

Université de Montréal

Rôle de la protéine Vpu dans l'assemblage du VIH-1 au niveau des radeaux lipidiques

Par
Geneviève St-Onge

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Avril 2005

© Geneviève St-Onge, 2005



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la protéine Vpu dans l'assemblage du VIH-1 au niveau des radeaux lipidiques

présenté par :

Geneviève St-Onge

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Lemay, président-rapporteur

Éric A. Cohen, directeur de recherche

Jacques Thibodeau, membre du jury

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), un rétrovirus de la sous-famille des lentivirus, cause le syndrome d'immunodéficience acquise, ou SIDA. Le VIH-1 code pour des protéines dites accessoires qui jouent un rôle important dans la pathogénèse du virus. Une de ces protéines accessoires, la protéine Vpu, a deux fonctions biologiques principales. D'abord, Vpu induit la dégradation de la molécule CD4, un des récepteurs du VIH-1 à la surface des cellules. Également, Vpu permet d'augmenter la relâche virale, ce qui a pour effet de diminuer la mortalité cellulaire et les effets cytopathiques, en plus de faciliter la propagation du virus. Cette augmentation de la relâche virale par Vpu s'effectuerait par un mécanisme lié au type cellulaire ou à l'environnement cellulaire, plutôt qu'à un effet direct sur Gag, une protéine du VIH-1 essentielle à son assemblage. Cependant, le mécanisme permettant à Vpu d'augmenter la relâche virale reste à déterminer. Certains éléments indiquent que l'assemblage du VIH-1 s'effectuerait au niveau de microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides, appelés radeaux lipidiques. Nous avons donc émis l'hypothèse que Vpu, pour augmenter la relâche virale, pourrait faciliter le ciblage et/ou l'assemblage du précurseur polyprotéique Gag au niveau des radeaux lipidiques. Au cours de cette étude, nous avons procédé à l'isolement de radeaux lipidiques à partir de cellules HeLa transfectées avec des constructions provirales déficientes pour les glycoprotéines d'enveloppe et la protéase virale, et différant pour la présence de Vpu. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer avec certitude si Vpu permet d'accroître la quantité de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. Il semble y avoir une augmentation de la quantité de Gag au niveau des radeaux lipidiques en présence de Vpu, mais la différence observée n'est pas très importante. De plus, nous avons montré que la réduction des radeaux lipidiques à la membrane plasmique n'a pas d'effet sur la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale. Cela nous porte à croire que Vpu pourrait agir sur la localisation de Gag à des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires, mais des expériences supplémentaires doivent être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

Mots clés : VIH-1, Vpu, assemblage viral, radeaux lipidiques.

Summary

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a retrovirus of the lentivirus subfamily that causes the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HIV-1 encodes accessory proteins that play an important role in viral pathogenesis. One of these accessory proteins, the Vpu protein, has two main biological functions. First, Vpu mediates the degradation of CD4 molecule, one of the HIV-1 receptors located on the cell surface. Also, Vpu increases viral release, which diminishes cell death and cytopathic effects, while increasing viral spread. This increased viral release by Vpu could be the result of a modification of a cellular pathway or the cell environment, instead of a direct effect on Gag, a HIV-1 protein essential for viral assembly. However, the mechanism used by Vpu to increase viral release is yet to be determined. Some observations indicate that HIV-1 assembles in membrane microdomains rich in cholesterol and sphingolipids named lipid rafts. We came with the hypothesis that Vpu could increase viral release by facilitating the targeting and/or the assembly of the Gag polyprotein precursor in lipid rafts. In this study, we have isolated lipid rafts from HeLa cells transfected with proviral constructs deficient for the envelope glycoproteins and the viral protease, and different for the expression of the Vpu protein. We were not able to clearly determine if Vpu increases the amount of Pr55^{Gag} in lipid rafts. There seems to be an increase of the amount of the Gag protein in lipid rafts when Vpu is present, but the difference observed is not very important. Also, we have shown that the depletion of the lipid rafts located at the plasma membrane had no effect on Vpu's ability to increase viral release. We came with the idea that Vpu could instead have an effect on the localisation of Gag in lipid rafts at intracellular membranes, but additional experiments have to be conducted to confirm this hypothesis.

Key words : HIV-1, Vpu, viral assembly, lipid rafts.

Table des matières

Résumé	iv
Summary	v
Liste des figures	viii
Sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
1. Introduction	1
2. Structure du virus	2
3. Organisation génomique du virus	3
4. Cycle de réplication viral	5
4.1 Attachement au récepteur et entrée	5
4.1.1 Env	5
4.2 Décapsidation et transcription inverse	6
4.2.1 Transcriptase inverse (RT)	7
4.3 Intégration	7
4.3.1 Intégrase (IN)	8
4.4 Transcription des gènes viraux	10
4.4.1 Tat	10
4.5 Transport des ARN viraux vers le cytoplasme	11
4.5.1 Rev	11
4.6 Synthèse des protéines accessoires	12
4.6.1 Nef	12
4.6.2 Vif	13
4.6.3 Vpr	14
4.6.4 Vpu	15
4.7 Assemblage et maturation des virus	15
4.7.1 Gag	16
4.7.2 Gag-Pol	16
4.7.2.1 Protéase (PR)	17
5. Assemblage, bourgeonnement et sortie du virus	18
5.1 Étapes de l'assemblage viral	18
5.1.1 Association de Gag à la membrane	18
5.1.2 Multimérisation de Gag	19
5.1.3 Bourgeonnement viral	21
5.2 Interaction entre Gag et Env	22
5.3 Voie endosomale et sortie du VIH-1	23
6. Structure et fonctions de la protéine accessoire Vpu	27
6.1 Structure de Vpu	27
6.2 Fonctions de Vpu	28
6.2.1 Vpu contribue avec Nef à la régulation négative de CD4	28
6.2.2 Augmentation de la relâche virale	30
7. Radeaux lipidiques	34
Hypothèse et objectifs du projet	41

Matériel et méthodes	43
1. Plasmides	43
2. Anticorps	46
3. Culture cellulaire et transfection	47
4. Analyse des protéines retrouvées dans les radeaux lipidiques	47
4.1 Isolement des radeaux lipidiques	47
4.2 Précipitation des protéines au TCA	48
4.3 Détection des protéines	48
5. Marquage métabolique et immunoprécipitations	49
6. Déplétion du cholestérol	50
7. Coloration à la filipin	52
8. Immunofluorescence et microscopie	52
Résultats	54
• Effet de la protéine Vpu sur la localisation intracellulaire de Gag et l'assemblage viral	54
• La protéine Vpu permet une relâche accrue de Pr55 ^{Gag} à partir de cellules HeLa	60
• Effet de Vpu sur le ciblage du précurseur Pr55 ^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques	63
• Effet de la réduction du cholestérol cellulaire sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu	70
Discussion	76
• Localisation intracellulaire de Gag	78
• Isolement des radeaux lipidiques	80
• Réduction du cholestérol cellulaire	84
• Importance de la fonction de relâche	86
Conclusion	88
Références	89

Liste des figures

Figure 1 :	Structure de la particule du VIH-1	4
Figure 2 :	Organisation génomique du VIH-1	4
Figure 3 :	Étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1	9
Figure 4 :	Étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1	9
Figure 5 :	Étapes tardives de l'assemblage des particules du VIH-1	17
Figure 6 :	Relation entre l'assemblage du VIH-1 et la voie endosomale	25
Figure 7 :	Structure de la protéine Vpu du VIH-1	28
Figure 8 :	Structure des radeaux lipidiques	35
Figure 9 :	Structure des bicouches lipidiques	35
Figure 10 :	Structure des cavéoles	37
Figure 11 :	Schéma des constructions provirales SVC21/BH10 et SVC21/BH10 Vpu ATG-	43
Figure 12 :	Schéma de la construction provirale SVC21 Vpu- Env- PR-	44
Figure 13 :	Schéma de la construction provirale SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-	45
Figure 14 :	Changement de cadre de lecture dans la séquence du gène <i>env</i>	45
Figure 15 :	Effet de Vpu sur la localisation de Gag et l'assemblage viral	
	A. Détection de la protéine Vpu	57
	B. Détection de la protéine p24	57
	C. Détection de la protéine p17	58
	D. Détection de la protéine p24 et de la protéine Vpu	58
	E. Détection de la protéine p17 et de la protéine Vpu	59
Figure 16A :	Effet de Vpu sur la relâche de Pr55 ^{Gag} dans les cellules Hela	62

Figure 16B : Effet de Vpu sur la relâche de Pr55Gag dans les cellules HeLa	62
Figure 17A : Effet de Vpu sur la localisation de Pr55Gag au niveau des radeaux lipidiques	65
Figure 17B : Effet de Vpu sur la localisation de Pr55Gag au niveau des radeaux lipidiques	65
Figure 17C : Effet de Vpu sur la localisation de Pr55Gag au niveau des radeaux lipidiques	66
Figure 17D : Effet de Vpu sur la localisation de Pr55Gag au niveau des radeaux lipidiques	66
Figure 17E : Effet de Vpu sur la localisation de Pr55Gag au niveau des radeaux lipidiques	67
Figure 18A : Effet de la méthyl- β -cyclodextrine sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu	73
Figure 18B : Effet de la méthyl- β -cyclodextrine sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu	73
Figure 18C : Effet de la méthyl- β -cyclodextrine sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu	74

Sigles et abréviations

ADN, ADNc	Acide désoxyribonucléique, ADN complémentaire
Ala	Alanine
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> ; cellules présentatrices d'antigènes
ARN, ARNm, ARNt	Acide ribonucléique, ARN messager, ARN de transfert
ARN pol II	ARN polymérase II
BSA	<i>Bovine sera albumine</i> ; albumine sérique de bovin
CA	Capside
Cav	Cavéoline
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DOC	Sodium deoxycholate
DRM	<i>Detergent-resistant membranes</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EE	<i>Early endosomes</i> ; endosomes précoces
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
Gln	Glutamine
GPI	Glycophosphatidylinositol
HAT	Histone acétyltransférase
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
KLH	<i>Keyhole limpet haemocyanin</i>
LE	<i>Late endosomes</i> ; endosomes tardifs
LTNP	<i>Long-term non-progressive</i> ; non progresseurs à long terme
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
MA	Matrice
MβCD	Méthyl- β -cyclodextrine
MIIC	<i>MHC-class-II-enriched compartments</i>
MVBs	<i>Multivesicular bodies</i>
NC	Nucléocapside
NES	<i>Nuclear exportation signal</i> ; signal d'export nucléaire
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i> ; signal de localisation nucléaire
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> ; résonance magnétique nucléaire
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> ; cellules mononucléaires du sang périphérique
PFA	Paraformaldéhyde
PI(4,5)P₂	Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
PIC	<i>Pre-integration complex</i> ; complexe de pré-intégration
PR	Protéase (virale)
Pro	Proline
RE	Réticulum endoplasmique
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i> ; transcriptase inverse
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TAR	<i>Trans-activation responsive element</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>

TfR	Récepteur de la transferrine
Thr	Thréonine
TM	Transmembranaire
UBP	<i>Vpu-binding protein</i>
VIH, VIH-1, VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine, VIH de type 1, VIH de type 2
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VLP	<i>Virus-like particles</i>

Remerciements

À mon directeur de recherche, Dr Éric A. Cohen, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, et de m'avoir fait confiance, malgré tout.

Aux membres actuels ou passés du laboratoire, que j'ai eu le privilège de côtoyer à un moment ou à un autre : Zhujun Ao, Nathalye Belzile, Julie Binette, Rachel Bourgeois, Philippe Courtemanche-Asselin, Mathieu Dubé, Dr Ghislaine Duisit, Andrés Finzi, Karine Lévesque, Johanne Mercier, Alexandre Ostiguy, Nicole Rougeau, Mélanie Welman, Yong Xiao, Dr Xiao-Jian Yao; merci pour votre aide, votre soutien tant moral que technique, et votre travail acharné. Vous avez fait pencher la balance à plus d'une reprise...

Aux merveilleux choristes du Chœur Les Voix de la montagne, et plus particulièrement à Daphné, Fabienne, Mélanie, Jocelyne, Marie-Pierre, Chantal, Martine, Charles et Stéphane, merci d'enseigner ma vie.

À Roxanne, Nathalie et Marie-Eve, merci pour les « soupers-théâtre » !

À mes amies Annie, Mélisa, Marie-Eve, Julie, Nathalie, Karine et Marie-Andrée, merci d'être là depuis si longtemps, dans les bons comme dans les moins bons moments.

Aux membres de ma famille, Lauzon ou St-Onge, merci pour vos encouragements continus et votre présence si bénéfique.

À mes parents, mon frère Martin, ma belle-sœur Catherine et mon filleul Loïk, merci pour votre soutien et votre amour inconditionnels. Si j'y suis arrivée, c'est grâce à vous...

« May the Force be with you. »

- Jedi Master Yoda

« Il faut chevaucher tes rêves les plus fous
Et franchir l'horizon des destins affranchis
Aux frontières de soi... »

- Paul Beauregard

1. Introduction

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise, ou SIDA. Ce syndrome se caractérise par une dégénérescence du système immunitaire et du système nerveux central. Environ 4,8 millions de personnes auraient été nouvellement infectées par le VIH en 2003. Pour l'année 2003 seulement, il y aurait eu 2,9 millions de décès attribués au VIH, portant ainsi le nombre de personnes décédées à plus de 20 millions depuis l'apparition des premiers cas de SIDA en 1981. Aujourd'hui, on estime que de 34,6 à 42,3 millions de personnes vivent avec le VIH. L'Afrique subsaharienne est la région du globe la plus touchée par l'épidémie; bien qu'elle n'abrite que 10% de la population mondiale, près des deux tiers des personnes infectées par le VIH vivent dans cette région (128). En 1983, différents laboratoires ont isolé un virus de patients asymptomatiques ou ayant le SIDA, et ont constaté des similarités avec des virus de la famille des rétrovirus. Le virus isolé était hautement cytopathique pour les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), et, lorsque mis en culture, tuait de façon spécifique les lymphocytes T CD4+. Le nouveau rétrovirus avait également des caractéristiques morphologiques et génétiques associées à la sous-famille des lentivirus, et il était associé au SIDA à la fois aux États-Unis, en Europe et en Afrique centrale. Il a donc été nommé virus de l'immunodéficience humaine, ou VIH. Il fut ensuite renommé VIH-1, à la suite de la découverte, en 1986, chez des individus de plusieurs pays d'Afrique de l'ouest, d'un rétrovirus apparenté, moins pathogène et distinct du point de vue immunologique, qui fut alors nommé VIH-2 (88). Ces deux virus ont également une organisation génomique différente, le VIH-1 codant pour le gène *vpu*, absent chez le VIH-2, ce dernier codant pour le gène *vpx*, absent chez le VIH-1 et apparenté au gène *vpr* (49). Par la suite, d'autres lentivirus de primates ont été découverts, certains montrant des ressemblances avec le VIH-1 au niveau de la morphologie et de l'organisation génomique. L'inoculation de ces virus à des singes macaques rhésus, par exemple, induisant une maladie semblable au SIDA, ces virus furent nommés virus de l'immunodéficience simienne (ou VIS), permettant ainsi de les distinguer des virus humains VIH-1 et VIH-2. Les relations phylogénétiques établies entre les différents lentivirus laissent croire que le VIH-1 serait dérivé du VIS_{cpz} (virus de

l'immunodéficience simienne, chimpanzé), et que le VIH-2 aurait pour origine le VIS_{sm} (sooty mangabey) (88).

De façon plus générale, les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant un génome ARN simple brin, linéaire, non segmenté et de polarité positive. Leur stratégie de réplication comprend la transcription inverse de leur génome ARN en ADN double brin linéaire, suivie de l'intégration de cet ADN dans le génome de la cellule hôte. Les rétrovirus sont considérés simples ou complexes en regard de leur organisation génomique. En plus des cadres de lecture pour les gènes structuraux *gag*, *pol*, et *env*, retrouvés chez tous les rétrovirus, les rétrovirus complexes, dont font partie les lentivirus, possèdent des cadres de lecture pour des gènes régulateurs et accessoires (29).

2. Structure du virus

La taille du virion est d'environ 145 nm, et ne varie pas avec la maturation (17)(Figure 1). Le VIH-1 acquiert son enveloppe lipidique de la membrane de la cellule hôte lors du bourgeonnement viral (49). Insérées dans cette enveloppe se trouvent de 70 à 80 spicules (56) formées des sous-unités TM (transmembranaire, gp41) et SU (surface, gp120) de la glycoprotéine Env. La protéine de matrice p17 (MA) forme une couche tapissant la membrane interne de l'enveloppe virale. À l'intérieur de la particule virale se trouve une structure de forme conique, appelée capsid ou core, constituée de la protéine p24 (CA). La partie N-terminale de CA permet l'incorporation de la cyclophiline A, une protéine cellulaire, alors que sa portion C-terminale contient un domaine de dimérisation compris entre les résidus 151 et 231 qui permet les interactions entre les molécules de Gag. La capsid renferme deux copies de l'ARN génomique viral. Ces brins non segmentés d'ARN génomique sont liés à des protéines de la nucléocapsid (p7, NC). Les enzymes transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN) se trouvent également à l'intérieur de la capsid, alors que l'enzyme protéase (PR) est retrouvée à l'extérieur de celle-ci (51). En plus des enzymes et des protéines de structure, les protéines virales Nef, Vif et Vpr sont

incorporées dans la particule virale (21, 24, 30). Certaines protéines cellulaires se retrouvent également dans les virions, telles la β 2-microglobuline, les molécules CD4, des antigènes des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et de type II, l'actine, l'ubiquitine et la cyclophiline A (4, 50, 92).

3. Organisation génomique du virus

Après l'entrée du virus dans la cellule hôte, le génome ARN est rétrotranscrit en ADN double brin. Cet ADN viral de 9,8 kb (117) sera par la suite intégré au génome cellulaire, et sera alors désigné ADN proviral, ou provirus. Cet ADN proviral contient, à chacune de ses extrémités 5' et 3', des séquences dupliquées appelées LTR (long terminal repeat), générées lors du processus de transcription inverse. Certaines séquences contenues dans ces LTR servent justement à l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique cellulaire. Cependant, une fois cette étape d'intégration passée, la principale fonction des LTR se situe au niveau de la régulation de la transcription des ARN viraux. Chacun des LTR est constitué, dans l'ordre, des régions U3, R et U5. Dans la région U3 se trouvent la séquence du promoteur ainsi que des séquences régulatrices. Dans le LTR en 5', ces séquences jouent leur rôle au moment de la réplication virale. La boîte TATA couvre les nucléotides -29 à -24 en amont du codon initiateur. Le facteur de transcription TFIID ira se lier à cette séquence, et sera reconnu par le facteur TFIIB, permettant ainsi le recrutement de l'enzyme ARN polymérase II cellulaire, ce qui initiera le processus de transcription et d'élongation des ARN viraux. La région R des LTR contient le signal de polyadénylation (AATAAA), et cette séquence présente dans le LTR en 3' joue son rôle lors de la réplication virale (88). Le VIH-1 étant un rétrovirus complexe, son génome code pour les gènes structuraux *gag*, *pol* et *env*, mais il contient également des cadres de lecture ouverts codant pour les gènes régulateurs *rev* et *tat*, ainsi que pour les gènes accessoires *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* (Figure 2). Les cadres de lecture ouverts Gag, Pol et Env, codent pour des précurseurs polyprotéiques qui produisent les composantes individuelles des protéines Gag, Pol et Env, suite à des étapes de maturation par la protéase virale et des protéases cellulaires.

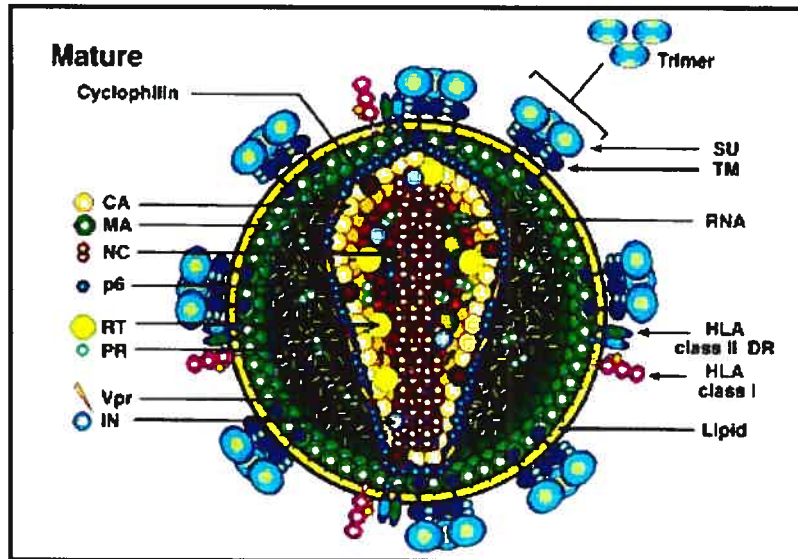


Figure 1. Structure de la particule virale du VIH-1. Schéma de l'organisation structurale de la particule virale. (Figure tirée de *Retroviruses*, Coffin, John M.; Hughes, Stephen H.; Varmus, Harold E. Plainview (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press; c1997.)

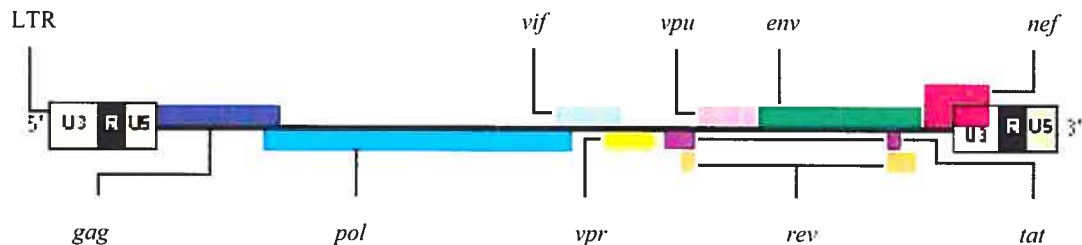


Figure 2. Organisation génomique du VIH-1. (Figure adaptée de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.* 8(7);673-680.)

4. Cycle de réplication viral

4.1 Attachement au récepteur et entrée

Le VIH-1 infecte principalement des lymphocytes T CD4+, ainsi que des cellules de la lignée monocytes/macrophages. Les virus ayant un tropisme pour les lymphocytes T CD4+ sont désignés T tropiques, alors que les virus M tropiques vont infecter préférentiellement les monocytes/macrophages (29). Ces deux types cellulaires possèdent à leur surface la molécule CD4, un des deux récepteurs du VIH-1. La molécule CD4 est une molécule de 55 kDa faisant partie de la famille des immunoglobulines. Elle est constituée de quatre domaines extracellulaires D1 à D4, d'un domaine transmembranaire hydrophobe, ainsi que d'un domaine cytoplasmique. Son rôle premier a lieu lors de réactions immunitaires; en effet, le CD4 permet une stabilisation de l'interaction entre le récepteur des lymphocytes T (TCR : T cell receptor) et les molécules du CMH de classe II retrouvées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC : antigen-presenting cells). En plus du récepteur CD4, le VIH-1 interagit avec deux principaux corécepteurs, les molécules CXCR4 et CCR5, qui sont des récepteurs de chimiokines. Les isolats du VIH-1 utilisant le CXCR4, généralement des virus T tropiques, sont désignés X4, alors que les isolats ayant comme corécepteur le CCR5, généralement des virus M tropiques, sont quant à eux désignés R5. Certaines souches ont un double tropisme, utilisant à la fois CXCR4 et CCR5; elles sont désignées X4R5 (88).

4.1.1 Env

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible se fait par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, de façon pH indépendante (159). La glycoprotéine d'enveloppe, exprimée à la surface du virus, permet l'attachement de ce dernier à la cellule cible. La glycoprotéine Env est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur de 160 kDa (gp160) au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) où elle est glycosylée de façon cotraductionnelle et où elle oligomérisse principalement sous forme de trimère. Le précurseur gp160 est par la suite transporté au Golgi où il subit un clivage protéolytique par une protéase cellulaire, la furine. Ce clivage permet

la formation de la sous-unité de surface (SU) gp120 et de la sous-unité transmembranaire (TM) gp41 (88). Ces deux sous-unités demeurent cependant associées de façon non covalente, les résidus 36 à 45 en N-terminal et les résidus 491 à 501 en C-terminal de la gp120 mature étant importants pour cette association (70). La molécule de gp120 est constituée de différents domaines conservés (C1 à C5) et variables (V1 à V5). Lors de l'attachement du virus à la cellule cible, il y a liaison des domaines C3 et C4 de gp120 avec une région en N-terminal du domaine extracellulaire de CD4. Cette liaison entraîne un changement de conformation permettant alors la liaison de la gp120 avec le corécepteur, CXCR4 ou CCR5. Le domaine V3 de gp120 semble jouer un rôle déterminant dans le tropisme du virus. Suite à la formation d'un complexe ternaire entre la gp120, CD4 et le corécepteur, il y a induction d'un second changement de conformation au niveau de la gp41, exposant ainsi un peptide de fusion. Ce dernier induira la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (88). L'oligomérisation de gp41 est importante pour cette activité fusogénique (8).

4.2 Décapsidation et transcription inverse

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire permet la formation d'un pore de fusion par lequel la capsid virale pénètre à l'intérieur de la cellule. Il y a alors décapsidation, processus encore mal compris mais qui impliquerait la cyclophiline A, les protéines virales Nef et peut-être Vif, ainsi que la phosphorylation de la protéine de matrice (MA) par une MAP kinase. La décapsidation permet la formation du complexe de transcription inverse comprenant le génome viral ARN, une amorce ARN^{t^{lys}}, et les protéines virales RT, IN, MA, NC et Vpr (66).

4.2.1 Transcriptase inverse (RT)

La transcription inverse génère un fragment d'ADN double brin à partir du génome viral ARN simple brin. Ce processus requiert l'action de l'enzyme virale transcriptase inverse (RT). L'enzyme RT mature est un hétérodimère composé de deux sous-unités de 66 et 51 kDa. Elle possède trois activités enzymatiques différentes : une activité ADN polymérase ARN dépendante; une activité RNaseH permettant la dégradation de l'ARN présent dans les hybrides ARN-ADN; et une activité ADN polymérase ADN dépendante. La RT n'a cependant pas de fonction de correction, ce qui cause des taux de mutation élevés (88). Le processus de transcription inverse comporte plusieurs étapes. D'abord, une amorce d'ARNt se lie à la séquence PBS (primer binding site) de l'ARN génomique. Cet ARNt est rétrotranscrit pour former une copie d'ADN de l'extrémité 5' de l'ARN génomique. L'activité RNase de la RT enlève l'ARN de l'hybride ARN-ADN ainsi formé. Le brin (-) d'ADN va alors effectuer un saut pour s'hybrider à la partie R située en 3' de l'ARN génomique. Ce brin (-) d'ADN est ensuite allongé et complété, la majorité de l'ARN est enlevé, sauf pour la séquence PPT (poly-purine track) qui sert d'amorce pour la synthèse de la partie 5' du brin (+) d'ADN. L'activité RNase va dégrader l'ARNt et la séquence d'ARN PPT. Le brin (+) d'ADN fait alors un saut pour se lier à la séquence PBS de l'extrémité 3' du brin (-) d'ADN. Finalement, les brins (-) et (+) d'ADN sont allongés et complétés, formant de l'ADN double brin avec des séquences LTR dupliquées se retrouvant dans la même orientation à chacune des extrémités (49).

4.3 Intégration

Une fois la transcription inverse complétée, il y a formation du complexe de préintégration (PIC : preintegration complex) composé de l'ADN viral double brin, des protéines virales IN, MA, RT et Vpr, ainsi que de la protéine cellulaire HMGI(Y) (high-mobility group DNA-binding protein) (66). Le VIH-1 peut infecter des cellules en arrêt de cycle (98). La taille du PIC étant environ le double du diamètre du pore

nucléaire, le PIC ne peut être importé au noyau par diffusion passive et donc doit être transporté activement à travers ce pore. Les protéines virales IN, Vpr et MA contiennent des signaux de localisation nucléaire (NLS) et seraient impliquées dans le transport actif du PIC dans le noyau (66).

4.3.1 Intégrase (IN)

Rendu à l'intérieur du noyau, l'ADN viral pourra être intégré à l'ADN chromosomique cellulaire de façon séquence indépendante. Cette intégration est médiée par l'enzyme virale intégrase (IN), une protéine de 32 kDa générée lors du clivage de la portion C-terminale du précurseur Gag-Pol par la protéase virale (PR). L'intégrase va d'abord cliver deux nucléotides aux extrémités 3' de chacun des brins de l'ADN viral linéaire, ce qui génère des extrémités 3'-OH libres. Une fois dans le noyau, l'intégrase va ensuite catalyser le clivage de l'ADN cellulaire cible, permettant la liaison des extrémités 3' de l'ADN viral avec les extrémités 5' de l'ADN cellulaire clivé. La machinerie de réparation cellulaire viendra remplir les espaces libres créés dans l'ADN cellulaire, ce qui complétera le processus d'intégration (88).

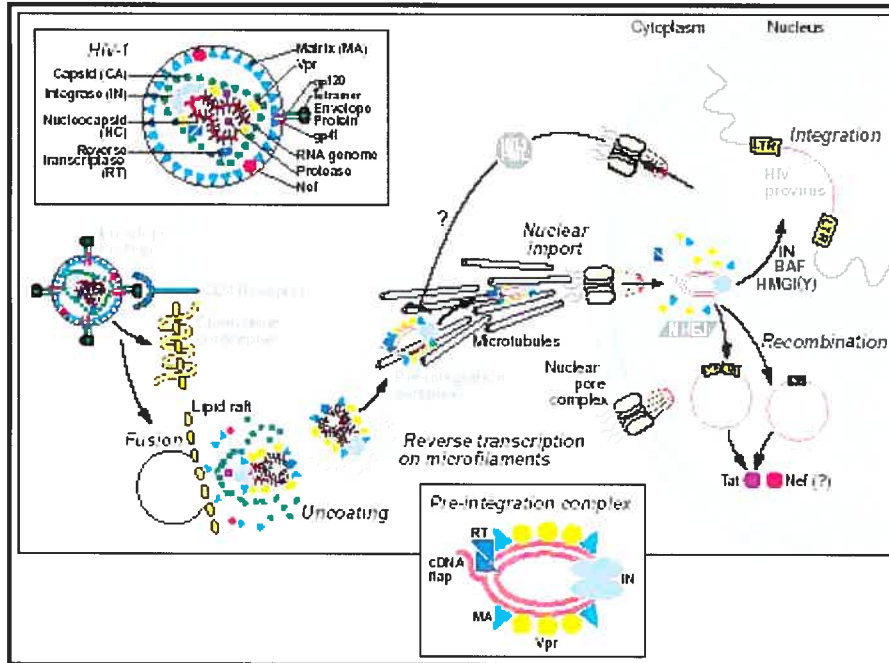


Figure 3. Étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1. (Figure tirée de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.* 8(7);673-680.)

