par rapport aux autres stratégies de thérapie génique. En effet, une des limitations majeures associées à l'emploi de VprIE est certainement l'efficacité relativement faible avec laquelle elle peut retarder la réplication du VIH-1 surtout en présence et donc en compétition avec les protéines Vpr produites par le virus. Plusieurs autres méthodes de thérapie génique (ribozymes, antisenses, anticorps intracellulaires) établissent des délais de protection en culture de cellules de plusieurs mois contre la propagation du VIH-1 (Bunnell and Morgan, 1998; Robbins *et al.*, 1998).

Une autre région de p6 hautement conservée à travers l'ensemble des isolats du VIH-1 est constituée du consensus PXXP situé en N-terminal de la protéine (Garnier *et al.*, 1998). Cette région a récemment été identifiée comme étant le déterminant majeur responsable de la taille et de la morphologie du VIH-1. En effet, les mutations de la séquence PXXP induisent la formation de particules virales plus grosses avec une organisation structurale aberrante. La séquence PXXP correspond aux séquences consensus retrouvées chez les ligands des protéines contenant des domaines SH3 (Chen and Sudol, 1995). Par conséquent, il semble que cette région de p6 interagisse avec le domaine SH3 d'une protéine cellulaire impliquée dans le bourgeonnement adéquat du VIH-1 (Garnier *et al.*, 1998). D'ailleurs, certaines études démontrent que l'insertion de mutations au niveau de la p6 et plus particulièrement de la séquence PXXP diminue le bourgeonnement du VIH-1 (Göttlinger *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995; Parent *et al.*, 1995). D'un point de vue mécanistique, il est possible que l'incorporation de VprIE ou de VprCAT diminuent l'infectivité du VIH-1 en provoquant un encombrement stérique individuelle à l'intérieur des particules virales. Par ailleurs, il est aussi possible que l'incorporation intravirale de VprIE via le domaine p6 inhibe partiellement ou complètement l'interaction entre la protéine cellulaire décrite et p6. En effet, le domaine C-terminal de Vpu, seul ou dans le contexte de la fusion avec 1-88Vpr, pourrait prendre la conformation d'un domaine SH3 et ainsi entrer en compétition avec la protéine cellulaire.

Les interactions médiées par les domaines SH3 sont critiques pour plusieurs processus cellulaires. Pour cette raison, les voies de transduction impliquées avec les domaines SH3 sont souvent piratées par les protéines virales. Par exemple, le virus de la leucémie murine Abelson, ainsi que la protéine Nef du VIH-1, interfèrent avec les voies de signalisation des protéines cellulaires contenant des domaines SH3 (Cohen *et al.*, 1995; Saksela *et al.*, 1995). Les protéines à motif SH3 sont impliquées dans le flux ionique et plus particulièrement dans le transport des ions calciques. De plus, ces protéines détiennent un rôle de premier plan dans le phénomène d'endocytose (Cohen *et al.*, 1995; Lim, 1996). Ces considérations sont en accord avec l'effet de Vpu sur les changements au niveau du flux ionique de la cellule et sur la relâche accrue des particules virales (Ewart *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1996). De plus, cette hypothèse d'interférence entre VprIE et la séquence PXXP de p6 expliquerait la formation de virus plus gros et morphologiquement anormaux lorsque produits en présence de VprIE. Cela pourrait aussi expliquer la différence entre l'effet antiviral généré par VprCAT et par VprIE. Effectivement, malgré leur taux équivalent d'incorporation dans les virions, VprIE, qui contient 107 acides aminés, diminue l'infectivité du VIH-1 plus efficacement que VprCAT qui en contient 305. Donc, il semble possible que les 18 derniers acides aminés de Vpu dans le contexte de la fusion et dans l'environnement immédiat de la p6 inhibent une fonction cellulaire spécifique. Par ailleurs, l'effet minime de VprCAT sur la réplication virale pourrait être dû à un simple encombrement stérique moins dramatique pour le virus.

Les chapitres 3 et 4 indiquent que l'incorporation de VprCAT à l'intérieur du VIH-1 diminue l'infectivité virale d'un facteur de 2 à 3 fois comparativement à de 10 à 30 fois pour VprIE. Néanmoins, la faible baisse du potentiel infectieux induit par les protéines de fusion VprCAT semble être spécifique puisque dépendante de l'incorporation intravirale. En effet, la protéine de fusion Vpr1-62CAT qui n'est pas incorporée à l'intérieur des particules virales n'affecte pas le potentiel infectieux du VIH-1 (chapitre 3). D'autres part, les différentes baisses du potentiel infectieux associées aux différentes protéines de fusion VprCAT ne semblent pas pouvoir être reliées à la présence d'un domaine particulier de Vpr. Par conséquent, il paraît plus probable que la conformation tridimensionnelle finale de la protéine de fusion VprCAT soit responsable de la baisse du potentiel infectieux plutôt que la séquence primaire de Vpr. D'ailleurs, aucun mutant transdominant négatif de Vpr n'a encore pu être identifié suggérant que le domaine de Vpr fusionné à CAT n'interagit pas de façon spécifique pour induire une diminution du potentiel infectieux du VIH-1. Dans le cadre des protéines de fusion, la perte d'une propriété et/ou d'une fonction de Vpr tel que l'oligomérisation, le transport du complexe de préintégration du cytoplasme au

noyau ou la transactivation peut difficilement expliquer les délais de trois à douze jours observés dans les cellules Jurkat.

Les données des chapitres 3 et 4 permettent de concevoir de manière optimiste le développement de nouvelles protéines de fusion capables d'interférer efficacement avec la réplication du VIH. La protéine de fusion VprIE, notre meilleure protéine thérapeutique contre la réplication du VIH-1, a servi d'outil pour établir une preuve de principe. Maintenant, il serait primordial de générer des nouveaux candidats capables de maximiser l'effet anti-HIV déjà observé avec VprIE. Tel que mentionné, le problème majeur de la stratégie ici décrite, c'est-à-dire l'inhibition intravirale, est la compétition qui s'établit entre la protéine de fusion produite par la cellule et la protéine Vpr apportée par le virus. Le chapitre 4 indique que les cellules Jurkat-VprCAT infectées par la souche HxBRU (*vpr+*) produisent des particules virales contenant 28% de la protéine de fusion VprCAT contre 72% de protéine Vpr. Bien que la protéine de fusion VprIE n'a pas pu être détectée à l'intérieur du VIH-1, la transposition du ratio obtenu avec VprCAT suggère que 28% d'incorporation de VprIE correspond à six jours de délai et que ce niveau d'incorporation doit être triplé (près de 100% dans le contexte d'un virus *vpr-* c'est-à-dire HxBRU-R-) pour augmenter le délai de réplication du VIH-1 à 12 jours. Cette compétition, observée à plusieurs niveaux (incorporation, morphologie virale, protection contre la réplication du virus et baisse du potentiel infectieux; voir chapitre 4) est difficilement surmontable en restant dans le contexte de l'interaction p6:Vpr. Par contre, il est envisageable de générer des protéines de fusion d'une efficacité telle qu'elles pourraient bloquer la réplication du VIH-1 même en compétition avec les molécules Vpr produites par le virus. Il existe déjà une autre fusion entre Vpr et un anticorps monocaténaire dirigé contre l'intégrase du VIH-1 qui semble posséder un potentiel thérapeutique jusqu'à 100 fois plus efficace que VprIE (Okui *et al.*, 1998).

Les chapitres 3 et 4 établissent les bases nécessaires à l'élaboration de fusion entre Vpr et d'autres candidats potentiellement capables d'inhiber la réplication du VIH-1 plus efficacement que VprIE. La protéine de fusion VprIE établit les bases et ouvre la porte à la fusion de Vpr avec des peptides capables d'inhiber des interactions ou des activités spécifiques entre des protéines virales et/ou cellulaires. En effet, les domaines de Vpr nécessaires et suffisants pour cibler des molécules thérapeutiques à l'intérieur des virions via le domaine p6 sont bien identifiés. Aussi, l'application clinique de cette stratégie serait facilitée par la possibilité d'utiliser la même méthodologie, le même protocole de transfert de gènes et les mêmes cibles cellulaires (lymphocytes T CD4⁺) que ceux élaborés et

développés pour RevM10 (en détails dans la référence; Nabel, 1994). De plus, l'utilisation des sites de clivage reconnus et coupés spécifiquement par la protéase du VIH-1 rend possible le relâchement de protéines inhibitrices à l'intérieur des virions. Cette approche pourrait permettre par exemple de libérer des protéases non-spécifiques sous une forme active et donc capables de dégrader non-spécifiquement les protéines associées aux particules virales. Plus spécifiquement, les sérines protéases, qui ont besoin de leur extrémité N-terminale libre pour former leur site catalytique et donc pour être actives, constituent d'excellents candidats comme partenaires de fusion à Vpr.

Certaines approches de thérapie génique possèdent plusieurs avantages par rapport aux approches cliniques plus traditionnelles telles que la trithérapie. Par exemple, aucun effet secondaire n'a encore été rapporté suite aux différentes études cliniques de thérapie génique utilisant les vecteurs rétroviraux comme moyen de transfert de gènes. De plus, la possibilité d'utiliser les vecteurs rétroviraux pour transférer le gène thérapeutique à l'intérieur des cellules souches hématopoïétiques permettrait de protéger un plus grand nombre de compartiments cellulaires contre l'infection au VIH. En effet, suite à la différenciation de ces cellules souches, le gène thérapeutique se retrouverait présent dans les monocytes/macrophages ainsi que dans les lymphocytes T CD4⁺. Enfin, bien que le transfert du gène thérapeutique serait onéreux chez le patient, un seul traitement pourrait être suffisant pour éradiquer indéfiniment la réplication du VIH-1. En conclusion, les fonctions des protéines accessoires Vpu et Vpr du VIH-1 peuvent être appliquées à de nouveaux concepts de thérapie génique qui pourraient être importants pour le traitement de nombreuses maladies.

