



Université de Montréal

**Analyse du mécanisme de la dégradation du récepteur CD4 par la protéine Vpu du  
virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)**

par

Julie Binette

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en virologie et immunologie

Décembre 2009

©, Julie Binette, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Analyse du mécanisme de la dégradation du récepteur CD4 par la protéine Vpu du virus de  
l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)

présentée par :  
Julie Binette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Desjardins  
président-rapporteur

Éric A. Cohen  
directeur de recherche

Jacques Archambault  
membre du jury

Lionel Berthoux  
examineur externe

Guy Lemay  
représentant du doyen

## RÉSUMÉ

Le VIH-1 a développé plusieurs mécanismes menant à la dégradation de son récepteur cellulaire, la molécule CD4, dans le but d'augmenter la relâche de particules virales infectieuses et d'éviter que la cellule soit surinfectée. L'un de ces mécanismes est la dégradation, induite par la protéine virale Vpu, du CD4 nouvellement synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE).

Vpu doit lier CD4 et recruter l'ubiquitine ligase cellulaire SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>, via sa liaison à  $\beta$ -TrCP, afin de dégrader CD4. Puisque CD4 doit être retenu au RE pour permettre à Vpu d'induire sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome, il a été suggéré que ce processus implique un mécanisme semblable à une voie cellulaire de dégradation des protéines mal-repliées appelée ERAD (« endoplasmic reticulum-associated degradation »).

La dégradation par ERAD implique généralement la dislocation des protéines du RE vers le cytoplasme afin de permettre leur poly-ubiquitination et leur dégradation par le protéasome. Nous avons démontré que Vpu induit la poly-ubiquitination de CD4 dans des cellules humaines. Nos résultats suggèrent aussi que CD4 doit subir une dislocation afin d'être dégradé par le protéasome en présence de Vpu. De plus, un mutant transdominant négatif de l'ATPase p97, qui est impliquée dans la dislocation des substrats ERAD, inhibe complètement la dégradation de CD4 par Vpu. Enfin, nos résultats ont montré que l'ubiquitination sur des résidus accepteurs de l'ubiquitine (lysines) de la queue cytoplasmique de CD4 n'était pas essentielle, mais que la mutation des lysines ralentit le processus de dégradation de CD4. Ce résultat suggère que l'ubiquitination de la queue cytosolique de CD4 pourrait représenter un événement important dans le processus de dégradation induit par Vpu.

L'attachement de l'ubiquitine a généralement lieu sur les lysines de la protéine ciblée. Toutefois, l'ubiquitination sur des résidus non-lysine (sérine, thréonine et cystéine) a aussi été démontrée. Nous avons démontré que la mutation de tous les sites potentiels d'ubiquitination cytoplasmiques de CD4 (K, C, S et T) inhibe la dégradation par Vpu. De plus, la présence de cystéines dans la queue cytoplasmique apparaît suffisante pour rendre CD4 sensible à Vpu en absence de lysine, sérine et thréonine. Afin d'expliquer ces résultats, nous proposons un modèle dans lequel l'ubiquitination de la queue cytosolique de

CD4 serait nécessaire à sa dégradation et où les sites d'ubiquitination de CD4 seraient sélectionnés de façon non spécifique par l'ubiquitine ligase recrutée par Vpu.

Enfin, nous avons observé que la co-expression d'une protéine Vpu incapable de recruter  $\beta$ -TrCP (Vpu S52,56/D) semble stabiliser le CD4 qui est retenu au RE. De plus, d'autres mutants de Vpu qui semblent capables de recruter  $\beta$ -TrCP et CD4 sont toutefois incapables d'induire sa dégradation. Ces résultats suggèrent que l'association de Vpu à CD4 et  $\beta$ -TrCP est essentielle mais pas suffisante pour induire la dégradation de CD4. Par conséquent, ces résultats soulèvent la possibilité que Vpu puisse recruter d'autres facteurs cellulaires pour induire la dégradation de CD4.

Les résultats présentés ont permis de mieux définir le mécanisme de dégradation de CD4 par Vpu dans des cellules humaines. De plus, ces résultats nous ont permis d'élaborer un modèle dans lequel l'ubiquitine ligase cellulaire SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> démontre de la flexibilité dans le choix des résidus à ubiquitiner afin d'induire la dégradation de CD4. Enfin, ces études jettent un oeil nouveau sur le rôle de Vpu dans ce processus puisque nos résultats suggèrent que Vpu doit recruter d'autres partenaires cellulaires, mis à part  $\beta$ -TrCP, pour induire la dégradation de CD4.

Mots clés : VIH-1; Vpu; dégradation de CD4; ERAD; système ubiquitine-protéasome; infectivité virale

## ABSTRACT

HIV-1 has developed many mechanisms leading to the down-regulation of its cellular receptor, the CD4 molecule, in order to increase the release of infectious viral particles and to inhibit superinfection of the target cell. One of these mechanisms is the HIV-1 Vpu-mediated degradation of newly synthesized CD4 at the level of endoplasmic reticulum (ER).

Vpu must interact with CD4 and recruit the cellular ubiquitin ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>, via its binding to  $\beta$ -TrCP, in order to induce CD4 degradation. Because CD4 has to be retained in the ER to allow Vpu to induce its degradation via the ubiquitin-proteasome system, it has been suggested that this process involves a mechanism reminiscent of a cellular degradation pathway involved in the proteolysis of unfolded proteins called ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation).

The ERAD degradation usually involves the dislocation of proteins from the ER to the cytoplasm in order to induce their poly-ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome. We demonstrated that Vpu induces the poly-ubiquitination of CD4 in human cells. Our results also suggest that CD4 has to be dislocated in order to be degraded by the proteasome in presence of Vpu. Furthermore, the expression of a transdominant negative mutant of the ATPase p97, that is involved in the dislocation of ERAD substrates, inhibits completely the Vpu-mediated CD4 degradation process. Finally, our results demonstrated that the ubiquitination of putative ubiquitin acceptor residues (lysines) in the cytosolic tail of CD4 is not essential but the mutation of these lysines slowed down the process of CD4 degradation induced by Vpu. This results suggests that ubiquitination of CD4 cytosolic tail could represent an important step during Vpu-mediated CD4 degradation.

Ubiquitin is usually attached on lysine residues in the targetted protein. However, the ubiquitination on non-lysine residues (S, T and C) has also been demonstrated. We demonstrated that the mutation of all cytosolic potential ubiquitination sites (K, C, S and T) of CD4 abolishes Vpu-mediated degradation. In addition, the presence of cysteines in the cytosolic tail of CD4 appeared sufficient to render CD4 sensitive to Vpu in absence of lysine, serine or threonine. In order to explain these results, we propose a model in which

CD4 cytosolic tail ubiquitination is necessary for its degradation and where ubiquitination sites are selected non specifically by the ubiquitin ligase recruited by Vpu.

Finally, we observed that co-expression of a phosphorylation mutant of Vpu unable to interact with  $\beta$ -TrCP (Vpu S52,56/D) appears to stabilize ER-retained CD4 molecules. In addition, other Vpu mutants seem able to recruit  $\beta$ -TrCP and CD4 without inducing CD4 degradation. These results suggest that Vpu association with CD4 and  $\beta$ -TrCP is essential but not sufficient for CD4 degradation. Consequently, these results raised the possibility that other cellular factors could be recruited by Vpu in order to induce CD4 degradation.

The results presented here allowed us to better define the mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation. In addition, these results allowed us to elaborate a model in which the ubiquitin ligase  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  show some flexibility in the choice of ubiquitination sites in order to induce CD4 degradation. Finally, these studies shed a new light on the role of Vpu in the CD4 degradation process because our results suggest that Vpu could recruit, in addition of  $\beta$ -TrCP, other cellular partners in order to induce CD4 degradation.

Keywords: HIV-1; Vpu; CD4 degradation; ERAD; ubiquitin-proteasome system; viral infectivity

## TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury .....	ii
Sommaire .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures .....	xi
Liste des tableaux .....	xiv
Liste des abbréviations .....	xv
Dédicace .....	xxi
Remerciements .....	xxii
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1).....</b>	<b>3</b>
2.1 Syndrôme de l'immunodéficience acquise (SIDA) .....	3
2.1.1 Épidémiologie .....	3
2.1.2 Pathologie causée par le VIH-1.....	3
2.2 Classification.....	7
2.3 Organisation génomique .....	7
2.4 Structure .....	8
<b>3. Cycle de réplication du virus.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Attachement au récepteur et entrée dans la cellule .....</b>	<b>12</b>
4.1 Récepteur principal : CD4.....	12
4.2 Co-récepteurs CXCR4 et CCR5 .....	13
4.3 Mécanisme moléculaire de l'entrée .....	13
<b>5. Étapes de pré-intégration .....</b>	<b>13</b>
5.1 Décapsidation et transcription inverse .....	14
5.2 Transport du complexe de pré-intégration (CPI) au noyau.....	14
5.3 Intégration dans le génome de la cellule cible .....	15