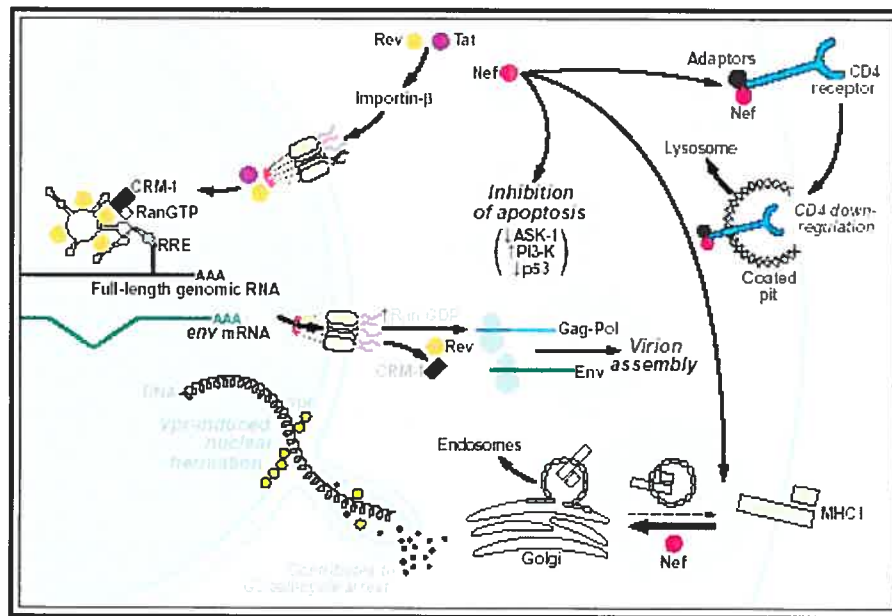


Figure 4. Étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1. (Figure tirée de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.* 8(7);673-680.)

4.4 Transcription des gènes viraux

4.4.1 Tat

Une fois l'ADN viral intégré au génome cellulaire, il y a transcription des gènes viraux par la machinerie de la cellule. Le LTR situé en 5' de l'ADN proviral contient la séquence promotrice, la boîte TATA, ainsi que des sites Sp1. Ces éléments permettent le positionnement de l'ARN polymérase II (ARN pol II) cellulaire au site d'initiation de la transcription. L'ARN pol II commence la transcription du génome viral, mais elle ne parvient pas à une élongation efficace des transcrits d'ARN (66). La protéine virale Tat, une protéine de 101 acides aminés, joue le rôle de transactivateur en augmentant l'efficacité de l'élongation des ARN viraux produits lors de la transcription (46). Les ARN viraux nouvellement transcrits contiennent une séquence de 59 nucléotides (nt) qui adopte une structure tige-boucle située à leur extrémité 5' et appelée TAR (trans-activation responsive element). La liaison de Tat avec TAR active la transcription à partir du LTR (58). La séquence +30CUGGG+34 de TAR est nécessaire pour la transactivation par Tat (47). À l'extrémité de la structure en tige de TAR, se trouve une séquence de 3 pyrimidines se liant à un domaine de Tat (acides aminés 49 à 57) riche en arginine. On y trouve également une boucle formée de 6 nt interagissant avec la cycline T1 cellulaire. Tat permet le recrutement de protéines histones acétyltransférases (HAT) qui permettent le relâchement de la conformation de la chromatine au niveau du LTR. Également, Tat est elle-même acétylée, ce qui lui permet d'interagir avec la cycline T1, sous-unité cycline de la kinase cycline-dépendante CDK9 du facteur d'élongation P-TEFb (positive transcription elongation factor b). Le complexe P-TEFb est un cofacteur d'élongation lors de la transcription par l'ARN pol II (58). La kinase CDK9 va phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN pol II, ce qui la rend plus processive. Il y a alors transition de l'initiation de la transcription à l'élongation des transcrits d'ARN (66).

4.5 Transport des ARN viraux vers le cytoplasme

La transcription des gènes du VIH-1 marque le début des étapes tardives du cycle de réplication viral. Il y a d'abord production d'une trentaine d'ARNm. Ces derniers sont divisés en trois catégories : ARNm de 9kb, non épissés, codant pour Gag et Gag-Pol; ARNm de 4kb, épissés une seule fois, codant pour Env, Vif, Vpr, et Vpu; ARNm de 2kb, multi épissés, codant pour Nef, Rev et Tat (27). Normalement, seuls les ARNm complètement épissés sont exportés du noyau. Les ARNm de 2kb, multi épissés, se retrouvent donc dans le cytoplasme, et les premières protéines virales à être produites sont Nef, Rev et Tat. Les ARNm de 9kb et 4kb, non complètement épissés, contiennent, en plus de séquences de rétention nucléaire, une séquence de 240 nt appelée RRE (Rev responsive element). Cette séquence adopte une structure secondaire pouvant se lier à Rev (27). La protéine virale Rev est essentielle pour le transport des ARN viraux de 9kb et 4kb vers le cytoplasme (106). En présence de Rev, les protéines codées par ces ARNm peuvent alors être traduites. Les protéines de structure Gag et Env, le précurseur polyprotéique Gag-Pol et les protéines accessoires Vif, Vpr et Vpu sont donc produites tardivement dans le cycle de réplication viral.

4.5.1 Rev

Rev est une protéine de 20 kDa, phosphorylée sur ses résidus sérines (28). Dans sa partie N-terminale, entre les acides aminés 35 à 50, se trouve une région riche en arginines comprenant une hélice alpha interagissant avec le site de liaison à Rev de la séquence RRE des ARN viraux, ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS). Les acides aminés 14 à 68 comprennent une région responsable de la multimérisation de Rev. Cette région est flanquée du domaine riche en arginines, et son intégrité semble nécessaire pour la fonction de transport de Rev. Dans la portion C-terminale de la protéine, entre les acides aminés 73 à 84, se trouve une séquence riche en leucines qui sert de signal d'export nucléaire (NES : nuclear export signal). La présence de signaux d'import et d'export nucléaire permet à Rev d'être constamment en mouvement entre le cytoplasme et le noyau. Après sa synthèse dans le cytoplasme, Rev est transportée au noyau, ce qui initie la phase tardive du cycle viral. Il y aura

interaction de Rev avec les RRE présents dans les ARN de 9kb et 4kb, ce qui permet leur transport vers le cytoplasme, et la production des protéines codées par ces ARN viraux (27).

4.6 Synthèse des protéines accessoires

4.6.1 Nef

Tout comme les protéines Rev et Tat, la protéine Nef est synthétisée à partir d'un ARNm complètement épissé qui est transporté hors du noyau sans l'intervention de Rev. Le gène *nef* chevauche partiellement la partie 3' du gène *env*, ainsi que le LTR en 3' de l'ADN proviral. Nef est une protéine de 27 kDa exprimée de façon précoce dans le cycle viral, et serait un déterminant important dans la progression de l'infection par VIH vers la phase SIDA (35). Elle est myristylée en N-terminal, ce qui lui permet un ciblage à la membrane plasmique. (3). Nef est également incorporée dans la particule virale, probablement par le fait de son association avec la membrane cellulaire (21). Bien que la protéine Nef soit associée à plusieurs activités biologiques, deux d'entre elles sont davantage étudiées, et sont apparemment les plus pertinentes. Une de ces fonctions est l'accélération de l'endocytose et de la dégradation lysosomale de la molécule CD4, récepteur du VIH-1. Nef agirait alors comme adaptateur entre le CD4 et les puits de clathrine. Ce processus implique la dissociation du complexe CD4-Lck par la protéine Nef, ainsi que son association avec des adaptines (AP) et avec la sous-unité régulatrice de l'ATPase vacuolaire (v-ATPase). Nef se lierait ensuite, probablement de façon indirecte, à la β -COP, ce qui dirigerait le CD4 vers les voies de dégradation lysosomales (3). Nef stimule également l'endocytose des molécules du CMH de classe I présentes à la surface de la cellule (153). Ce mécanisme semble impliquer la liaison de Nef avec un complexe PACS-1/AP 1 et avec la PI3 kinase, recrutant la voie d'endocytose ARF6 et diminuant ainsi l'expression du CMH de classe I à la surface. Nef empêcherait également le recyclage des molécules du CMH vers la surface cellulaire, menant à une accumulation de ces molécules au niveau du trans-Golgi. Cette diminution spécifique des allèles A et B du CMH de classe I par Nef est

suffisante pour empêcher la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), ce qui augmente par conséquent la production virale (7).

4.6.2 Vif

Vif (virion infectivity factor) est une protéine de 192 acides aminés faisant 23 kDa, exprimée dans la phase tardive du cycle viral. Le gène *vif* chevauche la partie 3' du gène *pol* et la partie 5' du gène *vpr*. La protéine Vif est phosphorylée sur ses résidus sérines et thréonines. Elle est localisée au niveau du cytoplasme, où elle est retrouvée à la fois sous forme soluble et associée à la membrane. Vif est incorporée dans la particule virale, à raison de 7 à 20 molécules par virion (24). Son rôle est d'accroître l'infectivité du virus (16). La présence de Vif permet de surmonter un bloc imposé par le facteur de restriction APOBEC3G (CEM15) (155). APOBEC3G est une protéine de 46 kDa (16) qui est incorporée dans les virions, probablement via son interaction avec la protéine de nucléocapside (NC) et l'ARN viral (142, 185), bien que certains groupes croient que seule la protéine NC est impliquée (2, 25). La protéine APOBEC3G est une cytidine déaminase qui modifie de façon spécifique les cytidines en uraciles dans le brin négatif d'ADNc lors de la transcription inverse (16). La présence de APOBEC3G dans les cellules infectées par des virus Δvif entraîne de hauts taux d'hypermutations de G vers A dans l'ADN viral, ce qui mène à la dégradation des ADNc viraux ou à la production de virus défectifs, et par conséquent à une infection abortive. Cet effet est contrecarré par la présence de Vif (107). Dans les cellules infectées, Vif forme un complexe avec APOBEC3G, ce qui réduit l'incorporation de celle-ci dans les virions (81, 111). De plus, Vif entraîne une diminution de la synthèse de APOBEC3G (81, 160), ainsi qu'une augmentation de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (114, 160). La coexpression de Vif et APOBEC3G entraîne une augmentation du niveau d'ubiquitination des deux protéines, ainsi qu'une augmentation de leur taux de dégradation par le protéasome (114).

4.6.3 Vpr

Vpr est une protéine tardive de 96 acides aminés faisant 14 kDa (31), qui est incorporée dans la particule virale (30). Cette incorporation est indépendante de la présence des gènes *pol* ou *env*, et requiert la présence du précurseur Gag (Pr55^{Gag}), sans besoin d'aucun clivage protéolytique de ce dernier (93, 104). En fait, une interaction entre la partie N-terminale de Vpr et la partie C-terminale de p6^{Gag} est requise pour que Vpr soit incorporée dans le virion (5). Le motif conservé ₄₁LXSLFG₄₆, situé en C-terminal de p6^{Gag}, est important pour l'incorporation de Vpr (90). Plus spécifiquement, la mutation de la leucine (L) en position 44 et de la phénylalanine (F) en position 45 du domaine p6 abolit l'interaction entre Pr55^{Gag} et Vpr, et empêche l'incorporation de Vpr dans la particule virale (5). Dans la cellule, Vpr présente à la fois une localisation nucléaire et périnucléaire (104). Plusieurs fonctions sont attribuées à cette protéine. D'abord, les formes de Vpr associées aux virions seraient impliquées dans l'import nucléaire du complexe de préintégration (PIC), une étape critique lors de l'infection de cellules en arrêt de division. L'hélice α en N-terminal de Vpr a la capacité de lier l'importine α , une composante du pore nucléaire (86), et l'absence de Vpr entraîne une diminution de la capacité de réplication du virus dans des macrophages différenciés et les lymphocytes T CD4+ quiescents (88). De plus, Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2. Elle remplirait cette fonction en inactivant Cdc2, une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M. La protéine Cdc2 hyperphosphorylée est inactive, ce qui contribuerait au maintien des cellules en phase G2 (186). Il a été montré que la transcription à partir du LTR du VIH-1 est augmentée lorsque les cellules sont en phase G2. Cet arrêt du cycle cellulaire causé par la protéine Vpr permettrait donc de maximiser la production virale (60). Également, Vpr provoquerait l'apoptose des cellules infectées. Un mutant de Vpr incapable d'induire l'apoptose, VprR77Q, est associé avec une infection LTNP (long-term non-progressive), suggérant ainsi un rôle de l'induction de l'apoptose par Vpr dans la progression vers la phase SIDA. Vpr induirait l'apoptose cellulaire en augmentant la perméabilité de la

membrane des mitochondries, ce qui aboutit à l'activation de caspases régissant la voie de mort cellulaire programmée (86).

4.6.4 Vpu

Le gène *vpu* est retrouvé chez le VIH-1 (32), ainsi que chez quelques isolats du VIS, soit VIS_{cpz} (78), VIS_{gsn} (34), VIS_{mon} et VIS_{mus} (33). Le produit de ce gène est une protéine de 81 acides aminés faisant 16 kDa (162). La protéine Vpu est traduite à partir d'un ARNm bicistronique codant également pour la protéine Env. C'est une protéine tardive, puisqu'elle requiert la présence de la protéine Rev pour sa traduction (154). Vpu a deux principales fonctions biologiques, soit l'augmentation de la relâche virale (162) et l'induction de la dégradation de la molécule CD4, récepteur du VIH-1 (176). Il a aussi été montré que Vpu pouvait diminuer l'expression des molécules du CMH de classe I (84), plus spécifiquement de la molécule HLA-A2 et de la molécule non classique HLA-G1 (40). Cependant, cette fonction de la protéine est beaucoup moins connue. La structure et les principales fonctions biologiques de la protéine Vpu seront traitées en détails plus loin dans ce texte.

4.7 Assemblage et maturation des virus

Lorsque tous les constituants de la particule virale sont synthétisés, ils s'assemblent pour former de nouveaux virions. Cet assemblage est principalement dirigé par le précurseur Gag. Dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage, l'assemblage du virus a lieu dans des compartiments intracellulaires, alors que l'assemblage s'effectue majoritairement à la membrane plasmique dans les lymphocytes T et les cellules épithéliales (125). Les aspects liés à l'assemblage et au bourgeonnement viral seront traités en détails plus loin dans ce texte.

4.7.1 Gag

Les protéines Gag du VIH-1 sont d'abord synthétisées sous la forme d'un précurseur polyprotéique de 55 kDa, Pr55^{Gag}. Ce précurseur est formé des régions suivantes, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale : MA, CA, p2, NC, p1 et p6. L'assemblage de Pr55^{Gag} en particules virales comprend trois étapes majeures : la liaison des précurseurs Gag avec la membrane, l'interaction des précurseurs Gag entre eux, et la relâche des particules virales de la surface cellulaire. Le précurseur Gag est localisé à la membrane plasmique grâce à son domaine de liaison à la membrane, ou domaine M, composé des 32 premiers résidus de la région MA et du groupement myristyl présent sur le résidu glycine en N-terminal. La protéine Pr55^{Gag} peut former des multimères. Le domaine I, ou domaine d'interaction, est responsable des interactions Gag-Gag. Ce domaine couvre des zones discontinues situées de la partie C-terminale de la région CA jusque dans la région NC de Pr55^{Gag}. Finalement, la relâche des particules virales de la surface de la cellule dépend de la présence du domaine L, ou domaine tardif, situé dans la région p6 de Pr55^{Gag}. Une séquence riche en proline, Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP), située en N-terminal de p6, est critique pour cette étape tardive de l'assemblage viral (82). Durant le bourgeonnement du virus, ou peu de temps après celui-ci, la protéase (PR) du VIH-1 clive le précurseur Pr55^{Gag} pour former les différentes protéines Gag matures. Ce clivage de Pr55^{Gag} par PR induit une transformation morphologique des virions, et donc leur maturation en des particules virales infectieuses (51).

4.7.2 Gag-Pol

Le gène *pol* code pour les enzymes protéase (PR), transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN). Ces protéines sont produites suite au clivage du précurseur Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}), une protéine de 160 kDa synthétisée suite à un changement de cadre de lecture lors de la synthèse de Pr55^{Gag} (88). Ce changement de cadre de lecture s'effectue au codon leucine UUA près de la partie 5' de la région de chevauchement des gènes Gag et Pol (80). Ce mécanisme permet que les protéines codées par le gène *pol* soit synthétisées à environ 5 à 10 % des niveaux d'expression des protéines Gag.

Le résidu glycine en N-terminal de Pr160^{Gag-Pol} est myristylé, ce qui permettra au précurseur Gag-Pol de localiser à la membrane plasmique, tout comme le précurseur Gag (88).

4.7.2.1 Protéase (PR)

L'enzyme virale protéase (PR) fonctionne sous forme de dimère, avec son site actif localisé au centre du dimère. Le site actif de PR comporte deux résidus aspartate (Asp) qui catalysent l'hydrolyse d'un lien peptidique dans la protéine cible. Durant le bourgeonnement de la particule virale, ou immédiatement après celui-ci, la protéase va catalyser son propre clivage du précurseur Gag-Pol. Cependant, il n'est pas encore établi si ce premier clivage a lieu à l'intérieur d'une même molécule, ou s'il implique deux molécules distinctes. Une fois séparée de Pr160^{Gag-Pol}, PR va induire le clivage des autres enzymes du précurseur Gag-Pol, ainsi que le clivage de Pr55^{Gag}, ce dernier conduisant à la maturation du virus (88).

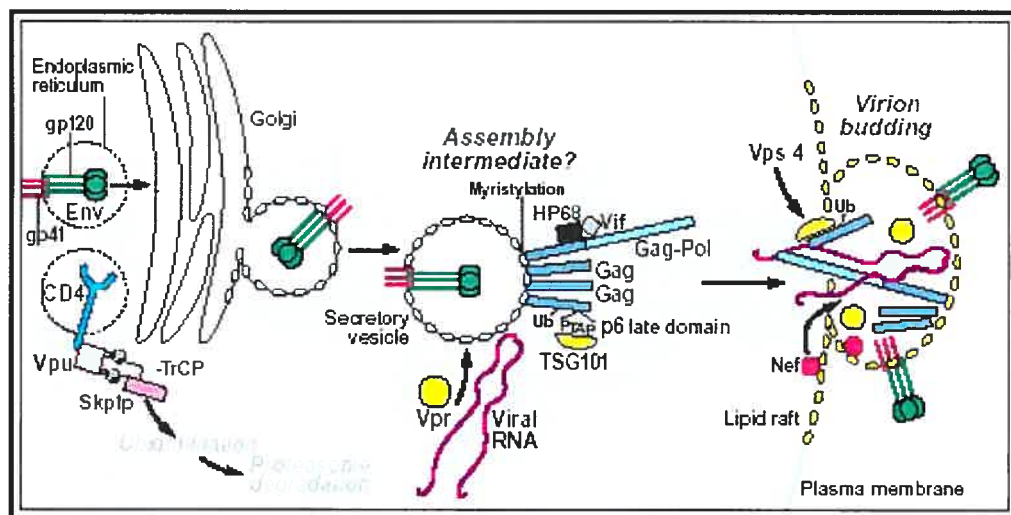


Figure 5. Étapes tardives de l'assemblage des particules du VIH-1. (Figure tirée de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.* 8(7);673-680.)

5. Assemblage, bourgeonnement et sortie du virus

5.1 Étapes de l'assemblage viral

Les protéines Gag du VIH-1 (p17^{MA}, p24^{CA}, p7^{NC} et p6) sont produites lors du clivage, par la protéase virale (PR), du précurseur polyprotéique de 55 kDa, Pr55^{Gag}. Cependant, en absence d'autres protéines virales ou d'ARN viral pouvant être encapsidé, Pr55^{Gag} est suffisant pour produire des particules virales immatures, non infectieuses (VLP : virus-like particles) (51). En effet, Pr55^{Gag} peut mener à la formation de VLP même en absence de PR (65). L'assemblage des particules du VIH-1 est une suite de différentes étapes, dirigées principalement par le précurseur Gag : l'association de Pr55^{Gag} à la membrane, déterminée par le domaine M; l'interaction des précurseurs Gag entre eux, médiée par le domaine I; le détachement des particules de la surface de la cellule, où le domaine L joue un rôle primordial (82).

5.1.1 Association de Gag à la membrane

La liaison de Gag à la membrane est nécessaire pour la production de particules virales. Plusieurs déterminants contribuent à cette liaison. Le domaine MA de Pr55^{Gag} agit au niveau de l'association et du ciblage de Pr55^{Gag} à la membrane. D'abord, la partie MA en N-terminal du précurseur Gag est myristylée sur son résidu glycine. Cette myristylation est nécessaire pour la production de particules virales et pour l'association de Pr55^{Gag} aux membranes (20, 65, 73, 158). Les acides aminés 15 à 31 de MA, riches en résidus basiques, contribuent également à la liaison de Gag à la membrane (187). Ces acides aminés basiques, en plus de la myristylation, sont requis pour le ciblage spécifique de Gag à la membrane plasmique (73). Aussi, la mutation des résidus 6 et 8 du domaine MA de Pr55^{Gag}, situés tout juste à la suite de la séquence consensus pour la myristylation de la glycine en N-terminal, entraîne une diminution de la liaison de Gag aux membranes, sans toutefois affecter sa myristylation (124). De plus, dans des cellules HeLa, des mutations des résidus 84 à 88 du domaine MA dirigent l'assemblage ainsi que la maturation des particules virales dans des compartiments intracellulaires (52, 127). Ces interactions de MA avec la membrane seraient importantes même après le bourgeonnement du virus. Des études

cristallographiques ont montré que la protéine de matrice s'assemble en un trimère. Cette trimérisation semble créer une surface bipartite de liaison à la membrane, dans laquelle les résidus basiques exposés pourraient coopérer avec l'acide myristylique en N-terminal pour ancrer la protéine à la surface interne de la membrane du virus (74).

La composition lipidique de la membrane plasmique semble aussi être un facteur régulant le ciblage de Gag. Le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate [PI(4,5)P₂] est une molécule lipidique chargée négativement et localisée au niveau du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique. Dans des cellules HeLa, la déplétion de PI(4,5)P₂ induit la relocalisation de Gag de la membrane plasmique vers des compartiments endosomaux tardifs, et inhibe la relâche virale. De plus, la surexpression de PI(4,5)P₂, provoquant la formation de vésicules riches en ce composé, entraîne la relocalisation de Gag dans ces vésicules, ainsi que le bourgeonnement du VIH-1 à l'intérieur de ces mêmes vésicules (122).

5.1.2 Multimérisation de Gag

Bien que MA soit essentielle pour le ciblage de Gag à la membrane plasmique, d'autres domaines de Pr55^{Gag} jouent un rôle pour sa liaison à la membrane. Le domaine NC permettrait une liaison efficace de Pr55^{Gag} à la membrane, après son ciblage par MA (141). De plus, Gag est capable de former des multimères. Les domaines permettant la multimérisation ne sont pas nécessaires pour la liaison de Gag à la membrane. Cette liaison n'est pas nécessaire à la multimérisation de Gag, bien qu'elle pourrait augmenter l'efficacité de l'interaction entre deux molécules Gag. Les fortes interactions Gag-Gag, importantes pour la multimérisation, requièrent la partie C-terminale de CA, la région p2 ainsi que le domaine NC de Gag (123). D'autres études ont également démontré que la partie C-terminale de la capsid (CA) contenait un domaine hydrophobe formant une interface de dimérisation. Cette interface contribue à la multimérisation de Pr55^{Gag} *in vitro*, même si le domaine NC est suffisant pour obtenir la majorité de cette multimérisation. Également, en absence de NC, les résidus basiques de MA contribuent à stabiliser la liaison Gag-Gag (22). Plus récemment, un autre groupe montrait l'importance d'un motif riche en glycine,

³⁵³GVGGP₃₅₇, situé dans la partie C-terminale de CA, pour la formation de particules virales. En effet, la mutation de n'importe lequel des résidus de ce motif entraîne une diminution de l'association de Gag aux membranes, une diminution de la multimérisation de Gag, ainsi qu'une réduction de la production virale. De plus, lors d'expériences d'immunofluorescence, les mutants de Gag pour ce motif ont une localisation cytoplasmique diffuse, alors que la protéine de type sauvage présente un marquage ponctué au niveau de la membrane plasmique (100). Également, une séquence conservée de 11 acides aminés dans la portion C-terminale de CA jouerait un rôle dans la relâche des particules virales de la surface cellulaire. Des mutations à ces acides aminés causent une diminution de la relâche et de l'infectivité, ainsi que la présence de structures en forme de tige (*rod-like structure*) à la surface des cellules infectées (115).

Récemment, un nouveau modèle a été proposé pour expliquer la liaison de Pr55^{Gag} à la membrane. Ce modèle établit un lien entre la multimérisation de Pr55^{Gag} et son association à la membrane. La protéine MA myristylée en N-terminal existe à la fois sous les formes monomérique et trimérique, un équilibre étant établi entre les deux formes. Des études de NMR ont montré que lorsque MA est sous forme de trimère, le groupement myristyl est exposé, alors qu'il est caché lorsque MA est monomérique. De plus, l'ajout de CA en C-terminal de MA a favorisé la trimérisation de MA, et par conséquent l'exposition du groupement myristyl (166). De plus, les résultats obtenus par le groupe de Paul D. Bieniasz (133) étaient aussi en accord avec le modèle de « myristoyl switch ». Leurs résultats suggèrent que, lorsque présente à de faibles concentrations dans le cytoplasme, Gag serait principalement sous forme de monomère, avec le groupement myristyl caché par la tête globulaire de MA, ce qui confinerait Gag au cytoplasme. Au fur et à mesure que la concentration de Gag augmente, une plus grande fraction de la protéine serait appelée à multimériser, permettant l'exposition du groupement myristyl et l'association aux membranes (133).

5.1.3 Bourgeoisement viral

Le domaine p6 de Pr55^{Gag} joue un rôle important dans la relâche des virus. D'abord, p6^{Gag} est phosphorylé au niveau du résidu Thr₂₃ par la MAP kinase cellulaire ERK-2 qui est incorporée dans les virus. La mutation de ce résidu thréonine entraîne une réduction de la relâche. Les particules virales alors produites ont une morphologie immature et sont moins infectieuses (71). Ensuite, en absence de p6^{Gag}, les particules virales s'assemblent à la membrane plasmique mais ne sont pas efficacement relâchées et s'accumulent à la surface de la cellule (64). Les résidus 7 à 10 de p6, Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP), forment un motif requis pour la production de particules virales (77). Ce motif fait partie d'un ensemble de séquences ayant un rôle dans le détachement des particules virales de la surface de la cellule. Ces séquences sont désignées domaines L (*late domains*), puisqu'elles jouent un rôle tardif dans le processus de relâche virale. Les domaines L viraux comportent trois classes de motifs : PTAP, PPXY et YXXL (51).

Certaines données suggèrent un rôle de l'ubiquitine dans la relâche des rétrovirus. Le traitement de cellules infectées par le VIH-1 avec des inhibiteurs du protéasome entraîne une diminution du clivage protéolytique de Pr55^{Gag}, ainsi qu'une diminution de la relâche virale et de l'infectivité du virus. L'inhibition de l'activité du protéasome nuit également à l'ubiquitination de p6^{Gag}, probablement parce que la quantité d'ubiquitine libre dans la cellule est affectée (148). Par la suite, un lien a été suggéré entre la fonction de relâche de p6^{Gag} et la machinerie de l'ubiquitine. En effet, une interaction a été trouvée entre le motif PTAP de la région p6 de Pr55^{Gag} et la portion N-terminale de Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*), un homologue de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2 : *ubiquitin-conjugating enzyme*) impliqué dans la régulation du transport intracellulaire, la régulation transcriptionnelle et le contrôle du cycle cellulaire (171).

Cette interaction entre Tsg101 et p6^{Gag} est spécifique. La protéine Tsg101, jouant un rôle dans la voie de transport vacuolaire (*Vps : vacuolar protein sorting*), est également importante pour la relâche virale. En effet, la déplétion de Tsg101 réduit la

relâche virale à partir de cellules 293T. Cette déplétion, ainsi que l'inhibition de la voie Vps, bloquent la relâche virale à des stades tardifs du bourgeonnement (55). La surexpression de la partie N-terminale de Tsg101, désignée TSG-5', inhibe la relâche de façon spécifique au VIH-1, en empêchant la liaison du motif PTAP de p6^{Gag} et Tsg101 (61). Cette diminution de la relâche semble s'effectuer à une étape tardive du bourgeonnement, au niveau du détachement des particules de la membrane plasmique. De plus, l'inhibition de la relâche par TSG-5' dépend de la présence d'un domaine L fonctionnel pour p6^{Gag} (36). Cependant, le recrutement de Tsg101 par le motif PTAP de p6 ne serait pas suffisant pour expliquer la fonction du domaine L de p6. Les résidus 15 à 51 de p6 contiendraient des séquences pouvant agir en *trans* et de façon synergique avec le motif PTAP pour permettre la relâche de particules virales (112).