CONTRIBUTION ORIGINALE

Ma première contribution ici au laboratoire fut certainement la mise au point et la caractérisation du système inductible à la tétracycline. L'établissement de ce protocole a nécessité la génération de plusieurs lignées cellulaires résistantes à un antibiotique, la néomycine, l'hygromicine ou la puromycine. Ceci m'a permis de développer une expertise concernant la construction de lignées cellulaires génétiquement modifiées qui a ensuite pu être mise à profit par plusieurs étudiants et assistants de recherche. De plus, j'ai été à même d'introduire et de mettre au point dans le laboratoire la majorité des protocoles de transferts de gènes utilisant les vecteurs rétroviraux. Désormais et suite à mes nombreuses demandes de matériels dans plusieurs universités étrangères, le laboratoire détient un nombre élevé de lignées d'encapsidation rétrovirales et aussi plusieurs vecteurs rétroviraux incluant ceux de dernières générations. Mon travail a aussi permis d'obtenir de nouvelles connaissances sur les cinétiques d'infection et de réplication de souches de laboratoire et de souches cliniques du VIH dans diverses lignées cellulaires. De plus, j'ai élaboré un protocole permettant de tester si des souches résistantes du VIH-1 pouvaient apparaître et réduire l'effet bénéfique d'une protéine thérapeutique. Plusieurs de mes résultats et de mes approches servent actuellement de contrôles et de points de repères et permettent d'élaborer et d'évaluer de nouvelles fusion entre Vpr et plusieurs candidats potentiellement capables d'inhiber la réplication du VIH-1. Enfin, la caractérisation de l'effet inhibiteur provoqué par VprIE m'a permis de développer de nouvelles conditions de PCR semi-quantitatif plus sensibles pouvant maintenant être utilisées par d'autres pour quantifier les niveaux précoces d'ADN viral intracellulaire post-infection. Ces expériences ont montré la pertinence de l'utilisation de certaines fonctions des protéines accessoires Vpu et Vpr du VIH-1 en thérapie génique. En effet, deux preuves de principes ont été élaborées au cours de ce travail. D'abord il est possible d'utiliser Vpu pour augmenter significativement les titres viraux associés aux lignées d'encapsidation rétrovirales. Deuxièmement, la fusion entre le domaine comprenant les acides aminés 1 à 88 de Vpr et certaines séquences peptidiques peut inhiber partiellement la réplication du VIH-1 sans apparition de souche résistante ni d'effet néfaste sur l'homéostasie cellulaire. Évidemment, l'avancement scientifique provient de l'effort collectif de la communauté scientifique en général mais aussi du travail en groupe en particulier. Par conséquent, j'ai contribué à cette avancement scientifique mais j'ai aussi bénéficié énormément du travail d'équipe. Le travail et les connaissances de Éric Cohen, Guy Lemay et Françoise Boisvert ont été essentiels à cette contribution.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad, N. and Venkatesan, S. *Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR*. Science, 241:1481, 1985.
- Aiken, C., Konner, J., Landou, N. R., Lenburg, M. E. and Trono, D. *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 76:853-864, 1994.
- Aiken, C. and Trono, D. *Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis*. Journal of Virology, 69:5048-5056, 1995.
- Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q-X., Planelles, V. and Chen, I. Y. *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*. Journal of Virology, 70:2581-2585, 1996.
- Aldovini, A. and Young, R. A. *Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus*. Journal of Virology, 54:1920-1927, 1990.
- Aloia, R. C., Tian, H. and Jensen, F. C. *Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:5181-5185, 1993.
- Anderson, W. F. *Human gene therapy*. Science, 256:808-813, 1992.
- Andeweg, A. C., Leeflang, P., Osterhaus, A. D. M. E. and Bosh, M. L. *Both the V2 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation*. Journal of Virology, 67:3232-3239, 1993.
- Arrigo, S. J. and Chen, I. S. *Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs*. Genes & Development, 5:808-819, 1991.

Arrigo, S. J., Weitsman, S., Zack, J. A. and Chen, I. S. *Characterization and expression of novel singly spliced RNA species of human immunodeficiency virus type 1*. Journal of Virology, 64:4585-4588, 1990.

Arthur, L. O., Bess, J. W., Sowder, R. C., Benveniste, R., Mann, R., Chermann, J.-C. and Henderson, L. E. *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 258:1935-1938, 1992.

Arya, S. K., Guo, C., Josephs, S. F. and Wong-Staal, F. *Trans-activator of human T-lymphotropic virus type 3 (HTLV-III)*. Science, 24:69, 1985.

Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J. and De Clercq, E. *Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 85:6132-6136, 1988.

Bachelder, R. E., Bilancieri, J., Lin, W. and Letvin, N. L. *A human recombinant Fab identifies a human immunodeficiency virus type 1-induced conformational change in cell surface-expressed CD4*. Journal of Virology, 69:5734-5742, 1995.

Bahner, I., Zhou, C., Yu, X. J., Hao, Q. L., Guatelli, J. C. and Kohn, D. B. *Comparison of trans-dominant inhibitory mutant human immunodeficiency virus type 1 genes expressed by retroviral vectors in human T lymphocytes*. Journal of Virology, 67:3199-3207, 1993.

Baltimore, D. *Intracellular immunization*. Nature, 335:395-396, 1988.

Bandres, J. C., Luria, S. and Ratner, L. *Regulation of human immunodeficiency virus Nef protein by phosphorylation*. Virology, 201:157-161, 1994.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome*. Science, 220:868-871, 1983.

Berger, E. A. *HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection*. AIDS, 11:S3-

16, 1997.

Blomer, U., Naldini, L., Verma, I. M., Trono, D. and Gage, F. H. *Applications of gene therapy to the CNS*. Human Molecular Genetics, 5:1397-1404, 1996.

Boeke, J. D. and Hahn, B. *Destroying retroviruses from within*. Trends in Microbiology, 4:421-426, 1996.

Bonyhadi, M. L., Rabin, L., Salimi, S., Brown, D. A., Kosek, J., McCune, J. M. and Kaneshima, H. *HIV induces thymus depletion in vivo*. Nature, 363:728-732, 1993.

Bor, Y. C., Miller, M. D., Bushman, F. D. and Orgel, L. E. *Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro*. Virology, 222:283-288, 1996.

Bottiger, D., Johansson, N.-G., Samuelsson, B., Zhang, H., Putkonen, P., Vrang, L. and Oberg, B. *Prevention of simian immunodeficiency virus, SIVsm or HIV-2 infection in cynomolgus monkeys by pre and postexposure administration of BEA-005*. AIDS, 11:157-162, 1997.

Bour, S., Boulterice, F. and Wainberg, M. A. *Inhibition of CD4 and gp160 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1*. Journal of Virology, 65:6387-6396, 1991.

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

Bouyac, M., Courcoul, M., Bertoia, G., Baudat, Y., Gabuzda, D., Blanc, D., Chazal, N., Boulanger, P., Sire, J., Vigne, R. and Spire, B. *Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor*. Journal of Virology, 71:9358-9365, 1997a.

Bouyac, M., Rey, F., Nascimbeni, M., Courcoul, M., Sire, J., Blanc, D., Clavel, F., Vigne, R. and Spire, B. *Phenotypically Vif- human immunodeficiency virus type 1 is produced by chronically infected restrictive cells*. Journal of Virology, 71:2473-2477, 1997b.

Bridges, S. H. and Sarver, N. *Gene therapy and immune restoration for HIV disease.* Lancet, 345:427-432, 1995.

Browne, M. J., Mayer, K. H., Chafee, S. B., Dudley, M. N., Posner, M. R., Steinberg, S. M., Graham, K. K., Geletko, S. M., Zinner, S. H., Denman, S. L. and et al. *2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or AIDS-related complex: a phase I trial.* Journal of Infectious Diseases, 167:21-29, 1993.

Bryant, M. and Ratner, L. *Myristylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 32:523-525, 1990.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Shavora, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and and Stevenson, M. *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells.* Nature, 365:666-669, 1993a.

Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G. and Stevenson, M. *Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:6125-6129, 1993b.

Bukrinsky, M. I., Shavora, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. and and Stevenson, M. *Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 89:6580-6584, 1992.

Bunnell, B. A. and Morgan, R. A. *Gene therapy for infectious diseases.* Clinical Microbiology Reviews, 11:42-56, 1998.

Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M. and Morgan, R. A. *High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 92:7739-7743, 1995.

- Camaur, D. and Trono, D. *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation*. Journal of Virology, 70:6106-6111, 1996.
- Cao, J., Park, I. W., Cooper, A. and Sodroski, J. *Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1*. Journal of Virology, 70:1340-1354, 1996.
- Capon, D. J. and Ward, R. H. *The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis*. Annual Review of Immunology, 9:649-678, 1991.
- Caputo, A., Grossi, M. P., Rossi, C., Campioni, D., Balboni, P. G., Corallini, A. and Barbanti-Brodano, G. *The tat gene and protein of the human immunodeficiency virus type 1*. New Microbiologica, 18:87-110, 1995.
- Cavert, W. and Haase, A. *A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstruction*. Science, 208:1865-1866, 1998.
- Champagne, P., Lavoie, P. M., Sékaly, R.-P. and Yachou, A. *L'infection par le VIH: importance des facteurs de l'hôte*. Médecine/Sciences, 14:142-147, 1998.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. and Kim, P. S. *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein*. Cell, 89:263-273, 1997.
- Checroune, F., Yao, X.-J., Göttlinger, H., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the P6 domain of Pr55^{gag}*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology, 10:1-7, 1995.
- Chen, H. I. and Sudol, M. *The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus establish for Src homology 3-binding modules*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 92:7819-7823, 1995.
- Chen, M. Y., Maldarelli, F., Karczewski, M. K., Willey, R. L. and Strebel, K. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity*. Journal of Virology, 67:3877-3884, 1993.

Chesebro, B., Buller, R., Portis, J. and Wehrly, K. *Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells.* Journal of Virology, 58:215-224, 1990.

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

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Sntos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.M., Montagnier, L. *Isolation of a new human retrovirus from west africa patients with AIDS.* Science, 223:343-346, 1986.

Clavel, F. and Grenstein, J. M. *Mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology.* Journal of Virology, 64:5230-5234, 1990.