<b>6. Étapes de post-intégration.....</b>	<b>15</b>
6.1 Synthèse des ARNm viraux et de l'ARN génomique, rôle de Tat.....	15
6.2 Export et traduction des ARNm viraux, rôle de Rev .....	16
6.3 Les protéines de structure et enzymatiques.....	17
6.3.1 Précurseurs Gag et Gag-pol .....	17
6.3.2 Structure et maturation des glycoprotéines de l'enveloppe virale .....	21
6.4 Assemblage, bourgeonnement et sortie virale .....	24
6.4.1 Ciblage aux membranes : Domaine M.....	24
6.4.2 Multimérisation : Domaine I.....	25
6.4.3 Bourgeonnement : Domaine L.....	25
<b>7. Les protéines accessoires .....</b>	<b>26</b>
7.1 Nef.....	26
7.2 Vpr .....	28
7.3 Vif .....	30
7.4 Vpu.....	31
7.4.1 Article 1 : Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions.....	31
7.4.2 Mise à jour des connaissances sur Vpu.....	53
<b>8. Régulation négative du CD4 par le VIH-1.....</b>	<b>57</b>
8.1 Article 2 : Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. ....	57
8.2 Mise à jour des connaissances.....	74
<b>9. Système ubiquitine-protéasome et mécanismes de dégradation des protéines au niveau du réticulum endoplasmique .....</b>	<b>76</b>
9.1 Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD).....	77
9.1.1 Reconnaissance des substrats du ERAD et ciblage vers la machinerie cytoplasmique de dégradation.....	77
9.1.2 Rétrotranslocation et système ubiquitine-protéasome .....	78
9.1.3 Différents types d'ERAD et protéines impliquées.....	81
9.1.4 Exemples de l'utilisation du système ubiquitine-protéasome par des protéines virales .....	84

9.1.4.1 Cytomégalo­virus humain (HCMV) et dégradation de la chaîne lourde du CMHI .....	84
9.1.4.1.1 La protéine US2 du HCMV .....	85
9.1.4.1.2 La protéine US11 du HCMV .....	85
9.1.4.2 $\gamma$ -herpesvirus de souris et dégradation de la chaîne lourde du CMHI .....	86
9.1.4.2.1 La protéine mk3 .....	86
9.2 Ubiquitination sur des résidus non-lysines .....	86
<b>10. Ubiquitine ligases (E3) .....</b>	<b>87</b>
10.1 Familles d'ubiquitine ligases .....	88
<b>11. Problématique et objectifs du projet de recherche .....</b>	<b>91</b>
<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE 3 .....</b>	<b>93</b>
<b>CHAPITRE 3 : ARTICLE 4 EN PRÉPARATION .....</b>	<b>136</b>
<b>CHAPITRE 4 : ÉTUDE DES FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DE CD4 INDUITE PAR VPU .....</b>	<b>167</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>168</b>
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>169</b>
<b>3. Résultats .....</b>	<b>173</b>
3.1 Stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D .....	173
3.1.1 La demi-vie de CD4 semble augmentée par l'expression de Vpu S52,56/D....	173
3.1.2 À l'équilibre, on observe plus de CD4 en présence de Vpu S52,56/N .....	173
3.1.3 La stabilisation par S52,56/D ne semble pas être due simplement à un phénomène de rétention du CD4 au RE.....	176
3.1.4 La stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ne semble pas être due à un masquage de sites potentiels d'ubiquitination .....	178
3.2 Analyse structure/fonction de Vpu (étude mutagénique).....	180
3.2.1 Rationnel des mutations introduites dans Vpu.....	180

3.2.2 Effet de ces mutations de Vpu sur la capacité d’induire la dégradation de CD4  
..... 183

**4. Discussion et perspectives..... 187**

**CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... 194**

**CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET CONTRIBUTIONS MAJEURES..... 207**

**CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 210**

**ANNEXE I ..... 262**

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 : Introduction

<b>Figure 1</b> : Évolution naturelle de la maladie causée par l'infection au VIH-1..	6
<b>Figure 2</b> : Organisation génétique du VIH-1.....	9
<b>Figure 3</b> : Schéma de la particule virale mature du VIH-1.....	10
<b>Figure 4</b> : Cycle de réplication du VIH-1.....	11
<b>Figure 5</b> : Schéma de l'organisation du précurseur Gag du VIH-1 avant son clivage par la protéase virale..	19
<b>Figure 6</b> : Schéma du précurseur de l'enveloppe virale.....	22
Article 1	
<b>Figure 7</b> : Genomic organization of HIV-1/SIVcpz and HIV-2/SIVmac.....	34
<b>Figure 8</b> : Alignment of the consensus Vpu sequences from the major clades of HIV-1 and SIVcpz.....	35
<b>Figure 9</b> : Secondary and tertiary structure of Vpu.....	37
<b>Figure 10</b> : Model of the CD4 degradation mediated by Vpu..	42
<b>Figure 11</b> : Model for the suppression of TASK-1 ion channel activity by Vpu and its resulting effect on viral release..	49
Article 2	
<b>Figure 12</b> : Model of the CD4 down-regulation mediated by Nef.....	62
<b>Figure 13</b> : Model of the CD4 degradation mediated by Vpu....	67
<b>Figure 14</b> : Different proposed models of CD4-mediated inhibition of HIV-1 infectivity.	71
 <b>Figure 15</b> : Schéma des différents types d'ERAD.....	 82
<b>Figure 16</b> : Structure de trois types d'ubiquitines ligases modulaires..	90

## LISTE DES FIGURES (SUITE)

### CHAPITRE 2 : Article 3

<b>Figure 1</b> : Poly-ubiquitination of CD4 is required for Vpu-mediated CD4 degradation...	123
<b>Figure 2</b> : Effect of Vpu on CD4 ubiquitination.....	125
<b>Figure 3</b> : Effect of Vpu on CD4 molecules lacking lysine residues in the cytoplasmic tail.....	127
<b>Figure 4</b> : Effect of Vpu on CD4 KRcyto poly-ubiquitination.....	129
<b>Figure 5</b> : Vpu-mediated CD4 degradation involves dislocation of ubiquitinated CD4 conjugates from the ER membrane to the cytosol.....	131
<b>Figure 6</b> : Effect of a TDN mutant of p97 on Vpu-mediated CD4 degradation.....	133
<b>Additional Figure 1</b> : Analysis of Vpu binding to CD4 wt or CD4 KRcyto.....	134
<b>Additional Figure 2</b> : Salt-wash experiment controls.....	135

### CHAPITRE 3 : Article 4 en préparation

<b>Figure 1</b> : Mutation of all potential ubiquitin acceptor sites in the cytosolic tail of CD4 renders CD4 insensitive to Vpu.....	162
<b>Figure 2</b> : Serine or threonine residues do not seem to act as ubiquitination sites during Vpu-mediated CD4 degradation.....	164
<b>Figure 3</b> : Cysteine residues in the cytosolic tail of CD4 are sufficient to render CD4 sensitive to Vpu.....	166

### CHAPITRE 4 : Étude des facteurs cellulaires impliqués dans la dégradation de CD4 induite par Vpu

<b>Figure 1</b> : Le mutant de Vpu S52,56/D augmente la demi-vie de CD4.....	174
<b>Figure 2</b> : La co-expression du mutant de Vpu S52,56/N semble augmenter la quantité de CD4 observée à l'équilibre.....	175
<b>Figure 3</b> : La BFA semble active pendant 12 heures.....	177

**LISTE DES FIGURES (SUITE)**

<b>Figure 4 :</b> La stabilisation par S52,56/D ne semble pas être due seulement à un phénomène de rétention du CD4 au RE.....	179
<b>Figure 5 :</b> La stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ne semble pas être due à un masquage de sites potentiels d'ubiquitination.....	181
<b>Figure 6 :</b> Représentation du domaine cytoplasmique de Vpu et des mutations effectuées.....	182
<b>Figure 7 :</b> Effet des mutations de la première hélice cytoplasmique de Vpu sur la capacité de dégradation de CD4.....	184
<b>Figure 8 :</b> Liaison des mutants de Vpu à CD4 et à $\beta$ -TrCP.....	186

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1 : Introduction

<b>Tableau I :</b> Estimation du nombre de personnes infectées par le VIH-1 par région en 2007 selon les données de ONUSIDA en 2007 .....	4
---	---

### ANNEXE I

<b>Tableau I :</b> Tableau récapitulatif de certains mutants de Vpu effectués au cours des études présentées dans cette thèse et de leur capacité à dégrader CD4 selon le type cellulaire.....	262
--	-----

<b>Tableau II :</b> Caractérisation de certains mutants de Vpu qui étaient déjà disponibles dans le laboratoire en ce qui concerne leur capacité d'interagir avec CD4 et d'induire sa dégradation selon le type cellulaire.....	263
---	-----

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN FRANÇAIS**

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNt : ARN de transfert  
CA : capsid  
CL : chaîne lourde  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPI : complexe de pré-intégration  
CypA : cyclophiline A  
DMEM + 5% : DMEM avec 5% de sérum de veau fœtal  
Env : précurseur gp160 des glycoprotéines de l'enveloppe  
gp : glycoprotéine  
Ii : chaîne invariante  
IN : intégrase  
LTC : lymphocyte T cytotoxique  
MA : matrice  
mac : macaques  
NC : nucléocapsid  
Pi : phosphate  
Pol : polymérase  
PR : Protéase  
RE : Réticulum endoplasmique  
RPM : révolutions par minute  
SCF<sup>βTrCP</sup> : Complexe Skp1-Culline1-protéine F-box β-TrCP  
*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*  
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise  
TI : Transcriptase inverse  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VIS : Virus de l'immunodéficience simienne