5.2 Interaction entre Gag et Env

Lors de l'assemblage du virus, il est essentiel que la glycoprotéine d'enveloppe soit incorporée. La protéine MA serait importante pour l'incorporation de Env dans la particule virale. Des délétions dans la partie MA de Pr55^{Gag} ont pour effet de diminuer les niveaux de Env présents dans les virus (183). Il a aussi été montré que des délétions en C-terminal de la sous-unité transmembranaire de Env (gp41) entraînent une réduction de l'incorporation de Env dans les particules virales (184). Plus précisément, la délétion des résidus 292 à 296 dans la seconde hélice alpha de la queue cytoplasmique de gp41 entraîne une diminution de l'incorporation de Env, ainsi qu'une diminution de l'infectivité des virus produits. L'effet de cette délétion est annulé par la substitution d'une valine (V) pour une isoleucine (I) au niveau du résidu 34 de MA, suggérant ainsi une interaction entre MA et la queue cytoplasmique de gp41 (119). De plus, une interaction entre la queue cytoplasmique de gp41 et Pr55^{Gag} a été observée dans des virions immatures (178). Également, dans des cellules épithéliales, il y a bourgeonnement polarisé du virus au niveau du domaine basolatéral (102). La tyrosine en position 712 du domaine intracytoplasmique de gp41 est responsable de ce ciblage basolatéral (103). Des mutants de p17^{MA} incapables d'interagir avec Env, et donc d'induire son incorporation dans les virus, ont montré une distribution non polarisée de la relâche virale. Il y aurait donc une corrélation

entre la capacité d'interaction de p17^{MA} avec Env et la relâche polarisée de Gag (102). Dans des lymphocytes T, il a aussi été démontré qu'il y avait un bourgeonnement polarisé de la p24. Cependant, lorsque la tyrosine en position 712 du domaine intracytoplasmique de la gp41 est mutée, il y a perte de polarisation, et la p24 se retrouve tout autour de la cellule (41). Les protéines Gag et Env du VIS semblent également interagir entre elles. Lorsque ces protéines ont été exprimées dans des cellules HeLa et HeLa CD4+, un anticorps spécifique contre la protéine Gag du VIS a permis de coimmunoprécipiter la protéine Env. Cette interaction est spécifique et requiert la présence de la queue cytoplasmique de Env. Dans la même étude, Vincent *et al.* ont montré qu'en présence de mutants de Env possédant un signal de rétention au réticulum endoplasmique (motif KKXX), il y a une diminution de la relâche de Gag. Cela suggère que les mutants de Env, même retenus au RE, peuvent interagir avec Gag, ce qui entraîne un ralentissement de la relâche de cette dernière (172). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une interaction entre les protéines de structure Gag et Env, lors de l'assemblage viral.

5.3 Voie endosomale et sortie du VIH-1

Certaines données relient l'assemblage du VIH-1 à la voie endosomale. D'abord, les compartiments cellulaires qui contiennent des vésicules intraluminales sont désignés collectivement corps multivésiculaires (MVBs : *multivesicular bodies*). Les MVBs appartiennent au système endosomal, qui comprend les vésicules d'endocytose primaires, les endosomes précoces (EE : *early endosomes*), les endosomes tardifs (LE : *late endosomes*) et les lysosomes. Les MVBs se trouvent dans une catégorie entre les endosomes tardifs et les lysosomes (37). La formation des MVBs implique l'interaction des complexes protéiques désignés ESCRT-I, -II et -III (ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport*), ainsi que l'action de l'ATPase Vps4A permettant la dissociation des complexes (113). Les protéines Tsg101, VPS28, VPS37B et VPS37C font partie du complexe ESCRT-I (43, 163). La protéine VPS28 se lie à la partie C-terminale de Tsg101, sur une région couvrant approximativement les résidus 330 à 377. En présence d'un mutant de VPS4A déficient pour l'activité ATPase, les protéines VPS37B et Tsg101 se retrouvent dans des compartiments

endosomaux aberrants (163). Pour sa part, VPS37C peut se lier à VPS28 et au domaine C-terminal de Tsg101 (43). Une autre protéine, nommée AIP1, permet de faire le pont entre les complexes ESCRT-I et ESCRT-III (113, 161). En effet, AIP1 interagit avec Tsg101, qui fait partie du complexe ESCRT-I, et avec des protéines CHMP4 (CHMP : *charged MVB protein*), qui font partie du complexe ESCRT-III. L'interaction entre AIP1 et CHMP4 dépend d'une protéine VPS4A fonctionnelle, c'est-à-dire ayant une activité ATPase intacte (161). Le domaine de liaison à l'ubiquitine en N-terminal de Tsg101 lie directement le motif $_{717}\text{PSAP}_{720}$ dans la partie C-terminale de AIP1 (174). Également, la protéine Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), de par son motif PSAP, lie Tsg101. La présence de Hrs est requise pour permettre une association efficace de ESCRT-I, et par le fait même de Tsg101, avec les membranes. Hrs est également requise pour la formation des MVBs, la déplétion de cette protéine entraînant un changement dans la morphologie des endosomes tardifs et des lysosomes. Hrs est principalement localisée aux endosomes précoces, alors que Tsg101 se retrouve en majorité aux endosomes tardifs. Par contre, les deux protéines colocalisent au niveau d'une sous-population d'endosomes contenant l'acide lyso-biphosphatidic. La surexpression de Hrs cause une accumulation de Tsg101 au niveau des endosomes précoces, et empêche sa localisation aux endosomes tardifs. Hrs permet donc le recrutement de ESCRT-I aux endosomes, et régule donc indirectement la formation des MVBs (6).

Il a été montré que Gag pouvait s'associer avec des compartiments de la voie endosomale, et qu'une relâche virale efficace nécessitait la liaison de Tsg101 avec l'ubiquitine et le motif PTAP de p6^{Gag} pour recruter la machinerie cellulaire requise pour la relâche (59). De plus, AIP1 lie p6^{Gag} via le motif $_{41}\text{LRSL}_{44}$ situé dans la partie C-terminale de p6^{Gag} (161, 174). Également, des mutants dominants négatifs des protéines VPS4B et CHMP entraînent la redistribution de Gag de la membrane plasmique vers des compartiments endosomaux aberrants dits de classe E. Cette redistribution est favorisée par la liaison de Gag à Tsg101 via le motif PTAP de p6^{Gag} . Ces mêmes mutants bloquent aussi la relâche du VIH-1 à une étape tardive, et diminuent l'infectivité virale (174). Il a été mentionné que la partie N-terminale de Tsg101 interagissait avec la partie C-terminale (résidus 222 à 777) de Hrs. Plus

précisément, le motif $_{348}\text{PSAP}_{351}$ ainsi que la région riche en proline et glutamine (Pro/Gln) de Hrs contribuent à la liaison de cette dernière avec Tsg101. La partie C-terminale de Hrs, fusionnée à des protéines Gag déficientes pour le domaine L, permet de rétablir la relâche virale, à condition de pouvoir lier Tsg101. En sachant que Hrs permet le recrutement de Tsg101/ESCRT-I aux endosomes, il est permis de croire que la protéine Gag du VIH-1 mimerait Hrs pour sa capacité à recruter Tsg101 (136).

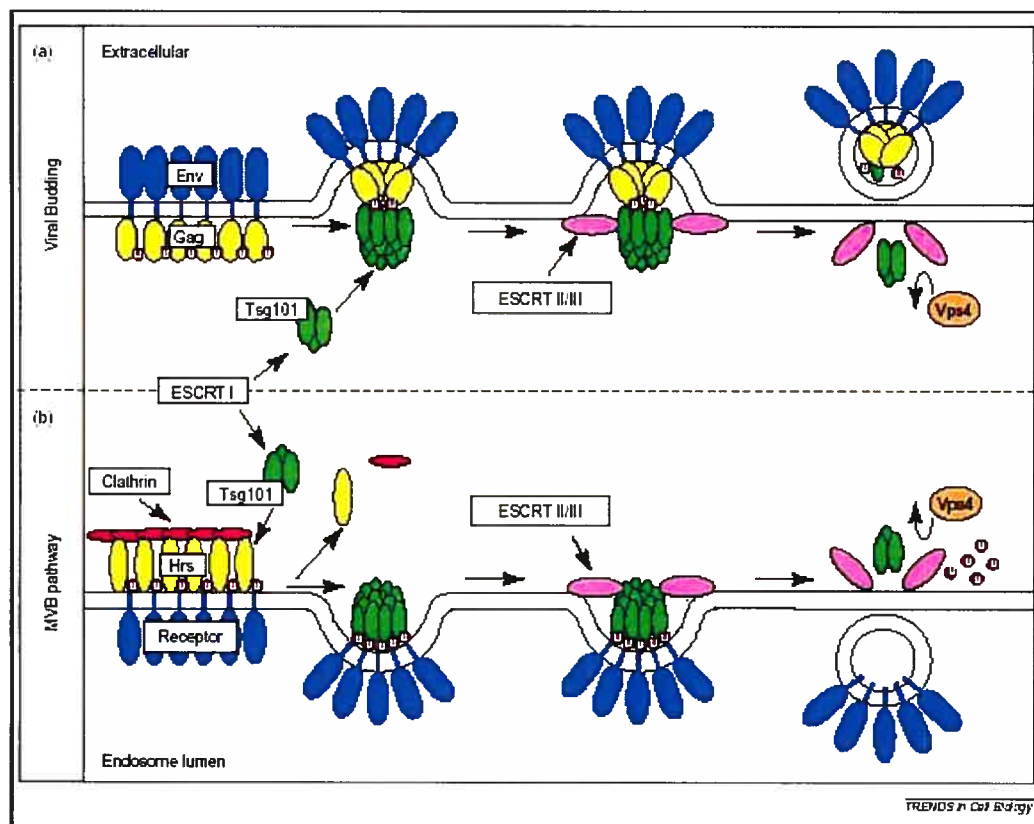


Figure 6. Relation entre l'assemblage du VIH-1 et la voie endosomale. (A) Modèle proposé pour le bourgeonnement du VIH-1. (B) Modèle proposé pour la formation des MVBs. (Figure tirée de Clague, M.J. & Urbé, S. 2003. Hrs function : viruses provide the clue. *TRENDS in Cell Biology* 13(12);603-606.)

Chez les cellules présentatrices d'antigènes (APC : *antigen-presenting cell*), telles les cellules dendritiques et les macrophages, les endosomes tardifs et les lysosomes contiennent la majorité des molécules du CMH de classe II intracellulaires, et sont donc désignés compartiments enrichis en CMH II (MIIC : *MHC-class-II-enriched compartments*) (37). Dans les macrophages, les particules du VIH-1 s'accumulent dans des compartiments intracellulaires ayant les caractéristiques des compartiments MIIC, c'est-à-dire des compartiments enrichis en CD63 et en molécules du CMH de classe II (137). Les particules bourgeonnent dans ces compartiments et acquièrent des protéines retrouvées à la membrane de ceux-ci, telles CD63, CD81, CD82, LAMP-1 et HLA-DR. Les virus seraient ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire par exocytose, lors de la fusion des compartiments MIIC avec la membrane plasmique (131, 137). Cependant, il a été montré que la protéine Gag s'accumule aux membranes de compartiments endosomaux tardifs non seulement dans des cellules de la lignée monocyte/macrophage, mais également dans d'autres types cellulaires (121). Il y aurait assemblage intracellulaire pour les virus VIH et MLV (*murine leukemia virus*) dans des cellules HeLa et 293T, ces virus utilisant les membranes des endosomes tardifs et des MVBs comme sites d'assemblage. Pour MLV, les protéines Env et Gag montraient une colocalisation à la membrane plasmique, ainsi qu'au niveau des vésicules intracellulaires. Ces résultats suggèrent que les rétrovirus peuvent interagir avec la machinerie de transport vacuolaire (156). Plus récemment, un autre groupe montrait que dans les cellules HeLa et les lymphocytes T, la protéine Gag de type sauvage est ciblée vers la membrane plasmique, alors que des mutants du domaine basique de p17^{MA} sont ciblés dans des compartiments intracellulaires CD63+, les MVBs. Par contre, dans les macrophages, Gag localise toujours aux MVBs, qu'il s'agisse du type sauvage ou de mutants de la protéine. De plus, la localisation de Gag aux MVBs est indépendante de la présence de p6^{Gag}, excluant la nécessité du recrutement de Tsg101 par p6^{Gag} pour le ciblage aux MVBs. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le ciblage à la membrane plasmique ou aux MVBs dépend du type cellulaire, et suggèrent l'existence de deux partenaires cellulaires différents pouvant lier Gag, l'un situé à la membrane plasmique et l'autre, au niveau des MVBs (125).

6. Structure et fonctions de la protéine accessoire Vpu

6.1 Structure de Vpu

Vpu est une protéine membranaire intégrale de type I. Elle aurait la capacité de former des homo-oligomères (Maldarelli et al., 1993), bien que les régions modulant cette oligomérisation demeurent mal identifiées. Les résidus en position 52 et 56 de la protéine sont des résidus sérines se trouvant dans un motif de dodécapeptide bien conservé, et formant la séquence consensus S/TXXD/E reconnue par la caséine kinase II cellulaire (149). Ces résidus sérines sont phosphorylés par une kinase ayant des propriétés similaires à la caséine kinase II cellulaire (147).

Plusieurs études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (NMR) ont permis de proposer un modèle de la structure de Vpu. Une première hélice α transmembranaire, constituée des résidus 9 à 29, est orientée de façon perpendiculaire à la membrane, formant un angle de 15 à 30° par rapport au plan de la membrane. Pour sa part, le domaine cytoplasmique de Vpu est constitué d'une première hélice α formée des résidus 30 à 49, suivie d'une région flexible contenant les résidus sérines en position 52 et 56. Une seconde hélice α , constituée des résidus 58 à 70, précède la queue terminale de la protéine, composée des résidus 71 à 81 (105, 177). La première hélice cytoplasmique de Vpu est une hélice amphipatique orientée parallèlement au plan de la membrane. La phosphorylation des résidus sérines 52 et 56 n'affecte ni l'orientation ni la conformation de cette hélice (72). De plus, le côté hydrophobe de la première hélice cytoplasmique est ancré partiellement dans la bicouche lipidique, alors que le côté hydrophile est exposé au cytoplasme. La région flexible située entre les deux hélices cytoplasmiques pointerait du côté opposé à la membrane, de par la nature acide des deux résidus sérines phosphorylés (14). L'orientation de la seconde hélice cytoplasmique par rapport au plan de la membrane et de la première hélice cytoplasmique n'est pas encore déterminée. Certaines études suggèrent que cette hélice est parallèle au plan de la membrane (105, 108), alors que d'autres favorisent un modèle où la seconde hélice cytoplasmique est orientée de façon à s'éloigner de la membrane (14, 177).

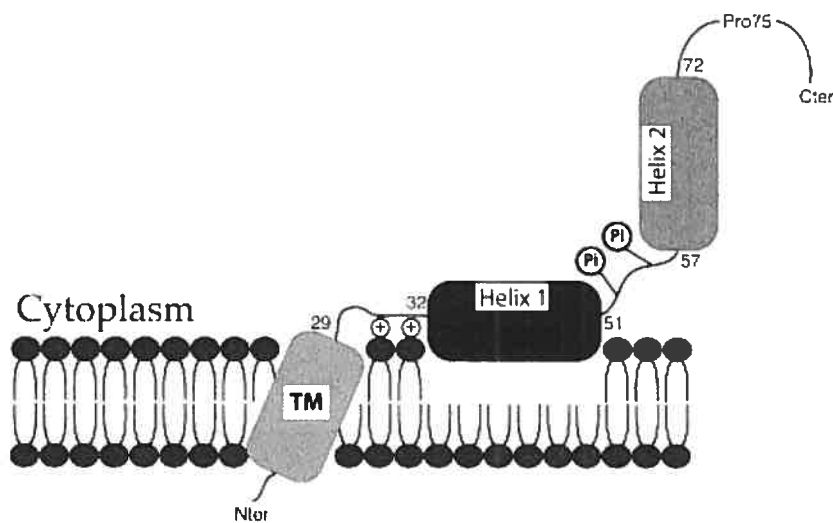


Figure 7. Structure de la protéine Vpu du VIH-1. (Figure tirée de Bour, S. & Strebel, K. 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5(11);1029-1039.)

6.2 Fonctions de Vpu

6.2.1 Vpu contribue avec Nef à la régulation négative de CD4

Une des fonctions biologiques de Vpu est l'induction de la dégradation de la molécule CD4, récepteur du VIH-1 à la surface des cellules (176). L'induction de la dégradation de CD4 par Vpu est indépendante du type cellulaire (152). Aux étapes tardives de l'infection par le VIH-1, le récepteur CD4 et le précurseur des glycoprotéines d'enveloppe gp160 forment des complexes au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ce qui confine les deux protéines à ce compartiment (96). Vpu permet donc la dégradation des molécules CD4 en complexe avec gp160 au niveau du RE (176). En absence de phosphorylation, Vpu est incapable d'induire la dégradation de CD4 (109, 150), les deux résidus sérines de Vpu devant être phosphorylés pour qu'il y ait dégradation de CD4 (129, 169). Vpu se lie de façon spécifique à la queue cytoplasmique de CD4. L'absence de phosphorylation de Vpu, bien qu'elle empêche l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu, n'a cependant aucun effet sur l'interaction entre les deux protéines. La liaison entre Vpu et CD4 est donc nécessaire

mais non suffisante pour induire la dégradation de CD4 (13, 169). La partie C-terminale de Vpu est requise pour induire la dégradation de CD4 ainsi que pour l'interaction Vpu-CD4 (109, 143). Plus spécifiquement, des mutations à l'intérieur de la première hélice α cytoplasmique de Vpu, ou des mutations perturbant le côté hydrophobe de cette hélice, ont un effet négatif sur la liaison à CD4. Pour la molécule CD4, la séquence $_{416}\text{EKKT}_{419}$, ainsi que l'hélice α située près de la membrane dans la partie cytoplasmique de CD4 sont nécessaires pour sa liaison à Vpu (13, 95, 169, 173, 175, 180). Également, la partie C-terminale de la région transmembranaire de Vpu est importante pour la dégradation de CD4, puisque des mutations dans cette partie abolissent la dégradation de CD4 par Vpu (168).

Vpu interagit aussi avec une protéine humaine, βTrCP . Cette liaison Vpu- βTrCP requiert la phosphorylation des deux sérines en position 52 et 56. Il y a formation de complexes CD4-Vpu- βTrCP , dans lesquels βTrCP permet le recrutement de la protéine Skp1p qui, à son tour, recrute le système de dégradation protéique ubiquitine-protéasome (110). Contrairement à d'autres substrats connus pour βTrCP , Vpu n'est pas elle-même dégradée, et ses niveaux demeurent stables alors que la molécule CD4 est dégradée. De plus, la dégradation de CD4 induite par Vpu est sensible à des inhibiteurs du protéasome, et elle nécessite que le système de conjugaison de l'ubiquitine soit intact. Ces données suggèrent que Vpu agit comme connecteur entre CD4 et la machinerie de dégradation ubiquitine-protéasome (96). Une des conséquences de la liaison de Vpu avec βTrCP est la moins grande disponibilité de ce facteur cellulaire pour accomplir ses fonctions habituelles. Normalement, βTrCP induit la dégradation de la protéine I $\kappa\text{B}\alpha$, cette dernière étant liée au facteur transcriptionnel NF- κB et le maintenant sous une forme inactive. En liant βTrCP , Vpu interfère avec la dégradation de I $\kappa\text{B}\alpha$, ce qui inhibe l'activation de NF- κB (11). L'inhibition de l'activation de NF- κB réduit les niveaux des facteurs anti-apoptotiques Bcl-xL, A1/Bfl-1 et TRAF1 (*TNF receptor-associated factor 1*), dont l'expression dépend de NF- κB . Les niveaux de la caspase 3 sont également augmentés. La surexpression de Vpu durant l'infection pourrait contribuer au processus de mort cellulaire par apoptose induit par le VIH (1).

La dégradation de CD4 induite par Vpu a des effets positifs au niveau de l'infectivité virale. Dans des cellules exprimant CD4, l'absence de Vpu entraîne l'incorporation de molécules CD4 dans les virions, résultant en une diminution de l'infectivité. L'incorporation de Env dans les virions n'est cependant pas affectée par l'absence de Vpu. La diminution d'infectivité observée serait le résultat de la formation de complexes Env-CD4 non fonctionnels à la surface des virions, ce qui pourrait interférer avec le processus d'attachement du virus à la cellule cible lors de l'infection (97, 165).

6.2.2 Augmentation de la relâche virale

Une autre activité biologique de Vpu est l'augmentation de la relâche virale. En effet, Vpu permet d'augmenter de 5 à 10 fois la quantité de particules virales produites (162). Il en résulte une diminution de la mortalité cellulaire et de la vitesse de formation de syncytium, donc une diminution des effets cytopathiques (79, 89, 167). En absence de Vpu, il y a accumulation de protéines virales dans la cellule infectée, et diminution de la relâche virale. Une grande proportion des virions demeurent aussi attachés à la surface de la cellule (79, 87). Cependant, l'absence de Vpu entraîne également l'accumulation et le bourgeonnement de particules virales dans des vacuoles intracellulaires (63, 87, 99). L'intégrité de la partie transmembranaire située en N-terminal de Vpu est nécessaire pour permettre l'augmentation de la relâche virale (130, 143). Pour sa part, la phosphorylation de Vpu n'est pas nécessaire à la fonction de relâche, bien qu'elle améliore cette dernière. En comparaison avec l'absence de Vpu, une protéine Vpu non phosphorylée permet d'augmenter la relâche virale. Toutefois, les niveaux de particules virales relâchées demeurent inférieurs à ceux obtenus en présence d'une protéine Vpu phosphorylée (53, 145, 150).

Le VIH-2 ne code pas pour une protéine Vpu. Dans le contexte d'une infection par l'isolat ROD10 du VIH-2, la présence du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe (Env) permet d'augmenter la relâche virale (12, 15). Cependant, ce ne sont pas toutes les protéines Env du VIH-2 qui peuvent augmenter la relâche virale. Toutefois, pour l'isolat ROD14 du VIH-2, il a été montré que la mutation du résidu

alanine en position 598 dans la partie extracellulaire de la sous-unité transmembranaire de Env permet d'augmenter la relâche virale (10). De plus, il a été montré que pour un isolat primaire du VIH-1, désigné AD8, ayant un tropisme pour les macrophages et ne codant pas pour Vpu, il y avait une augmentation de l'expression du précurseur gp160 et de la sous-unité de surface gp120. Cette expression augmentée de Env concordait avec une relâche virale accrue (144). La fonction d'augmentation de la relâche virale serait donc importante pour la propagation du virus, puisqu'elle est conservée et peut être exercée par plus d'une protéine.

Une des hypothèses avancée pour expliquer l'augmentation de la relâche virale par Vpu est que cette dernière aurait la capacité de former des canaux ioniques *in vitro* dans des bicouches lipidiques et *in vivo* lorsque exprimée chez *Escherichia coli*. Vpu fonctionnerait ainsi de façon analogue à la protéine M2 du virus influenza A, qui permet d'augmenter la relâche virale en formant des canaux ioniques (45). Vpu permet aussi d'augmenter la perméabilité membranaire de *Escherichia coli* ou de cellules COS (62). L'expression de Vpu dans des oocytes de *Xenopus* augmenterait la conductance membranaire, phénomène dépendant de l'intégrité du domaine TM de Vpu (146). Des études de modélisation suggèrent que le domaine TM de Vpu s'assemblerait en structures pentamériques pour former des canaux ioniques (67). De plus, le traitement avec des dérivés de l'amiloride, un inhibiteur du transport des ions, a un effet inhibiteur sur les canaux ioniques formés par Vpu, ainsi que sur la relâche de VLP à partir de cellules HeLa exprimant les protéines Gag et Vpu. Il y aurait donc un lien entre l'augmentation de la relâche virale par Vpu et son activité de canal ionique (44). Cette hypothèse est cependant controversée. En effet, d'autres études effectuées montrent que l'expression de Vpu dans des oocytes de *Xenopus* n'entraîne pas une augmentation de la conductance membranaire, mais a plutôt un effet inhibiteur sur la conductance liée aux ions K^+ (26). Récemment, un lien a été établi entre Vpu et une protéine cellulaire appelée TASK-1. Cette protéine a une activité de canal à ions K^+ sensible au pH acide. Des similarités structurales existent entre Vpu et le domaine transmembranaire en N-terminal de TASK-1. Des expériences de coimmunoprécipitation ont montré une interaction entre les deux protéines. Dans des cellules HeLa transfectées avec une construction provirale du VIH-1, la surexpression

de TASK-1 entraîne une diminution de la relâche virale. En absence de Vpu, aucun effet de TASK-1 n'est observé sur la relâche virale. L'effet inhibiteur de TASK-1 serait donc spécifique à Vpu. Toutefois, l'expression de Vpu inhibe, de manière dose-dépendante, l'activité de canal ionique de TASK-1. Le premier segment transmembranaire de TASK-1, désigné Ttm1, lorsque coexprimé avec TASK-1, a, tout comme Vpu, un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'activité de canal ionique de TASK-1. De plus, en absence de Vpu, l'expression de Ttm1 induit une augmentation de la relâche virale. Il est donc possible que Vpu augmente la relâche non pas par son activité intrinsèque de canal ionique, mais par sa capacité d'inhiber l'activité d'un autre canal ionique qui semble avoir un effet restrictif sur la relâche virale (76).

La protéine Vpu permet d'augmenter la relâche virale indépendamment de la présence des glycoprotéines d'enveloppe (Env) (181). De plus, Vpu peut augmenter la relâche de Gag même en absence de la protéase virale, donc sans besoin de la maturation du précurseur Pr55^{Gag} (63, 94). Lors d'expériences de fractionnement cellulaire, il a été montré qu'en présence de Vpu, Gag localisait dans des fractions membranaires, alors qu'en absence de Vpu, la majorité de Gag localisait dans des fractions cytosoliques. De plus, une protéine de fusion MA-GFP montre une redistribution du cytosol vers la membrane plasmique en présence de Vpu (39). L'augmentation de la relâche virale par Vpu n'est pas limitée aux seules capsides du VIH-1, puisque Vpu peut augmenter la production de particules virales formées des protéines Gag de d'autres rétrovirus tels le VIH-2, le virus Visna et le virus Mo-MLV (*Moloney murine leukemia virus*). Ces observations indiquent qu'une interaction spécifique entre Vpu et la protéine Gag du VIH-1 n'est pas requise pour que Vpu puisse augmenter la relâche virale, et suggèrent que Vpu permet l'augmentation de la relâche virale en modifiant des voies cellulaires déjà existantes (63). Une protéine cellulaire exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus humains a la capacité de se lier à Vpu et à Gag. La protéine UBP (*Vpu-binding protein*) a un poids moléculaire de 41 kDa et appartient à la famille des protéines TPR (*tetratricopeptide repeat*) (23). En absence de Vpu, UBP et Gag se trouvent dans le cytoplasme. En présence de Vpu, il y a une redistribution de UBP et Gag au niveau de la membrane plasmique (68). Lorsqu'elle lie UBP, Vpu inhibe de façon compétitive l'interaction entre Gag et UBP.

Dans les cellules HeLa, la surexpression de UBP a un effet négatif sur la relâche virale. Gag interagirait de façon stable avec UBP, pour former un complexe Gag-UBP. Vpu viendrait défaire ce complexe et se lierait à UBP, pour former le complexe Vpu-UBP. En se dissociant du complexe Gag-UBP, Gag subirait une modification conformationnelle l'empêchant d'interagir à nouveau avec UBP. Gag pourrait alors participer à la formation de nouvelles particules virales (23).

Le besoin de Vpu pour une relâche efficace des particules virales dépend du type cellulaire. La présence de Vpu permet d'augmenter la relâche virale dans différents types de cellules humaines, telles les cellules HeLa, 293T, lymphocytes T CD4+ primaires, cellules T Jurkat et MT4, macrophages et PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) (89, 140, 145, 152). Vpu est également nécessaire pour une relâche virale efficace à partir de cellules quiescentes, comme, par exemple, des macrophages différenciés (38). Toutefois, Vpu n'a aucun effet sur la relâche à partir de cellules simiennes, telles CV-1, COS-1 et COS-7 (57, 140, 152). En comparant la relâche virale à partir d'hétérocaryons de cellules humaines et simiennes, et d'hétérocaryons de cellules simiennes, un groupe a récemment démontré que les cellules humaines possèdent un facteur cellulaire inhibant la relâche virale de façon dominante, et que ce facteur est absent des cellules simiennes. De plus, Vpu permet de surmonter le bloc de relâche imposé par ce facteur dans les cellules humaines (170). Toutefois, le mécanisme d'action de Vpu dans ce contexte reste à déterminer. Cependant, le mécanisme par lequel Vpu permet une augmentation de la relâche virale est différent de celui employé par p6^{Gag}. En effet, la relâche efficace à partir de cellules HeLa et Jurkat, des cellules humaines, dépend de la présence de Vpu, et n'est pas affectée par l'absence de p6^{Gag}. Au contraire, p6^{Gag} est requis pour une relâche efficace à partir de cellules COS, des cellules simiennes, alors que dans ce même type cellulaire, Vpu n'a aucun effet (152).

7. Radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques (*lipid rafts*) sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides (figure 8). À de basses températures, les radeaux lipidiques ont la particularité de résister à la solubilisation par des détergents non ioniques, comparativement aux phospholipides membranaires qui sont solubilisés dans les mêmes conditions (18). Les sphingolipides diffèrent de la plupart des phospholipides biologiques par leur contenu en longues chaînes acylées saturées. Cela permet une disposition entassée des sphingolipides les uns par rapport aux autres. Cette propriété leur confère des températures de fusion (T_m : *melting temperatures*) plus élevées que celles de la membrane composée de glycérophospholipides, qui sont plutôt riches en chaînes acylées non saturées. L'entassement des chaînes acylées saturées est un des éléments clé de l'organisation des radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques riches en sphingolipides adopteraient un état de phase liquide ordonné (l_o : *liquid-ordered phase*), alors que les domaines riches en phospholipides auraient plutôt un état plus relâché, une phase liquide désordonnée (l_d : *liquid-disordered phase*) (figure 9). La technique la plus utilisée pour analyser les radeaux lipidiques est l'extraction par détergent. Des domaines membranaires résistants aux détergents (DRM : *detergent-resistant membranes*) seront alors isolés des lysats cellulaires, ces DRM se trouvant dans une phase l_o (19).