Clerici, M. and Shearer, G. M. *The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights.* Immunology Today, 15:575-581, 1994.

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

Cochrane, A. W., Jones, K. S., Beidas, S., Dillon, P. J., Skalka, A. M. and Rosen, C. A. *Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression.* Journal of Virology, 65:5305-13, 1991.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. and et al. *Human immunodeficiency viruses [letter].* Science, 232:697, 1986.

Coffin, J. M. *Superantigens and endogenous retroviruses: a confluences of puzzles.*

Science, 255:411-413, 1992.

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

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

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

Cohen, G. B., Ren, R. and Baltimore, D. *Molecular binding domains in signal transduction proteins.* Cell, 80:237-248, 1995.

Collette, Y., Dutartre, H., Benziane, A. and Olive, D. *The role of HIV1 Nef in T-cell activation: Nef impairs induction of Th1 cytokines and interacts with the Src family tyrosine kinase Lck.* Research in Virology, 148:52-58, 1997.

Cossarizza, A. *T cell repertoire and HIV infection: Facts and perspectives.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 11:1075-1088, 1997.

Cosset, F. L. and Russell, S. J. *Targeting retrovirus entry.* Gene Therapy, 3:946-956, 1996.

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

Crise, B., Buonocore, L. and Rose, J. K. *CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor.* Journal of Virology, 64:5585-5593, 1990.

Cullen, B. R. *Mechanism of action of regulatory protein encoded by complex retroviruses.* Microbiological Reviews, 56:375-394, 1992.

- Cullen, B. R. *Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights?* Cell, 73:417-420, 1993.
- Cullen, B. R. *The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses.* Virology, 205:1-6, 1994.
- Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D. and Ho, D. D. *Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments].* New England Journal of Medicine, 324:961-4, 1991.
- Dadaglio, G., Garcia, S., Montainier, L. and Gougeon, M. L. *Selective anergy of V-beta CD8+ T cells in human immunodeficiency virus-infected individuals.* Journal of Experimental Medicine, 179:413-424, 1994.
- Dadaglio, G., Michel, F., Langlade-Demoyen, P., Sansonetti, P., Chevrier, D., Vuillier, F., Plata, F. and Hoffenbach, A. *Enhancement of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte responses by zidovudine (AZT) treatment.* Clinical & Experimental Immunology, 87:7-14, 1992.
- Daefler, S., Klotman, M. E. and Wonng-Staal, F. *Trans-Activating Rev Protein of Human Immunodeficiency Virus 1 Interacts Directly and Specifically with its Target RNA.* Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 87:4571-4575, 1990.
- Dalglish, A. G., Beverly, P. C. and Clapham, P. R. *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.* Nature, 14:763, 1984.
- Darlix, J. L., Vincent, A., Gabus, C., de Rocquigny, H. and Roques, B. *Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA.* Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie Iii, Sciences de la Vie, 316:763-771, 1993.
- Das, A. T. and Berkhout, B. *Efficient extension of a misaligned tRNA-primer during replication of the HIV-1 retrovirus.* Nucleic Acids Research, 23:1319-1326, 1995.
- de Vreese, K., Kofler-Mongold, V., Leutgeb, C., Weber, V., Vermeire, K., Schacht, S.,

- Anne, J., de Clercq, E., Datema, R. and Werner, G. *The molecular target of bicyclams, potent inhibitors of human immunodeficiency virus replication.* Journal of Virology, 70:689-696, 1996.
- Deng, H. K., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N. and Littman, D. R. *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses [see comments].* Nature, 388:296-300, 1997.
- deRonde, A., Klaver, B., Keulin, W., Smit, L. and Goudsmit, J. *Natural HIV-1 Nef Accelerates Virus Replication in Primary Human Lymphocytes.* Virology, 188:391-395, 1992.
- Desrosiers, R. C. *HIV with multiple gene deletions as a live attenuated vaccine for AIDS.* AIDS Research & Human Retroviruses, 8:411-21, 1992.
- Dorfman, T., Luban, J., Goff, S. P., Haseltine, W. A. and Göttlinger, H. G. *Mapping of functionally important residues of a cysteine-Histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein.* Journal of Virology, 56:786-794, 1993.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A. and Gottlinger, H. G. *Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.* Journal of Virology, 68:1689-1696, 1994.
- Dragic, T., Picard, L. and Alizon, M. *Proteinase-resistant factors in human erythrocyte membranes mediate CD4-dependent fusion with cells expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins.* Journal of Virology, 69:1013-1018, 1995.
- Dropulic, B. and Jeang, K. T. *Gene therapy for human immunodeficiency virus infection: genetic antiviral strategies and targets for intervention.* Human Gene Therapy, 5:927-939, 1994.
- Dunbar, C. E. and Emmons, R. V. *Gene transfer into hematopoietic progenitor and stem cells: progress and problems.* Stem Cells, 12:563-576, 1994.

Earl, P., Doms, R. and Moss, B. *Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 9:648-651, 1990.

Earl, P., Moss, B. and Doms, R. *Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein*. *Journal of Virology*, 12:2047-2054, 1991.

Effros, R. B., Allsopp, R., Chiu, C. P., Hausner, M. A., Hirji, K., Wang, L., Harley, C. B., Villeponteau, B., West, M. D. and Giorgi, J. V. *Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis*. *AIDS*, 10:F17-22, 1996.

Einfeld, D. (1996) In H.-G. Kräusslich (ed.) *Maturation and assembly of retroviral glycoproteins*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. 214, pp. 133-176.

Emerman, M. *HIV-1Vpr and the cell cycle*. *Current Biology*, 6:1096-1103, 1996.

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

Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. *HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer*. *Cell*, 67:1211-1221, 1991.

Eron, J. J., Benoit, S. L., Jemsek, J., MacArthur, R. D., Santana, J., Quinn, J. B., Kuritzkes, D. R., Fallon, M. A. and Rubin, M. *Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter*. *North American HIV Working Party [see comments]*. *New England Journal of Medicine*, 333:1662-1669, 1995.

Estaquier, J., Tanaka, M., Suda, T., Nagata, S., Golstein, P. and Ameisen, J. C. *Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists*. *Blood*, 87:4959-4966, 1996.

Ewart, G. D., Sutherland, T., Gage, P. W. and Cox, G. B. *The Vpu Protein of Human*

Immunodeficiency Virus Type 1 Forms Cation-Selective Ion Channels. Journal of Virology, 70:7108-7115, 1996.

Facke, M., Janetzko, A., Shoeman, R. L. and Krausslich, H. G. *A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum.* Journal of Virology, 67:4972-4980, 1993.

Farnet, C. and Haseltine, W. A. *The Circularization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) DNA in Vitro.* Journal of Virology, 4:213-220, 1991.

Farnet, C. M. and Bushman, F. D. *HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro.* Cell, 88:483-492, 1997.

Farnet, C. M. and Haseltine, W. A. *Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex.* Journal of Virology, 65:1910-1915, 1991.

Fauci, A. S. *The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanism of pathogenesis.* Science, 239:617-622, 1988.

Federau, T., Schubert, U., Flossdorf, J., Henklein, P., Schomburg, D. and Wray, V. *Solution structure of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 encoded virus protein U (Vpu).* International Journal of Peptide & Protein Research, 47:297-310, 1996.

Feinberg, M. B., Jarret, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C. and Wong-Stall, F. *HTLV III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA.* Cell, 46:807-817, 1986.

Finston, W. I. and Champoux, J. J. *RNA Primed Initiation of Moloney Murine Leukemia Virus Plus Strands by Reverse Transcriptase in Vitro.* Journal Virology, 1:26-33, 1984.

Fisher, A. G., Feinberg, M. B. and Joseph, S. F. *Trans-Activator Gene of HTLV-III as Essential for Virus Replication.* Nature, 16:367, 1986.

- Fletcher, M. T., Soares, M. A., McPhearson, S., Hui, H., Wiskerchen, M., Muesing, M. A., Shaw, G. M., Leavitt, A. D., Boeke, J. D. and Hahn, B. H. *Complementation of integrase function in HIV-1 virions*. EMBO Journal, 16:5123-5138, 1997.
- Forget, J., Yao, X.-J., Mercier, J. and Cohen, E. A. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein transactivation function: mechanism and identification of domains involved*. in press, Journal of Molecular Biology, 1998.
- Fouchier, R., Meyer, B., Simon, J., Fischer, U., Albright, A., Gonzalez-Scarano, F. and Malim, M. *Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex*. Journal of Virology, 72:6004-6013, 1998.
- Fouchier, R. A., Simon, J. H., Jaffe, A. B. and Malim, M. H. *Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins*. Journal of Virology, 70:8263-8269, 1996.
- Franchini, G., Robert-Guroff, M., Tartaglia, J., Aggarwal, A., Abimiku, A., Benson, J., Markham, P., Limbach, K., Hurteau, G., Fullen, J. and et al. *Highly attenuated HIV type 2 recombinant poxviruses, but not HIV-2 recombinant Salmonella vaccines, induce long-lasting protection in rhesus macaques*. AIDS Research & Human Retroviruses, 11:909-920, 1995.
- Franke, E. K., Yuan, H. E. and Luban, J. *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions [see comments]*. Nature, 372:359-362, 1994.
- Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchschacher, G. L., Jr. and Panganiban, A. T. *A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 89:70-74, 1992.
- Freed, E. O. and Martin, M. A. *Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix*. Journal of Virology, 69:1984-1989, 1995.
- Friborg, J., Ladha, A., Göttlinger, H., Haseltine, W. A. and Cohen, E. A. *Functional*

analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 8:10-22, 1995.

Fujii, Y., Otake, K., Tashiro, M. and Adachi, A. *Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells.* FEBS Letters, 393:93-96, 1996.

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

Gaines, H., von Sydow, M. A., von Stedingk, L. V., Biberfeld, G., Bottiger, B., Hansson, L. O., Lundbergh, P., Sonnerborg, A. B., Wasserman, J. and Strannegard, O. *Immunological changes in primary HIV-1 infection.* Acquired Immunodeficiency Syndrome, 4:995-999, 1990.