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN ANGLAIS

- AIDS : « Acquired Immunodeficiency Syndrome »
- apoB : « apolipoprotein B »
- APOBEC : « apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like »
- ARN-pol II : « ARN polymerase II »
- AP : « clathrin Adaptor Complexes »
- APC : « anaphase promoting complex »
- ATCC : « american type culture collection »
- Atx3 : « ataxin 3 »
- AZT : « azidothymidine »
- BAF : « barrier-to-autointegration factor »
- BAP31 : « B-cell receptor (BCR)-associated protein 31 »
- $\beta$ -COP : «  $\beta$ -subunit of the endosomal COP-I coatomer »
- $\beta$ TrCP : « human beta transducin-repeat containing protein »
- BFA : « Brefeldin A »
- BiP : « binding immunoglobulin protein »
- BST2 : « B cell stromal factor 2 »
- CAML : « calcium modulating cyclophilin ligand »
- CBC : « cullin 2-elongine B-elongin C »
- CCR5 : « C-C motif receptor 5 »
- CD : « circular dichroism »
- CD4 : « cluster of differentiation 4 »
- CDC48 : « cell division cycle protein 48 »
- Cdk9 : « cyclin dependant kinase 9 »
- CFTR : « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
- cpz : « chimpanzee »
- CTD : « C-terminal domain »
- CXCR4 : « CXC chemokine receptor 4 »
- DCAF1 : « DDB1-cullin4-associated factor 1 »
- DCSIGN : « Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin »
- DDB1 : « damage specific DNA binding protein 1 »
- den : « Dent's mona monkey »

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN ANGLAIS (SUITE)**

- DMEM : « Dulbecco's modified eagle medium »
- Doa : « degradation of alpha 2 »
- E1 : « ubiquitin activating enzyme »
- E2 : « ubiquitin conjugating enzyme »
- E3 : « Ubiquitin ligase »
- E4 : « ubiquitin elongation factor »
- EDEM : « ER degradation-enhancing  $\alpha$  mannosidase-like protein »
- EGFP : « enhanced green fluorescent protein »
- ER : « Endoplasmic Reticulum »
- ERAD : « ER-Associated Degradation »
- ESCRT : « endosomal sorting complexes required for transport »
- FasL : « Fas ligand »
- FRET : « fluorescence resonance energy transfert »
- Gag : « group antigen »
- $\gamma$ HV68 : « murine  $\gamma$ -herpesvirus 68 »
- gsn : « greater spot-nosed monkey »
- HAART : « highly active antiretroviral therapy »
- HCMV : « human cytomegalovirus »
- HECT : « homologous to E6-associated protein (E-6AP) C-terminus »
- HEK 293T : « human embryonic kidney 293T cells »
- Herp : « homocystein-induced ER protein »
- HIV : « Human Immunodeficiency Virus »
- Hrd : « Hmg CoA reductase degradation »
- Hsp : « heat shock protein »
- HTLV : « human T-cell leukemia/lymphoma virus »
- Htm1/Mnl1 : « homologous to mannosidase 1/mannosidase-like protein 1 »
- IFN : « interferon »
- IKK : « I $\kappa$ B kinase »
- KSHV : « Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus »
- LAP2 $\alpha$  : « lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  »

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN ANGLAIS (SUITE)**

LEDGF : « lens epithelium-derived growth factor »  
LLR : « leucine-rich repeats »  
LTNPs : « Long-Term Non Progressors »  
LTR : « long terminal repeat »  
M : « Main group »  
MHCI : « class I Major Histocompatibility Complex »  
MHCII : « class II Major Histocompatibility Complex »  
MHR : « major homology region »  
MIP1 $\alpha$  : « macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  »  
MIR : « modulator of immune recognition »  
mk3 : « murine  $\gamma$ -herpesvirus 68 k3 protein »  
MoMLV : « Moloney murine leukemia virus »  
mon : « mona monkey »  
mus : « mustached monkey »  
MVBs : « multi-vesicular bodies »  
N : « New »  
Nef : « Negative factor »  
NES : « nuclear export signal »  
NFAT : « nuclear factor of activated T cells »  
NF- $\kappa$ B : « nuclear factor- $\kappa$ B »  
NK : « natural killer »  
NLS : « nuclear localization signal »  
NMR : « nuclear magnetic resonance »  
NNRTI : « non-nucleoside analogs reverse transcriptase inhibitors »  
Npl4 : « Nuclear protein localization 4 »  
NRTI : « nucleoside analogs reverse transcriptase inhibitors »  
NTD : « N-terminal domain »  
O : « Outliers »  
Pael-R : « parkin associated endothelin receptor-like receptor »  
PDI : « protein disulfide isomerase »

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN ANGLAIS (SUITE)**

- PHD/LAP : « plant homeodomain/LRR and PDZ »
- PI : « protease inhibitor »
- Rev : « regulator of virion »
- RING : « really interesting new gene »
- RIPA-DOC : « radio-immunoprecipitation assay-deoxycholate buffer »
- RRE : « Rev responsive element »
- SCF : « Skp1-Cullin-Fbox »
- SCID : « Severe Combined Immunodeficiency »
- SHIV : « Simian-Human Immunodeficiency Virus »
- SIV : « Simian Immunodeficiency Virus »
- sm : « sootey mangabey monkeys »
- SOCS : « suppressor of cytokine signalling »
- SSNMR : « solid-state nuclear magnetic resonance »
- SU : « gp120 protein »
- TAR : « *trans*-activation responsive region »
- Tat : « transactivator of transcription »
- TASK1 : « TWIK-related acid sensitive K<sup>+</sup> ion channel »
- TCR : « T-cell receptor »
- TEMs : « tetraspanins-enriched microdomains »
- TGN : « Trans-Golgi Network »
- TIP47 : « tail-interacting protein of 47kDa »
- TM : « Transmembrane »
- TNF : « tumor necrosis factor »
- Trim5 $\alpha$  : « tripartite motif 5 $\alpha$  »
- Ub : « Ubiquitin »
- UBP : « Vpu binding protein »
- Ufd1 : « ubiquitin fusion degradation 1 »
- UPR : « unfolded protein response »
- US : « unique short region »
- Vif : « Viral infectivity factor »
- V1H : « subunit H of the Vacuolar ATPase »

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS EN ANGLAIS (SUITE)**

VLP : « viral-like particle »

Vpr : « Viral protein R »

VprBP : « Vpr binding protein »

Vpu : « Viral protein U »

VSV : « vesicular stomatitis virus »

WB : « western-blot »

Wnt : « wingless type »

Yos9 : « yeast osteosarcoma gene homolog 9 »

Je dédie cette thèse à Marc, mon mari et à mon fils Édouard, les deux hommes de ma vie, l'un pour son amour et son support inconditionnels qui m'ont permis de passer au travers de toutes les épreuves et l'autre pour toute la joie qu'il a su apporter dans mon cœur, même lors des périodes de découragement et de doute.

*Douter de tout ou tout croire sont deux solutions également commodes, qui l'une et l'autre nous dispensent de réfléchir.*

Henri Poincaré

*Un jour viendra peut-être - qui sait si ce n'est pas aujourd'hui ? - où la science reprendra sa place normale : source de sagesse et non de puissance, à l'égal de la musique et de la poésie.*

Charles Morgan

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord dire merci à mon directeur de recherche, Éric Cohen, qui m'a donné l'opportunité de parfaire mon savoir pendant toutes ces années où j'ai fait partie de la grande équipe de son laboratoire. Merci pour votre support technique et financier et pour m'avoir permis de présenter mes résultats de recherche à plusieurs reprises. Cette expérience a été très enrichissante à plusieurs niveaux.

Je voudrais aussi remercier les membres du jury qui ont gentiment accepté de corriger ma thèse.

Merci à Jacques Thibodeau et à Andrés Finzi qui ont relu les manuscrits présentés dans l'introduction. Merci à Klaus Strebél, Ron Kopito, Martin Latterich et Richard Benarous pour le matériel qu'ils ont accepté de nous donner afin de pouvoir faire le travail qui est présenté dans cette thèse. Merci à Dalia Halawani, du laboratoire de Martin Latterich, qui a toujours été d'une gentillesse incroyable.

Un grand merci aux deux « super techniciennes » du labo, Nicole Rougeau et Johanne Mercier dont la capacité d'organisation à toute épreuve compense pour les lacunes des étudiants... Merci en particulier à Johanne qui a travaillé avec moi pendant un certain temps. J'ai beaucoup apprécié ton travail et aussi apprendre à mieux te connaître.

Merci à Karine Levesque qui a été ma directrice de stage à mon arrivée dans le laboratoire. J'ai toujours admiré ta mémoire phénoménale et j'ai bien aimé faire partie du conseil de l'AEGSFM avec toi.

Un grand merci à mes compagnons et compagnes de travail que j'ai cotoyés tout au long de mes études. Nous avons pu forger des amitiés qui sont essentielles pour évoluer dans un milieu tel que la recherche académique. Je vais m'ennuyer des fous rires collectifs à l'heure du midi! Merci en particulier à Mathieu Dubé qui m'a toujours appuyée et qui n'avait pas peur de me dire « les vraies affaires ». J'apprécie beaucoup ton amitié et ta franchise. Merci aussi à Ines Benzaghoul pour ton amitié et les grandes conversations (philosophiques ou non...) qu'on avait parfois autour d'un bon café. Je crois que je vais me rappeler longtemps de tes expressions comme « genre beau gosse ». Merci aussi à Jean-Philippe Belzile (M. Google comme Ines le surnomme). J'ai grandement apprécié ton aide et tes conseils.

Un grand merci à tous ceux qui ont lu certaines parties de ma thèse et m'ont fait part de leurs précieux conseils. Un gros merci en particulier à Mathieu Dubé qui a passé beaucoup de temps à lire plusieurs des sections. Merci aussi à Ines Benzaghoul, Jean-Philippe Belzile, Julien Briffotiaux et Amélie Fradet-Turcotte. Ce fut grandement apprécié.

Je voudrais aussi remercier mon amie Sapha Barkati. Je me souviens encore des éclats de rire en se remémorant des sketches de François Pérusse quand tu faisais ta maîtrise chez Guy Lemay! J'admire ta bonne humeur inconditionnelle et tu as toujours été de bon conseil. C'est aussi beaucoup grâce à toi et à ton mari Alexandre que je suis rendue là où je suis maintenant... Merci aussi à Mélanie Welman, ton amitié a été grandement appréciée dans les moments difficiles.