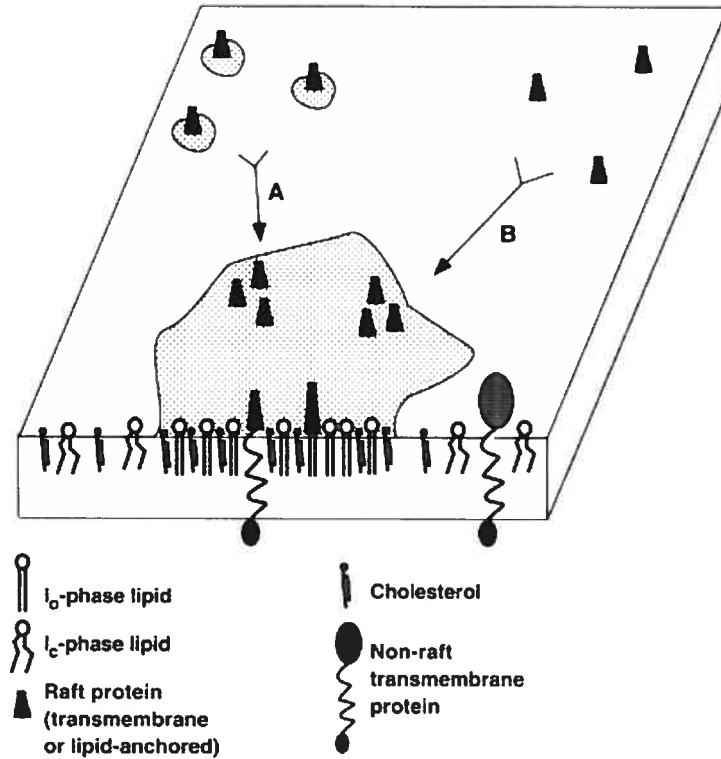


Figure 8. Structure des radeaux lipidiques. (Figure tirée de Brown, D.A. & London, E. 2000. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 275(23);17221-17224.)

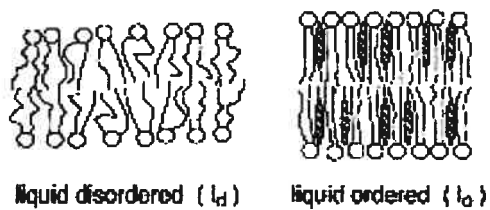


Figure 9. Structure des bicouches lipidiques. (Figure tirée de Munro, S. 2003. Lipid Rafts : Elusive or Illusive ? *Cell* 115;377-388.)

Les radeaux lipidiques sont retrouvés principalement dans des membranes enrichies en cholestérol et en sphingolipides, ce qui inclut la membrane plasmique, les voies de sécrétions tardives (*late secretory pathway*), les compartiments endocytaires et l'appareil de Golgi (19, 54). À la membrane plasmique, les radeaux lipidiques seraient associés de façon préférentielle avec des invaginations de 50 à 100 nm appelées cavéoles, présentes chez plusieurs types de cellules de mammifères. Cependant, les radeaux lipidiques ne sont pas restreints aux cavéoles, et sont également retrouvés dans des cellules où les cavéoles sont absentes (19). Les cavéoles sont formées par l'insertion des protéines cavéolines dans les microdomaines *rafts*, ce qui cause leur invagination (figure 10). Les cavéolines se lient directement au cholestérol, molécule enrichie dans les cavéoles, et représentent le composant structural majeur des cavéoles *in vivo*. Les cavéolines jouent un rôle clé dans le transport et la régulation des niveaux de cholestérol dans les radeaux lipidiques. La partition des cavéolines dans des domaines de phase l_o pourrait débiter au niveau de l'appareil de Golgi, initiant alors la génèse des cavéoles (54).

Plusieurs protéines retrouvées dans les radeaux lipidiques ou les DRM sont liées à des chaînes acylées saturées, et seront donc plus enclines à préférer un environnement ordonné. Il existe deux façons pour les protéines d'être liées à des chaînes acylées saturées. Elles peuvent être liées à un groupement glycoposphatidylinositol (GPI), qui leur servira d'ancrage à la membrane, ou elles peuvent être modifiées par myristylation ou palmitoylation (18, 116). Le myristate, ou acide myristylique, est un acide gras saturé à 14 carbones. Les protéines qui sont myristylées commencent par une méthionine suivie d'une glycine (séquence Met-Gly). La méthionine d'initiation est enlevée de façon co-translationnelle par la méthionine amino-peptidase, puis le groupement myristyl est lié à la glycine par un lien amide, réaction catalysée par l'enzyme N-myristyl transférase. Pour sa part, le palmitate est un acide gras saturé à 16 carbones. Le groupement palmitate est attaché au groupement sulfhydryl des cystéines par un lien thioester (138).

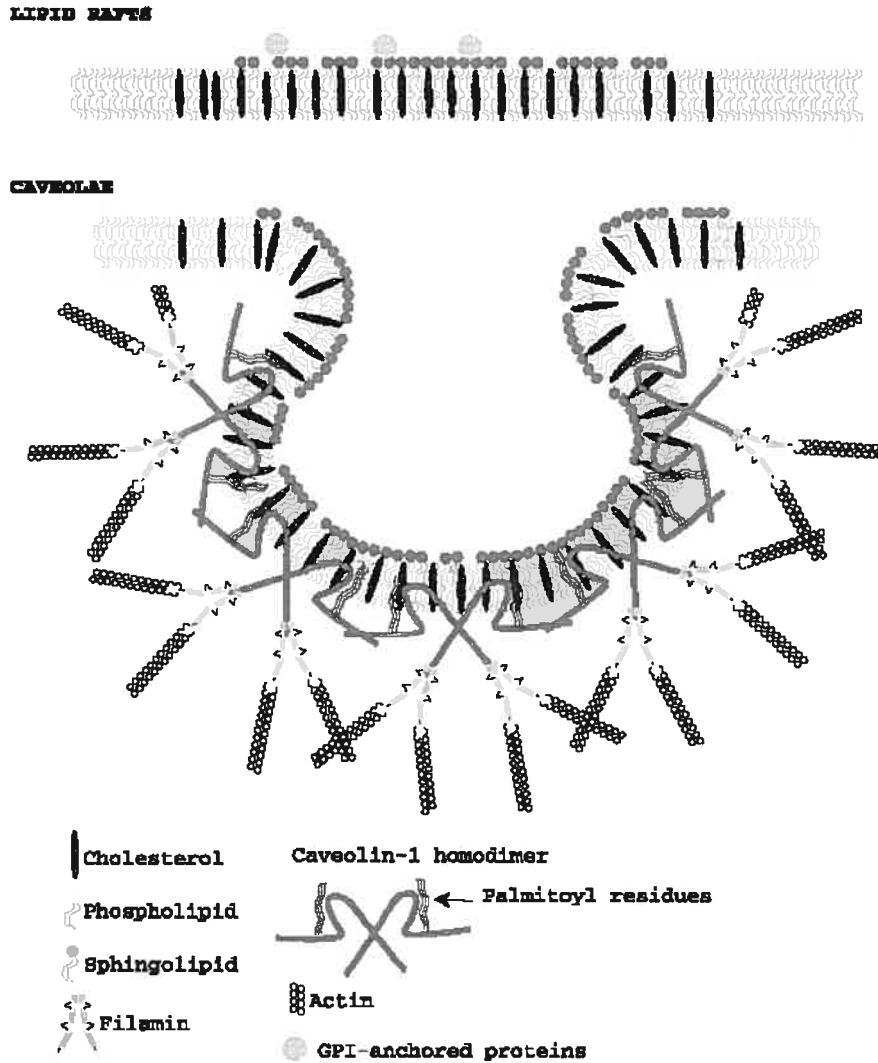


Figure 10. Structure des cavéoles. (Figure tirée de Quest, A.F.G., Leyton, L., Pàrraga, M. 2004. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling and disease. *Biochem. Cell Biol.* 82(1);129-144.)

Il a été suggéré que les radeaux lipidiques pourraient jouer un rôle dans la distribution des lipides et des protéines dans les voies de sécrétion et d'endocytose. Ils seraient également impliqués dans la transduction de signal via des protéines transmembranaires chez les cellules hématopoïétiques. Par exemple, la protéine FcεRI, récepteur des IgE à la surface des basophiles et des mastocytes, joue un rôle dans la cascade de signaux menant à la dégranulation de ces cellules. La localisation de ce récepteur au niveau des radeaux lipidiques corrèle avec la capacité d'initier la signalisation (18). D'ailleurs, le fait de réduire le cholestérol cellulaire a pour effet de détruire les radeaux lipidiques et inhibe la phosphorylation des tyrosines des récepteurs dans les lymphocytes T et les basophiles, ainsi que la signalisation des lymphocytes T (19). De manière plus générale, les radeaux lipidiques permettraient de concentrer, de façon sélective, des protéines ou des complexes protéiques, et seraient ainsi une plateforme pour des interactions protéines-protéines régulées de façon spécifique. Les radeaux lipidiques seraient également impliqués dans l'assemblage de plusieurs virus enveloppés, tels les virus influenza A, Ebola et VIH-1 (164).

Plusieurs indices laissent croire que l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales du VIH-1 a lieu au niveau des radeaux lipidiques. D'abord, la protéine Gag se retrouve dans les radeaux lipidiques (101, 120, 126). Cette localisation dans les rafts se fait après la liaison de Gag à la membrane. Il y a donc un délai entre la liaison de Gag aux membranes et son association aux radeaux lipidiques. La localisation de Gag dans ces domaines se fait grâce à sa région N-terminale, bien qu'elle soit augmentée par le domaine d'interaction Gag-Gag (126). La multimérisation de Gag rend toutefois difficile son isolement dans les fractions correspondant habituellement aux radeaux lipidiques. Après traitement des lysats cellulaires au détergent, ceux-ci sont soumis à une centrifugation sur gradient de densité. Après division de ce gradient en plusieurs fractions, les DRM seront retrouvés dans des fractions de faible densité. Les multimères de Gag sont cependant retrouvés dans des fractions de plus forte densité, désignées « barges ». La myristylation de Gag est nécessaire pour la localisation aux « barges ». Pour augmenter l'efficacité du ciblage aux radeaux lipidiques, un groupe a construit une protéine chimérique

Fyn(10)Gag, dans laquelle les dix premiers acides aminés de la protéine Fyn remplacent les dix premiers acides aminés de Gag, ce qui fournit une séquence en N-terminal à la fois myristylée et palmitoylée. L'utilisation de cette protéine chimérique a permis une augmentation de la localisation aux « barges », ainsi qu'une augmentation de la production virale (101).

Également, dans des cellules COS, des études de microscopie confocale ont montré que Gag et Env étaient tous deux situés à la membrane plasmique. Lorsqu'un mutant de Gag cause l'assemblage des particules virales à des sites intracellulaires, Env est redistribué de façon diffuse dans la cellule, et n'est plus localisé à la membrane. Gag pourrait donc recruter Env aux sites d'assemblage à la membrane plasmique (73). Également, Env est palmitoylé au niveau de ses résidus cystéines en position 764 et 837, localisés dans la région transmembranaire de la sous-unité gp41 (179). Cette palmitoylation est importante pour la localisation de la glycoprotéine d'enveloppe au niveau des radeaux lipidiques. De plus, l'absence de palmitoylation de gp160 entraîne une diminution importante de la quantité de protéine dans les virions, ce qui cause une baisse de l'infectivité virale. La palmitoylation de Env serait donc nécessaire à son infectivité (139). De plus, la colocalisation de gp160 avec le ganglioside GM1, retrouvé dans les radeaux lipidiques, a été démontrée en microscopie confocale dans des cellules 293T (134). Toutefois, des études plus récentes ont montré que la localisation de Env au niveau des radeaux lipidiques n'était pas essentielle pour l'infectivité du virus. En effet, la mutation des résidus cystéines de la queue cytoplasmique de gp41, inhibant la palmitoylation et causant la perte de localisation de Env au niveau des radeaux lipidiques, a cependant permis de maintenir les niveaux d'incorporation des protéines Env mutantes à 40 % des niveaux obtenus avec la protéine Env de type sauvage (9).

Aussi, des composants reconnus pour se trouver dans les radeaux lipidiques sont incorporés dans les particules de VIH-1 : GM1 (ganglioside retrouvé dans les radeaux lipidiques), Thy-1 et CD59 (*GPI-linked proteins*). Thy-1 et CD59 ne sont pas présentes en grandes quantités à la surface cellulaire, mais ces protéines sont incorporées dans les particules virales. La protéine CD45, qui est exclue des radeaux

lipidiques, peut recouvrir de 10 à 25% de la surface de la membrane cellulaire. Cette protéine n'est cependant pas incorporée dans les virus. Par contre, l'exclusion de CD45 des particules du VIH-1 n'est peut-être pas seulement due à son exclusion des radeaux lipidiques. En effet, la taille importante de la queue cytoplasmique de la protéine, soit environ 700 acides aminés, peut rendre son incorporation difficile pour cause d'encombrement stérique (120). Finalement, la réduction du cholestérol cellulaire, une composante importante des radeaux lipidiques, entraîne la diminution de la production virale du VIH-1, et donc de l'infectivité du virus. Par contre, cette diminution n'a aucun effet sur la production virale d'un virus non associé aux radeaux lipidiques, tel VSV (126).

Hypothèse et objectifs du projet

Il existe plusieurs éléments indiquant que l'assemblage du VIH-1 s'effectuerait au niveau des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques. D'abord, les protéines Gag et Env localisent dans ces microdomaines (101, 120, 126, 134, 139). Il a aussi été démontré qu'un ciblage accru de la protéine Gag aux radeaux lipidiques permettait d'augmenter la relâche de particules virales (101). Certains composants présents dans les radeaux lipidiques, tels le ganglioside GM1 et les protéines Thy-1 et CD59, sont incorporés dans les particules du VIH-1 (120). Le fait de réduire le cholestérol cellulaire, une composante importante des radeaux lipidiques, entraîne une diminution de la production virale, et par conséquent diminue l'infectivité du virus (126). Pour sa part, la protéine Vpu permet une relâche plus efficace des virus (162). L'absence de Vpu résulte en l'accumulation et le bourgeonnement des virus dans des vacuoles intracellulaires (63, 87, 99). Également, Vpu permet l'augmentation de particules virales (VLP : *virus-like particles*) indépendamment de la présence de la protéine Env (181) et de la maturation du précurseur Pr55^{Gag} (63, 94). Lorsque Vpu est présente, la protéine Gag est davantage retrouvée dans des fractions membranaires, et il y a une redistribution de Gag du cytosol vers la membrane plasmique (39). Cette augmentation de la relâche virale par Vpu s'effectuerait par un mécanisme lié au type cellulaire ou à l'environnement cellulaire, plutôt qu'à un effet direct sur la protéine Gag, puisque aucune interaction spécifique entre Vpu et Gag n'est requise pour que Vpu puisse augmenter la relâche virale (63). De plus, Vpu permet d'augmenter la relâche virale par un mécanisme différent de celui employé par p6^{Gag} (152), suggérant ainsi que l'action de Vpu s'effectuerait à une étape précédant le détachement de la particule virale de la membrane cellulaire. Notre hypothèse est donc que Vpu pourrait faciliter le ciblage et/ou l'assemblage du précurseur polyprotéique Gag au niveau des radeaux lipidiques.

L'objectif général du projet est de déterminer le mécanisme par lequel Vpu facilite la relâche des particules du VIH-1. Plus spécifiquement, il s'agit de déterminer si Vpu facilite le ciblage et/ou l'assemblage des particules virales au niveau des radeaux

lipidiques. En utilisant des cellules HeLa transfectées avec des constructions provirales déficientes pour la protéase virale et la protéine Env, nous avons d'abord voulu vérifier si la présence de Vpu permettait d'accroître la localisation de la protéine Gag dans les radeaux lipidiques. La localisation de la protéine Vpu dans ces mêmes microdomaines a également été vérifiée. Ensuite, nous avons voulu déterminer si l'inhibition de la formation des radeaux lipidiques avait un effet sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu. Finalement, en utilisant des constructions provirales complètes, nous avons voulu vérifier l'effet de Vpu sur la localisation intracellulaire de Gag lors de l'assemblage viral.

Matériel et méthodes

1. Plasmides

Le plasmide SVC21/BH10, codant pour une protéine Vpu fonctionnelle, a été obtenu en remplaçant le fragment Sall-KpnI (nucléotides des positions 5787 à 6347) du provirus SVC21 par le fragment Sall-KpnI du provirus BH10, tel que décrit précédemment (167). Le plasmide SVC21/BH10 Vpu ATG- a été obtenu en modifiant le codon d'initiation ATG de Vpu, en position 5420, pour le codon CTG, empêchant ainsi la production de la protéine (figure 11).

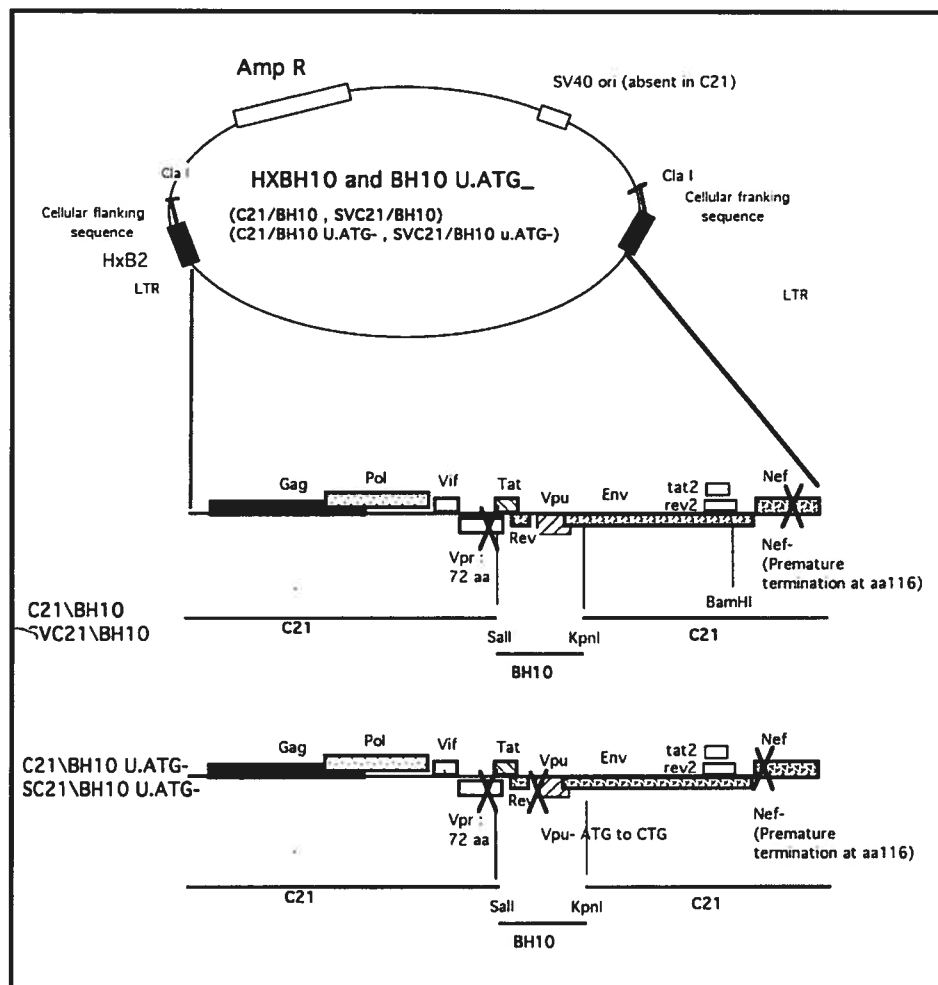


Figure 11. Schéma des constructions provirales SVC21/BH10 et SVC21/BH10 Vpu ATG-. Le fragment Sall-KpnI du provirus SVC21 (nucléotides 5787 à 6347) a été remplacé par le fragment Sall-KpnI du provirus BH10. Pour la construction SVC21/BH10 Vpu ATG-, le codon d'initiation ATG de Vpu a été remplacé par le codon CTG.

Le plasmide SVC21 Vpu- Env- PR- (figure 12) a été obtenu en remplaçant le fragment Sall-BamHI (nucléotides des positions 5787 à 8476) de la construction SVC21 PR- par le fragment Sall-BamHI de la construction SVC21 Vpu- Env-. Dans la construction SVC21 PR-, l'acide aspartique, résidu en position 25 de la protéase, est modifié pour une arginine. La substitution de l'acide aspartique du site actif de l'enzyme rend la protéase inactive (65). Le plasmide SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR- (figure 13) a été obtenu en remplaçant le fragment Sall-BamHI (positions 5787 à 8476) du plasmide SVC21 PR- par le fragment Sall-BamHI (positions 5144 à 7831) de la construction SVC21/BH10 Vpu+ Env-. Pour obtenir une construction Env-, le codon initiateur ATG a été muté, et un changement de cadre de lecture a été introduit à la position 6347 dans la séquence codant pour Env, éliminant ainsi un site KpnI (figure 14).

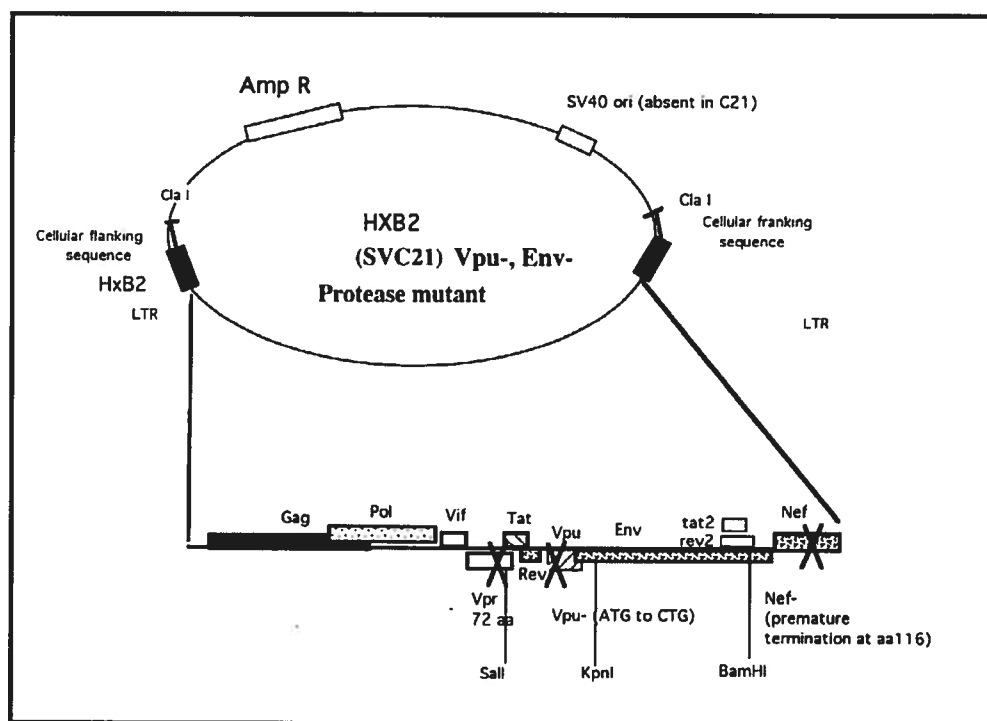


Figure 12. Schéma de la construction provirale SVC21 Vpu- Env- PR-. La protéase virale a été inactivée par la substitution, dans son site actif, de l'acide aspartique pour une arginine. Le fragment Sall-BamHI (nucléotides 5787 à 8476) de la construction SVC21 PR- a été remplacé par le fragment Sall-BamHI de la construction SVC21 Vpu- Env-, pour obtenir la construction SVC21 Vpu- Env- PR-.

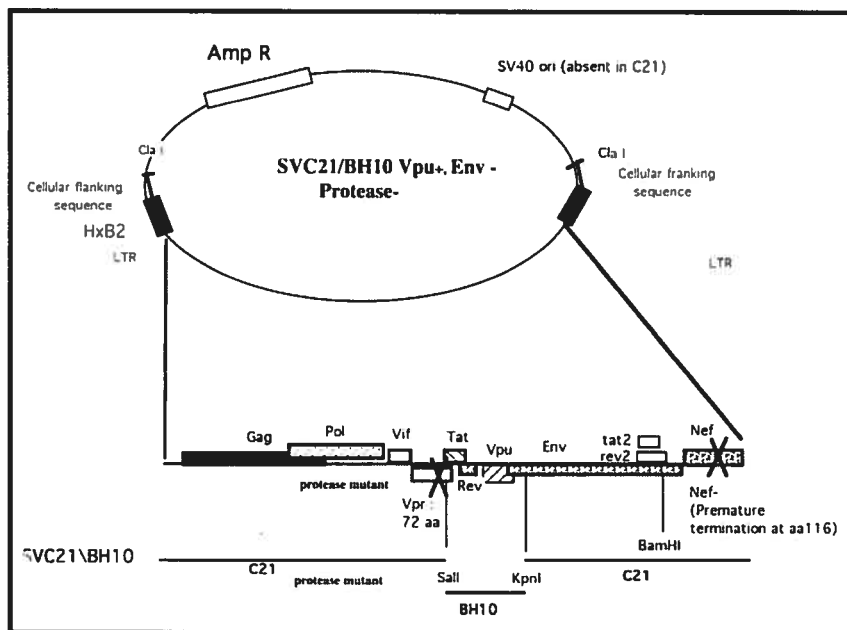


Figure 13. Schéma de la construction provirale SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-. La protéase virale a été inactivée par la substitution, dans son site actif, de l'acide aspartique pour une arginine. Le fragment Sall-BamHI (nucléotides 5787 à 8476) de la construction SVC21 PR- a été remplacé par le fragment Sall-BamHI (nucléotides 5144 à 7831) de la construction SVC21/BH10 Vpu+ Env-, pour obtenir la construction SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-.

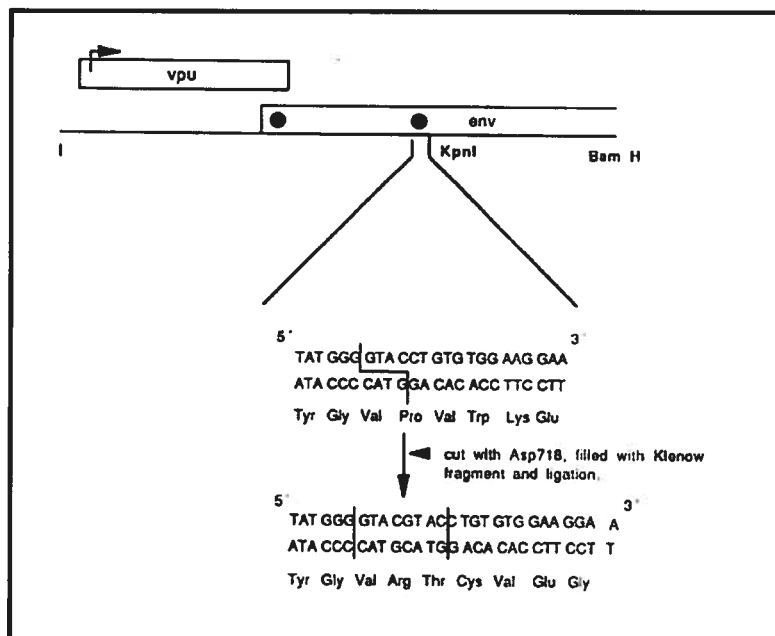


Figure 14. Changement de cadre de lecture dans la séquence codante du gène env. Le gène env a été inactivé en mutant le codon initiateur ATG, ainsi qu'en introduisant un changement de cadre de lecture à la position 6347 de la séquence codante du gène, ce qui élimine un site KpnI.

2. Anticorps

L'anticorps polyclonal de lapin anti-Vpu a été obtenu suite à l'injection d'un lapin avec un peptide correspondant à la séquence en C-terminal de Vpu (32), lequel peptide était couplé à la protéine KLH (*keyhole limpet haemocyanin*) utilisée comme transporteur protéique (157). Cet anticorps, désigné 4H₁₀LC-KLH, a été utilisé lors de la révélation de la protéine Vpu par immunobuvardage, ainsi que lors des marquages par immunofluorescence. Un autre anticorps polyclonal de lapin anti-Vpu a été produit de la même façon que pour 4H₁₀LC-KLH, le peptide étant cette fois couplé à l'albumine sérique de bovin (BSA : *bovine sera albumin*). Cet anticorps, désigné 4H₁₀LC-BSA, a été utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation de la protéine Vpu.

Le sérum anti-VIH-1 (#153) a été obtenu d'un individu infecté par le VIH-1 et dont le sérum a testé positif par ELISA pour la présence d'anticorps contre le VIH-1, tel que décrit précédemment (97). Les protéines structurales du VIH-1 sont reconnues par ce sérum. L'anticorps monoclonal de souris anti-p24 provient de l'ascite de souris Balb/c ayant été injectées avec un hybridome p24 (no catalogue ATCC HB9725; American Type Culture Collection, Manassas, VA), tel que décrit précédemment (97). L'anticorps polyclonal de lapin anti-p24 a été obtenu du AIDS Reagent Program (no catalogue 4250). L'anticorps monoclonal de souris anti-p17 provient du surnageant de culture d'hybridomes produisant des anticorps contre la protéine p17 (no ATCC HB8975; American Type Culture Collection, Manassas, VA). L'anticorps monoclonal de souris anti-récepteur de la transferrine (TfR) a été acheté chez Zymed Laboratories Inc. L'anticorps polyclonal de lapin anti-cavéoline a été acheté chez BD Biosciences.

L'anticorps polyclonal d'âne dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à l'enzyme HRP (*horseradish peroxidase*), ainsi que l'anticorps polyclonal de mouton dirigé contre les anticorps de souris et couplé à l'enzyme HRP, ont été achetés chez Amersham Biosciences. L'anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (GAR₄₈₈), ainsi que l'anticorps polyclonal d'âne

dirigé contre les anticorps de souris et couplé à Alexa Fluor® 594 (DAM₅₉₄), ont été achetés chez Molecular Probes.

3. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu Dulbecco Eagle modifié (DMEM) (Wisent Inc.), additionné de 10 % de sérum fœtal de bovin (Wisent Inc.) et de 1 % d'antibiotiques (P/S : pénicilline et streptomycine; Wisent Inc.). La culture des cellules s'est effectuée à 37°C, dans une atmosphère de 5 % de CO₂. Lors des différentes expériences, les cellules ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium (182).