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

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. and Markham, P. D. *Frequent detection and isolation of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS.* Science, 224:500-503, 1984.

Gao, Q., Gu, Z. X., Parniak, M. A., Li, X. G. and Wainberg, M. A. *In vitro selection of variants of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine.* Journal of Virology, 66:12-19, 1992.

Garcia, J. A., Wu, F. K., Mitsuyasu, R. and Gaynor, R. B. *Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus.* EMBO Journal, 6:3761-3770, 1987.

Garnier, L., Ratner, L., Rovinski, B., Cao, S. X. and Wills, J. W. *Particle size determinants in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein.* Journal of Virology, 72:4667-4677, 1998.

Garry, R. F. *Potential mechanism for the cytopathic properties of HIV*. AIDS, 54:683-694, 1989.

Gaulton, G. N. *Viral pathogenesis and immunity within the thymus*. Immunologic Research, 17:75-82, 1998.

Gelderblom, H. R. *Assembly and morphology of HIV : potential effect of structure on viral function*. AIDS, 5:617-637, 1991.

Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H. S. and Ozel, M. *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 12:171-177, 1987.

Gelderblom, H. R., Ozel, M. and Pauli, G. *Morphogenesis and morphology of HIV. structure-function relations*. Archives of Virology, 106:1-13, 1989.

Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Baca, L. M., Weiser, B., Burger, H., Kalter, D. C. and Meltzer, M. S. *The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection [see comments]*. AIDS, 3:475-495, 1989.

Gheysen, D., Jacobs, E., De Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. and De Wilde, M. *Assembly and release of HIV-1 precursor p55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells*. Cell, 59:103-112., 1989.

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

Goff, S. P. *Genetics of retroviral integration*. Annual Review in Genetics, 26:527-544, 1992.

Goncalves, J., Shi, B., Yang, X. and Gabuzda, D. *Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains*. Journal of Virology, 69:7196-7204, 1995.

Gosling, J., Monteclaro, F. S., Atchison, R. E., Arai, H., Tsou, C. L., Goldsmith, M.

- A. and Charo, I. F. *Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 94:5061-5066, 1997.
- Goto, T., Harada, S., Yamamoto, N. and Nakai, M. *Entry of human immunodeficiency virus (HIV) into MT-2, human T cell leukemia virus carrier cell line [published erratum appears in Arch Virol 1989;105(1-2):following 140]*. Archives of Virology, 102:29-38, 1988.
- Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. A. and Haseltine, W. A. *Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:7381-7385, 1993.
- Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 88:3195-3199, 1991.
- Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G. and haseltine, W. A. *Role of capsid precursor processing and myristylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86:5781-5785, 1989.
- Gougeon, M. L. *Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis*. Psychoneuroendocrinology, 22:S33-39, 1997.
- Gougeon, M. L., Garcia, S., Heeney, J., Tschopp, R., Lecoer, H., Guetard, D., Rame, V., Dauguet, C. and Montagnier, L. *Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections*. AIDS Research & Human Retroviruses, 9:553-563, 1993.
- Gougeon, M. L., Lecoer, H., Dulioust, A., Enouf, M.-G., Courvoisier, M., Goujard, C., Debord, T. and Montagnier, L. *Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons*. Journal of Immunology, 156:3509-3520, 1996.
- Grice, A. L., Kerr, I. D. and Sansom, M. S. *Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a*

modelling and simulation study. FEBS Letters, 405:299-304, 1997.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D. and Garten, W. *Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160.* Nature, 360:358-361, 1992.

Hamm, T., Rekosh, D. and Hammarskjöld, M.-L. (1997) In C. S. H. Laboratory (ed.) *Identification and characterization of HIV-1 variants that are resistant to REV M10*, Cold Spring Harbor, New York, pp. 380.

Harrich, D., Garcia, J., Mitsuyasu, R. and Gaynor, R. *TAR independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester stimulated T lymphocytes.* EMBO Journal, 9:4417-4423, 1990.

Haseltine, W. *Replication and pathogenesis of the AIDS virus.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom, 6:217-240, 1988.

Haseltine, W. A. *Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1.* FASEB Journal, 5:2349-2360, 1991.

Hayashi, T., Shioda, T., Iwakura, Y. and Shibuta, H. *RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1.* Virology, 188:590-599, 1992.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O. and Landau, N. R. *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.* Journal of Virology, 69:6705-6711, 1995.

Heinkelein, M., Sopper, S. and Jassoy, C. *Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells.* Journal of Virology, 69:6925-6931, 1995.

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

Helseth, E., Kowalski, M., Gabuzda, D., Olshevsky, U., Haseltine, W. and and Sodroski, J. *Rapid complementation assays measuring replicative potential of HIV-1 envelope glycoprotein mutants.* Journal of Virology, 24:2415-2420, 1990.

Henderson, L. E., Bowers, M. A., owder, R. C., Serabyn, S. A., Johnson, D. G., Bess, J. W., Arthur, L. A., Bryant, D. and Fenseleau, C. *Gag protein of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processing and complete amino acid sequences.* Journal of Virology, 66:1856-1865, 1992.

Henderson, L. E., Krutzsch, H. C. and Oroszlan, S. *Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: an unusual post-translational proteins modification .* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 80:339-343, 1983.

Hildreth, J. E. and and Orentas, R. J. *Involvement of a leucocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation.* Science, 244:1075-1078, 1989.

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

Ho, D. D. *Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead.* Science, 280:1866-1867, 1998.

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

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.* Gene, 4:51-59, 1989.

Hoch, J., Lang, S. M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Dittmer, U., Hunsmann, G., Fuchs, D., Muller, J., Sopper, S. and et al. *vpr deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys.* Journal of Virology,

69:4807-4813, 1995.

Hogg, R. S., O'Shaughnessy, M. V., Gataric, N., Yip, B., Criab, K., Scheschter, M. T. and Montaner, J. S. G. *Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals*. Lancet, 349:1294, 1997.

Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. and Gabuzda, D. *Role of vif during packing of the core of HIV-1*. Virology, 201:349-355, 1994.

Hrimech, M., Yao, X., Bachand, F., Rougeau, N. and Cohen, E. *Functional Role of virion-associated Vpr during the early stage of HIV replication in dividing T cells*. Submitted, 1998.

Hsu, M. C., Dhingra, U., Earley, J. V., Holly, M., Keith, D., Nalin, C. M., Richou, A. R., Schutt, A. D., Tam, S. Y., Potash, M. J. and et al. *Inhibition of type 1 human immunodeficiency virus replication by a tat antagonist to which the virus remains sensitive after prolonged exposure in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:6395-6399, 1993.

Hu, W.-S. and Temin, H. M. *Retroviral recombination and reverse transcription*. Science, 250:1227-1233, 1990.

Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. and Freed, E. O. *p6 gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease*. Journal of Virology, 69:6810-6818, 1995.

Imberti, L., Sottini, A., Bertinardi, A., Puoti, N. and Primi, D. *Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V-beta sequences*. Science, 255:860-862, 1991.

Jabbar, M. A. and and Nayak, D. P. *Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane*. Journal of Virology, 64:6297-6304, 1990.

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

- Jones, J. S., Allan, R. W. and Temin, H. M. *Alteration of location of dimer linkage sequence in retroviral RNA: Little effect on replication or homologous recombination.* Journal of Virology, 67:3151-3158, 1993.
- Jones, J. S., Allan, R. W. and Temin, H. M. *One retroviral RNA is sufficient for synthesis of viral DNA.* Journal of Virology, 68:207-216, 1994.
- Jones, K. A., Luciw, P. A. and Duchange, N. *Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters.* Genes and Development, 2:1101-1114, 1988.
- Jones, T., Sheer, D., Bevec, D., Kappel, B., Hauber, J. and Steinkasserer, A. *The human HIV-1 Rev binding-protein hRIP/Rab (HRB) maps to chromosome 2q36.* Genomics, 40:198-199, 1997.
- Jonsson, C. B., Donzella, G. A., Gaucan, E., Smith, C. M. and Roth, M. J. *Functional domains of Moloney murine leukemia virus integrase defined by mutation and complementation analysis.* Journal of Virology, 70:4585-4597, 1996.
- Kaiser, P. K., Offermann, J. T. and Lipton, S. A. *Neuronal injury due to HIV-1 envelope protein is blocked by anti-gp120 antibodies but not by anti-CD4 antibodies.* Neurology, 40:1757-1761, 1990.
- Karn, J., Dingwall, C., Finch, J. T., Heaphy, S. and Gait, M. J. *RNA binding by the tat and rev proteins of HIV-1.* Biochimie, 73:9-16, 1991.
- Kelleher, A. D., Al-Harhi, L. and Landay, A. L. *Immunological effects of antiretroviral and immune therapies of HIV.* Acquired Immunodeficiency Syndrom, 11:S149-S155, 1997.
- Kestler, H. W., III, Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. and Desrosiers, R. C. *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for the development of AIDS.* Cell, 65:651-662, 1991.
- Kewalramani, V. N. and Emerman, M. *Vpx association with mature core structures of*

HIV-2. *Virology*, 218:159-168, 1996.

Kim, J. K., Palaniappan, C., Chow, S., Fa y, P. J. and Bambara, R. A. (1998) In C. S. H. Laboratory (ed.) *Vpr stimulates DNA synthesis by HIV-RT*, Cold Spring Harbor, Vol. 1, pp. 261.

Kim, S., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D. *Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infections: evidence for differential gene expression*. *Journal of Virology*, 28:3708-3717, 1989.

Kimpton, J. and Emerman, M. *Detection of replication competent and pseudotyped HIV with a sensitive cell line based on activation of an integrated beta-galactosidase gene*. *Journal of Virology*, 66:2232-2239, 1992.

Kimura, T., Green, S. M. and Karn, J. *HIV-1 vpu protein stimulates envelope glycoprotein accumulation in the golgi*. *Journal of Virology*, 31:453-460, 1992.

Klatzmann, D., Champagne, E. and Chamaret, S. *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. *Nature (London)*, 76:767, 1984.

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A. and Orenstein, J. M. *The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release*. *Journal of Virology*, 64:621-629, 1990.