Je voudrais remercier aussi ma famille et ma belle-famille qui ont toujours été un support pour moi, sans trop poser la question : « Pis, c'est quand tu finis? ». J'ai toujours senti que vous étiez avec moi.

Enfin, un merci tout spécial à mon mari et mon chum, Marc Robillard. Lui qui a dit un jour : *La science c'est comme une « bubble gum », avant de la gonfler, il faut la mâcher!* Sans toi, je ne serais pas arrivée à grand chose. Tu m'as supportée avec toute la force de ton amour et tes conseils judicieux. On forme une super bonne équipe! Merci aussi à mon fils Édouard, mon « p'tit boy ». Ta bonne humeur, tes éclats de rire et ton amour parfait ont toujours été une source de bonheur inépuisable dans laquelle j'allais puiser dans les moments difficiles.

J'ai pu faire ces études avec le soutien financier de mon directeur, du département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal et du Fonds de la Recherche en Santé du Québec.



## **CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## 1. Introduction

Les premiers cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ont été décrits en 1981. L'agent étiologique de cette maladie, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été découvert en 1983. Parmi tous les virus qui infectent les humains, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un des plus étudiés puisqu'il est la cause d'une grave pandémie qui ne semble pas vouloir se résorber.

Le VIH infecte directement les cellules du système immunitaire, ce qui mène ultimement à un affaiblissement généralisé de ce dernier se caractérisant par l'apparition d'infections opportunistes en phase SIDA. De plus, l'incroyable variabilité génétique du virus rend difficile la conception d'un vaccin unique efficace contre tous les sous-types viraux. Les chances d'éradication du VIH-1 sont présentement très faibles puisqu'il n'y a pas encore de vaccin prophylactique efficace. De plus, les traitements actuels ne permettent pas d'éliminer complètement le virus de son hôte. Toutefois, les connaissances acquises via la recherche fondamentale amènent certainement de nouveaux espoirs de voir un jour la mise au point de nouveaux traitements ou vaccins plus efficaces.

L'entrée du virus dans la cellule cible est une étape cruciale du cycle de réplication viral. Elle a lieu principalement suite à l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe du virus avec le récepteur viral, la molécule CD4, présente à la surface de la cellule. L'utilisation par le VIH-1 de la molécule CD4 comme récepteur principal explique la tendance du virus à infecter certaines cellules T et les macrophages chez l'hôte, ce qui mène, en absence de traitement, à une dysfonction du système immunitaire (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). Même si CD4 est nécessaire à l'entrée efficace du virus dans la cellule cible, une trop grande quantité du récepteur présent à la surface de la cellule est délétère pour la réplication virale. Afin d'éviter ces effets, le VIH-1 a développé plusieurs mécanismes menant à la dégradation de CD4.

Le travail qui sera présenté ici fait état de l'avancement de recherches sur le mécanisme de la dégradation du récepteur viral, CD4, par la protéine Vpu du VIH-1. Pour commencer, une description du VIH-1 sera présentée dans la revue de la littérature qui suit ainsi qu'une introduction sur certains mécanismes cellulaires qui sont impliqués dans le processus de dégradation du CD4 par Vpu.

## 2. Le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)

### 2.1 Syndrôme de l'immunodéficience acquise (SIDA)

Le VIH-1 est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme. Le SIDA est le dernier stade de l'infection par ce virus et constitue un ensemble de symptômes qui apparaissent suite à la destruction de plusieurs types de cellules du système immunitaire par l'infection au VIH-1.

#### 2.1.1 Épidémiologie

Selon les dernières estimations fournies par ONUSIDA en 2007 (le rapport ONUSIDA 2008 reprend les mêmes données qu'en 2007), il y aurait environ 33 millions de personnes infectées par le VIH-1 dans le monde et le SIDA aurait causé la mort d'environ 25 millions de personnes depuis sa découverte en 1981 (ONUSIDA 2007). Selon le même rapport, l'Afrique sub-saharienne est la plus touchée avec 22,5 millions de personnes infectées. Vient ensuite l'Asie du sud et du sud-est avec 4 millions de personnes séropositives. Par comparaison, il y aurait 1,3 millions de personnes infectées en Amérique du Nord. Pour de plus amples informations, le Tableau I montre les estimations du nombre de personnes infectées par région en 2007.

#### 2.1.2 Pathologie causée par le VIH-1

Les cellules ciblées par le VIH-1 sont celles exprimant le récepteur CD4 à leur surface, c'est-à-dire majoritairement les cellules T CD4<sup>+</sup>, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales du cerveau (Rosenberg and Fauci 1989).

La pathologie causée par l'infection au VIH-1 a une évolution très lente qui s'étend généralement sur plusieurs années. L'une des caractéristiques principales de l'infection est la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves et mémoires (Levy 1993). Il est par ailleurs possible de suivre l'évolution de la maladie en mesurant la quantité de cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi que la quantité de virus circulant (virémie). L'infection par le VIH-1 entraîne un

**Tableau I** : Estimation du nombre de personnes infectées par le VIH-1 par région en 2007 selon les données de ONUSIDA en 2007 (ONUSIDA 2007).

<b>Région</b>	<b>Nombre estimé d'adultes et d'enfants infectés par le VIH-1</b>
Afrique sub-saharienne	22.5 millions
Sud et sud-est de l'Asie	4.0 millions
Europe de l'Est et Asie centrale	1.6 millions
Amérique latine	1.6 millions
Amérique du Nord	1.3 millions
Est de l'Asie	800 000
Europe de l'Ouest et centrale	760 000
Afrique du Nord et de l'Est	380 000
Caraïbes	230 000
Australie, Nouvelle-Zélande et région du Pacifique	75 000
<b>Total</b>	<b>33.2 millions</b>

dérèglement généralisé du système immunitaire et une diminution de l'efficacité de la réponse immune (Munier and Kelleher 2007). La déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> et le dysfonctionnement du système immunitaire semblent causés par l'activation chronique de ce dernier par le virus (Giorgi et al. 1999; Sousa et al. 2002). Par ailleurs, le niveau d'activation du système immunitaire dans la phase précoce sert à prédire l'évolution de la maladie (Hazenbergh et al. 2003; Deeks et al. 2004; van Asten et al. 2004).

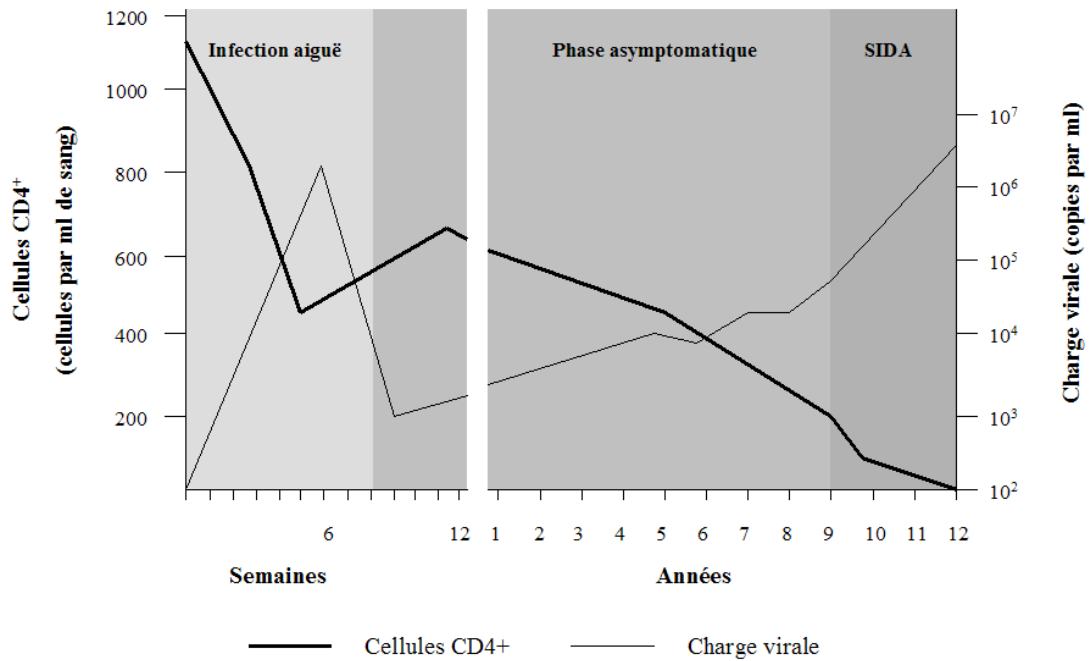
L'infection par le VIH-1 se caractérise par trois phases : la phase de primo-infection, la phase de latence clinique ou phase asymptomatique et la phase SIDA (voir Figure 1).

La primo-infection fait suite à l'introduction du virus dans l'organisme. À ce stade, la personne infectée présente des symptômes ressemblant à ceux de la grippe ou d'une mononucléose (Cooper et al. 1985; Levy 1993). Le virus se réplique activement, pouvant générer plus de 100 millions de copies de génome viral/ml de sang (Albrecht and et.al. 2007). La virémie élevée, conjointement avec la disparition d'une grande partie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui circulent dans le sang, favorise la dissémination du virus dans tout l'organisme (Clark et al. 1991; Daar et al. 1991). Après cette phase, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus contrôlent l'infection (Koup and Ho 1994; Koup et al. 1994; Pantaleo et al. 1994), mais on observe aussi l'apparition d'une réponse humorale dirigée contre certaines protéines virales (Ho et al. 1985; Koup et al. 1994; Moore et al. 1994).