4. Analyse des protéines retrouvées dans les radeaux lipidiques

4.1 Isolement des radeaux lipidiques

Les cellules HeLa ont été étalées dans des pétris de 60 mm de diamètre, à raison de 0,75 à 1 X 10⁶ cellules par pétri. Environ 24 heures plus tard, les cellules ont été transfectées avec 10 µg d'ADN (construction SVC21 Vpu- Env- PR- ou SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-). De 16 à 20 heures après la transfection, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par du milieu DMEM frais. À 48 heures après la transfection, les cellules ont été rincées une fois avec du PBS froid (*phosphate buffered saline* : 136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,14 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄), puis les cellules ont été décollées du pétri à l'aide d'un grattoir. Les cellules ont été comptées afin d'avoir des échantillons de 1 X 10⁶ cellules. Les échantillons ont été resuspendus dans 320 µL de TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl, 4mM EDTA, cocktail d'inhibiteurs de protéases CompleteTM [Roche]) et maintenus sur glace. Les cellules ont été lysées par sonication (sonicateur Ultrasonic Processor), à raison de 5 pulsations de 0,5 secondes à une amplitude de 38%, les échantillons étant maintenus sur glace durant la lyse. Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 2000 RPM pour 3 minutes à 4°C (Eppendorf Centrifuge 5402), et 300 µL de PNS (*post-nuclear supernatant*) ont été récupérés pour chaque échantillon. À ce 300 µL de PNS ont été ajoutés 9 µL de NaCl 5 M (concentration finale 150 mM), puis 310 µL de TNE (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,

4 mM EDTA) ou TNE + 0,25 % Triton X-100 (MP Biomedicals) (concentration finale de 0,125 % Triton). Les échantillons ont été laissés sur glace ou à 37°C pour 20 minutes, avec une légère agitation par vortex à toutes les 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été placés sur un gradient de saccharose (Fisher Scientific) fait de trois couches distinctes (TNE + 85,5 % saccharose, TNE + 65 % saccharose, TNE + 10 % saccharose). Les pourcentages de saccharose indiqués représentent des pourcentages poids/volume (p/v). Les gradients ont été soumis à une ultracentrifugation dans un rotor SW41 Ti (Beckman) à une vitesse de 28 000 RPM pour 17 heures à 4°C. Pour chacun des gradients, 10 fractions de 1,2 mL ont été récupérées du haut du gradient vers le bas du gradient, soit du moins dense au plus dense. À chacune de ces fractions, 350 µL de RIPA 5X (700 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 5 % Nonidet P-40, 0,25 % SDS, 2,5 % sodium deoxycholate) ont été ajoutés.

4.2 Précipitation des protéines au TCA

À 600 µL de chacune des fractions récupérées, ont été ajoutés 700 µL d'une solution de 20 % d'acide trichloroacétique (TCA : *trichloroacetic acid* [Sigma Aldrich]) froide (concentration finale de 11 % TCA). Après agitation, les échantillons ont été incubés sur glace pendant 30 minutes, puis ont été centrifugés à 14 000 RPM pour 15 minutes à 4°C (Eppendorf Centrifuge 5402). Le surnageant a été enlevé, et le culot a été resuspendu dans 300 µL d'acétone (Fisher Scientific) froid. Les échantillons ont été centrifugés à 14 000 RPM pour 5 minutes à 4°C, le surnageant a été enlevé, et le culot a été resuspendu dans 100 µL de tampon réducteur SDS contenant 50 µL/mL de Tris-HCl 1 M pH 8.

4.3 Détection des protéines

Les protéines contenues dans chacune des fractions ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5 %, en présence de SDS (SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), puis transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) pendant 16 heures à 4°C à 150 mA dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 193 mM glycine, 20 % méthanol). Les protéines ont ensuite été révélées par immunobuvardage. D'abord, les membranes

ont été incubées pendant 30 minutes à la température de la pièce dans du TBST (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween®20 [MP Biomedicals Inc]) contenant 5 % de lait écrémé, puis ont été lavées pendant 3 périodes de 10 minutes dans du TBST. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C avec différents anticorps primaires dilués dans du TBST : l'anticorps de souris anti-TfR (dilution 1:1000); l'anticorps de lapin anti-cavéoline (dilution 1:1000); l'anticorps de souris anti-p24 (dilution 1:4000); et l'anticorps de lapin anti-Vpu 4H₁₀LC-KLH (dilution 1:1000). Après un lavage de 15 minutes et 3 lavages de 10 minutes dans du TBST, les membranes ont été incubées pendant 40 minutes à la température de la pièce avec les anticorps secondaires dilués dans du TBST. L'anticorps de mouton dirigé contre les anticorps de souris, et l'anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de lapin, tous deux couplés à l'enzyme HRP, ont été utilisés comme anticorps secondaires (dilution 1:7500). Après avoir lavé les membranes pendant une période de 15 minutes, une période de 10 minutes et 4 périodes de 5 minutes, la révélation des protéines a été effectuée selon la technique ECL (*enhanced chemiluminescence*), tel que décrit précédemment (97). La densité des bandes obtenues a été analysée à l'aide d'un densitomètre de Molecular Dynamics, en utilisant le programme ImageQuant™.

5. Marquage métabolique et immunoprécipitations

Selon les expériences, 1×10^6 à $1,5 \times 10^6$ cellules HeLa ont été étalées et transfectées, 24 heures plus tard, avec les constructions SVC21 Vpu- Env- PR- ou SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-, à raison d'un ou de deux pétris par construction. Après 48 heures, les cellules ont été mises en privation pour 30 minutes dans du milieu DMEM ne contenant ni cystéine ni méthionine (MP Biomedicals), et additionné ou non de 10 % de sérum fœtal de bovin dialysé, selon les expériences. Ensuite, les cellules ont été marquées pendant 5 ou 16 heures, selon les expériences, dans du milieu DMEM sans cystéine ni méthionine, additionné ou non de 10 % de sérum fœtal de bovin dialysé, et de 100 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ou de 300 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de ³⁵S-translabel (Perkin Elmer), à raison de 3 mL de milieu par pétri.

À la fin des marquages, les surnageants ont été récupérés, et les cellules lysées dans 1 mL de RIPA (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 % Nonidet P-40, 0,05 % SDS, 0,5 % sodium deoxycholate [DOC]) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases CompleteTM (Roche). Les surnageants ont été centrifugés à 1000 RPM pour 3 minutes, puis à 3000 RPM pour 5 minutes, pour être ensuite filtrés sur une membrane de 0,45 µm. Les VLP (*virus-like particles*) ont été sédimentées sur un coussin de 1 mL de saccharose 20 % p/v dans du PBS, par ultracentrifugation à 35 000 RPM dans un rotor de type 70.1 Ti (Beckman) pendant 2 heures à 4°C. Les VLP ont ensuite été lysées dans 1 mL de RIPA.

La protéine Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée à partir des lysats de cellules et de VLP en utilisant 10 µL de sérum anti-VIH-1 (#153) et 5 µL d'anticorps de souris anti-p24. La protéine Vpu a été immunoprécipitée des lysats cellulaires en utilisant 10 µL d'anticorps de lapin anti-Vpu 4H₁₀LC-BSA. Les complexes immuns ont été précipités en utilisant des billes de protéine A-sépharose (Amersham Biosciences), lavés deux fois avec du RIPA sans DOC et une fois avec du Tris-NaCl pH 7,2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl), puis resuspendus dans du tampon réducteur SDS et séparés par SDS-PAGE 12,5 %. La présence de Vpu et de Pr55^{Gag} a été révélée par autoradiographie. Les bandes obtenues par autoradiographie ont été quantifiées à l'aide d'un densitomètre de Molecular Dynamics, en utilisant le programme ImageQuantTM.

6. Déplétion du cholestérol

Le méthyl-β-cyclodextrine permet d'extraire le cholestérol de la membrane plasmique des cellules (126). Pour déterminer la concentration optimale de MβCD (Sigma) à utiliser, les cellules ont été cultivées pendant 48 heures dans du milieu DMEM sans sérum additionné de 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont ensuite été décollées des pétris avec du PBS-EDTA, puis comptées pour avoir des échantillons de 0,5 X 10⁶ cellules. Les cellules ont été laissées en présence de 5 mM, 10 mM, 15 mM ou 20 mM de MβCD pour 30 minutes, toujours dans du DMEM sans sérum additionné de 1 % pénicilline/streptomycine. Lors des expériences de mesure de la relâche virale en présence de MβCD, les cellules ont été cultivées pendant 32

heures, après les transfections, dans du milieu DMEM additionné de 10 % de sérum fœtal de bovin et de 1 % pénicilline/streptomycine, puis elles ont été cultivées pendant 16 heures dans du milieu DMEM sans sérum additionné de 1 % pénicilline/streptomycine. Les cellules ont ensuite été traitées avec 10 mM de M β CD pour la période de privation de 30 minutes précédant le marquage métabolique, puis avec 2 mM de M β CD pendant le marquage métabolique de 5 heures avec le ³⁵S-translabel.

La simvastatin inhibe l'enzyme HMG-CoA réductase, ce qui bloque la biosynthèse du cholestérol (126). La simvastatin (Calbiochem) a été activée tel que décrit précédemment (85), avec quelques modifications. 25 mg de simvastatin ont été dissous dans 0,5 mL d'éthanol 95 %, puis 390,9 μ L de NaOH 1 N ont été ajoutés. Le pH a été ajusté avec du HCl 1 N, jusqu'à un pH de 7,2. Le volume a été complété jusqu'à 6,25 mL avec de l'eau distillée, et des aliquots de 1 mL ont été placés à -20°C . Pour déterminer la concentration optimale de simvastatin à utiliser, $0,5 \times 10^6$ cellules ont été cultivées pendant 48 heures dans du milieu DMEM sans sérum additionné de 1 % de pénicilline/streptomycine, en présence de 5 μ M, 10 μ M, ou 20 μ M de simvastatin et 500 μ M de mévalonate (*mevalonic acid lactone*; Sigma), tel que décrit précédemment (126). Lors des expériences de mesure de la relâche virale en présence de simvastatin, les cellules ont été cultivées pendant 24 heures avec du milieu DMEM additionné de 10 % de sérum fœtal de bovin et de 1 % pénicilline/streptomycine. Environ 16 heures après transfection, le milieu a été changé et les cellules ont été cultivées pour environ 32 heures dans du milieu DMEM sans sérum additionné de 1 % pénicilline/streptomycine, en présence de 5 μ M simvastatin et de 500 μ M mévalonate. Les cellules ont ensuite été mise en privation pendant 30 minutes dans du milieu DMEM sans cystéine ni méthionine, et ont subi un marquage métabolique au ³⁵S-translabel pour une période de 16 heures, toujours en présence de 5 μ M simvastatin et de 500 μ M mévalonate. L'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase entraîne normalement un arrêt de croissance et un changement morphologique des cellules. Le mévalonate est le produit de la réaction catalysée par l'enzyme HMG-CoA réductase,

et son ajout dans le milieu de culture permet de minimiser les effets de la simvastatin (48).

7. Coloration à la filipin

Les cellules HeLa traitées avec différentes concentrations de M β CD et de simvastatin ont été colorées avec la filipin, un métabolite fongique fluorescent qui se lie au cholestérol (83). Les cellules ont été décollées des pétris avec du PBS-EDTA, rincées avec du PBS froid, puis fixées pour 15 minutes à la température de la pièce avec une solution contenant 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS. Les cellules ont été à nouveau rincées avec du PBS froid, et colorées pour 15 minutes à la température de la pièce avec 400 μ L d'une solution de 125 μ g/mL de filipin (Sigma) dans du PBS. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS froid, et analysées par cytométrie en flux avec un cytomètre LSR (Becton Dickinson). Un laser UV (hélium-cadmium) a été utilisé à une longueur d'onde d'excitation à 325 nm, alors que l'émission a été captée à une longueur d'onde de 510 nm.

8. Immunofluorescence et microscopie

Pour les expériences d'immunofluorescence, trente mille cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles dans des vials de 1 cm de diamètre, et transfectées, 24 heures plus tard, avec 0,5 μ g d'ADN (constructions SVC21/BH10 et SVC21/BH10 Vpu ATG-). Après 48 heures, les cellules ont été fixées pour 30 minutes à la température de la pièce avec une solution contenant 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS. Elles ont ensuite été perméabilisées pour 10 minutes à la température de la pièce avec une solution de PBS contenant 0,2 % Triton X-100, puis traitées pour 10 minutes à la température de la pièce avec une solution de chlorure d'ammonium (50 mM NH₄Cl). La fixation des cellules avec la paraformaldéhyde génère des groupements aldéhydes libres qui peuvent causer une autofluorescence des cellules. Le chlorure d'ammonium bloque les groupements aldéhydes libres, ce qui diminue l'autofluorescence des cellules (http://www.emlab.ubc.ca/p_fluore.htm). Les cellules ont été incubées pour 2 heures à 37°C dans un environnement humide, avec différents anticorps dilués dans du PBS contenant 2 % de lait écrémé : anticorps de lapin anti-Vpu 4H₁₀LC-KLH (dilution

1:500), anticorps de lapin anti-p24 (dilution 1:1000), anticorps de souris anti-p24 (dilution 1:1000), et anticorps de souris anti-p17 (dilution 1:10). Les cellules ont été lavées pour trois périodes de 5 minutes avec du PBS à la température de la pièce. Ensuite, elles ont été incubées pour 40 minutes à la température de la pièce à l'abri de la lumière avec un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (dilution 1:500 dans du PBS), ou avec un anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de souris et couplé à Alexa Fluor® 594 (dilution 1:500 dans du PBS). Les cellules ont été lavées avec du PBS, puis elles ont été colorées avec une solution de DAPI (dilution 1:1000 dans du PBS) pour 5 minutes à la température de la pièce, afin de colorer les noyaux. Finalement, les cellules ont été lavées durant 3 périodes de 5 minutes avec du PBS. Les lamelles ont été montées sur des lames, puis placées à -20°C pour au moins 24 heures. Les images ont été obtenues à l'aide d'un système Zeiss Cell Observer équipé d'un microscope Axiovert 200 M, en utilisant un objectif 100X à immersion d'huile. Les images ont subi une déconvolution digitale à l'aide du logiciel Axio Vision 3.1, en utilisant la méthode de déconvolution Nearest Neighbor.


Résultats

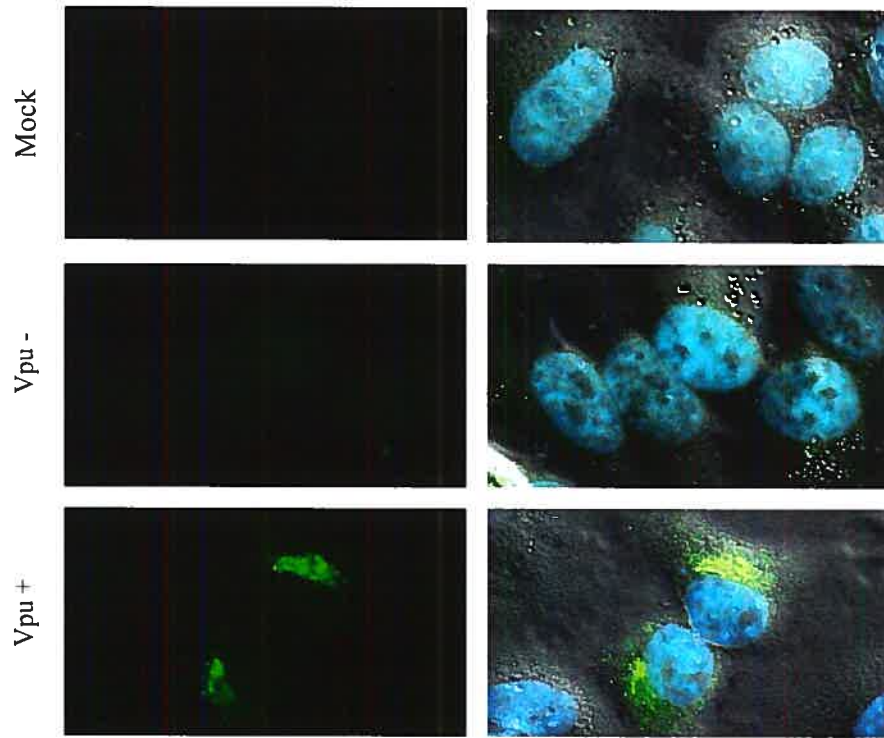
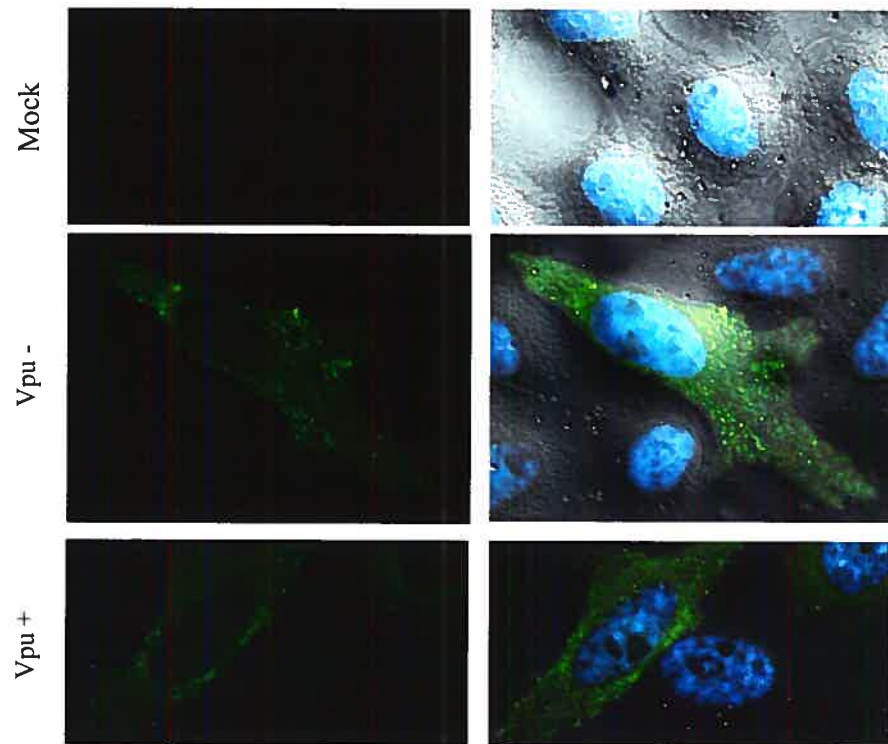
Effet de la protéine Vpu sur la localisation intracellulaire de Gag et l'assemblage viral

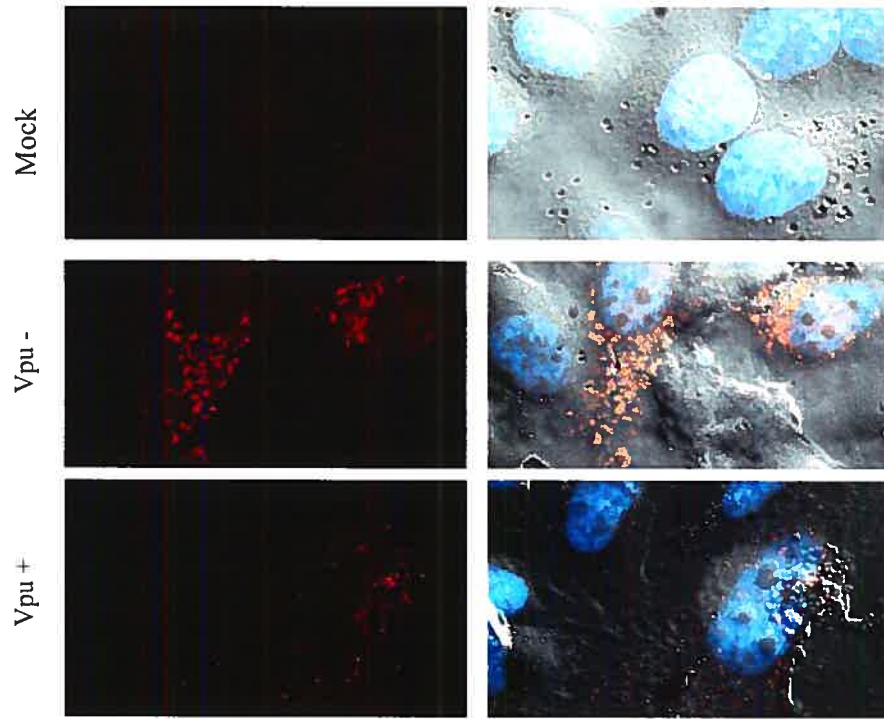
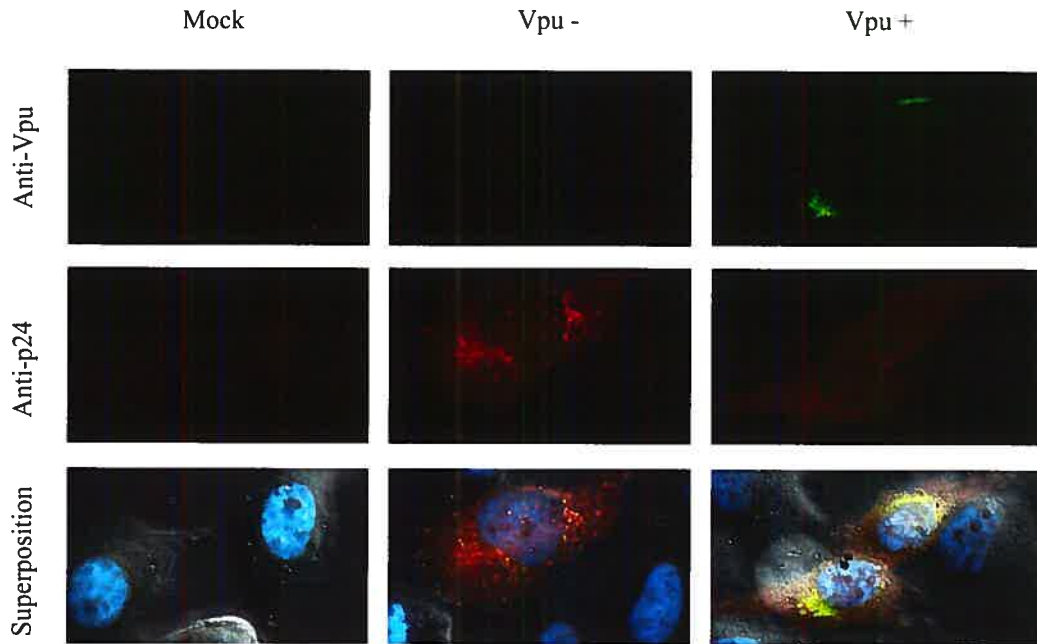
Nous avons voulu vérifier l'effet de Vpu sur la localisation de Gag dans le contexte d'un virus infectieux. Dans ce contexte, le précurseur Pr55^{Gag} est clivé au moment de la relâche des virus. Nous avons donc procédé à des expériences d'immunofluorescence afin de visualiser des différences dans la localisation intracellulaire de Gag lors de l'assemblage viral, en absence et en présence de Vpu. De plus, nous avons voulu vérifier une possible colocalisation de Vpu et de Gag. Des cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles, puis ont été transfectées avec les constructions provirales SVC21/BH10 et SVC21/BH10 Vpu ATG-. Après 48 heures, les cellules ont été fixées puis incubées avec différents anticorps reconnaissant les protéines p24, p17 et Vpu. Les anticorps dirigés contre la protéine p24 reconnaissent le précurseur Pr55^{Gag} et la protéine p24 mature, alors que l'anticorps dirigé contre la protéine p17 ne reconnaît que la protéine p17 mature. La protéine p17 n'étant produite qu'au moment de la maturation virale, elle nous permet de visualiser les sites d'assemblage et de relâche du virus. Les protéines ont été détectées en utilisant des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, et visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les images obtenues sont présentées à la figure 15, et sont représentatives de la majorité des cellules observées pour chacun des marquages. D'abord, nous pouvons remarquer que la protéine Vpu est principalement localisée dans la région périnucléaire (Fig. 15A). En absence de Vpu, il y a une accumulation intracytoplasmique de la protéine p24, celle-ci semblant se localiser sous forme de granules dans le cytoplasme (Fig. 15B et D, Vpu-). En présence de Vpu, la protéine p24 présente cependant une localisation beaucoup plus diffuse dans le cytoplasme, avec une diminution importante de l'apparence granulaire et du signal (Fig. 15B et D, Vpu+). En ce qui concerne la protéine p17, elle semble également s'accumuler dans le cytoplasme de la cellule en absence de Vpu, avec une granulation semblable à celle obtenue pour la protéine p24 (Fig.15C et E, Vpu-). Toutefois, lorsque Vpu est

présente, il y a une forte diminution du signal pour la protéine p17 (Fig. 15C et E, Vpu+), bien que l'on puisse distinguer une localisation de la p17 au niveau de la membrane plasmique (Fig. 15E, Vpu+). Finalement, les images présentées aux figures 15D et 15E montrent que la protéine Vpu ne colocalise pas avec la protéine p24, ni avec la protéine p17, respectivement. Ce résultat supporte l'idée que Vpu agit de façon indirecte sur Gag pour augmenter la relâche virale (63).

Figure 15. Effet de Vpu sur la localisation de Gag et l'assemblage viral. Des cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles et transfectées avec 0,5 µg d'ADN (constructions provirales SVC21/BH10 et SVC21/BH10 Vpu ATG-). Après 48 heures, elles ont été fixées pendant 30 minutes à la température de la pièce avec une solution de PFA 4 % dans du PBS. Après un traitement de 10 minutes à la température de la pièce avec une solution de 0,2 % Triton X-100, et un traitement de 10 minutes avec une solution de 50 mM de chlorure d'ammonium, toujours à la température de la pièce, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires pendant 2 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 40 minutes à la température de la pièce et à l'abri de la lumière, avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, pour finalement être colorées au DAPI pendant 5 minutes à la température de la pièce. Les protéines ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

- A. Détection de la protéine Vpu. Les cellules ont été incubées avec un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Vpu, et incubées de nouveau avec un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (vert).
 - B. Détection de la protéine p24. Les cellules ont été incubées avec un anticorps de lapin dirigé contre la protéine p24, puis avec un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (vert).
 - C. Détection de la protéine p17. Les cellules ont été incubées avec un anticorps de souris dirigé contre la protéine p17, et incubées de nouveau avec un anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de souris et couplé à Alexa Fluor® 594 (rouge).
 - D. Détection de la protéine p24 et de la protéine Vpu. Les cellules ont d'abord été incubées avec un anticorps de souris dirigé contre la protéine p24 et un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Vpu. Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de souris et couplé à Alexa Fluor® 594 (rouge), et avec un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (vert).
- 

A. Anti-Vpu**B. Anti-p24**

C. Anti-p17**D. Anti-p24 et anti-Vpu**

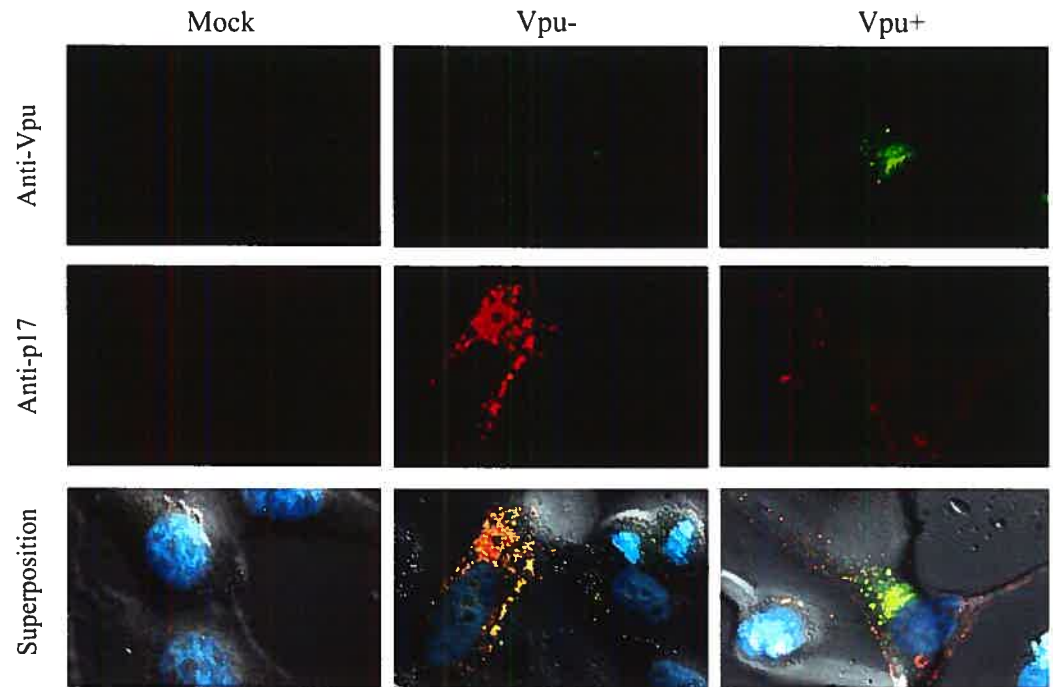
E. Anti-p17 et anti-Vpu

Fig. 15E. Détection de la protéine p17 et de la protéine Vpu. Les cellules ont d'abord été incubées avec un anticorps de souris dirigé contre la protéine p17 et un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Vpu. Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de souris et couplé à Alexa Fluor® 594 (rouge), et avec un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à Alexa Fluor® 488 (vert).