Knoell, D. L. and Yiu, I. M. *Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials*. *American Journal of Health System Pharmacy*, 55:899-904, 1998.

Kobinger, G. P., Borsetti, A., Nie, Z., Mercier, J., Daniel, N., Göttinger, H. and Cohen, E. A. *Virion-targeted viral inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins*. *Journal of Virology*, 72:5441-5448, 1998.

Kobinger, G. P., Dandache, S., Yao, X.-J., Daniel, N. and Cohen, E. A. *Viral inactivation by using Vpr fusion proteins impairs HIV-1 replication without appearance of resistant viruses*. In preparation for submission to PNAS, 1999.

Kobinger, G. P., Mouland, A. J., J-P, L. and Cohen, E. A. *Enhancement of retroviral*

- production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency virus type 1 vpu gene.* Gene Therapy, 4:868-874, 1997.
- Kohl, N. E., Emini, E. A. and Schleif, W. A. *Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 67:4686-4690, 1988.
- Kohn, D. B. *Gene therapy for haematopoietic and lymphoid disorders.* Clinical and Experimental Immunology, 107:54-57, 1997.
- Kolesnitchenko, V., Wahl, L. M., Tian, H., Tani, Y., Hartmann, D.-P., Cossman, J., Raffeld, M., Orenstien, J., Samelson, L. E. and Cohen, D. I. *Human immunodeficiency type 1 envelope-initiated G2-phase programmed cell death.* Proceeding of the National Academy of Science of USA, 92:11889-11893, 1995.
- Kondo, E. and Gottlinger, H. G. *A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.* Journal of Virology, 70:159-164, 1996.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A. and Göttinger, H. G. *The P68^{ag} domain of Human Immunodeficiency Virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles.* Journal of Virology, 69: 2759-2764, 1995.
- Kotani, H., Newton, P. B. r., Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F. and McGarrity, G. J. *Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy.* Human Gene Therapy, 5:19-28, 1994.
- Kotler, M., Simm, M., Zhao, Y. S., Sova, P., Chao, W., Ohnona, S. F., Roller, R., Krachmarov, C., Potash, M. J. and Volsky, D. J. *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro.* Journal of Virology, 71:5774-5781, 1997.
- Lamb, R. A. and Pinto, L. H. *Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B have ion channel activities in the viral life cycle?* Virology, 229:1-11, 1997.

Laurence, J. *Novel vaccination and anti receptor strategies against HIV*. AIDS Research in Human Retroviruses, 6:175-181, 1990.

Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L., Conley, S. R., Moore, J. P., Raina, J. L., Renz, H., Gelderblom, H. R. and Nara, P. L. *Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus*. Virology, 189:695-714, 1992.

Leavitt, M. C., Yu, M., Yamada, O., Kraus, G., Looney, D., Poeschla, E. and Wong-Staal, F. *Transfer of an anti-HIV-1 ribozyme gene into primary human lymphocytes*. Human Gene Therapy, 5:1115-1120, 1994.

Lee, S. W., Gallardo, H. F., Gilboa, E. and Smith, C. *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in human T cells by a potent Rev response element decoy consisting of the 13-nucleotide minimal Rev-binding domain*. Journal of Virology, 68:8254-8264, 1994.

Lee, T. C., Sullenger, H. F., Gallardo, H. F., Ungers, G. E. and Gilboa, E. *Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells*. New Biology, 4:66-74, 1992.

Lemp, G. F., Hirozawa, A. M., Cohen, J. B., Derish, P. A., McKinney, K. C. and Hernandez, S. R. *Survival for woman and men with AIDS*. Journal of Infectious Diseases, 166:74-79, 1992.

Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. and Sodroski, J. *Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions*. Journal of Virology, 67:4085-4084, 1989.

Levy, J. A. *Mysteries of HIV: challenges for therapy and prevention*. Nature, 333:519-522, 1988.

Levy, J. A. *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiological Reviews, 57:183-289, 1993.

Levy, J. A. *HIV research: a need to focus on the right target*. Lancet, 345:1619-1621,

1995.

Levy, J. A. (1998a) In A. S. f. Microbiology (ed.) *Antiviral therapies*, ASM press, Washington, D.C., pp. 351-355.

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

Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. and Oshiro, L. S. *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 225:840-842, 1984.

Lewis, P., Hensel, M. and Emerman, M. *Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle*. EMBO Journal, 87:3053-3058, 1992.

Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. and Pardee, A. B. *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. Science, 268:429-431, 1995.

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

Li, P., Stephenson, A. J., Brennan, P. A., Karageorgos, L., Kok, T., Kuiper, L. J., Swift, J. and Burrell, C. J. *Initiation of reverse transcription during cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection uses pre-existing reverse transcriptase*. Journal of General Virology, 75:1917-1926, 1994.

Lifson, J. D., Feinberg, M. B., Reyes, G. R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K. S. and Engleman, E. G. *Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein*. Nature, 323:725-728, 1986a.

Lifson, J. D., Rausch, D. M., Kalyanaraman, V. S., Hwang, K. M. and Eiden, L. E. *Synthetic peptides allow discrimination of structural features of CD4(81-92) important for HIV-1 infection versus HIV-1-induced syncytium formation*. AIDS Research & Human

Retroviruses, 7:521-527, 1991.

Lifson, J. D., Reyes, G. R., McGrath, M. S., Stein, B. S. and Engleman, E. G. *AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen.* Science, 232:1123-1127, 1986b.

Lim, W. A. *Reading between the lines: SH3 recognition of an intact protein.* Structure, 4:657-659, 1996.

Liska, V., Spehner, D., Mehtali, M., Schmitt, D., Kirn, A. and Aubertin, A.-M. *Localization of viral protein X in simian immunodeficiency virus macaque strain and analysis of its packaging requirements.* Journal of General Virology, 75:2955-2962, 1994.

Liszewicz, J., Sun, D., Smythe, J., Lusso, P., Lori, F., Louie, A., Markham, P., Rossi, J., Reitz, M. and Gallo, R. C. *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by regulated expression of a polymeric Tat activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:8000-8004, 1993.

Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H. and Kappes, J. C. *The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures.* Journal of Virology, 69:7630-7638, 1995.

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

Lodge, R. E., Darlix, J.-L. and Cohen, E. A. *L'infection par le VIH: rôle des facteurs viraux.* Médecine/Sciences, 14:148-154, 1998.

Lu, Y.-L., Spearman, P. and Ratner, L. *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions.* Journal of Virology, 67:6542-6550, 1993.

Lu, Y. Y., Koga, Y., Tanaka, K., Sasaki, M., Kimura, G. and Nomoto, K. *Apoptosis*

induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. Journal of Virology, 68:390-399, 1994.

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

Luo, Z., Butcher, D. J., Murali, R., Srinivasan, A. and Huang, Z. *Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein.* Biochemical & Biophysical Research Communications, 244:732-736, 1998.

Maciejewski, J. P., Weichold, F. F., Young, N. S., Cara, A., Zella, D., Reitz, M. S. and Gallo, R. C. *Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection in vitro.* Nature Medicine, 1:667-673, 1995.

Mackewicz, C. E., Landay, A., Hollander, H. and Levy, J. A. *Effect of Zidovudine therapy on CD8+ T cell anti-HIV activity.* Clinical Immunology and Immunopathology, 73:80-87, 1994.

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

Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T. and Weiner, D. B. *Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.* Journal of Virology, 71:6339-6347, 1997.

Mahalingam, S. A., Khan, S. A., Murali, R., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G. and Srinivasan, A. *Mutagenesis of the putative alpha helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 92:3794-3798, 1995.

Maldarelli, F., Chen, M. Y., Willey, R. L. and Strebel, K. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein.* Journal of

Virology, 67:5056-5061, 1993.

Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, A. J. and Cullen, B. R. *Functional dissection of the HIV-1 rev trans-activator derivation of the trans-dominant repressor of rev function.* Cell, 8:205-217, 1989.

Marechal, V., Clavel, F., Heard, J. M. and Schwartz, O. *Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology, 72:2208-2212, 1998.

Margottin, F., Bour, S., Durand, H., Sello, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. and Benarous, R. *A novel human WD protein, h-BTrCP, that interacts with HIV-1 Vpu Connects CD4 to the ER degradation Pathway through an F-box motif.* Molecular Cell, 1:565-574, 1998.

Mariani, R., Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Sullivan, J. L., Desrosiers, R. C. and Skowrons. *High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection.* Journal of Virology, 70:7752-7764, 1996.

Marshall, E. *Gene therapy's growing pains.* Science, 269:1050-1055, 1995.

Martin, J. L., Wilson, J. E., Furfine, E. S., Hopkins, S. E. and Furman, P. A. *Biochemical analysis of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase containing a mutation at position lysine 263.* Journal of Biological Chemistry, 268:2565-2570, 1993.

Massiah, M. A., Starich, M. R., Paschall, C., Summers, M. F., Christensen, A. M. and Sundquist, W. I. *Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein.* Journal of Molecular Biology, 244:198-223, 1994.

Matsuda, Z., Yu, X., Yu, Q.-C., Lee, T.-H. and Essex, M. *A virion inhibitory molecule with therapeutic potential for human immunodeficiency virus type 1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:3544-3548, 1993.

Matthews, T. J., Weinhold, K. J. and Lyerly, H. K. *Interaction between the human T-*

cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 4:55-58, 1987.

McCloskey, T. W., Ott, M., Tribble, E., Khan, S. A., Teichberg, S., Paul, M. O., Pahwa, S., Verdin, E. and Chirmule, N. *Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells.* Journal of Immunology, 158:1014-1019, 1997.

McClure, M. O., Marsh, M. and Weiss, R. A. *Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism.* EMBO Journal, 7:513-518, 1988.

McClure, M. O., Moore, J. P., Blanc, D. F., Scotting, P., Cook, G. M., Keynes, R. J., Weber, J. N., Davies, D. and Weiss, R. A. *Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro.* AIDS Research & Human Retroviruses, 8:19-26, 1992.

McCune, J. M. *Thymic function in HIV-1 disease.* Sem Immunology, 9:397-404, 1998.