La primo-infection est suivie par une période de latence pendant laquelle la virémie devient presque indétectable et le niveau de cellules T CD4<sup>+</sup> se stabilise temporairement puisqu'elles sont renouvelées (Albrecht and et.al. 2007). Même si la virémie est très basse, le virus continue à se répliquer, ce qui a pour effet de diminuer lentement la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Figure 1) en plus d'entraîner leur dysfonctionnement (Lange et al. 2003; Lichterfeld et al. 2004). Cette période de latence peut s'étendre sur une dizaine d'années avant que les symptômes de la phase SIDA apparaissent (Lemp et al. 1990a; Lemp et al. 1990b).

Après plusieurs années de répllication virale causant la mort graduelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la quantité de cellules CD4<sup>+</sup> circulant dans le sang atteint un seuil critique de 200/mm<sup>3</sup> (Figure 1) alors que le taux normal se trouve entre 600 et 1200/mm<sup>3</sup>. À 200/mm<sup>3</sup>, le patient est considéré comme immunodéprimé et des infections opportunistes et cancers rares apparaissent, c'est ce que l'on nomme la phase SIDA (CDC 1993).

**Figure 1 : Évolution naturelle de la maladie causée par l'infection au VIH-1.** Le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> et le nombre de copies du génome viral par ml de sang est représenté en fonction du temps suite à l'infection. Figure adaptée de celle présentée dans HIV medicine 2007 (Albrecht and et.al. 2007).



Il est donc évident que malgré une réponse immunitaire dirigée contre le virus, ce dernier est toujours capable de se répliquer et de se disséminer dans l'organisme. L'une des raisons pouvant expliquer l'échec du système immunitaire à contrôler le virus est que le VIH-1 code pour plusieurs protéines accessoires (Vif, Vpr, Nef et Vpu) qui contrecarrent l'activité de protéines cellulaires destinées à bloquer sa réplication (voir la section 7 de l'introduction).

L'étude de la fonction de ces protéines accessoires est donc primordiale afin de développer de nouvelles avenues de traitement qui pourraient permettre d'éradiquer le virus de l'organisme des personnes infectées.

## 2.2 Classification

Le VIH-1 est un virus du genre *Lentivirus* faisant partie de la famille des *Retroviridae*. On retrouve aussi dans le genre *Lentivirus* le virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) ainsi que les virus d'immunodéficience simiens (VIS). Le VIH-1 est un rétrovirus dit complexe car en plus des cadres de lecture codant pour les protéines structurales et enzymatiques (*gag*, *pol* et *env*), aussi présents chez les rétrovirus simples, le VIH-1 possède des protéines régulatrices et accessoires. Sa capsidie contient deux copies du génome d'ARN simple brin de polarité positive et elle est recouverte d'une enveloppe lipidique provenant de la cellule infectée.

Plusieurs isolats du VIH-1 ont été séquencés et la comparaison des séquences nucléotidiques obtenues ont permis de distinguer trois groupes principaux de VIH-1 soient les groupes M (« main group »), O (« outliers ») et N (« new »), ainsi que plusieurs formes recombinantes. Le groupe M est prédominant et est divisé en 7 sous-types appelés clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) qui sont prévalant dans des régions géographiques différentes (Korber et al. 2001; Thomson and Najera 2005).

## 2.3 Organisation génomique

La structure génétique minimale des rétrovirus dits « simples » est constituée de trois gènes principaux : *gag* (« group-antigen »), *pol* (« polymerase ») et *env* (« envelope ») qui sont encadrés par deux régions longues et répétées (LTR pour « long terminal repeat »)

(5' LTR-*gag-pol-env*-LTR 3') (Figure 2). Les LTR ne codent pas pour des protéines virales mais sont plutôt des régions régulatrices nécessaires à la réplication virale.

Les gènes *gag* et *env* codent pour les protéines structurales du virus (Gag et Env). Chez le VIH-1, Gag est un précurseur poly-protéique dont les différents produits de clivage sont la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC) et le peptide p6. La protéine Env est divisée en deux portions, soit la portion transmembranaire gp41 et la portion extracellulaire gp120. Le gène *pol* code pour les protéines virales ayant des propriétés enzymatiques (protéase (PR), transcriptase inverse (TI) et intégrase (IN)) qui sont produites à partir d'un autre précurseur poly-protéique nommé Gag-Pol (Figure 2).

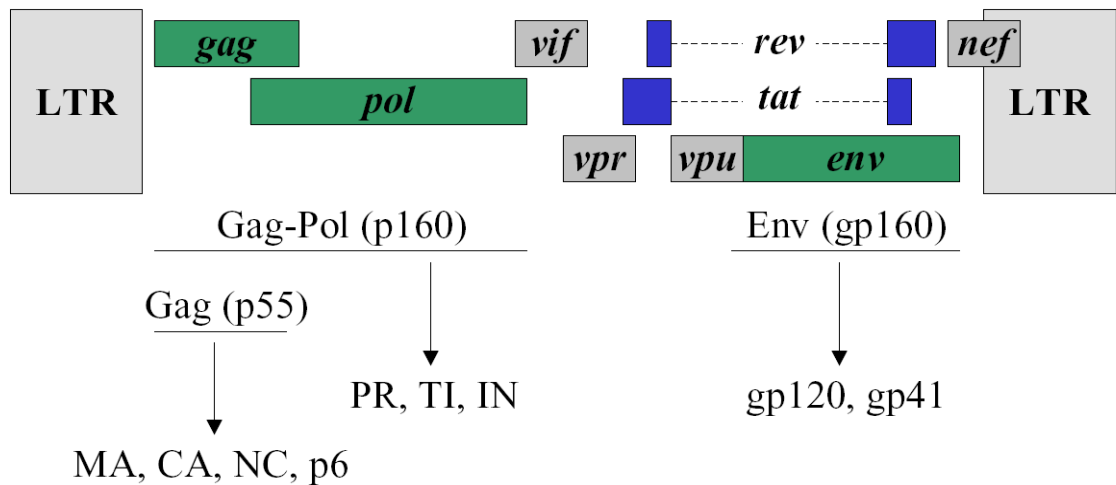
En plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, le VIH-1 possède six autres gènes (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef*) (Figure 2) qui codent pour des protéines régulatrices (Tat et Rev) et des protéines dites accessoires (Vif, Vpr, Vpu et Nef) puisqu'elles ne sont pas nécessaires à la réplication virale dans certaines lignées cellulaires humaines *in vitro*. Toutefois, ces protéines jouent un rôle important lors de la réplication virale *in vivo* et sont capables de favoriser la progression de la maladie chez les patients infectés par le VIH-1 (Fields and al. 1996).

## 2.4 Structure

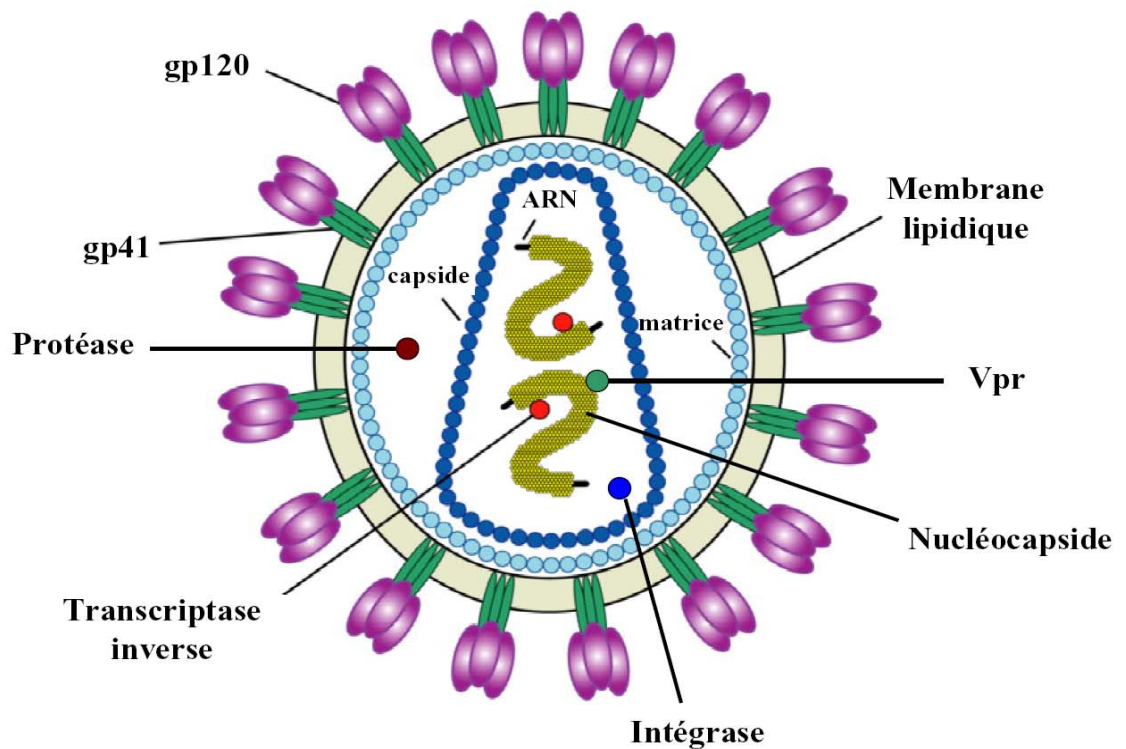
La particule virale du VIH-1, d'un diamètre d'environ 100nm, est entourée d'une membrane lipidique provenant de la cellule infectée. La Figure 3 montre un schéma de la particule virale mature. À la membrane, on retrouve des trimères de la glycoprotéine d'enveloppe virale qui est formée d'une sous-unité transmembranaire (gp 41) et d'une sous-unité externe (gp120). La protéine de la matrice virale (MA) tapisse la face interne de la membrane lipidique. La protéine de la capsid (CA) forme une capsid en forme de cône très caractéristique au VIH-1. La capsid contient deux copies du génome d'ARN viral complexé aux protéines de la nucléocapsid (NC) et à la transcriptase inverse (TI). La particule virale contient toutes les enzymes nécessaires pour la réplication virale, soient la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase (Albrecht and et.al. 2007).