La protéine Vpu permet une relâche accrue de Pr55^{Gag} à partir de cellules HeLa

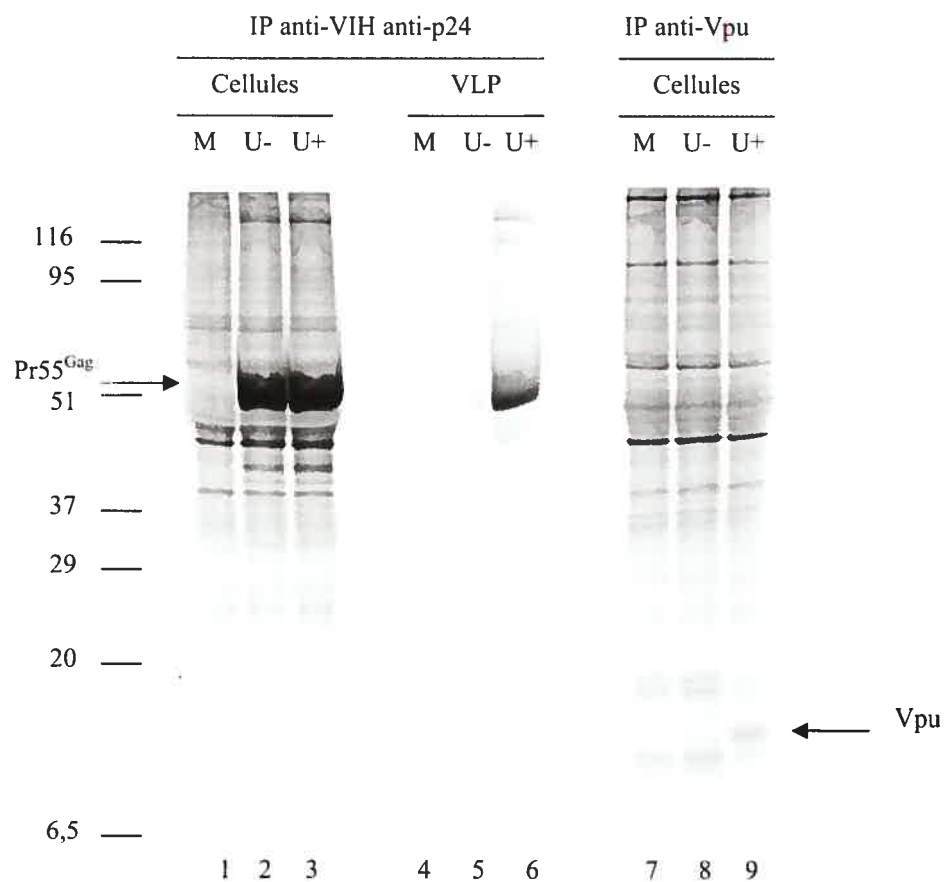
Il a été démontré par plusieurs groupes que la protéine Vpu permettait une augmentation de la relâche virale à partir de cellules HeLa (63, 94, 130, 140, 152, 170, 181). De plus, Vpu peut augmenter la relâche virale en absence des glycoprotéines d'enveloppe (181) et de la protéase virale (63, 94). Nous avons donc voulu confirmer la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale à partir de cellules HeLa, dans le contexte de constructions provirales PR- et Env-. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions provirales SVC21 Vpu- Env- PR- et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-, isogéniques pour l'expression de Vpu, puis marquées au ³⁵S-translabel. La protéine Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée à partir des lysats de cellules et de VLP afin de déterminer l'efficacité de la relâche virale. La figure 16A nous montre que la quantité de Pr55^{Gag} associée aux VLP est plus importante avec la construction provirale SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR- qu'avec la construction SVC21 Vpu- Env- PR- (Fig. 16A, comparer les lignes 5 et 6). Une analyse quantitative par densitométrie nous a permis de calculer un pourcentage de relâche 8,5 fois plus élevé pour SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-, comparativement à SVC21 Vpu- Env- PR- (Fig. 16B). Nous aurions peut-être pu nous attendre à ce que la quantité de Pr55^{Gag} associée aux cellules soit plus importante en absence de Vpu, par rapport à la quantité retrouvée en présence de Vpu (Fig. 16A, comparer lignes 2 et 3). Cependant, bien que la quantité de Pr55^{Gag} relâchée en présence de Vpu soit plus importante, d'autres groupes ont observé des niveaux similaires de Pr55^{Gag} associés aux cellules en absence et en présence de Vpu (63, 94). Également, une immunoprécipitation effectuée avec un anticorps dirigé contre Vpu nous a permis de montrer que cette protéine est exprimée uniquement dans les cellules transfectées avec la construction SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR- (Fig. 16A, ligne 9). La relâche virale plus importante obtenue avec cette construction provirale serait donc due à la présence de la protéine Vpu.

Figure 16. Effet de Vpu sur la relâche de Pr55^{Gag} dans les cellules HeLa.

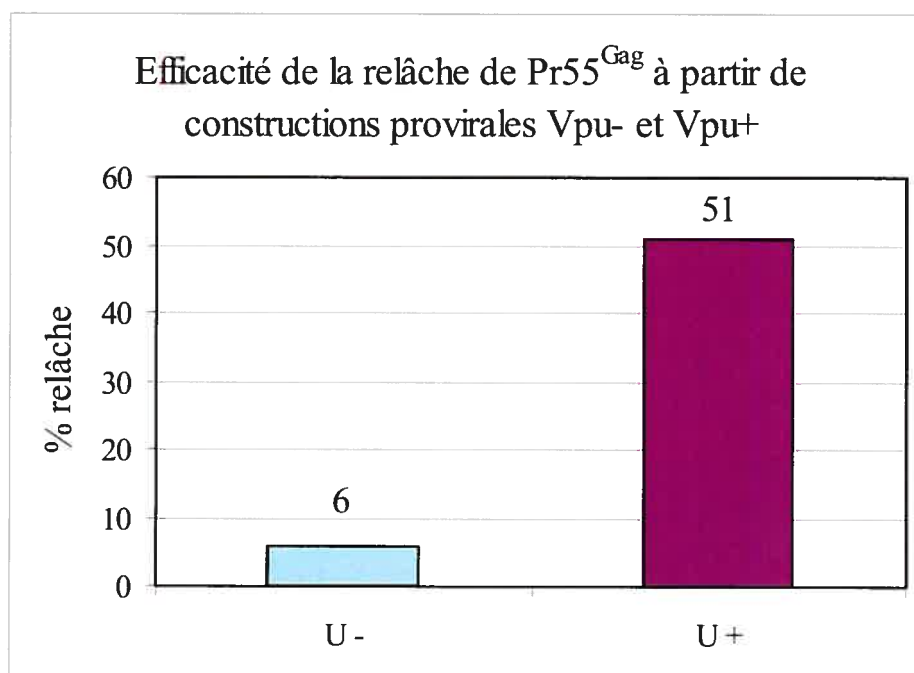
- A.** Des cellules HeLa ont été non transfectées (lignes 1, 4 et 7) ou transfectées avec les constructions SVC21 Vpu- Env- PR- (U-, lignes 2, 5 et 8) et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR- (U+, lignes 3, 6 et 9). Après un marquage métabolique au ³⁵S-translabel, la protéine Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires et des VLP à l'aide d'un sérum provenant d'un individu infecté par le VIH-1 et d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine p24. La protéine Vpu a été immunoprécipitée des lysats cellulaires à l'aide d'un anticorps dirigé contre Vpu. Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie.
- B.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage de relâche virale pour chacune des constructions. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant à Pr55^{Gag} sur l'autoradiogramme présenté à la figure 16A a été mesurée. La densité obtenue pour chacune des bandes a été considérée comme étant la quantité de protéine présente dans chaque cas. Les quantités ainsi obtenues ne sont donc pas les quantités réelles de protéine récupérée, mais cela nous permet tout de même de comparer entre eux les différents échantillons. Le pourcentage de relâche virale a ensuite été calculé en divisant la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans les VLP par la quantité totale de Pr55^{Gag} (quantité retrouvée dans les cellules additionnée à la quantité retrouvée dans les VLP).



A.



B.



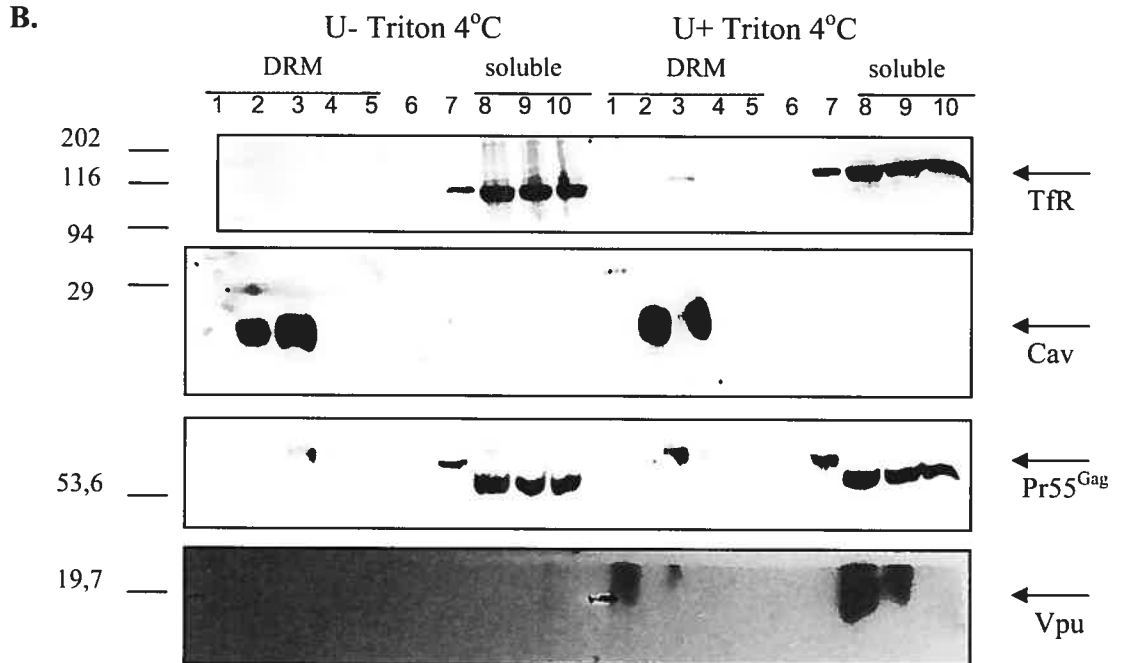
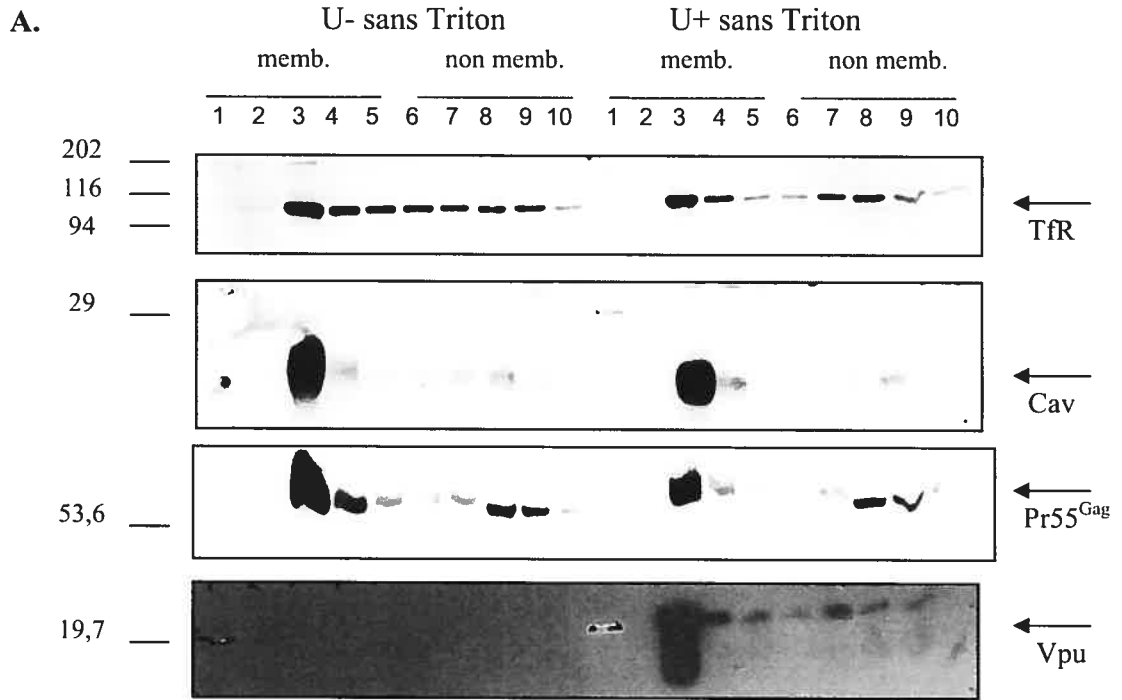
Effet de Vpu sur le ciblage du précurseur Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques

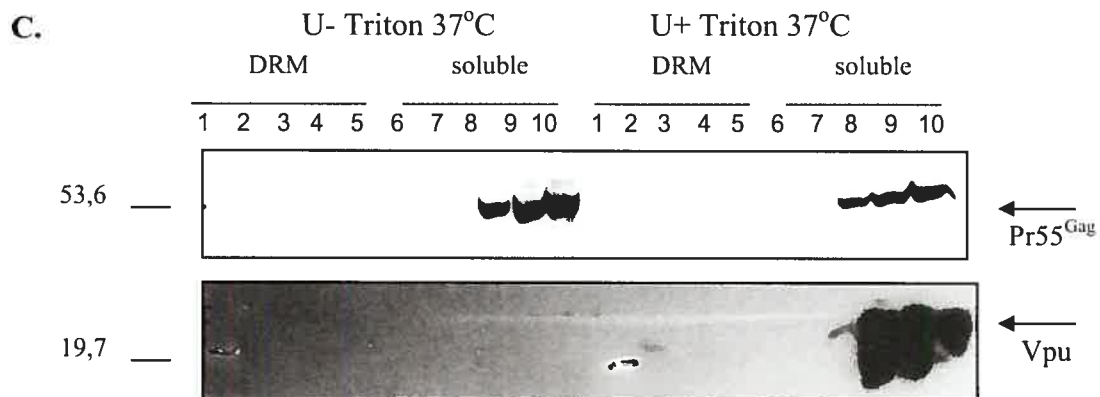
Les expériences de microscopie à fluorescence nous ont permis de constater que, dans le contexte d'un virus infectieux, Vpu permet une localisation de la protéine p17 au niveau de la membrane plasmique. De plus, nous savons que les radeaux lipidiques sont, entre autres, retrouvés à la membrane plasmique (19). Notre hypothèse de travail est que Vpu, pour augmenter la relâche virale, permettrait d'accroître la quantité de Pr55^{Gag} présente dans les radeaux lipidiques. Puisque Vpu peut augmenter la relâche virale en absence des glycoprotéines d'enveloppe (181) et de la protéase virale (63, 94), nous avons choisi de tester notre hypothèse en isolant les radeaux lipidiques à partir de cellules HeLa dans le contexte d'un virus Env- et PR-. Des cellules HeLa ont donc été transfectées avec les constructions SVC21 Vpu- Env- PR- et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-, lysées par sonication, puis les lysats cellulaires ont été homogénéisés et traités avec ou sans Triton X-100, à une concentration finale de 0,125 %, afin d'isoler les radeaux lipidiques des membranes cellulaires. Chacun des échantillons traités a été soumis à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose afin de séparer les différents constituants selon leur densité. En absence de Triton X-100, les membranes, ayant une plus faible densité, flottent dans le gradient au niveau des faibles densités de saccharose. En présence de Triton X-100, les domaines membranaires résistants au détergent, désignés DRM, ont une plus faible densité, et se retrouvent flottant dans le haut du gradient, alors que les membranes ayant été solubilisées par le détergent ont une plus forte densité et se retrouvent au fond du gradient. Pour chacun des gradients, 10 fractions ont été récupérées et numérotées 1 à 10, du haut du gradient vers le bas du gradient, les fractions 1 à 5 étant considérées comme les fractions contenant les membranes ou les DRM, selon l'absence ou la présence de détergent. Les protéines contenues dans chacune des fractions ont été séparées par SDS-PAGE, puis analysées par immunobuvardage. D'abord, en absence de détergent, les contrôles TfR et Cav sont majoritairement détectés dans le haut du gradient, c'est-à-dire dans les fractions membranaires, autant en absence qu'en présence de Vpu (Fig. 17A, TfR et Cav, U- vs U+). La protéine Pr55^{Gag} se retrouve distribuée dans plusieurs fractions du gradient,

Figure 17. Effet de Vpu sur la localisation de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. Des cellules HeLa ont été transfectées avec SVC21 Vpu- Env- PR- (U-) et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR- (U+), lysées par sonication, homogénéisées et traitées avec ou sans 0,125% Triton X-100 à 4°C ou à 37°C, puis les lysats cellulaires ont été ultracentrifugés sur gradients de saccharose. Les protéines TfR, Cav, Pr55^{Gag} et Vpu ont été détectées par immunobuvardage. Les fractions membranaires (memb.), non membranaires (non memb.), résistantes au détergent (DRM) et solubles au détergent (soluble) sont montrées.

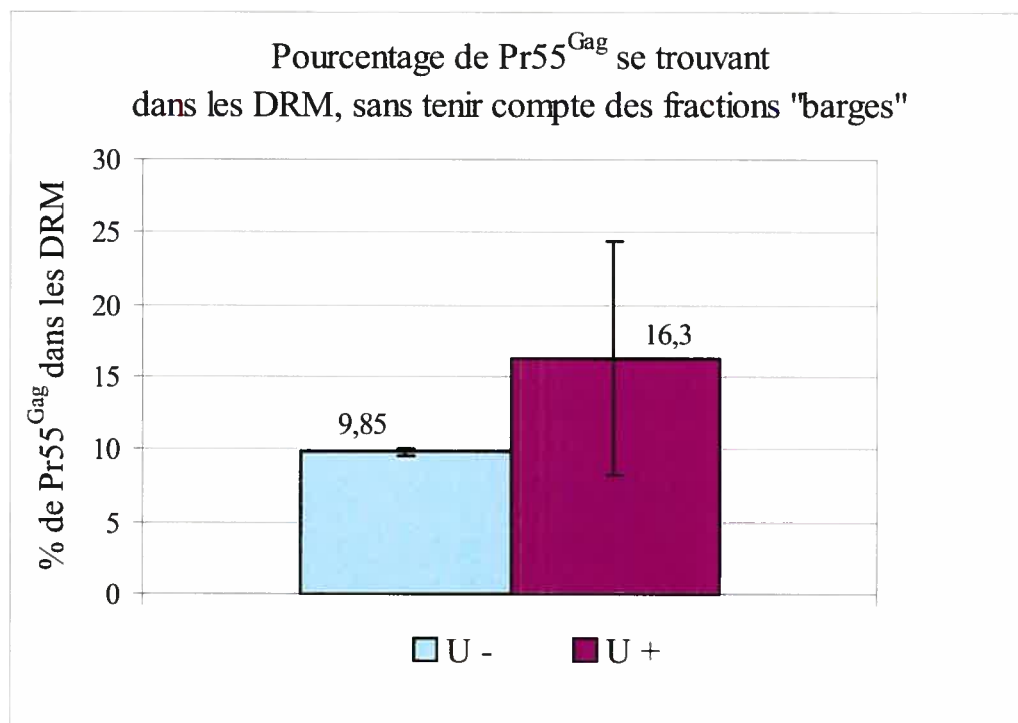
- A. Les lysats cellulaires homogénéisés ont été incubés à 4°C en absence de Triton X-100.
- B. Les lysats cellulaires homogénéisés ont été traités avec une concentration finale de 0,125 % Triton X-100 à 4°C.
- C. Les lysats cellulaires homogénéisés ont été traités avec une concentration finale de 0,125 % Triton X-100 à 37°C.
- D. Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée pour calculer le pourcentage de Pr55^{Gag} dans les fractions DRM. Ce pourcentage a été obtenu en divisant la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans les fractions 1 à 5, considérées comme DRM (Fig. 17B, Pr55^{Gag}), par la quantité totale de Pr55^{Gag} (DRM + soluble). Les pourcentages indiqués représentent la moyenne de deux expériences, et les écart-types ont été calculés à partir de ces moyennes.
- E. Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée pour calculer le pourcentage de Pr55^{Gag} dans les fractions DRM. Dans ce cas-ci, les fractions 1 à 7 ont été considérées comme étant les fractions DRM (Fig. 17B, Pr55^{Gag}). Le pourcentage de Pr55^{Gag} retrouvé dans les DRM a été obtenu en divisant la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans les fractions DRM par la quantité totale de Pr55^{Gag} (DRM + soluble). Les pourcentages indiqués représentent la moyenne de deux expériences, et les écart-types ont été calculés à partir de ces moyennes.



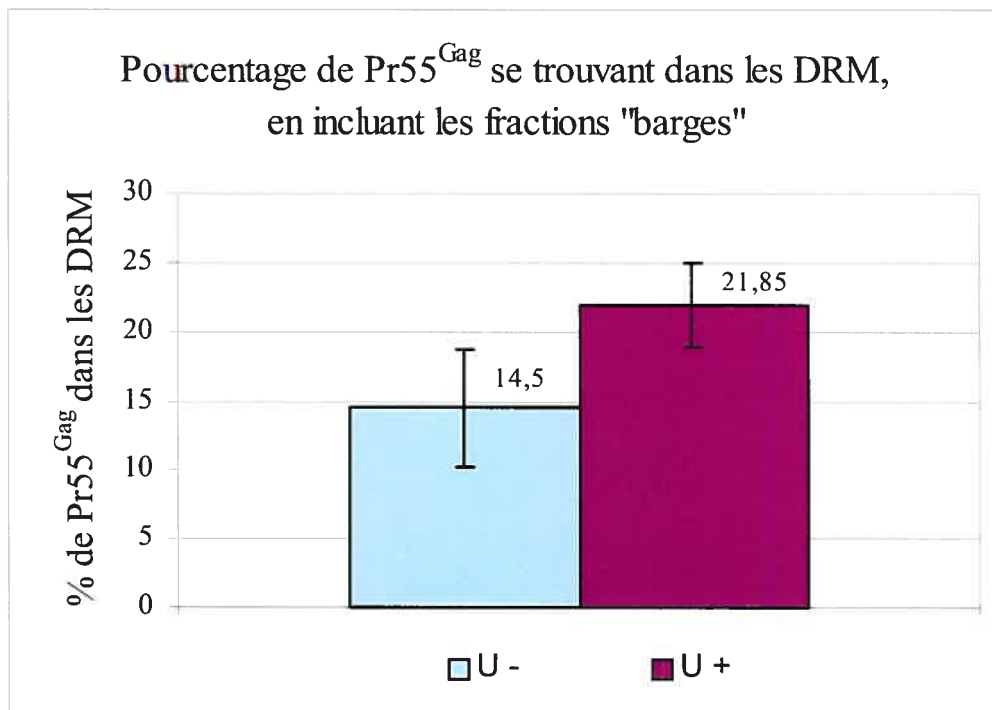




D.



E.



bien qu'elle se retrouve principalement dans les fractions membranaires, indépendamment de la présence de Vpu (Fig. 17A, Pr55^{Gag}, U- vs U+). Pour sa part, la protéine Vpu se situe majoritairement dans les fractions membranaires (Fig. 17A, Vpu, U+). En présence de Triton X-100 à 4°C, le contrôle TfR (non *raft*) se retrouve dans les fractions solubles, alors que le contrôle Cav (*raft*) demeure dans les fractions DRM (Fig. 17B, TfR et Cav, U- vs U+), tel qu'observé précédemment (126). La protéine Vpu est également retrouvée dans des fractions DRM, ainsi que dans des fractions solubles. Cependant, la proportion de Vpu retrouvée dans les fractions DRM est beaucoup moins importante que la proportion de la protéine retrouvée dans les fractions solubles (Fig. 17B, Vpu, U+).

En analysant la distribution de Pr55^{Gag} dans les différentes fractions, en présence de Triton X-100 à 4°C, nous ne pouvons que remarquer la migration plus lente de Pr55^{Gag} dans les fractions 1 à 7, en comparaison avec la migration de Pr55^{Gag} dans les fractions 8 à 10 (Fig. 17B, Pr55^{Gag}, U- et U+). Cette différence de migration de Pr55^{Gag} dans les fractions DRM comparativement aux fractions solubles n'est pas retrouvée dans la littérature (101, 120, 126). Nous pouvons supposer que cette différence au niveau de la migration est due à l'association du Pr55^{Gag} présent dans les fractions DRM avec une protéine de faible poids moléculaire. Cependant, la séparation des protéines contenues dans les différentes fractions ayant été effectuée par SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes, cela nous laisse supposer qu'il s'agit d'une interaction covalente. Pour l'instant, nous ne savons pas quelle pourrait être la protéine associée à Pr55^{Gag} dans les DRM, ni les raisons possibles de cette association. De plus, cette différence au niveau de la migration de Pr55^{Gag} ne se produit qu'en présence de Triton X-100 à 4°C (comparer Fig. 17A et 17B, Pr55^{Gag}). Il a déjà été montré que la présence du Triton X-100 favorise la formation de domaines ordonnés dans les bicouches lipidiques. Il se pourrait donc que le traitement au Triton X-100 ait favorisé l'aggrégation de composants contenus dans les membranes (69). Il n'est donc pas exclu qu'une association entre Pr55^{Gag} et une autre protéine au niveau des DRM ne soit due qu'à l'action du Triton X-100, et ne soit pas le reflet de ce qui se passe au niveau des membranes cellulaires.

Pour déterminer la proportion de Pr55^{Gag} se retrouvant dans les fractions DRM, nous avons procédé à une analyse quantitative par densitométrie. La densité des bandes correspondant à Pr55^{Gag} a été mesurée à l'aide d'un densitomètre. Le pourcentage de Pr55^{Gag} se trouvant dans les DRM a été calculé en divisant la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans les fractions DRM, par la quantité de Pr55^{Gag} totale (fractions DRM + solubles). Nous avons d'abord considéré les fractions 1 à 5 comme étant les fractions DRM, puisque c'est dans ces mêmes fractions que se trouve la protéine contrôle cavéoline (*raft*), après traitement au Triton X-100 à 4°C (Fig. 17B, Cav, U- et U+). En absence de Vpu, 9,85 % des précurseurs Pr55^{Gag} sont retrouvés dans les fractions DRM, alors que 16,3 % des précurseurs Pr55^{Gag} sont retrouvés dans ces fractions, en présence de Vpu (Fig. 17D). Il y aurait donc 1,6 fois plus de Pr55^{Gag} dans les DRM en présence de Vpu. Cependant, il s'agit des résultats moyens obtenus à partir de seulement deux expériences. De plus, la grande marge d'erreur pour U+ (Fig. 17D) nous laisse croire que la différence observée entre U- et U+ n'est pas suffisamment grande pour être considérée comme réelle.

Afin de déterminer la proportion de Pr55^{Gag} se retrouvant dans les fractions DRM, nous avons également considéré les fractions 1 à 5, ainsi que les fractions 6 et 7, plus denses, comme étant des fractions DRM. En effet, les multimères de Gag sont retrouvés dans des fractions de plus forte densité, désignées « barges » (101). De plus, le fait que la Pr55^{Gag} retrouvée dans la fraction 7 migre à la même hauteur que dans la fraction 3 (Fig. 17B, Pr55^{Gag}, U- vs U+) nous porte à croire que la protéine Pr55^{Gag} retrouvée dans la fraction 7 se trouve en fait dans des « barges » DRM. Une analyse densitométrique nous a permis de calculer qu'en absence de Vpu, 14,5 % des précurseurs Pr55^{Gag} sont retrouvés dans les fractions DRM, alors qu'en présence de Vpu, 21,85 % de ces précurseurs sont retrouvés dans ces mêmes fractions (Fig. 17E). En présence de Vpu, il y aurait alors 1,5 fois plus de Pr55^{Gag} localisé dans les DRM. Les marges d'erreur pour U- et U+ ne se chevauchent pas (Fig. 17E), la différence observée pourrait donc être considérée suffisamment importante pour être réelle. Toutefois, ces résultats ne sont la moyenne que de deux expériences. Bien qu'il semble y avoir un léger enrichissement de Pr55^{Gag} dans les DRM en présence de Vpu, il est nécessaire d'effectuer d'autres expériences afin de confirmer cette tendance.

Également, la localisation de Pr55^{Gag} et de Vpu dans des fractions solubles en présence de Triton X-100 à 37°C (Fig. 17C) suggère que les protéines retrouvées dans des fractions DRM lors du traitement au détergent à 4°C ne sont pas simplement des multimères non liés aux membranes qui se retrouveraient dans ces fractions à cause de leur densité (126). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que Vpu ne semble pas entraîner un ciblage accru de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques, bien qu'une légère tendance à l'enrichissement de Pr55^{Gag} dans les DRM soit observée en présence de Vpu. D'autres expériences doivent cependant être effectuées afin de déterminer si cet enrichissement en présence de Vpu est bien réel.

Effet de la réduction du cholestérol cellulaire sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu

Les résultats présentés jusqu'à maintenant indiquent que la protéine Vpu permet une augmentation de la relâche virale à partir de cellules HeLa. Cependant, les expériences d'isolement des radeaux lipidiques indiquent que Vpu n'entraîne pas, de façon claire, de ciblage accru de Pr55^{Gag} au niveau des DRM. Il a déjà été démontré qu'une réduction du cholestérol cellulaire, avec pour effet une perte d'intégrité des radeaux lipidiques, entraîne une diminution de la relâche virale (126). Nous avons donc voulu vérifier si la destruction des radeaux lipidiques avait un effet sur la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale. Si Vpu agit au niveau des radeaux lipidiques pour augmenter la relâche virale, la destruction de ceux-ci devrait entraîner des niveaux de relâche équivalents en absence et en présence de Vpu. Par contre, si Vpu n'agit pas au niveau des radeaux lipidiques, leur destruction ne devrait pas empêcher la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale.

Une des méthodes employées pour réduire le cholestérol cellulaire est le traitement des cellules avec la méthyl- β -cyclodextrine, un sucre cyclique qui, par son affinité pour le cholestérol, permet son extraction de la membrane plasmique des cellules traitées (126). Pour déterminer la concentration optimale de méthyl- β -cyclodextrine à utiliser, nous avons d'abord traité des cellules HeLa avec différentes concentrations de

cette drogue, puis nous avons coloré ces cellules avec la filipin, un métabolite fongique fluorescent se liant au cholestérol (83). Les cellules traitées et colorées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux, afin de connaître la moyenne de fluorescence obtenue pour chacune des concentrations de M β CD testée. Les niveaux de cholestérol cellulaire sont alors proportionnels à la fluorescence mesurée. La figure 18A présente les pourcentages de fluorescence mesurés pour des concentrations de M β CD de 5 mM, 10 mM, 15 mM et 20 mM. À une concentration de 10 mM, il y a une diminution de la fluorescence de 41,6 % par rapport au contrôle. Nous avons choisi d'utiliser cette concentration de M β CD, celle-ci étant la plus petite concentration de M β CD nous permettant d'obtenir une diminution de la fluorescence autour de 50 %, tel qu'obtenu précédemment (126).