Meerlo, T., Parmentier, H. K., Osterhaus, A. D., Goudsmit, J. and Schuurman, H. J. *Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells. An immunoelectron microscopic study.* AIDS, 6:1105-1016, 1992.

Mellors, J. W., Rinaldo Jr., C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. and Kingsley, L. A. *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.* Science, 272:1167-1170, 1996.

Meltzer, M. S. and Gendelman, H. E. *Mononuclear phagocytes as targets, tissue reservoirs, and immunoregulatory cells in human immunodeficiency virus disease.* Current Topics in Microbiology & Immunology, 181:239-263, 1992.

Merigan, T. C., Hirsch, R. L., Fisher, A. C., Meyerson, L. A., Goldstein, G. and Winters, M. A. *The prognostic significance of serum viral load, codon 215 reverse transcriptase mutation and CD4+ T cells on progression of HIV disease in a double-blind study of thymopentin.* AIDS, 10:159-165, 1996.

- Meylan, P. R., Guatelli, J. C., Munis, J. R., Richman, D. D. and Kornbluth, R. S. *Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages*. *Virology*, 193:138-148, 1993.
- Miller, A. D. *Human gene therapy comes of age*. *Nature*, 357:455-460, 1992.
- Miller, A. D. *Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:11407-11413, 1996.
- Miller, M. A., Garry, R. F., Jaynes, J. M. and Montelaro, R. C. *A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides*. *AIDS Research of Human Retroviruses*, 7:511-519, 1991.
- Mitsuya, H. and Broder, S. *Antiretroviral chemotherapy against human immunodeficiency virus (hiv) infection: perspective for therapy of hepatitis B virus infection*. *Cancer Detection & Prevention*, 14:299-308, 1989.
- Moebius, U., Clayton, L. K., Abraham, S., Harrison, S. C. and Reinherz, E. L. *The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure*. *Journal of Experimental Medicine*, 176:507-517, 1992.
- Moore, J. P., McKeating, J. M., Weiss, R. A. and Sattentau, Q. J. *Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4*. *Science*:1139-1142, 1990.
- Morgan, J. R., LeDoux, J. M., Snow, R. G., Tompkins, R. G. and Yarmush, M. L. *Retrovirus infection: Effect of time and target cell number*. *Journal of Virology*, 69:6994-7000, 1995.
- Myagkikh, M., Alipanah, S., Markham, P. D., Tartaglia, J., Paoletti, E., Gallo, R. C., Franchini, G. and Robert-Guroff, M. *Multiple immunizations with attenuated poxvirus HIV type 2 recombinants and subunit boosts required for protection of rhesus macaques*. *AIDS Research & Human Retroviruses*, 12:985-992, 1996.
- Nabel, G. and Baltimore, D. *An Inducible Transcription Factor Activates Expression of Human Immunodeficiency Virus in T cells*. *Nature*, 326:711-713, 1987.

Nabel, J. G. *A molecular genetic intervention for AIDS-effects of a transdominant negative form of Rev*. Human Gene Therapy, 5:79-92, 1994.

Nahmias, A. J., Weiss, J., Yao, X., Lee, F., Kodosi, R., Shanfield, M., Matthews, T., Bolognesi, D., Durack, D., Motulsky, A., Kanki, P. and Essex, M. *Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959*. Lancet, 1:1279-1280, 1986.

Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]*. Science, 272:263-267, 1996.

Natsoulis, G., Seshaiyah, P., Federspiel, M. J., Rein, A., Hughes, S. H. and Boeke, J. D. *Targeting of a nuclease to murine leukemia virus capsids inhibits viral multiplication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 92:364-368, 1995.

Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R., Yao, X., Checroune, F., Rougeau, N. and Cohen, E. A. *The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells*. Journal Virology, 72:4104-4115, 1998.

Nienhuis, A. W. *Gene transfer into hematopoietic stem cells*. Blood Cells, 20:141-148, 1994.

O'Brien, W. A., Sumner-Smith, M., Mao, S. H., Sadeghi, S., Zhao, J. Q. and Chen, I. S. *Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of an oligocationic compound mediated via gp120 V3 interactions*. Journal of Virology, 70:2825-2831, 1996.

Okui, N., Kobayashi, N. and Kitamura, Y. *Production of uninfecious human immunodeficiency virus type 1 containing viral protein R fused to a single-chain antibody against viral integrase*. Journal of Virology, 72:6960-6964, 1998.

Olsen, H. E., Cochrane, A. W. and Dillon, P. J. *Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein with structure region in env mRNA is dependent upon multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids*.

Genes and Development, 23:1357-1365, 1990.

Oroszlan, S. and Luftig, R. B. *Retroviral proteinases*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 157:153-185, 1990.

Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Bucsh, L. K., Johnson, D. G., Sowder II, R. C., Chertova, E. N., Arthur, L. O. and Henderson, L. E. *Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions*. Journal of Virology, 70:7734-7743, 1996.

Pal, R., Mumbauer, S., Hoke, G. M., Takatsuki, A. and Sarngadharan, M. G. *Brefeldin A inhibits the processing and secretion of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1*. AIDS Research & Human Retroviruses, 7:707-712, 1991.

Pandori, M. W., Fitch, N. J., Craig, H. M., Richman, D. D., Spina, C. A. and Guatelli, J. C. *Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein*. Journal of Virology, 70:4283-4290, 1996.

Pang, S., Koyanagi, Y., Miles, S., Wiley, C., Vinters, H. V. and Chen, I. S. *High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients*. Nature, 343:85-89, 1990.

Pantaleo, G. *How immune-based interventions can change HIV therapy*. Nature Medicine, 3:483-490, 1997.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P. and Fauci, A. S. *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 362:355-358, 1993.

Pardoll, D. *New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells*. Current Opinion in Immunology, 4:619-623, 1992.

Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C. and Wills, J. W. *Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and*

- human immunodeficiency virus Gag proteins*. Journal of Virology, 69:5455-5460, 1995.
- Park, I. W. and Sodroski, J. *Targeting a foreign protein into virion particles by fusion with the Vpx protein of simian immunodeficiency virus*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology, 11:341-350, 1996.
- Paul, R. W., Morris, D., Hess, B. W., Dunn, J. and Overell, R. W. *Increased viral titer through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines*. Human Gene Therapy, 4:609-615, 1993.
- Pauza, C. D. and Price, T. M. *Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis*. Journal of Cell Biology, 107:959-968, 1988.
- Paxton, W., Connor, R. I. and Landau, N. R. *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis*. Journal of Virology, 67:7229-7237, 1993.
- Peliska, J. A., Balasubramanian, S., Giedroc, D. P. and Benkovic, S. J. *Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein accelerates HIV-1 reverse transcriptase catalyzed DNA strand transfer reactions and modulates RNase H activity*. Biochemistry, 33:13817-13823, 1994.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. and Ho, D. D. *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 271:1582-1586, 1996.
- Perrin, L. and Telenti, A. *HIV treatment failure: Testing for HIV resistance in clinical practice*. Science, 280:1871-1873, 1998.
- Peterlin, B. M. (1995) In J. A. Levy (ed.) *Molecular biology of HIV*, Plenum Press, New York, Vol. 4, pp. 185-238.
- Piatak, M., Saag, J. S., Yang, L. C., Kappes, J. C., Luk, K.-C., Hahn, B. H., Shaw, G. M. and Lifson, J. D. *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR*. Science, 259:1749-1754, 1993.

- Piller, S. C., Ewart, G. D., Premkumar, A., Cox, G. B. and Gage, P. W. *Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 93:111-115, 1996.
- Pinter, A., Honnen, W. and Tilley, S. *Oligomeric Structure of gp41, The Transmembrane Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1*. Journal of Virology, 67:2674-2681, 1989.
- Poli, G., Pantaleo, G. and Fauci, A. S. *Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Clinical Infectious Diseases, 17:S224-9, 1993.
- Pomerantz, R. J., Seshamma, T. and Trono, D. *Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency*. Journal of Virology, 66:1809-1813, 1992.
- Poon, B., Jowett, J. B. M., Stewart, S., Armstrong, R. W., Rishton, G. M. and Chen, I. S. Y. *Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard*. Journal of Virology, 71:3961-3971, 1997.
- Poon, D. T., Wu, J. and Aldovini, A. *Charged amino acid residues of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p7 protein involved in RNA packaging and infectivity*. Journal of Virology, 70:6607-6616, 1996.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.-A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G. and Bukrinsky, M. *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. EMBO Journal, 17:909-917, 1998.
- Ragheb, J. A., Bressler, P., Daucher, M., Chiang, L., Chuah, M. K., Vandendriessche, T. and Morgan, R. A. *Analysis of trans-dominant mutants of the HIV type 1 Rev protein for their ability to inhibit Rev function, HIV type 1 replication, and their use as anti-HIV gene therapeutics*. AIDS Research & Human Retroviruses, 11:1343-1353, 1995.
- Raja, N. U. and Jabbar, M. A. *The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein tethered to the CD4 extracellular domain is localized to the plasma membrane and is biologically active in the secretory pathway of mammalian cells: implications for the*

mechanism of Vpu function. Virology, 220:141-151, 1996.

Ranga, U., Woffendin, C., Yang, Z. Y., Xu, L., Verma, S., Littman, D. R. and Nabel, G. J. *Cell and viral regulatory elements enhance the expression and function of a human immunodeficiency virus inhibitory gene.* Journal of Virology, 71:7020-7029, 1997.

Rasheed, S., Gottlieb, A. A. and Garry, R. F. *Cell killing by ultraviolet-inactivated human immunodeficiency virus.* Virology, 154:395-400, 1986.

Re, F., Braaten, D., Franke, E. K. and Luban, J. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B.* Journal of Virology, 69:6859-6864, 1995.

Rebai, N., Pantaleo, G., Demarest, J. F., Ciurli, C., Soudeyns, H., Adelsberger, J. W., Vaccarezza, M., Walker, R. E., Sekaly, R. P. and Fauci, A. S. *Analysis of the T-cell receptor B-chain variable region (VB) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: evidence for perturbations of specific VB segments in CD4+ T cells of the virus-positive twins.* Proceeding of the National Academy of Science of USA, 91:1529-1533, 1994.

Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. and Gottlinger, H. G. *Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein.* EMBO Journal, 17:2699-2708, 1998.

Rey, O., Canon, J. and Krogstad, P. *HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments.* Virology, 220:530-534, 1996.

Rice, W. G., Supko, J. G., Malspeis, L., Buckheit, R. W., Jr., Clanton, D., Bu, M., Graham, L., Schaeffer, C. A., Turpin, J. A., Domagala, J. and et al. *Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS.* Science, 270:1194-1197, 1995.

Richman, D. D. *Emergence of mutant HIV reverse transcriptase conferring resistance to AZT.* Journal of Enzyme Inhibition, 6:55-64, 1992.

Rizzuto, C. D. and Sodroski, J. G. *Contribution of virion ICAM-1 to human*

immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. Journal of Virology, 71:4847-4851, 1997.

Robbins, P. D., Tahara, H. and Ghivizzani, S. C. *Viral vectors for gene therapy*. Trends In Biotechnology, 16:35-40, 1998.

Robinson, H. *DNA vaccines for immunodeficiency viruses*. Acquired Immunodeficiency Syndrom, 11:s109-s119, 1997.

Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. and Brown, P. O. *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis*. EMBO Journal, 12:2099-2108, 1993.

Rogel, M. E., Wu, L. I. and Emerman, M. *The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection*. Journal of Virology, 69:882-888, 1995.

Roques, B. P., Morellet, N., de Rocquigny, H., Demene, H., Schueler, W. and Jullian, N. *Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7*. Biochimie, 79:673-680, 1997.

Rosen, C. A. *Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactions*. Trends in Genetics, 7:9-14, 1991.

Rosen, C. A., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 82:6502-6506, 1985.

Rossi, F., Gallina, A. and Milanesi, G. *Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system*. Virology, 217:397-403, 1996.

Roth, M. J., Schwartzberg, P., Tanese, L. and Goff, S. P. *Analysis of mutations in the integration function of Moloney murine leukemia virus: Effects on binding and cutting*. Journal of Virology, 64:4709-4717, 1990.

Roth, M. J., Schwartzberg, P. L. and Goff, S. P. *Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: Dependence of IN function and terminal*

DNA sequence. Cell, 58:47-54, 1989.

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

Sabatier, J. M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., Hue, B. and Bahraoui, E. *Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology, 65:961-967, 1991.

Sakai, H., Tokunaga, K., Kawamura, M. and Adachi, A. *Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types.* Journal of General Virology, 76:2717-2722, 1995.

Sakai, K., Ma, X., Gordienko, I. and Volsky, D. J. *Recombinational analysis of natural noncytopathic human immunodeficiency type 1: role of Vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathology.* Journal of Virology, 65:5765-5773, 1991.

Saksela, K., Chen, G. and Baltimore, D. *Proline-rich (PXXP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4.* EMBO Journal, 14:484-491, 1995.

Sarin, P. S., Sun, D. K., Thornton, A. H., Naylor, P. H. and Goldstein, A. L. *Neutralization of HTLV III/Lav replication by antiserum to thymosin alpha 1.* Science, 232:506-508, 1986.

Sato, A., Igarashi, H., Adachi, A. and Hayami, M. *Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1.* Virus Genes, 4:303-312, 1990.

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

Sawai, E. T., Cheng-Mayer, C. and Luciw, P. A. *Nef and the Nef-associated kinase.* Research in Virology, 148:47-52, 1997.

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

Schnittman, S. M. and Fauci, A. S. *Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update.* Advances in Internal Medicine, 39:305-355, 1994.

Schnittman, S. M. and Fox, L. *Preliminary evidence for partial restoration of immune function in HIV type 1 infection with potent antiretroviral therapies: clues from the Fourth Conference on Retroviruses and Opportunistic Diseases.* AIDS Research & Human Retroviruses, 13:815-818, 1997.

Schubert, U., Anton, L. C., Bacik, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orłowski, M., Strebel, K. and Yewdell, J. W. *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway.* Journal of Virology, 72:2280-2288, 1998.

Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., Maldarelli, F. and Strebel, K. *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains.* Journal of Virology, 70:800-819, 1996.

Schubert, U. and Strebel, K. *Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments.* Journal of Virology, 68:2260-2271, 1994.

Schumann, G., Cannon, K., Ma, W.-P., Crouch, R. J. and Boeke, J. D. *Antiretroviral effect of a gag-RNase HI fusion gene.* Gene Therapy, 4:593-599, 1997.

Schumann, G., Qin, L., Rein, A., Natsoulis, G. and Boeke, J. D. *Therapeutic effect of Gag-nuclease fusion protein on retrovirus-infected cell cultures.* Journal of Virology, 1996:4329-4337, 1996.

Schwartz, S., Felber, B. K. and Benko, D. M. *Cloning and functional analysis of multiple spliced mRNA species of human immunodeficiency virus.* Journal of Virology, 31:2519 -2529, 1990a.

Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. and Pavlakis, G. N. *Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs.* Journal of Virology, 64:5448-5456, 1990b.

Schwartz, S., Felber, B. K. and Pavlakis, G. N. *Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing.* Virology, 183:677-686, 1991.

Selby, M. J., Bain, E. S., Luciw, P. A. and Peterlin, B. M. *Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through The HIV-1 long terminal repeat.* Genes and Development, 43:547-554, 1989.

Shang, F., Huang, H., Revesz, K., Chen, H. C., Herz, R. and Pinter, A. *Characterization of monoclonal antibodies against the human immunodeficiency virus matrix protein, p17gag: identification of epitopes exposed at the surfaces of infected cells.* Journal of Virology, 65:4798-4804, 1991.

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

Shioda, T., Levy, J. A. and Cheng-Mayer, C. *Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 89:9434-9438, 1992.

Silvestri, R., Artico, M., Pagnozzi, E., Stefancich, G., Massa, S., La Colla, P., Loi, A. G., Spiga, M. G., Corrias, S. and Lichino, D. *Synthesis and anti-HIV activity of 10,11-dihydropyrrolo [1,2-b][1,2,5]benzothiadiazepine-11-acetic acid 5,5-dioxide derivatives and related compounds.* Farmaco, 51:425-430, 1996.

Simmons, G., Wilkinson, D., Reeves, J. D., Dittmar, M. T., Beddows, S., Weber, J., Caregie, G., Desselberger, U., Gray, P. W., Weiss, R. A. and Clapham, P. R. *Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry.* Journal of Virology, 70:8355-8360, 1996.

- Simon, J. and Malim, M. *The human immunodeficiency virus type 1 vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes.* Journal of Virology, 70:5297-5305, 1996.
- Simon, J. H., Fouchier, R. A., Southerling, T. E., Guerra, C. B., Grant, C. K. and Malim, M. H. *The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells.* Journal of Virology, 71:5259-5267, 1997.
- Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F. and Haseltine, W. *Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III.* Science, 229:74-77, 1985.
- Sodroski, J. G., Goh, W. C. and Rosen, C. *A Second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication.* Nature, 322:412-415, 1986a.
- Sodroski, J. G., Goh, W. C., Rosen, C., Campbell, K. and Haseltine, W. A. *Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cythopathicity.* Nature, 322:470-474, 1986b.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J. *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.* Nucleic Acids Research, 23:628-336, 1995.
- Sova, P. and Volsky, D. J. *Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology, 67:6322-6326, 1993.
- Spearman, P., Wang, J. J., Vander Heyden, N. and Ratner, L. *Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly.* Journal of Virology, 68:3232-3242, 1994.
- Spruance, S. L., Pavia, A. T., Mellors, J. W., Murphy, R., Gathe, J., Stool, J. E., Jemsek, J. G., Dellamonica, P., Cross, A. and Dunkle, L. *Clinical efficacy of monotherapy with Stavudin compared with zidovudine in HIV-infected, zidovudine*

experience patients. Annual Internal Medicine, 126:355-363, 1997.

Steffy, K. and Wong-Staal, F. *Genetic regulation of human immunodeficiency virus. Microbiological Reviews*, 55:193-205, 1991.

Stein, B. and Englemann, E. *Intracellular Processing of gp160 HIV-1 Envelope precursors. Journal of Biological Chemistry*, 23:2640-2647, 1990.

Stein, B., Gonda, S. and Lifson, J. *pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. Cell*, 43:659-672, 1987.

Stevenson, M. *Portal of entry: uncovering HIV nuclear transport pathways. Trends in Cell Biology*, 6:9-14, 1996.

Stevenson, M., Brichacek, B., Heinzinger, N., Swindells, S., Pirruccello, S., Janoff, E. and Emerman, M. *Molecular basis of cell cycle dependent HIV-1 replication. Implications for control of virus burden. Advances in Experimental Medicine & Biology*, 374:33-45, 1995.

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

Strebel, K., Klimkait, T., Maldarelli, F. and Martin, M. A. *Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. Journal of Virology*, 63:3784-3791, 1989.

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

Subbramanian, R. A. and Cohen, E. A. *Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. Journal of Virology*, 68:6831-6835, 1994.

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

Experimental Medicine, 187:1103-1111, 1998a.

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

Sullenger, B. A. and Cech, T. R. *Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA.* Science, 262:1566-1569, 1993.

Susal, C., Kirshfink, M., Daniel, V. and Opelz, G. *Complement activation by HIV-1 glycoprotein gp120.* Journal of Immunology, 152:6028-6034, 1994.

Swanstrom, R., Varmus, H. E. and Bishop, J. M. *The terminal redundancy of the retroviral genome facilitates chain elongation by reverse transcriptase.* Journal of Biological Chemistry, 256:1115-1121, 1981.

Tani, K., Lin, T., Hibino, H., Takahashi, K., Nakazaki, Y., Takahashi, S., Nagayama, H., Ozawa, K., Saitoh, I., Mulligan, R. and et al. *Transduction of LacZ gene into leukemia cells using viral vectors of retrovirus and adenovirus.* Leukemia, 9:S64-65, 1995.