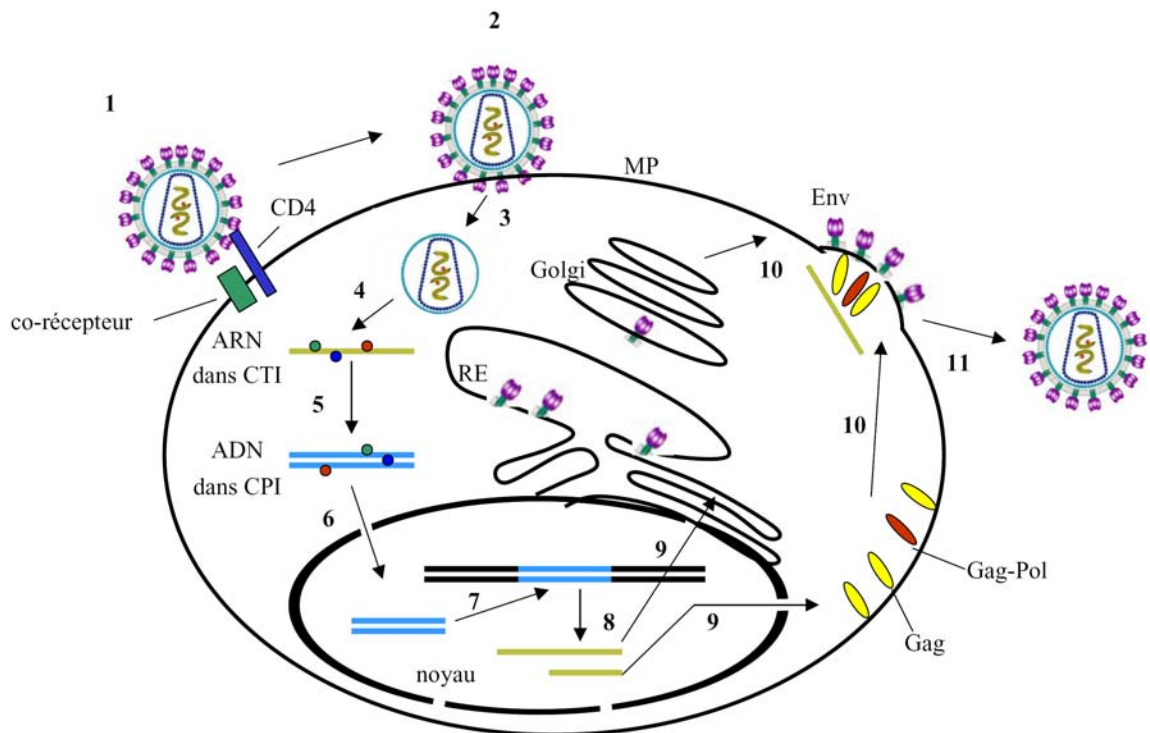
**Figure 2 : Organisation génétique du VIH-1.** En plus de ses trois gènes de base (*gag*, *pol* et *env*, présentés en vert), le VIH-1 code pour six autres gènes (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef*) qui codent pour des protéines régulatrices (Tat et Rev, présentées en bleu) et des protéines dites accessoires (Vif, Vpr, Vpu et Nef, présentées en gris). Les précurseurs Gag, Gag-Pol et Env sont montrés avec les protéines qui sont produites à partir de ceux-ci.



**Figure 3 : Schéma de la particule virale mature du VIH-1.** Dans la capside conique formée par la protéine de la capside, on retrouve les deux copies de l'ARN génomique qui est protégé par la nucléocapside. La protéine de la matrice tapisse la membrane lipidique virale. Toutes les enzymes nécessaires à la réplication virale et aussi la protéine Vpr sont incorporées dans la particule virale. On retrouve à la surface de la membrane des trimères de l'enveloppe virale composés des portions transmembranaires (gp41) et des portions de surface (gp120) qui servent à lier le récepteur CD4 et les co-récepteurs CXCR4 ou CCR5 à la surface des cellules cibles. Cette image a été originalement créée par le « National Institute of Health » (<http://www.niaid.nih.gov/factsheets/graphics/howhiv.jpg>). Elle fait partie du domaine public et n'est donc pas protégée par « copyright ». Elle a donc été reproduite et adaptée pour cette revue.



**Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1.** Les glycoprotéines d'enveloppe virale interagissent avec CD4 et les co-récepteurs CXCR4 ou CCR5 (1). Suite à la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique (MP) de la cellule cible (2), la capside est alors libérée (3) et il y a décapsidation et relâche du complexe de transcription inverse (CTI) (4). La transcription inverse convertit le génome d'ARN simple brin de polarité positive en ADN double brin que l'on nomme provirus (5). Le provirus est retrouvé au sein d'un complexe de pré-intégration (CPI) qui est alors transporté au noyau (6) où l'ADN proviral est intégré dans le génome cellulaire grâce à l'action de l'intégrase (7). Les ARN messagers viraux, produits par l'ARN polymérase cellulaire (8), sont transportés hors du noyau (9) et une partie de ces ARNm nécessite la protéine Rev pour quitter le noyau. Les protéines virales sont produites par la machinerie cellulaire. Les protéines de l'enveloppe sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique alors que les précurseurs Gag et Gag-Pol sont synthétisés dans le cytoplasme. Finalement, tous les composants de la particule virale s'assemblent pour former des particules virales immatures (10) qui subiront une maturation pendant le bourgeonnement et la relâche afin de produire des particules virales matures (11).



### 3. Cycle de réplication du virus

Le cycle de réplication du VIH-1 suit un schéma général assez simple qui est commun à tous les rétrovirus et est présenté à la Figure 4. Toutefois, plusieurs protéines virales sont impliquées dans la régulation des différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1. Chacune de ces étapes sera décrite en détail dans les prochaines sections en mettant l'accent sur le rôle des différentes protéines virales.

### 4. Attachement au récepteur et entrée dans la cellule

L'entrée du virus dans la cellule est une étape cruciale du cycle de réplication virale. Avant son entrée dans la cellule, le virus doit tout d'abord s'attacher à la membrane de la cellule cible via l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe avec le récepteur principal CD4 et avec un des différents co-récepteurs du virus dont il sera question plus bas.

#### 4.1 Récepteur principal : CD4

CD4 est le principal récepteur du VIH-1 et se lie à la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). CD4 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire qu'elle a un seul domaine transmembranaire, sa portion N-terminale se trouve à l'extérieur de la cellule et sa portion C-terminale est cytoplasmique. CD4 a un poids moléculaire de 55 kDa et est exprimé majoritairement à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup>, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules microgliales du cerveau (Rosenberg and Fauci 1989). CD4 est aussi le récepteur principal du VIH-2 et de certains isolats de VIS (Hoxie et al. 1988; Sattentau et al. 1988).

La liaison entre CD4 et la gp120 se fait via le domaine D1 situé dans la région N-terminale du domaine extra-cellulaire de CD4. Cette interaction est nécessaire pour la liaison du virus à la membrane cellulaire, mais elle est toutefois insuffisante pour permettre l'infection de la cellule. En effet, les lentivirus ont besoin de l'interaction de leurs glycoprotéines d'enveloppe avec un co-récepteur afin d'initier le processus de fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire. Ces co-récepteurs sont des récepteurs de chimiokines dont les deux principaux sont le CXCR4 et CCR5.

## 4.2 Co-récepteurs CXCR4 et CCR5

Les virus qui infectent les monocytes/macrophages (« M-tropic » ou R5) utilisent le co-récepteur CCR5 (Deng et al. 1996; Doranz et al. 1996; Dragic et al. 1996), alors que les virus qui infectent les cellules T (« T-tropic » ou X4) utilisent le co-récepteur CXCR4 (Feng et al. 1996). Ce classement a toutefois été effectué suite à la culture de virus sur des lignées de cellules immortalisées et les virus « M-tropic » et « T-tropic » sont tous deux capables d'infecter les cellules T primaires isolées du sang (Albrecht and et.al. 2007).

Il semble que les premiers virus retrouvés dans le sang d'une personne infectée sont du type R5. Durant le cours de la maladie, il y aurait ensuite émergence de virus plus cytopathiques de type X4 (Moore et al. 2004). Enfin, certaines études suggèrent que les virus R5 pourraient évoluer vers un tropisme mixte (« dual tropism ») R5/X4 pour ensuite devenir X4 (Collman et al. 1992; Singh and Collman 2000). Ce changement de tropisme viral serait associé à des mutations dans la région de l'enveloppe (Shioda et al. 1991).

## 4.3 Mécanisme moléculaire de l'entrée

Suite à la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 avec CD4, un changement conformationnel a lieu dans la gp120 qui permet d'exposer la boucle V3 qui est normalement masquée. Cette boucle est responsable du tropisme viral (R5 ou X4) puisqu'elle interagit de façon spécifique avec un ou l'autre des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (Hwang et al. 1991; Shioda et al. 1991). L'interaction entre la gp120, CD4 et le co-récepteur engendre un autre changement conformationnel ayant pour effet d'exposer le peptide de fusion de la sous-unité gp41 de l'enveloppe virale. Ce peptide de fusion s'insère alors dans la membrane cellulaire pour former une structure en épingle à cheveux qui adopte alors une conformation énergétiquement stable entraînant la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire (Sattentau and Moore 1991; Chan and Kim 1998).