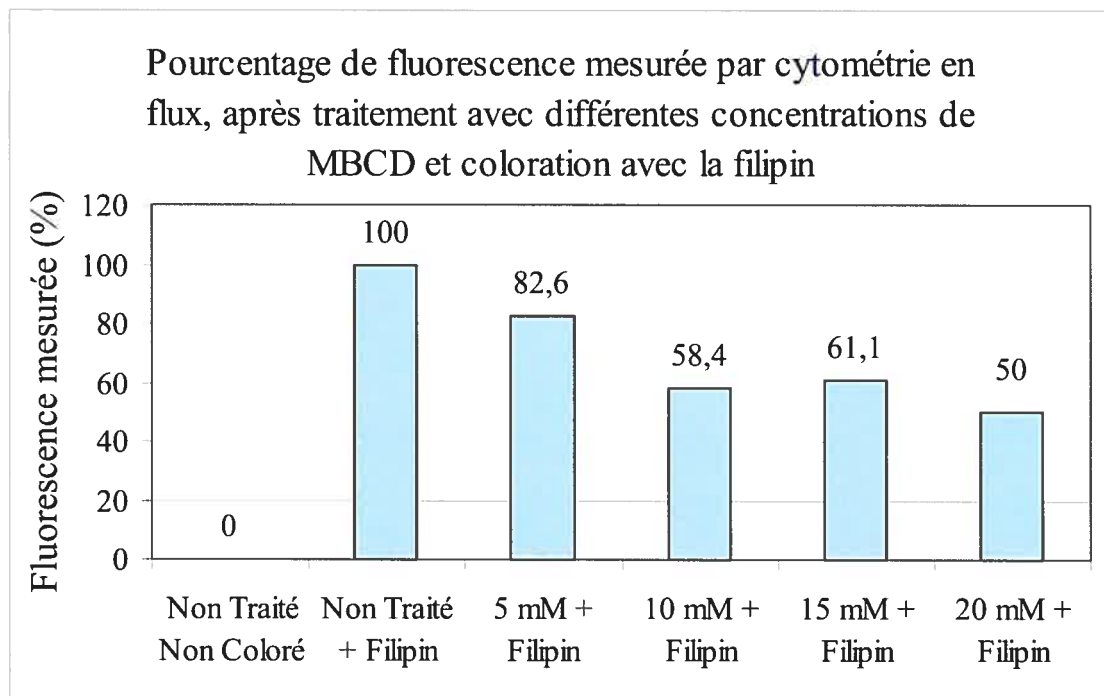
Pour vérifier l'effet de la M β CD sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu, des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions SVC21 Vpu- Env- PR- et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-. Après 48 heures, les cellules ont été traitées ou non avec 10 mM de M β CD pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été marquées au ³⁵S-translabel pendant 5 heures, en présence ou non de 2 mM de M β CD. Les cellules ont été lysées, et les VLP ont été récupérées des surnageants de culture. La protéine Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée à partir des lysats de cellules et de VLP. En absence de M β CD, la présence de Vpu permet une augmentation de la relâche virale de 3 fois en comparaison avec l'absence de Vpu (Fig. 18B, comparer les lignes 7 et 9; Fig. 18C). Lorsque les cellules sont traitées avec la M β CD, les pourcentages de relâche virale sont diminués de 3 fois, autant en absence qu'en présence de Vpu. Cependant, les cellules transfectées avec la construction Vpu+ ont relâché 3 fois plus de Pr55^{Gag} que les cellules transfectées avec la construction Vpu-, soit dans les mêmes proportions que pour les cellules non traitées (Fig. 18B, lignes 8 et 10; Fig. 18C). Ces résultats indiquent que l'effet de Vpu sur la relâche virale n'est pas affecté par la destruction des radeaux lipidiques à la membrane plasmique. Cela suggère que Vpu, pour augmenter la relâche virale, pourrait agir sur la protéine Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques de membranes intracellulaires, avant sa localisation à la membrane plasmique.

Figure 18. Effet de la méthyl- β -cyclodextrine sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu.

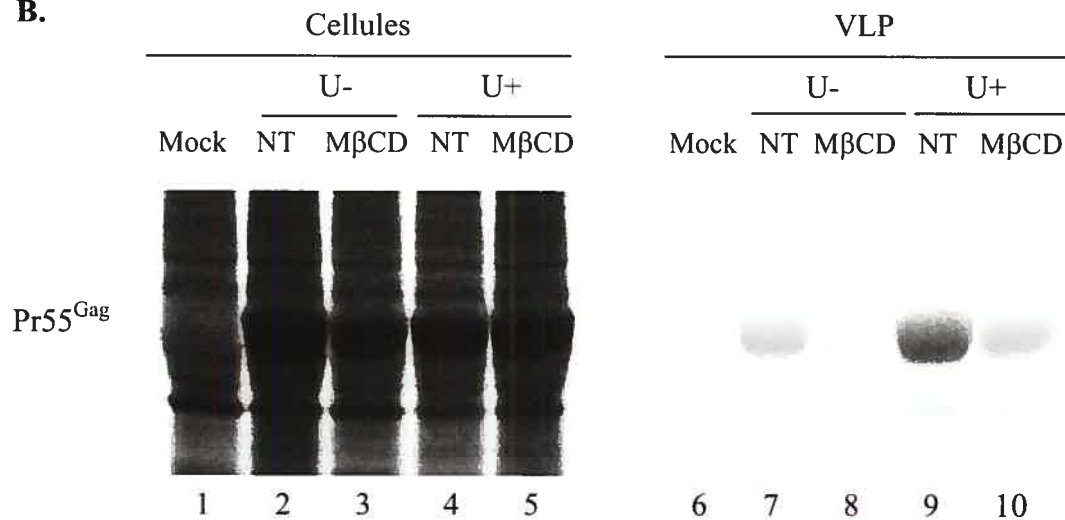
- A.** Détermination de la concentration de M β CD à utiliser. Des cellules HeLa ont été traitées ou non avec 5 mM, 10 mM, 15 mM et 20 mM de M β CD pendant 30 minutes à 37°C. Elles ont ensuite été fixées à la température de la pièce pendant 15 minutes avec une solution de PFA 4 % dans du PBS. Les cellules fixées ont été colorées avec une solution de filipin à 125 μ g/mL dans du PBS. La fluorescence émise par les cellules a été mesurée par cytométrie en flux. Les pourcentages de fluorescence ont été calculés en divisant la moyenne de fluorescence obtenue avec les différents échantillons par la moyenne de fluorescence obtenue avec les cellules contrôles non traitées et colorées. Cette expérience a été faite une fois.
- B.** Mesure de la relâche de Pr55^{Gag} à partir de cellules HeLa, en présence ou en absence de Vpu, avec ou sans traitement à la M β CD. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions provirales SVC21 Vpu- Env- PR- et SVC21/BH10 Vpu+ Env- PR-. Après 48 heures, les cellules ont été traitées avec 10 mM de M β CD pendant la période de privation de 30 minutes précédant le marquage métabolique, puis elles ont été traitées avec 2 mM de M β CD pendant le marquage métabolique de 5 heures avec le ³⁵S-translabel. La protéine Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires et des VLP à l'aide d'un sérum anti-VIH et d'un anticorps dirigé contre la protéine p24. Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie. Cette expérience a été faite une fois.



A.



B.



C.

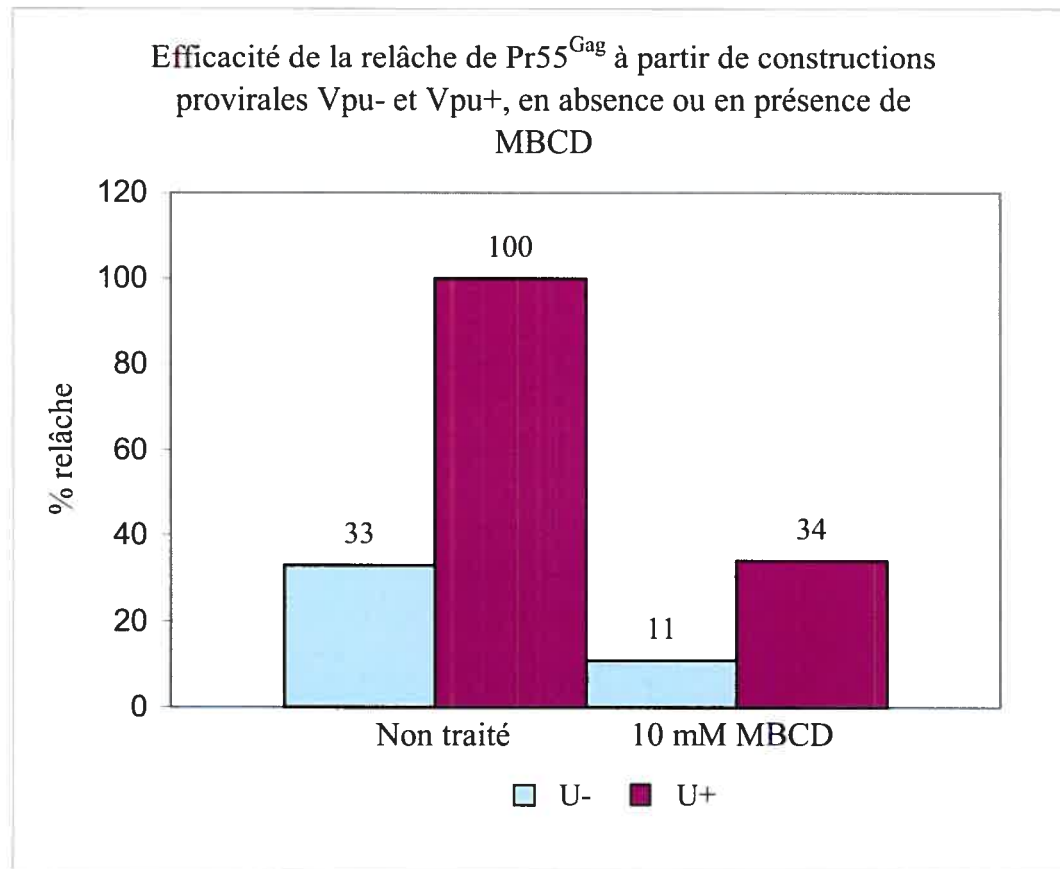


Figure 18C. Analyse densitométrique des bandes obtenues pour Pr55^{Gag} à la figure 18B. Le pourcentage de relâche virale a été calculé en divisant la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans les VLP par la quantité totale de Pr55^{Gag} (quantité retrouvée dans les cellules additionnée à la quantité retrouvée dans les VLP). Les pourcentages de relâche sont exprimés par rapport au pourcentage de relâche calculé pour l'échantillon Vpu+ non traité (Fig. 18B, lignes 4 et 9), ce dernier étant considéré comme ayant 100 % de relâche virale.

La réduction du cholestérol au niveau de la membrane plasmique n'ayant pas d'effet sur la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale, nous avons voulu vérifier si la réduction du cholestérol au niveau de membranes intracellulaires affecte l'augmentation de la relâche par Vpu. La méthyl- β -cyclodextrine permet d'extraire le cholestérol de la membrane plasmique, mais elle n'affecte pas, ou très peu, le cholestérol des membranes intracellulaires. Une autre façon de réduire le cholestérol consiste à traiter les cellules avec la simvastatin, une drogue qui inhibe l'enzyme HMG-CoA réductase impliquée dans la biosynthèse du cholestérol (126). L'inhibition de la synthèse du cholestérol a un effet non seulement sur le cholestérol à la membrane plasmique, mais aussi sur le cholestérol situé à des membranes intracellulaires. Nous avons donc traité des cellules HeLa transfectées avec les constructions SVC21 Vpu-Env-PR- et SVC21/BH10 Vpu+ Env-PR- avec la simvastatin, afin de voir l'effet de cette drogue sur l'augmentation de la relâche virale par Vpu. L'expérience n'a toutefois pas été concluante. Nous savons cependant que le traitement à la simvastatin permet de diminuer de 3,5 fois les niveaux de Pr55^{Gag} relâchés en présence de Vpu (résultats non montrés). Par contre, lorsque la protéine Vpu est absente, les niveaux de Pr55^{Gag} relâchés dans le surnageant de culture sont indétectables, autant pour les cellules non traitées que pour les cellules traitées à la simvastatin (résultats non montrés). Cependant, comme Pr55^{Gag} est relâchée à des niveaux indétectables en absence de Vpu, il est impossible de comparer les pourcentages de relâche obtenus en absence de Vpu avec les pourcentages de relâche obtenus en présence de cette protéine. Nous pouvons toutefois constater que la diminution de la relâche virale en présence de Vpu est du même ordre de grandeur lors de la réduction du cholestérol cellulaire, que ce soit lors d'un traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine (Fig. 18C) ou avec la simvastatin (résultats non montrés). Dans les conditions où nous avons fait l'expérience, il nous est impossible d'arriver à une quelconque conclusion quant à l'effet de la simvastatin sur la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale. Nous ne pouvons donc infirmer ni confirmer la possibilité que Vpu puisse agir sur la protéine Pr55^{Gag} au niveau de membranes intracellulaires, avant son transport à la membrane plasmique.

Discussion

L'assemblage du VIH-1 s'effectuerait au niveau des radeaux lipidiques. Les protéines Gag et Env sont retrouvées dans les radeaux lipidiques (101, 120, 126, 134, 139), et un ciblage accru de la protéine Gag dans ces microdomaines résulte en une augmentation de la production virale (101). Des composants retrouvés dans les radeaux lipidiques (GM1, Thy-1, CD59) sont incorporés dans les particules virales (120). La réduction du cholestérol cellulaire, un constituant important des radeaux lipidiques, a pour effet de diminuer la production virale, et donc de diminuer l'infectivité du VIH-1 (126). La protéine Vpu permet d'augmenter la quantité de particules virales produites (162), et son absence entraîne l'accumulation et le bourgeonnement de virus dans des vacuoles intracellulaires (63, 87, 99). L'augmentation de la relâche virale par Vpu se fait indépendamment de la présence des glycoprotéines d'enveloppe (181) et de la maturation du précurseur Pr55^{Gag} (63, 94). En présence de Vpu, Gag se retrouve davantage dans des fractions membranaires, et il y a une redistribution de Gag du cytosol vers la membrane plasmique (39). Une interaction spécifique entre Vpu et Gag n'est cependant pas requise pour permettre l'augmentation de la relâche par Vpu, suggérant que Vpu permettrait l'augmentation de la relâche virale en modifiant des voies cellulaires existantes (63). De plus, le mécanisme employé par Vpu pour augmenter la relâche est différent de celui employé par p6^{Gag} (152), ce qui suggère que Vpu pourrait fonctionner à une étape précédant le détachement de la particule virale de la membrane cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que Vpu, pour augmenter la relâche virale, pourrait faciliter le ciblage et/ou l'assemblage du précurseur Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques.

D'abord, dans le contexte de virus infectieux, nous avons vérifié l'effet de Vpu sur la localisation et l'assemblage de Gag, dans des cellules HeLa. Les images obtenues à l'aide de la microscopie à fluorescence nous montrent qu'en absence de Vpu, il y a une accumulation des protéines p24 et p17 au niveau du cytoplasme, avec une localisation sous forme granulaire. En présence de Vpu, la protéine p24 est cependant localisée de façon plus diffuse dans le cytoplasme, et il y a une forte diminution du signal autant

pour la protéine p24 que pour la protéine p17, bien qu'il soit possible de distinguer une localisation à la membrane plasmique pour la protéine p17 (Fig. 15B, C, D et E). Également, il y a absence de colocalisation entre Vpu et les protéines p24 et p17 (Fig. 15D et E), renforçant l'idée que Vpu n'interagit pas directement avec Gag pour augmenter la relâche virale (63). Nous avons ensuite vérifié que Vpu permettait d'augmenter la relâche à partir de cellules HeLa en utilisant des constructions provirales déficientes pour les glycoprotéines d'enveloppe et la protéase virale. Nous avons démontré que dans ce contexte, Vpu permet d'augmenter la relâche de particules virales non infectieuses (VLP), en comparaison avec l'absence de Vpu (Fig. 16). Nous avons ensuite utilisé des cellules HeLa transfectées avec les constructions provirales Env- et PR-, et différant pour la présence de Vpu, afin d'isoler les radeaux lipidiques des autres domaines membranaires. Avec cette expérience, nous n'avons pas pu montrer clairement que Vpu permettait un ciblage accru de la protéine Pr55^{Gag} dans des fractions résistantes à la solubilisation au détergent. En considérant les fractions « barges » comme des fractions DRM, il semble cependant y avoir une augmentation de la quantité de Pr55^{Gag} dans les DRM, bien que cette différence ne soit pas très importante (Fig. 17). Nous avons également montré qu'un traitement des cellules avec la méthyl- β -cyclodextrine, permettant l'extraction du cholestérol de la membrane plasmique et donc une réduction des radeaux lipidiques à cet endroit, n'affecte pas la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale (Fig. 18). Cela laisse croire que Vpu pourrait cibler la protéine Pr55^{Gag} à des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires, avant que Pr55^{Gag} n'atteigne la membrane plasmique. Nous avons donc traité les cellules avec la simvastatin, un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol, dans le but de réduire le cholestérol, et par conséquent les radeaux lipidiques, des membranes intracellulaires. Pour les cellules exprimant Vpu, ce traitement a entraîné une diminution de la relâche par rapport aux cellules non traitées. Par contre, pour les cellules n'exprimant pas Vpu, les niveaux de Pr55^{Gag} dans le surnageant sont indétectables, autant pour les cellules non traitées que pour les cellules traitées avec la simvastatin (résultats non montrés). Il nous est alors impossible de calculer les pourcentages de relâche virale en absence de Vpu, ce qui nous empêche de faire une comparaison avec les pourcentages obtenus en présence de Vpu. Nous ne

pouvons donc ni affirmer ni confirmer la possibilité que Vpu puisse augmenter le ciblage de Pr55^{Gag} à des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires.

Localisation intracellulaire de Gag

Les résultats présentés à la figure 15 montrent qu'en absence de Vpu, il y a une accumulation de la protéine de capsid p17 à l'intérieur de la cellule (Fig. 15C et E). Cette protéine n'étant produite que lors du clivage du précurseur Pr55^{Gag} au moment de l'assemblage et de la maturation virale, nous pouvons supposer que l'accumulation de p17 concorde alors avec une accumulation de particules virales dans la cellule. Ce résultat vient confirmer ce qui a déjà été obtenu par plusieurs groupes (63, 87, 99). En présence de Vpu, le marquage pour la p24 est plus diffus dans le cytoplasme, en comparaison avec l'absence de Vpu (Fig. 15B et D). La protéine de capsid p24 permet de marquer à la fois le précurseur Pr55^{Gag} et la protéine p24 mature. En présence de Vpu, il y a une forte diminution du signal pour la protéine p17 (Fig. 15C et E), mais il est toutefois possible d'observer une certaine accumulation de la protéine p17 à la membrane plasmique (Fig. 15E). La protéine p17 identifiant les virus matures, cela nous laisse supposer que le bourgeonnement et la maturation du virus s'effectue à la membrane plasmique en présence de Vpu.

Suite à l'isolement des radeaux lipidiques, nos résultats ne démontrent pas avec certitude que Vpu permet un ciblage accru de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. En présence de Vpu, il y a toutefois une tendance à une augmentation de Pr55^{Gag} au niveau des DRM lorsque les « barges » sont considérés comme faisant partie des DRM. Cette tendance doit par contre être confirmée par d'autres expériences d'isolement des radeaux lipidiques. Les résultats obtenus suite à la déplétion du cholestérol cellulaire montrent que Vpu n'agit pas sur la localisation de Pr55^{Gag} dans des radeaux lipidiques situés à la membrane plasmique, ce qui nous laisse penser que Vpu pourrait agir sur la localisation de Pr55^{Gag} à des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires. Cependant, il nous a été impossible de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. De plus, nous ne pouvons exclure que l'effet observé lors de la déplétion du cholestérol ne soit pas dû à une destruction des radeaux

lipidiques, mais bien à une altération d'autres fonctions cellulaires nécessitant le cholestérol. Pour contourner ce problème, il serait intéressant de voir si les protéines p24 et p17 colocalisent avec des marqueurs de radeaux lipidiques, en présence et en absence de Vpu. Une colocalisation accrue des protéines p24 et/ou p17 avec les marqueurs de radeaux lipidiques, tel le GM1 par exemple, en présence de Vpu, viendrait ainsi renforcer les résultats obtenus suite à l'isolement des radeaux lipidiques. Toutefois, la visualisation des radeaux lipidiques impose leur regroupement en incubant d'abord les cellules avec la choléra toxine B (CTx-B) qui se lie au GM1, pour ensuite incuber les cellules avec un anticorps dirigé contre la CTx-B (91, 132). Le regroupement des radeaux lipidiques ne pouvant se faire qu'à la membrane plasmique, il serait alors impossible de déterminer si Vpu permet un ciblage accru de Pr55^{Gag} à des radeaux lipidiques intracellulaires. Cependant, cette expérience nous permettrait de compléter les données obtenues lors de l'isolement des radeaux lipidiques. Aussi, une proportion de la protéine Vpu se retrouve dans les fractions DRM, bien qu'en moindre importance par rapport à la proportion de la protéine retrouvée dans les fractions solubles (Fig. 17B). Une certaine proportion de Pr55^{Gag} se retrouve également dans les fractions DRM (Fig. 17B). Toutefois, les observations faites à l'aide de la microscopie à fluorescence montrent que Vpu ne colocalise ni avec la protéine p24 ni avec la protéine p17 (Fig. 15D et E). Il serait cependant difficile de montrer une colocalisation de Vpu avec des marqueurs de radeaux lipidiques, puisque Vpu se localise principalement dans la région périnucléaire (Fig. 15A), et que les radeaux lipidiques ne peuvent être visualisés qu'à la membrane plasmique. Dans le cas où des expériences supplémentaires démontreraient que Vpu entraîne une localisation accrue de Pr55^{Gag} dans les radeaux lipidiques, il serait aussi intéressant de vérifier l'effet du mutant de Vpu F8I9, déficient pour l'augmentation de la relâche, sur la localisation intracellulaire des protéines p24 et p17, d'une part, et sur la colocalisation de ces mêmes protéines avec les marqueurs de radeaux lipidiques, d'autre part. De plus, il serait également intéressant de vérifier la localisation intracellulaire de ce mutant de Vpu, afin de voir si la localisation de la protéine a un effet sur sa capacité d'augmenter la relâche virale.

Isolement des radeaux lipidiques

La technique principalement employée pour isoler les radeaux lipidiques des autres composantes de la membrane consiste en l'extraction à l'aide de détergents non ioniques. Les termes DIG (*detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched membranes*) et DRM (*detergent-resistant membranes*) sont employés pour désigner les radeaux lipidiques. Ces microdomaines sont d'ailleurs définis traditionnellement comme étant des domaines membranaires résistants à la solubilisation par 1 % Triton X-100 à de basses températures, et qui flottent à l'interface des densités 5 % saccharose / 30 % saccharose dans un gradient de densité (135). Dans nos expériences d'isolement de radeaux lipidiques, nous avons utilisé une concentration finale de 0,125 % Triton X-100, et des gradients de saccharose formés de trois couches de 85,5 %, 65 % et 10 % de saccharose. Le type de gradient est le même que celui utilisé dans un article de Ono & Freed montrant une localisation de Pr55^{Gag} avec des fractions DRM (126). Les concentrations de saccharose utilisées pour ce gradient ne nous permettent malheureusement pas de discriminer de façon plus fine les densités auxquelles pourraient se retrouver des complexes Gag. Le groupe de M. D. Resh a utilisé un gradient Optiprep comprenant des étages de 50 %, 40 %, 30 %, 20 % et 10 % d'Optiprep, et ils ont montré que Gag se retrouvait dans des fractions de 30-40 % d'Optiprep, alors que les marqueurs de radeaux lipidiques cavéoline et GM1 se retrouvaient dans des fractions de 0-30 % d'Optiprep. Les auteurs ont alors conclu que Gag localisait dans des domaines semblables aux radeaux lipidiques, appelés « barges » (101). Nous avons calculé le pourcentage de Pr55^{Gag} présent dans les fractions DRM de deux façons. Dans l'un de ces calculs, nous avons considéré le Pr55^{Gag} retrouvé dans la fraction 7 de notre gradient comme se trouvant dans des fractions DRM (Fig. 17B), justement par qu'il se retrouvait dans une fraction de plus forte densité, et que nous avons associé cette fraction aux « barges ». Toutefois, il subsiste des réserves à ce rapprochement. D'abord, nous avons fait nos expériences à partir de cellules HeLa, alors que le groupe de M. D. Resh a utilisé des cellules COS-1. Le type de gradient utilisé est également différent. Alors que le groupe de M. D. Resh a utilisé un gradient Optiprep fait de cinq étages (voir plus haut), nous avons utilisé un

gradient de saccharose fait de trois concentrations différentes (voir section Matériel et méthodes). Il serait intéressant de faire l'isolement des radeaux lipidiques en utilisant un gradient ayant plus d'étages, ce qui nous permettrait de mieux définir la localisation de Pr55^{Gag}, et de déterminer si la protéine se retrouve dans les mêmes fractions que les marqueurs de radeaux lipidiques comme la cavéoline. De plus, la protéine Vpu se retrouve également dans des fractions DRM, tout comme la protéine Pr55^{Gag} (Fig. 17B). Cependant, les résultats obtenus en microscopie à fluorescence nous indiquent qu'il n'y a aucune colocalisation entre Vpu et Gag (Fig. 15D et E). En utilisant un gradient composé de plusieurs étages ayant des pourcentages de saccharose plus rapprochés, nous pourrions certainement voir une localisation de Vpu et de Pr55^{Gag} dans des fractions du gradient ayant des densités différentes. Les résultats que nous avons obtenus nous laissent supposer que Vpu permet un ciblage accru de Pr55^{Gag} dans les fractions DRM, bien que la différence entre les pourcentages de Pr55^{Gag} situés aux DRM en présence et en absence de Vpu ne soit pas très importante. Il y a une grande variabilité d'une expérience d'isolement des radeaux lipidiques à l'autre, et il sera donc nécessaire d'effectuer d'autres expériences afin de confirmer ou d'infirmer un effet de Vpu sur la localisation de Pr55^{Gag} aux radeaux lipidiques. Tout en tenant compte des variabilités inhérentes à ces expériences, et sachant qu'une augmentation du ciblage aux « barges » permet une augmentation de la production de VLP (101), l'utilisation d'un gradient permettant une séparation plus fine des protéines nous permettrait de déterminer si Vpu permet d'accroître la quantité de Pr55^{Gag} retrouvée dans des fractions DRM, ou si Vpu augmente le pourcentage de Pr55^{Gag} retrouvé dans les fractions « barges ».

Cependant, la notion de « barges » reste controversée. Dans un article paru plus récemment, Ding *et al.* ont montré que lors de l'extraction avec du Triton X-100, les marqueurs de radeaux lipidiques PLAP et Fyn-GFP se retrouvent à l'interface entre 10 % et 30 % d'un gradient d'iodixanol, alors que Gag-GFP se retrouve à l'interface entre 30 % et 40 %. Les complexes Gag résistants à la solubilisation par le Triton X-100 se situent donc dans des fractions ayant une densité plus élevée que la densité des fractions contenant les marqueurs de radeaux lipidiques, ce qui rejoint le résultat obtenu par le groupe de M. D. Resh. Toutefois, après une extraction du cholestérol

cellulaire avec la méthyl- β -cyclodextrine et la centrifugation sur gradient de densité des lysats cellulaires, le marqueur de radeaux lipidiques Fyn-GFP se retrouve en majorité dans les fractions solubilisées, alors que la densité de flottaison des complexes Gag n'est pas affectée. Les auteurs croient donc que les complexes Gag résistants au détergent ne représentent pas des complexes Gag associés aux radeaux lipidiques (42). Également, Holm *et al.* ont montré que Gag, après une extraction au Triton X-100, se retrouve à l'interface entre 30 % et 40 % d'iodixanol, alors que le marqueur de radeaux lipidiques CD55 se trouve à l'interface entre 5 % et 30 % d'iodixanol. Les domaines retrouvés à l'interface 30-40 % correspondrait encore une fois aux « barges », mais ce groupe a aussi montré que différents types de protéines non associées aux radeaux lipidiques se trouvent également à cette interface. De plus, la localisation de Pr55^{Gag} à l'interface 30-40 % d'iodixanol résiste au traitement avec le Triton X-100 à 37°C. Holm *et al.* croient donc que la localisation de Gag dans des fractions de plus forte densité ne saurait être associée à une localisation au niveau des radeaux lipidiques (75). Cependant, il peut être discutable de comparer entre eux les résultats obtenus par ces trois groupes. En effet, alors que Ding *et al.* ont utilisé des cellules 293T, et Holm *et al.*, des cellules Jurkat, Lindwasser & Resh ont quant à eux utilisé des cellules COS-1 pour déterminer la localisation de Gag dans les radeaux lipidiques. Il a été montré que pour l'utilisation d'un même détergent, la composition des DRM pouvait être différente d'un type cellulaire à un autre (151), ce qui pourrait expliquer les variations entre les résultats de ces trois groupes.

Des détergents autres que le Triton X-100 sont utilisés pour isoler des radeaux lipidiques, tels le Brij 58, le Brij 96, le Brij 98, le Nonidet P40, le CHAPS, le Lubrol WX et le Tween 20 (135, 151). Dans leur article, Holm *et al.* ont d'ailleurs montré que Pr55^{Gag} localisait dans des domaines membranaires sensibles à la solubilisation au Triton X-100, mais résistants à la solubilisation au Brij98, un détergent permettant l'isolement des radeaux lipidiques à 37°C (75). La protéine Pr55^{Gag} se retrouve même dans des fractions de plus faible densité lors de la solubilisation avec le Brij98 (20-25 % iodixanol), comparativement à la densité des fractions où se retrouve Pr55^{Gag} lors la solubilisation au Triton X-100 (30-40 % iodixanol). Par contre, lors de l'utilisation du

Triton X-100, Holm *et al.* ont isolé les radeaux lipidiques à partir de cellules Jurkat, alors qu'ils ont utilisé des cellules 293T pour le traitement au Brij98, ce qui peut sembler difficile à comparer. En utilisant un seul et même type cellulaire, il pourrait alors être intéressant de comparer l'effet de Vpu sur la localisation de Pr55^{Gag} dans les radeaux lipidiques, en utilisant parallèlement le Triton X-100 et le Brij98, pour voir si Vpu ne permettrait pas un enrichissement de Pr55^{Gag} dans des domaines sensibles au Triton X-100 mais résistants au Brij98. Cependant, il a été montré que pour un même type cellulaire, l'utilisation de différents détergents permettent d'isoler différents types de radeaux lipidiques (135). Une même protéine peut se retrouver dans des fractions différentes d'un gradient, selon le détergent utilisé pour la solubilisation des membranes. De plus, le Triton X-100 et le CHAPS sont les détergents les plus fiables pour analyser une association possible avec les radeaux lipidiques (151).