Tateno, M., Gonzalez-Scarano, F. and Levy, J. A. *Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86:4287-4290, 1989.

Tersmette, M., Lange, J. M., de Goede, R. E., de Wolf, F., Eeftink-Schattenkerk, J. K., Schellekens, P. T., Coutinho, R. A., Huisman, J. G., Goudsmit, J. and Miedema, F. *Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality.* Lancet, 1:983-985, 1989.

Terwilliger, E. F., Cohen, E. A., Lu, Y. C., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. *Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86:5163-5167, 1989.

Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. and

- Gottlinger, H. G. *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions [see comments]*. *Nature*, 372:363-365, 1994.
- Tian, H., Lempiki, R., King, L., Donoghue, E., Samelson, L. E. and Cohen, D. I. *Hiv envelope-directed abberancies and cell death of CD4+ T cells in the absence of TCR costimulation*. *Internal Immunology*, 8:65-74, 1996.
- Tiganos, E., Yao, X.-J., Friborg, J., Daniel, N. and Cohen, E. A. *Putative α -helical structures in the human immunodeficiency virus type -1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule*. *Journal of Virology*, 71:4952-4960,1997.
- Tisdale, M., Schulze, T., Larder, B. A. and Moelling, K. *Mutations within the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase abolish virus infectivity*. *Journal of General Virology*, 72:59-66, 1991.
- Tristem, M., Marshal, C., Karpas, A. and Hill, F. *Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpr and vpx*. *EMBO Journal*, 11:3405-3412, 1992.
- Trono, D. *HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast*. *Cell*, 82:189-192, 1995.
- Trono, D. and Wang, J. K. *Nef and PAK: virulence factor and cellular accomplice*. *Chemistry & Biology*, 4:13-15, 1997.
- Tung, H. Y., De Rocquigny, H., Zhao, L. J., Cayla, X., Roques, B. P. and Ozon, R. *Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr*. *FEBS Letters*, 401:197-201, 1997.
- Vandendriessche, T., Chuah, M. K., Chiang, L., Chang, H. K., Ensoli, B. and Morgan, R. A. *Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) type 1 isolates in primary CD4+ T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes*. *Journal of Virology*, 69:4045-4052, 1995.
- Varmus, H. E. and Swanstrom, R. *Replication of Retroviruses*. . In Weiss, R. Teich, N. Varmus, H. Coffin, J. (RNA Tumor Viruses; p 369.):Page listed in title, 1982.

Verma, I. M. and Somia, N. *Gene therapy-promises, problems and prospects*. Nature, 389:239-242, 1997.

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

von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. and Trono, D. *Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells*. Journal of Virology, 67:4945-4955, 1993.

Voss, T. G., Fermin, C. D., Levy, J. A., Vigh, S., Choi, B. and Garry, R. F. *Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus*. Journal of Virology, 70:5447-5454, 1996.

Wang, C. T. and Barklis, E. *Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants*. Journal of Virology, 67:4264-4273, 1993.

Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. and Zhao, L. J. *Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat*. Journal of Biological Chemistry, 270:25564-25569, 1995.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emami, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Saag, M. S. and Shaw, G. M. *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Nature, 373:117-122, 1995.

Weiss, R. *How does HIV cause AIDS*. Science, 260:1273-1279, 1993.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. *Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 [see comments]*. Nature, 387:426-430, 1997.

- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R. and Krässlich, H.-G. *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into the virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase.* Virology, 219:228-236, 1996.
- Werner, A. and Levy, J. A. *Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 is cleaved after incubation with recombinant soluble CD4.* Journal of Virology, 67:2566-2574, 1993.
- Westby, M., Manca, F. and Dalgleish, A. G. *The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection.* Immunology Today, 17:120-126, 1996.
- Whalen, R. G. *DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if?* Emergence of Infectious Diseases, 2:168-175, 1996.
- White, J. M. *Viral and cellular membrane fusion proteins.* Annual Review in Physiology, 52:675-697, 1990.
- Willbold, D., Hoffmann, S. and Rosch, P. *Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution.* European Journal of Biochemistry, 245:581-588, 1997.
- Willey, R., Bonifacino, J. and Potts, B. *Biosynthesis, cleavage and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86:9580-9584, 1988.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. and Strebel, K. *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes.* Journal of Virology, 66:226-234, 1992.
- Wills, J. W. and Craven, R. C. *Form, function and use of retroviral Gag proteins.* AIDS, 5:639-654, 1991.
- Wirth, M., Grannemann, R., Klehr, D. and Hauser, H. *Screening retroviral packaging cells for highly efficient virus production by using a combined selection procedure.* Journal of Virology, 68:566-569, 1994.

- Woffendin, C., Ranga, U., Yang, Z.-Y., Xu, L. and Nabel, G. J. *Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus -infected patients.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 93:2889-2894, 1996.
- Woffendin, C., Yang, Z. Y., Udaykumar, Xu, L., Yang, N. S., Sheehy, M. J. and Nabel, G. J. *Nonviral and viral delivery of human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91:11581-11585, 1994.
- Wolber, V., Rensland, H., Brandmeier, B., Sagemann, M., Hoffmann, R., Kalbitzer, H. R. and Wittinghofer, A. *Expression, purification and biochemical characterisation of the human immunodeficiency virus 1 nef gene product.* European Journal of Biochemistry, 205:1115-1121, 1992.
- Wolthers, K. C., Bea, G., Wisman, A., Otto, S. A., de Roda Husman, A. M., Schaft, N., de Wolf, F., Goodsmitt, J., Coutinho, R. A., van der Zee, A. G. J., Meyaard, L. and Miedema, F. *T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover.* Science, 274:1543-1547, 1996.
- Wooley, D. P., Smith, R. A., Czajak, S. and Desrosiers, R. C. *Direct demonstration of retroviral recombination in rhesus monkey.* Journal of Virology, 71:9650-9653, 1997.
- Wu, F. K., Garcia, J. A., Harrich, D. and Gaynor, R. B. *Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1.* EMBO Journal, 56:2117-2121, 1988.
- Wu, X., Conway, J. A., Kim, J. and Kappes, J. C. *Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein.* Journal of Virology, 68:6161-6169, 1994.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hunter, E. and Kappes, J. C. *Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein.* EMBO Journal, 16:5113-5122, 1997.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A. and Kappes, J. C. *Inhibition of human and*

simian immunodeficiency virus protease function by targeting Vpx-protease-mutant fusion protein into viral particles. Journal of Virology, 70:3378-3384, 1996a.

Wu, X., Liu, H., Xiao, H. and Kappes, J. C. *Proteolytic activity of human immunodeficiency virus Vpr- and Vpx-protease fusion protein.* Virology, 219:307-313, 1996b.

Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Kim, J., Partha, S., Natsoulis, G., Boeke, J. D., Hahn, B. and Kappes, J. C. *Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx.* Journal of Virology, 69:3389-3398, 1995.

Yahi, N., Baghdiguan, S., Moreau, H. and Fantini, J. *Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells.* Journal of Virology, 54:4848-4854, 1992.

Yang, Y., Su, Q., Grewal, I. S., Schilz, R., Flavell, R. A. and Wilson, J. M. *Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues.* Journal of Virology, 70:6370-6377, 1996.

Yang, Y. and Wilson, J. M. *Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo.* Journal of Immunology, 155:2564-2570, 1995.

Yao, X., Kobinger, G., Dandache, S., Rougeau, N. and Cohen, E. *HIV virion-incorporation of Vpr-CAT fusion proteins and their inhibitory activity to infectivity of human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology, Submitted, 1998a.

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

Yao, X.-J., Mouland, A., Subbramanian, R., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D. and Cohen, E. A. *Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells.* Journal of Virology, 72:4686-4693, 1998b.

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

Yao, X. J., Garzon, S., Boisvert, F., Haseltine, W. A. and Cohen, E. A. *The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 6:135-141, 1993.

Yao, X. J., Göttinger, H., Haseltine, W. A. and Cohen, E. A. *Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu facilitated HIV-1 capsid export.* Journal of Virology, 66:5119-5126, 1992.

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

Yu, M., Ojwang, J., Yamada, O., Hampel, A., Rapaport, J., Looney, D. and Wong-Staal, F. *A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1 [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Sep 1;90(17):8303].* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:6340-6344, 1993a.

Yu, X., Yuan, X., McLane, M. F., Lee, T. H. and Essex, M. *Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions.* Journal of Virology, 67:213-221, 1993b.

Yu, X.-F., Matsuda, Z., Yu, Q.-C., Lee, T.-H. and Essex, M. *Vpx of simian immunodeficiency virus is localized primarily outside the virus core in mature virions.* Journal of Virology, 67:4386-4390, 1993c.

Yu, X.-F., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.-H. and Essex, M. *The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions.* Journal of Virology, 66:4966-4971, 1992.

Yu, X. F., Matsuda, M., Essex, M. and Lee, T. H. *Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein.* Journal of Virology, 64:5688-5693, 1990.

Yu, X. F., Matsuda, Z., Yu, Q. C., Lee, T. H. and Essex, M. *Role of the C terminus Gag protein in human immunodeficiency virus type 1 virion assembly and maturation.* Journal of General Virology, 76:3171-3179, 1995.

Yuan, X., Matsuda, Z., Matsuda, M., Essex, M. and Lee, T. H. *Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein.* AIDS Research & Human Retroviruses, 6:1265-1271, 1990.

Zazopoulos, E. and Haseltine, W. A. *Effect of nef alleles on replication of human immunodeficiency virus type 1.* Virology, 194:20-27, 1993.

Zhang, L., Huang, Y., He, T., Cao, Y. and Ho, D. D. *HIV-1 subtype and second-receptor use.* Nature, 383:768, 1996.

Zhao, L.-J., Mukherjee, S. and Narayan, O. *Biochemical mechanism of HIV-1 vpr function: specific interaction with a cellular protein.* Journal of Biological Chemistry 289:15827-15832, 1994a.

Zhao, L.-J., Wang, L., Mukherjee, S. and Narayan, O. *Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: oligomerization mediated by the N-terminal domain.* Journal of Biological Chemistry, 269:3231-3237, 1994b.

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