## 5. Étapes de pré-intégration

Le cycle de réplication du VIH-1 est souvent divisé en deux parties. La première partie est constituée des processus précoces ayant lieu avant l'intégration du génome dans

celui de la cellule cible (étape de pré-intégration). La deuxième partie (tardive) commence après l'intégration (étape de post-intégration). Voyons tout d'abord les étapes de pré-intégration.

### 5.1 Décapsidation et transcription inverse

Suite à la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire, la capsid du virus est relâchée dans le cytoplasme. Le génome viral doit être transcrit en ADN par la TI avant de pouvoir s'intégrer au génome cellulaire et le processus de transcription inverse est initié à l'intérieur de la capsid. Toutefois, la déstructuration de la capsid (décapsidation) doit avoir lieu afin que la transcription inverse se poursuive (Auewarakul et al. 2005). Ce processus nécessite aussi un ARN de transfert ( $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{lys}}$ ) qui est encapsidé sélectivement dans la particule virale lors du cycle de réplication précédent (Jiang et al. 1993; Mak et al. 1994). Le génome d'ADN double brin produit par transcription inverse contient alors une région LTR (« long terminal repeat ») à chaque extrémité et est complexé à d'autres protéines virales. (Fields and al. 1996) Le complexe de pré-intégration (CPI) ainsi formé contient le génome d'ADN viral, des protéines virales (IN, MA, RT et Vpr) (Bukrinsky and Haffar 1998) ainsi que des protéines cellulaires comme BAF (« barrier-to-autointegration factor »), Lap2 $\alpha$  (« lamina-associated polypeptide 2 ») et LEDGF (« lens-epithelium-derived growth factor ») (Suzuki and Craigie 2007).

### 5.2 Transport du complexe de pré-intégration (CPI) au noyau

L'entrée de l'ADN des rétrovirus dans le noyau cellulaire nécessite généralement la désintégration de la membrane nucléaire ayant lieu durant la métaphase de la mitose (Suzuki and Craigie 2007). Le VIH-1, par contre, a aussi la capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas puisque son CPI peut être transporté activement au noyau en utilisant les pores nucléaires sans avoir besoin de la dissolution de la membrane nucléaire qui s'effectue lors de la mitose.

Il a été proposé que l'import nucléaire actif soit effectué grâce à des signaux de localisation nucléaire présents dans certaines protéines faisant partie du CPI telles que l'IN (Gallay et al. 1997; Bouyac-Bertoia et al. 2001), la MA (Bukrinsky et al. 1993; Haffar et al. 2000) et Vpr (Subbramanian et al. 1998). L'entrée active du CPI au noyau nécessiterait

aussi la présence d'une structure produite lors de la transcription inverse du génome viral, le « DNA flap » (Zennou et al. 2000; Ao et al. 2004).

### 5.3 Intégration dans le génome de la cellule cible

Suite à l'entrée du CPI dans le noyau, l'ADN proviral est intégré au génome cellulaire par l'action de la protéine virale IN. L'intégration du génome viral au génome cellulaire s'effectue aussi en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'IN clive deux paires de bases à chaque extrémité 3' du provirus libérant ainsi un groupement hydroxyle. L'IN clive alors l'ADN cellulaire et les groupements hydroxyles du provirus sont alors liés aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cellulaire. La machinerie cellulaire répare ensuite les bris d'ADN qui sont présents au site d'intégration (Brown et al. 1989). L'intégration du VIH-1 a lieu principalement au sein de gènes actifs (Schroder et al. 2002), préférentiellement en aval de la région où débute la transcription (Wu et al. 2003b).

## 6. Étapes de post-intégration

Le génome viral étant intégré dans le génome de la cellule cible, la formation de nouvelles particules virales peut alors débuter en commençant par la transcription et la maturation des ARNm viraux, leur transport du noyau au cytoplasme suivi de la synthèse des différentes protéines virales régulatrices et structurales. Cette étape est régulée de façon très étroite par les protéines virales régulatrices Tat et Rev.

### 6.1 Synthèse des ARNm viraux et de l'ARN génomique, rôle de Tat.

Le LTR présent en 5' du génome viral intégré possède une boîte TATA qui sert de séquence promotrice ainsi qu'un site d'initiation de la transcription et des sites de liaison à différents facteurs de transcription cellulaires tels que la protéine SP1 (Taube et al. 1999). Ces facteurs cellulaires permettent le bon positionnement de l'ARN polymérase II (ARN-pol II) et l'assemblage du complexe de pré-initiation au niveau du site d'initiation de la transcription sur le génome viral.

En amont du promoteur du génome viral se trouve une région amplificatrice (« enhancer ») de la transcription où se lient entre autres les facteurs cellulaires NF- $\kappa$ B (« nuclear factor  $\kappa$ B ») et NFAT (« nuclear factor of activated T cells ») qui régulent la transcription basale du VIH-1 (Pereira et al. 2000). Toutefois, la présence de la protéine virale Tat est nécessaire afin de favoriser l'élongation des transcrits.

Au début de la transcription, plusieurs petits transcrits non-polyadénylés sont synthétisés par l'ARN-pol II qui a une faible capacité d'élongation intrinsèque. Les protéines Tat, Rev et Nef sont produites à partir de ces petits ARNm épissés (Kim et al. 1989). En absence de Tat, la transcription s'arrête au niveau d'une structure secondaire présente en 5' de tous les transcrits d'ARN, nommée TAR (« *trans*-activation responsive region») (Kao et al. 1987; Brady and Kashanchi 2005). Tat active la transcription en se liant au TAR et en recrutant la cycline T1, une sous-unité du facteur positif d'élongation de la transcription b (P-TEFb) qui contient aussi la protéine kinase-9 cycline-dépendante (Cdk9). Ces facteurs entraînent l'hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN-pol II (domaine CTD) ce qui a pour effet d'augmenter sa processivité (Mancebo et al. 1997; Wei et al. 1998). Tat peut aussi stimuler la réplication virale par un mécanisme indépendant de TAR (Bagasra et al. 1992; Taylor et al. 1993).

## 6.2 Export et traduction des ARNm viraux, rôle de Rev

Après la synthèse des ARN viraux, ceux-ci sont soit laissés intacts ou épissés complètement ou partiellement. Les protéines précoces Tat, Rev et Nef sont produites à partir d'ARNm complètement épissés et transportés dans le cytoplasme constitutivement. L'expression de Rev est nécessaire pour la transition de la phase précoce du cycle d'infection du VIH vers la phase tardive où les protéines de structures et protéines accessoires sont produites (Strebel 2003). En effet, ces protéines sont produites à partir d'ARNm non-épissés ou épissés partiellement qui ne peuvent sortir du noyau en absence de Rev (Sodroski et al. 1986; Rosen et al. 1988; Malim and Cullen 1991). Le génome viral (non-épissé) nécessite aussi Rev afin d'être acheminé au cytoplasme pour l'assemblage.

Rev possède des signaux d'import (« nuclear localisation signal » ou NLS) et d'export (« nuclear export signal » ou NES) nucléaires qui lui permettent de transiter entre le noyau et le cytoplasme (Steffens and Hope 2001) par l'utilisation des voies normales



d'import/export du noyau (Nekhai and Jeang 2006). Une fois dans le noyau, Rev interagit avec le RRE (« Rev responsive element »), une structure en boucle qui se trouve au niveau de la région de Env sur les ARNm non-épissés ou épissés partiellement. Il y a ensuite interaction entre le NES de Rev et la protéine cellulaire CRM1 aussi appelée exportine 1. Cette interaction est nécessaire pour que les ARNm non épissés et épissés partiellement soient transportés au cytoplasme (Nekhai and Jeang 2006). Ainsi, Rev fait continuellement le voyage entre le noyau et le cytoplasme afin de faciliter le transport des ARNm viraux.

La machinerie de traduction cellulaire est responsable de la synthèse des protéines virales. La plupart des protéines sont traduites dans le cytoplasme, toutefois, les protéines de l'enveloppe et Vpu sont traduites au niveau du réticulum endoplasmique rugueux à partir du même ARNm mono-épissé (Schwartz et al. 1990). Les deux cadres de lecture de Env et Vpu se chevauchent sur cet ARNm et la synthèse d'Env semble être possible grâce à un mécanisme de « leaky scanning » durant lequel le ribosome passe outre le codon d'initiation de Vpu et permet ainsi la synthèse d'Env (Schwartz et al. 1990; Schwartz et al. 1992).

Les ARNm non-épissés qui sont traduits dans le cytoplasme de la cellule servent à faire la synthèse des précurseurs Pr55Gag et Pr160Gag-Pol (voir Figure 2). Le précurseur Gag-Pol est obtenu suite à un décalage d'un nucléotide du cadre de lecture à la fin de la traduction de Gag. Ce mécanisme nécessite la présence d'une structure en tige-boucle dans l'ARNm qui permet le glissement du ribosome d'un nucléotide durant la traduction du précurseur Gag (Jacks et al. 1988; Bidou et al. 1997).

### 6.3 Les protéines de structure et enzymatiques

Voyons tout d'abord comment les protéines de structure et enzymatiques sont synthétisées et assemblées pour former les nouvelles particules virales.

#### 6.3.1 Précurseurs Gag et Gag-pol

Les différentes protéines virales structurales et enzymatiques sont produites à partir de grands précurseurs poly-protéiques Gag, Gag-Pol et Env. Le précurseur Gag est nécessaire et suffisant à la formation de particules virales non infectieuses (VLP pour

« viral like particles ») (Gottlinger 2001). Toutefois, afin de former des particules virales infectieuses, Gag doit interagir avec l'ARN génomique, l'enveloppe virale, la membrane cellulaire ainsi que le précurseur Gag-Pol.