En ce qui concerne le rôle de Vpu, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer que Vpu permet bien d'augmenter la quantité de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. Ensuite, il s'agirait de vérifier l'effet de différents mutants de Vpu sur le ciblage de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. Plusieurs mutants de la partie transmembranaire de Vpu, responsable de la fonction de relâche de la protéine, ont déjà été construits dans notre laboratoire. Un de ces mutants, dont l'isoleucine en position 8 est changée pour une phénylalanine, et la valine en position 9 changée pour une isoleucine, a une capacité réduite d'augmenter la relâche virale, comparativement avec la protéine Vpu de type sauvage. Ce mutant, désigné F8I9, peut induire la dégradation de la molécule CD4 avec la même efficacité que Vpu de type sauvage (168). De plus, la phosphorylation des résidus sérine en position 52 et 56 de Vpu améliore sa capacité d'augmenter la relâche virale, mais elle n'est pas nécessaire à cette fonction (53, 145, 150), alors qu'elle est indispensable pour la dégradation de la molécule CD4 (129, 169). Il serait alors intéressant de vérifier, dans le contexte d'une construction provirale Env- et PR-, la distribution de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques, en présence du mutant de relâche F8I9 et du mutant de phosphorylation S52/56D. Cela nous permettrait d'établir un lien entre l'activité d'augmentation de la relâche virale par Vpu et l'association des protéines de structure du virus aux radeaux lipidiques. Éventuellement, il faudrait déterminer la localisation de Gag avec des

marqueurs de radeaux lipidiques, en absence ou en présence de Vpu, dans des conditions plus physiologiques, en utilisant des cellules T CD4⁺ (MT4, Jurkat) infectées avec des virus Vpu⁻ ou Vpu⁺.

Réduction du cholestérol cellulaire

Si Vpu permet une relâche virale accrue en augmentant le ciblage et/ou l'assemblage de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques, la destruction ou la perturbation de ces microdomaines devrait entraîner une diminution de la relâche par Vpu. Les pourcentages de relâche obtenus en présence de Vpu devraient donc rejoindre les pourcentages obtenus en l'absence de la protéine. La réduction du cholestérol cellulaire est un des moyens utilisé pour altérer les radeaux lipidiques, ceux-ci étant enrichis en cholestérol. Le traitement des cellules avec la méthyl- β -cyclodextrine permet une diminution importante du cholestérol cellulaire, tel que nous l'avons montré à la figure 18A. Le ratio entre les pourcentages de relâche obtenus en présence et en absence de Vpu est resté le même lors du traitement des cellules avec la M β CD, en comparaison avec les cellules non traitées. La M β CD permettant l'extraction du cholestérol de la membrane plasmique, seuls les radeaux lipidiques de cette membrane étaient affectés. Nos résultats suggèrent que Vpu n'agit pas sur la localisation de Pr55^{Gag} dans les radeaux lipidiques situés à la membrane plasmique, puisque leur destruction n'a pas affecté la capacité de Vpu d'augmenter la relâche virale, en comparaison avec l'absence de la protéine. Alors, si Vpu agit bien au niveau des radeaux lipidiques, elle pourrait alors agir sur la localisation de Pr55^{Gag} dans des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires.

Le traitement des cellules à la simvastatin, un inhibiteur de l'enzyme HMG-CoA réductase impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, permet de réduire le cholestérol non seulement à la membrane plasmique, mais aussi aux membranes à l'intérieur de la cellule. Nous avons cependant été incapables de conclure quoi que ce soit de cette expérience, puisque les niveaux de Pr55^{Gag} relâchés en absence de Vpu sont indétectables, autant pour les cellules non traitées que pour celles traitées avec la simvastatin. Il nous est alors impossible de calculer les pourcentages de relâche

obtenus en absence de Vpu, et de les comparer avec ceux obtenus en présence de Vpu. Nous croyons que le problème de détection du Pr55^{Gag} relâché en absence de Vpu peut venir en partie du traitement à la simvastatin. En effet, les cellules ont été cultivées pour 48 heures en présence de simvastatin, dans du milieu sans sérum. Dans leur expérience, Ono et Freed ont utilisé du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS) pour la culture des cellules lors du traitement à la simvastatin (126). Au moment de faire notre expérience, il y avait une pénurie pour ce type de sérum. Nous avons donc choisi de cultiver les cellules en absence de sérum. Dans ces conditions, nous avons obtenu une bonne expression de Pr55^{Gag} dans les cellules (résultats non montrés). À première vue, l'absence de sérum dans le milieu de culture ne semble donc pas poser de problème. Par contre, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que l'absence de sérum affecte la production de VLP. Les niveaux de Pr55^{Gag} relâchés en absence de Vpu étant déjà peu élevés (Fig. 16A), une diminution de la production virale causée par un manque de sérum lors de la culture des cellules pourrait rendre indétectables les niveaux de Pr55^{Gag} relâchés. Cette expérience mériterait donc d'être à nouveau tentée avec, cette fois, du sérum LPDS pour la culture des cellules lors du traitement à la simvastatin. L'utilisation de cellules HeLa transfectées avec des constructions provirales déficientes pour les glycoprotéines d'enveloppe et la protéase virale ne nous permet cependant qu'un seul cycle de production virale, les particules produites étant non infectieuses. De plus, l'efficacité de transfection des cellules HeLa par la méthode du phosphate de calcium est relativement peu élevée en comparaison avec d'autres types cellulaires, comme les cellules 293T par exemple. Cela peut contribuer à des niveaux plus faibles de VLP relâchées. L'utilisation d'une autre méthode de transfection pour les cellules HeLa, FuGene par exemple, pourrait peut-être augmenter le pourcentage de cellules positives et, par conséquent, la quantité de VLP produites. Alternativement, des cellules HeLa-CD4 pourraient être infectées avec des virus Vpu- et Vpu+, et traitées à la simvastatin. L'utilisation de particules virales infectieuses permettrait plusieurs cycles d'infection, augmentant ainsi le nombre de virus relâchés.

En faisant abstraction de la méthode employée, la réduction du cholestérol cellulaire permet de détruire ou de perturber la structure des radeaux lipidiques. Toutefois, cette approche ne tient pas compte des effets négatifs potentiels que pourrait

causer la perte du cholestérol pour d'autres fonctions cellulaires. Si le cholestérol a des fonctions aux membranes autres que la formation des radeaux lipidiques, la déplétion du cholestérol peut affecter ces autres fonctions. Les effets observés, par exemple sur la relâche virale, seraient peut-être imputables à la perturbation de ces autres fonctions, et non seulement à la destruction des radeaux lipidiques. D'ailleurs, des fonctions liées aux propriétés physiques des membranes cellulaires ont été suggérées pour le cholestérol et les sphingolipides, incluant la perméabilité et la fluidité membranaires, ainsi que des interactions spécifiques avec des protéines. Donc, en considérant que le cholestérol est important pour plusieurs propriétés physiques des membranes, et que des processus cellulaires pourraient être affectés à différents degrés par des changements à n'importe laquelle de ces propriétés, les effets liés à la réduction du cholestérol cellulaire peuvent avoir plusieurs causes, la perte des radeaux lipidiques n'étant qu'une de celles-là (118).

Importance de la fonction de relâche

La capacité de la protéine Vpu d'augmenter la relâche virale a de grandes implications au niveau de la pathogénèse et de la propagation du virus. D'abord, la relâche d'un plus grand nombre de particules virales par cellule infectée facilite la dissémination du virus chez l'individu infecté. Plus il y a de virus relâchés, plus grande est la possibilité d'infecter de nouvelles cellules. La propagation facilitée du virus chez un individu infecté pourrait alors accélérer l'évolution de la maladie, puisqu'un plus grand nombre de lymphocytes T CD4⁺ et autres cellules cibles du VIH serait possiblement infectés, entraînant une détérioration plus rapide du système immunitaire. Également, l'infection accrue de nouvelles cellules donne au virus davantage d'occasions de se répliquer. En augmentant les possibilités de nouveaux cycles de réplication, les possibilités de mutations du virus sont aussi accrues. L'enzyme transcriptase inverse, qui génère un fragment d'ADN double brin à partir du génome viral simple brin, n'a pas de fonction de correction, ce qui entraîne de hauts taux de mutations (88). Une capacité de mutation accrue pourrait entraîner une meilleure capacité du virus à résister aux traitements anti-rétroviraux, avec des conséquences sur la santé des patients infectés. La présence d'une protéine Vpu

fonctionnelle est donc importante pour le VIH-1. Dans le contexte d'une infection par le VIH-2, qui ne code pas pour une protéine Vpu, c'est plutôt la protéine Env qui agit comme facilitateur de la relâche virale (10, 12, 15). La fonction d'augmentation de la relâche semble donc être très importante pour la propagation du virus, puisqu'elle est conservée entre les deux types du VIH, et qu'elle peut être exercée par plus d'une protéine.

Conclusion

En résumé, nos résultats ne montrent pas clairement que Vpu permet un ciblage accru du précurseur polyprotéique Gag dans les radeaux lipidiques. Il semble toutefois y avoir une augmentation de la quantité de Pr55^{Gag} dans les radeaux lipidiques en présence de Vpu, mais cette différence n'est pas très importante. D'autres expériences doivent être menées afin de confirmer l'effet de Vpu sur la localisation de Pr55^{Gag} au niveau des radeaux lipidiques. Nos résultats suggèrent également que Vpu ne favorise pas la localisation de Gag à des radeaux lipidiques situés à la membrane plasmique, ce qui nous laisse croire que Vpu pourrait favoriser la localisation de Gag à des radeaux lipidiques situés à des membranes intracellulaires. D'autres expériences doivent cependant être menées afin de confirmer cette hypothèse. Par des expériences de microscopie à fluorescence, nous avons de plus montré que Vpu et Gag ne colocalisaient pas à l'intérieur de cellules HeLa. Nos données indiquent aussi une accumulation de la protéine de capsid p17 à l'intérieur du cytoplasme en absence de Vpu, ce qui renforce des résultats obtenus par d'autres groupes. Un mutant de Vpu ayant une capacité réduite d'augmenter la relâche virale a déjà été construit au laboratoire. Il serait intéressant de vérifier la capacité de ce mutant d'augmenter le ciblage du précurseur polyprotéique Gag dans les radeaux lipidiques. Nous pourrions ainsi établir un lien entre l'activité de relâche de Vpu et l'association de protéines de structure aux radeaux lipidiques. De plus, nous voudrions vérifier la localisation de ce mutant de Vpu, afin d'évaluer l'importance de la localisation de la protéine pour sa capacité d'augmenter la relâche virale. Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre le mécanisme d'action par lequel Vpu facilite la relâche des particules du VIH-1. Compte tenu de l'importance de cette fonction pour la propagation du virus, une meilleure connaissance de la machinerie impliquée dans l'augmentation de la relâche virale par Vpu pourra sans doute permettre de développer de nouvelles stratégies afin de mieux combattre les infections par le VIH-1.

Références bibliographiques

1. **Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi, and K. Strebel.** 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* **194**:1299-311.
2. **Alice, T. M., and W. Popik.** 2004. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **279**:34083-6.
3. **Arold, S. T., and A. S. Baur.** 2001. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci* **26**:356-63.
4. **Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. Sowder, 2nd, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**:1935-8.
5. **Bachand, F., X. J. Yao, M. Hrimech, N. Rougeau, and E. A. Cohen.** 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J Biol Chem* **274**:9083-91.
6. **Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark.** 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* **162**:435-42.
7. **Baur, A.** 2004. Functions of the HIV-1 Nef protein. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:309-13.
8. **Bernstein, H. B., S. P. Tucker, S. R. Kar, S. A. McPherson, D. T. McPherson, J. W. Dubay, J. Lebowitz, R. W. Compans, and E. Hunter.** 1995. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* **69**:2745-50.
9. **Bhattacharya, J., P. J. Peters, and P. R. Clapham.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins that lack cytoplasmic domain cysteines: impact on association with membrane lipid rafts and incorporation onto budding virus particles. *J Virol* **78**:5500-6.
10. **Bour, S., H. Akari, E. Miyagi, and K. Strebel.** 2003. Naturally occurring amino acid substitutions in the HIV-2 ROD envelope glycoprotein regulate its ability to augment viral particle release. *Virology* **309**:85-98.

11. **Bour, S., C. Perrin, H. Akari, and K. Strebel.** 2001. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *J Biol Chem* **276**:15920-8.
12. **Bour, S., U. Schubert, K. Peden, and K. Strebel.** 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**:820-9.
13. **Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol* **69**:1510-20.
14. **Bour, S., and K. Strebel.** 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**:1029-39.
15. **Bour, S., and K. Strebel.** 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* **70**:8285-300.
16. **Bovolenta, C.** 2004. Blocking HIV-1 Vif restores a natural mechanism of intracellular antiviral defense. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:257-63.
17. **Briggs, J. A., T. Wilk, R. Welker, H. G. Krausslich, and S. D. Fuller.** 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* **22**:1707-15.
18. **Brown, D. A., and E. London.** 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:111-36.
19. **Brown, D. A., and E. London.** 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**:17221-4.
20. **Bryant, M., and L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:523-7.
21. **Bukovsky, A. A., T. Dorfman, A. Weimann, and H. G. Gottlinger.** 1997. Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J Virol* **71**:1013-8.
22. **Burniston, M. T., A. Cimarelli, J. Colgan, S. P. Curtis, and J. Luban.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* **73**:8527-40.

23. **Callahan, M. A., M. A. Handley, Y. H. Lee, K. J. Talbot, J. W. Harper, and A. T. Panganiban.** 1998. Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *J Virol* **72**:5189-97.
24. **Camaur, D., and D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* **70**:6106-11.
25. **Cen, S., F. Guo, M. Niu, J. Saadatmand, J. Deflassieux, and L. Kleiman.** 2004. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* **279**:33177-84.
26. **Coady, M. J., N. G. Daniel, E. Tiganos, B. Allain, J. Friborg, J. Y. Lapointe, and E. A. Cohen.** 1998. Effects of Vpu expression on Xenopus oocyte membrane conductance. *Virology* **244**:39-49.
27. **Cochrane, A.** 2004. Controlling HIV-1 Rev function. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:287-95.
28. **Cochrane, A., R. Kramer, S. Ruben, J. Levine, and C. A. Rosen.** 1989. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**:264-6.
29. **Coffin, J. M. H., Stephen H.; Varmus, Harold E.** 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview (NY).
30. **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**:3097-9.
31. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**:11-8.
32. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**:532-4.
33. **Courgnaud, V., B. Abela, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, S. Loul, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2003. Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J Virol* **77**:12523-34.
34. **Courgnaud, V., M. Salemi, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, B. Abela, P. Auzel, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*)

provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**:8298-309.

35. **Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, and et al.** 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**:988-91.
36. **Demirov, D. G., A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2002. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:955-60.
37. **Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze.** 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113 Pt 19**:3365-74.
38. **Deora, A., and L. Ratner.** 2001. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J Virol* **75**:6714-8.
39. **Deora, A., P. Spearman, and L. Ratner.** 2000. The N-terminal matrix domain of HIV-1 Gag is sufficient but not necessary for viral protein U-mediated enhancement of particle release through a membrane-targeting mechanism. *Virology* **269**:305-12.
40. **Derrien, M., N. Pizzato, G. Dolcini, E. Menu, G. Chaouat, F. Lenfant, F. Barre-Sinoussi, and P. L. Bouteiller.** 2004. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* **85**:1945-54.
41. **Deschambeault, J., J. P. Lalonde, G. Cervantes-Acosta, R. Lodge, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* **73**:5010-7.
42. **Ding, L., A. Derdowski, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2003. Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J Virol* **77**:1916-26.
43. **Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, W. Chung, T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2005. Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding. *J Biol Chem* **280**:628-36.
44. **Ewart, G. D., K. Mills, G. B. Cox, and P. W. Gage.** 2002. Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur Biophys J* **31**:26-35.

45. **Ewart, G. D., T. Sutherland, P. W. Gage, and G. B. Cox.** 1996. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* **70**:7108-15.
46. **Feinberg, M. B., D. Baltimore, and A. D. Frankel.** 1991. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:4045-9.
47. **Feng, S., and E. C. Holland.** 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* **334**:165-7.
48. **Fenton, R. G., H. F. Kung, D. L. Longo, and M. R. Smith.** 1992. Regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins. *J Cell Biol* **117**:347-56.
49. **Flint, S. J. E., L.W.; Krug, R.M.; Racaniello, V.R.; Skalka, A.M.** 2000. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press, Washington, D.C.
50. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-62.
51. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1-15.
52. **Freed, E. O., J. M. Orenstein, A. J. Buckler-White, and M. A. Martin.** 1994. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* **68**:5311-20.
53. **Friborg, J., A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1995. Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**:10-22.
54. **Galbiati, F., B. Razani, and M. P. Lisanti.** 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**:403-11.
55. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
56. **Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M. A. Koch.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.

57. **Geraghty, R. J., K. J. Talbot, M. Callahan, W. Harper, and A. T. Panganiban.** 1994. Cell type-dependence for Vpu function. *J Med Primatol* **23**:146-50.
58. **Giacca, M.** 2004. The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:277-85.
59. **Goff, A., L. S. Ehrlich, S. N. Cohen, and C. A. Carter.** 2003. Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol* **77**:9173-82.
60. **Goh, W. C., M. E. Rogel, C. M. Kinsey, S. F. Michael, P. N. Fultz, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and M. Emerman.** 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* **4**:65-71.
61. **Goila-Gaur, R., D. G. Demirov, J. M. Orenstein, A. Ono, and E. O. Freed.** 2003. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* **77**:6507-19.
62. **Gonzalez, M. E., and L. Carrasco.** 1998. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry* **37**:13710-9.
63. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine.** 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7381-5.
64. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3195-9.
65. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.
66. **Greene, W. C., and B. M. Peterlin.** 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**:673-80.
67. **Grice, A. L., I. D. Kerr, and M. S. Sansom.** 1997. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett* **405**:299-304.
68. **Handley, M. A., S. Paddock, A. Dall, and A. T. Panganiban.** 2001. Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein. *Virology* **291**:198-207.

69. **Heerklotz, H.** 2002. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* **83**:2693-701.
70. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**:2119-23.
71. **Hemonnot, B., C. Cartier, B. Gay, S. Rebuffat, M. Bardy, C. Devaux, V. Boyer, and L. Briant.** 2004. The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J Biol Chem* **279**:32426-34.
72. **Henklein, P., R. Kinder, U. Schubert, and B. Bechinger.** 2000. Membrane interactions and alignment of structures within the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain: effect of phosphorylation of serines 52 and 56. *FEBS Lett* **482**:220-4.
73. **Hermida-Matsumoto, L., and M. D. Resh.** 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* **74**:8670-9.
74. **Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3099-104.
75. **Holm, K., K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* **77**:4805-17.
76. **Hsu, K., J. Seharaseyon, P. Dong, S. Bour, and E. Marban.** 2004. Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell* **14**:259-67.
77. **Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed.** 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**:6810-8.
78. **Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson.** 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**:356-9.
79. **Iwatani, Y., S. K. Song, L. Wang, J. Planas, H. Sakai, A. Ishimoto, and M. W. Cloyd.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augmented virus release. *J Gen Virol* **78 (Pt 4)**:841-6.

80. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
81. **Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-White, and K. Strebel.** 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**:11398-407.
82. **Kaplan, A. H.** 2002. Assembly of the HIV-1 core particle. *AIDS Rev* **4**:104-11.
83. **Keller, P., and K. Simons.** 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **140**:1357-67.
84. **Kerkau, T., I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Hunig, A. Schimpl, and U. Schubert.** 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* **185**:1295-305.
85. **Keyomarsi, K., L. Sandoval, V. Band, and A. B. Pardee.** 1991. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res* **51**:3602-9.
86. **Kino, T., and G. N. Pavlakis.** 2004. Partner molecules of accessory protein Vpr of the human immunodeficiency virus type 1. *DNA Cell Biol* **23**:193-205.
87. **Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-9.
88. **Knipe, D. M. H., Peter M.; Griffin, Diane E.; et al.** 2001. *Fields Virology*, Fourth ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
89. **Komoto, S., S. Tsuji, M. S. Ibrahim, Y. G. Li, J. Warachit, K. Taniguchi, and K. Ikuta.** 2003. The vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 plays a protective role against virus-induced apoptosis in primary CD4(+) T lymphocytes. *J Virol* **77**:10304-13.
90. **Kondo, E., F. Mammano, E. A. Cohen, and H. G. Gottlinger.** 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol* **69**:2759-64.
91. **Kozak, S. L., J. M. Heard, and D. Kabat.** 2002. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* **76**:1802-15.

92. **Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono.** 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* **9**:622-31.
93. **Lavallee, C., X. J. Yao, A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1994. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J Virol* **68**:1926-34.
94. **Lee, Y. H., M. D. Schwartz, and A. T. Panganiban.** 1997. The HIV-1 matrix domain of Gag is required for Vpu responsiveness during particle release. *Virology* **237**:46-55.
95. **Lenburg, M. E., and N. R. Landau.** 1993. Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* **67**:7238-45.
96. **Levesque, K., A. Finzi, J. Binette, and E. A. Cohen.** 2004. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr HIV Res* **2**:51-9.
97. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem* **278**:28346-53.
98. **Lewis, P. F., and M. Emerman.** 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* **68**:510-6.
99. **Li, Q. G., Y. J. Zhang, Y. Liang, C. Q. Feng, Y. Z. Li, R. Sjoberg, Y. Jiang, N. F. Wang, and G. Wadell.** 1995. The morphogenesis of a Chinese strain of HIV-1 forming inclusion bodies in Jurkat-tat III cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **9**:103-13.
100. **Liang, C., J. Hu, J. B. Whitney, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 2003. A structurally disordered region at the C terminus of capsid plays essential roles in multimerization and membrane binding of the gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:1772-83.
101. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**:7913-24.
102. **Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* **68**:4857-61.
103. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is

- critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *Embo J* **16**:695-705.
104. **Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* **67**:6542-50.
 105. **Ma, C., F. M. Marassi, D. H. Jones, S. K. Straus, S. Bour, K. Strebel, U. Schubert, M. Oblatt-Montal, M. Montal, and S. J. Opella.** 2002. Expression, purification, and activities of full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1. *Protein Sci* **11**:546-57.
 106. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
 107. **Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
 108. **Marassi, F. M., C. Ma, H. Gratkowski, S. K. Straus, K. Strebel, M. Oblatt-Montal, M. Montal, and S. J. Opella.** 1999. Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14336-41.
 109. **Margottin, F., S. Benichou, H. Durand, V. Richard, L. X. Liu, E. Gomas, and R. Benarous.** 1996. Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation. *Virology* **223**:381-6.
 110. **Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**:565-74.
 111. **Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
 112. **Martin-Serrano, J., and P. D. Bieniasz.** 2003. A bipartite late-budding domain in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:12373-7.
 113. **Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz.** 2003. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12414-9.

114. **Mehle, A., B. Strack, P. Ancuta, C. Zhang, M. McPike, and D. Gabuzda.** 2004. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**:7792-8.
115. **Melamed, D., M. Mark-Danieli, M. Kenan-Eichler, O. Kraus, A. Castiel, N. Laham, T. Pupko, F. Glaser, N. Ben-Tal, and E. Bacharach.** 2004. The conserved carboxy terminus of the capsid domain of human immunodeficiency virus type 1 gag protein is important for virion assembly and release. *J Virol* **78**:9675-88.
116. **Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, and D. A. Brown.** 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**:3910-7.
117. **Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky, and D. J. Capon.** 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**:450-8.
118. **Munro, S.** 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**:377-88.
119. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* **74**:3548-54.
120. **Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-72.
121. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902-10.
122. **Ono, A., S. D. Ablan, S. J. Lockett, K. Nagashima, and E. O. Freed.** 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14889-94.
123. **Ono, A., D. Demirov, and E. O. Freed.** 2000. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J Virol* **74**:5142-50.
124. **Ono, A., and E. O. Freed.** 1999. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J Virol* **73**:4136-44.
125. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* **78**:1552-63.

126. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-30.
127. **Ono, A., J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **74**:2855-66.
128. **ONUSIDA/OMS.** 2004. Le point sur l'épidémie de SIDA. Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA). Organisation mondiale de la Santé (OMS).
129. **Paul, M., and M. A. Jabbar.** 1997. Phosphorylation of both phosphoacceptor sites in the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain is essential for Vpu-mediated ER degradation of CD4. *Virology* **232**:207-16.
130. **Paul, M., S. Mazumder, N. Raja, and M. A. Jabbar.** 1998. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu transmembrane domain that promotes the enhanced release of virus-like particles from the plasma membrane of mammalian cells. *J Virol* **72**:1270-9.
131. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**:443-55.
132. **Percherancier, Y., B. Lagane, T. Planchenault, I. Staropoli, R. Altmeyer, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, D. C. Hoessli, and F. Bachelier.** 2003. HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* **278**:3153-61.
133. **Perez-Caballero, D., T. Hatziioannou, J. Martin-Serrano, and P. D. Bieniasz.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions. *J Virol* **78**:9560-3.
134. **Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed.** 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol* **75**:7175-83.
135. **Pike, L. J.** 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**:281-92.
136. **Pornillos, O., D. S. Higginson, K. M. Stray, R. D. Fisher, J. E. Garrus, M. Payne, G. P. He, H. E. Wang, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* **162**:425-34.
137. **Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze.** 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**:718-29.

138. **Resh, M. D.** 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**:1-16.
139. **Rousso, I., M. B. Mixon, B. K. Chen, and P. S. Kim.** 2000. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13523-5.
140. **Sakai, H., K. Tokunaga, M. Kawamura, and A. Adachi.** 1995. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J Gen Virol* **76 (Pt 11)**:2717-22.
141. **Sandefur, S., V. Varthakavi, and P. Spearman.** 1998. The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol* **72**:2723-32.
142. **Schafer, A., H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 2004. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* **328**:163-8.
143. **Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarell, and K. Strebel.** 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**:809-19.
144. **Schubert, U., S. Bour, R. L. Willey, and K. Strebel.** 1999. Regulation of virus release by the macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 AD8 isolate is redundant and can be controlled by either Vpu or Env. *J Virol* **73**:887-96.
145. **Schubert, U., K. A. Clouse, and K. Strebel.** 1995. Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes. *J Virol* **69**:7699-711.
146. **Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Henklein, K. Strebel, and M. Montal.** 1996. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* **398**:12-8.
147. **Schubert, U., P. Henklein, B. Boldyreff, E. Wingender, K. Strebel, and T. Porstmann.** 1994. The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted alpha-helix-turn-alpha-helix-motif. *J Mol Biol* **236**:16-25.
148. **Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H. G. Krausslich, and J. W. Yewdell.** 2000.

- Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13057-62.
149. **Schubert, U., T. Schneider, P. Henklein, K. Hoffmann, E. Berthold, H. Hauser, G. Pauli, and T. Porstmann.** 1992. Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II. *Eur J Biochem* **204**:875-83.
 150. **Schubert, U., and K. Strebel.** 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J Virol* **68**:2260-71.
 151. **Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, and K. Simons.** 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5795-800.
 152. **Schwartz, M. D., R. J. Geraghty, and A. T. Panganiban.** 1996. HIV-1 particle release mediated by Vpu is distinct from that mediated by p6. *Virology* **224**:302-9.
 153. **Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**:338-42.
 154. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* **64**:5448-56.
 155. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-50.
 156. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785-801.
 157. **Shuler, K. R., R. G. Dunham, and P. Kanda.** 1992. A simplified method for determination of peptide-protein molar ratios using amino acid analysis. *J Immunol Methods* **156**:137-49.
 158. **Spearman, P., J. J. Wang, N. Vander Heyden, and L. Ratner.** 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol* **68**:3232-42.

159. **Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engleman.** 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**:659-68.
160. **Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**:591-601.
161. **Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689-99.
162. **Strebel, K., T. Klimkait, and M. A. Martin.** 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**:1221-3.
163. **Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2004. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* **279**:36059-71.
164. **Suomalainen, M.** 2002. Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic* **3**:705-9.
165. **Tanaka, M., T. Ueno, T. Nakahara, K. Sasaki, A. Ishimoto, and H. Sakai.** 2003. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology* **311**:316-25.
166. **Tang, C., E. Loeliger, P. Luncsford, I. Kinde, D. Beckett, and M. F. Summers.** 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:517-22.
167. **Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5163-7.
168. **Tiganos, E., J. Friberg, B. Allain, N. G. Daniel, X. J. Yao, and E. A. Cohen.** 1998. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology* **251**:96-107.
169. **Tiganos, E., X. J. Yao, J. Friberg, N. Daniel, and E. A. Cohen.** 1997. Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J Virol* **71**:4452-60.
170. **Varthakavi, V., R. M. Smith, S. P. Bour, K. Strebel, and P. Spearman.** 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15154-9.

171. **VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter.** 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7724-9.
172. **Vincent, M. J., L. R. Melsen, A. S. Martin, and R. W. Compans.** 1999. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol* **73**:8138-44.
173. **Vincent, M. J., N. U. Raja, and M. A. Jabbar.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains of CD4: role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **67**:5538-49.
174. **von Schwedler, U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H. E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimbara, A. Scott, H. G. Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* **114**:701-13.
175. **Willey, R. L., A. Buckler-White, and K. Strebel.** 1994. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Virol* **68**:1207-12.
176. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* **66**:226-34.
177. **Wray, V., R. Kinder, T. Federau, P. Henklein, B. Bechinger, and U. Schubert.** 1999. Solution structure and orientation of the transmembrane anchor domain of the HIV-1-encoded virus protein U by high-resolution and solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* **38**:5272-82.
178. **Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken.** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **74**:9381-7.
179. **Yang, C., C. P. Spies, and R. W. Compans.** 1995. The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9871-5.
180. **Yao, X. J., J. Friberg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R. P. Sekaly, 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**:615-23.

181. **Yao, X. J., H. Gottlinger, 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**:5119-26.
182. **Yao, X. J., R. A. Subbramanian, N. Rougeau, F. Boisvert, D. Bergeron, and E. A. Cohen.** 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* **69**:7032-44.
183. **Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* **66**:4966-71.
184. **Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J Virol* **67**:213-21.
185. **Zennou, V., D. Perez-Caballero, H. Gottlinger, and P. D. Bieniasz.** 2004. APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **78**:12058-61.
186. **Zhao, L. J., and H. Zhu.** 2004. Structure and function of HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr: novel clues to drug design. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:265-75.
187. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**:2556-69.