Pendant l'assemblage et le bourgeonnement viral, la protéase qui est codée par le précurseur Gag-Pol s'active et est responsable de la maturation des particules virales. Elle clive le précurseur Gag en quatre protéines soient la matrice (MA ou p17), la capsid (CA ou p24), la nucléocapsid (NC ou p7) et la protéine p6. Deux peptides plus petits qui servent de séparation entre les différentes protéines sont aussi générés pendant ce clivage, il s'agit de p2 et p1 (Krausslich et al. 1995) (Voir Figure 5). Il est important de noter que les différents produits de clivage du précurseur Gag immature jouent un rôle tardif lors de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales alors que les formes matures de ces protéines (faisant suite au clivage par la protéase) possèdent des fonctions précoces suite à l'entrée de la particule virale mature dans la cellule cible.

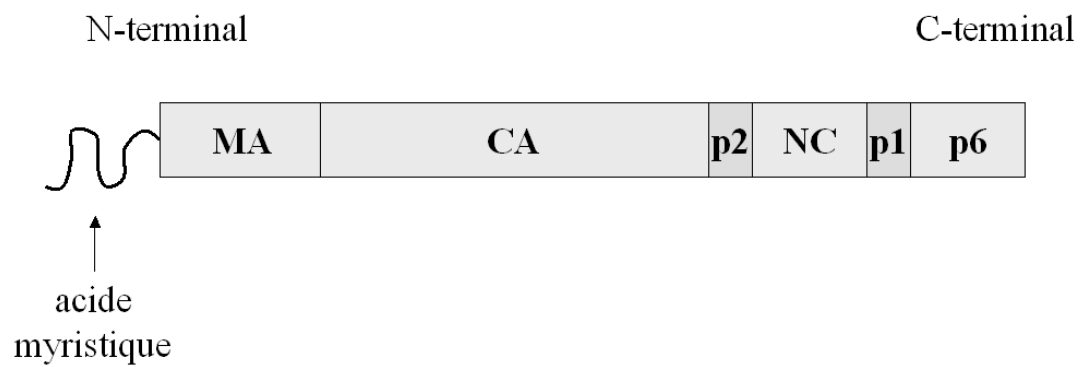
#### Protéine de la matrice : rôle tardif

Avant la maturation par la protéase virale, le précurseur Gag est myristylé au niveau de la portion MA qui est située en N-terminal du précurseur afin de lui permettre de s'associer aux membranes. Cette myristilation se traduit par l'ajout d'un acide gras de 14 carbones sur la glycine située en N-terminal du précurseur (Bryant and Ratner 1990). La myristilation est toutefois insuffisante pour permettre à Gag de s'associer de façon stable avec les membranes. La portion MA contient en plus un autre signal d'association aux membranes qui est composé de résidus hydrophobes (positions 6 à 8) et d'une région basique (positions 26 à 32) qui permet à la MA d'interagir avec les phospholipides des membranes qui possèdent une charge négative (Hermida-Matsumoto and Resh 1999; Ono and Freed 1999; Paillart and Gottlinger 1999). Elle interagit aussi avec la queue cytoplasmique de la gp41 pour permettre l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les particules virales (Yu et al. 1992; Dorfman et al. 1994b).

#### Protéine de la matrice : rôle précoce

Lors d'une nouvelle infection, la MA mature se dissocie des membranes et participerait au ciblage du CPI au noyau grâce à ses deux signaux de localisation nucléaire (Bukrinsky et al. 1992; Bukrinsky et al. 1993; von Schwedler et al. 1994; Haffar et al. 2000).

**Figure 5 : Schéma de l'organisation du précurseur Gag du VIH-1 avant son clivage par la protéase virale. MA (matrice), CA (capside), NC (nucléocapside).**



### Protéine de la capsid : rôle tardif

La CA possède deux domaines bien distincts. La portion N-terminale ou NTD est responsable de la forme conique de la capsid que l'on retrouve chez les particules virales matures. Ce domaine n'est toutefois pas nécessaire pour l'assemblage des particules virales immatures (Dorfman et al. 1994a; Borsetti et al. 1998). La portion C-terminale ou CTD est impliquée dans l'assemblage des particules virales matures et immatures et est responsable de la multimérisation du précurseur Pr55Gag (Dorfman et al. 1994a). On retrouve aussi dans le CTD une région très conservée parmi les capsides rétrovirales que l'on nomme MHR (« major homology region ») (Gottlinger 2001) qui pourrait jouer un rôle dans l'assemblage et la décapsidation du virus (Craven et al. 1995; Alin and Goff 1996; Cairns and Craven 2001).

### Protéine de la capsid : rôle précoce

Il est bien connu que la CA, en plus de protéger le génome viral, joue un rôle au niveau de la décapsidation lors d'une nouvelle infection. La capsid est capable d'incorporer dans la particule virale une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase appelée cyclophiline A (CypA) (Luban et al. 1993; Franke et al. 1994; Thali et al. 1994). La cyclophiline A est importante pour les étapes précoces de l'infection, mais celle qui est présente dans la cellule cible a plus d'importance que celle qui est incorporée dans la particule virale (Towers et al. 2003; Sokolskaja et al. 2004; Hatzioannou et al. 2005). Dans les cellules humaines, l'interaction entre la CA et CypA pourrait empêcher la liaison d'un facteur de restriction cellulaire à la CA qui bloquerait les étapes précoces du cycle de réplication viral (Hatzioannou et al. 2005; Towers 2007).

Le bloc de la réplication du VIH-1 observé en absence de CypA se produit à la même étape que celui observé lors de l'infection de cellules de singes (Himathongkham and Luciw 1996; Hofmann et al. 1999). Toutefois, dans ces cellules, le bloc de la réplication du VIH-1 est dû à la liaison du facteur de restriction TRIM5 $\alpha$  (« tripartite motif » 5 $\alpha$ ) à la capsid mature (Sayah et al. 2004; Stremlau et al. 2004). Contrairement à son effet dans les cellules humaines, l'expression de la CypA dans les cellules de singes de l'ancien monde (« old world monkeys ») entraîne l'inhibition de la réplication du VIH-1, mais seulement en présence de TRIM5 $\alpha$  (Berthoux et al. 2005; Keckesova et al. 2006; Stremlau et al. 2006).

### Protéine de la nucléocapside : rôle tardif

La NC possède deux motifs en doigts de zinc (« zinc finger ») qui sont requis pour l'encapsulation de l'ARN génomique viral à l'intérieur de la capsid (South and Summers 1993; Berkowitz et al. 1996). La liaison de la NC à l'ARN promouvoit la dimérisation et par la suite, la multimérisation de Pr55Gag (Alfadhli et al. 2005). Enfin, la NC stabilise le dimère du génome viral suite à la maturation du virion (Fu et al. 1994).

### Protéine de la nucléocapside : rôle précoce

La NC protège le génome viral des nucléases (Lapadat-Tapolsky et al. 1993; Tanchou et al. 1995) et participe à l'étape de transcription inverse en permettant l'initiation par sa liaison avec l'ARNt<sub>3</sub><sup>lys</sup> (Barat et al. 1993; Darlix et al. 1995).

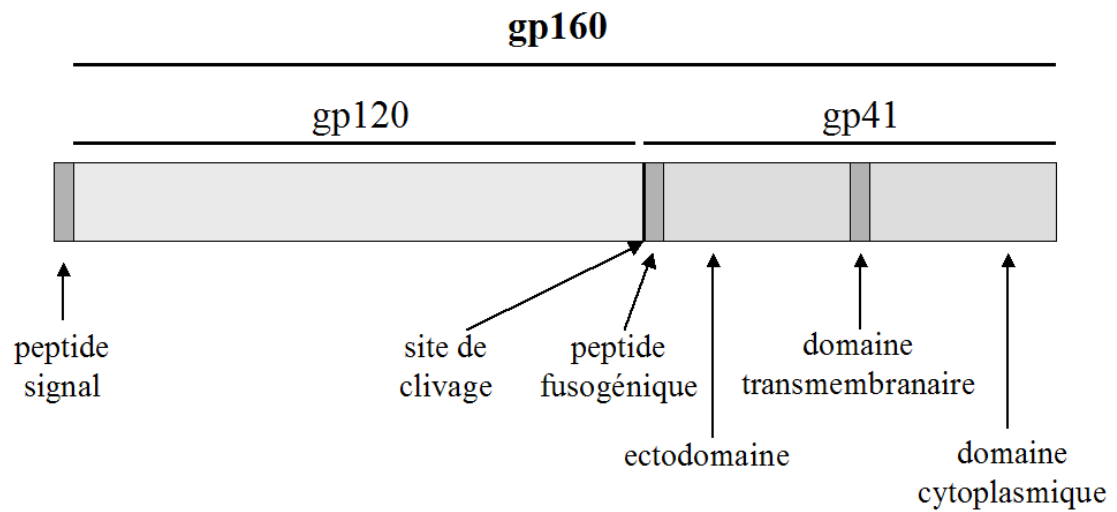
### Protéine p6

La protéine p6 joue essentiellement un rôle tardif dans le cycle de réplication virale. Jusqu'à maintenant, aucun rôle de p6 dans les étapes précoces du cycle de réplication viral n'a été identifié. Mis à part son rôle essentiel dans l'incorporation de la protéine accessoire Vpr à l'intérieur des particules virales (Paxton et al. 1993), p6 facilite une étape tardive du bourgeonnement viral (Gottlinger et al. 1991; Huang et al. 1995; Yu et al. 1995). En absence de p6, les nouveaux virus produits restent attachés à la membrane plasmique de la cellule productrice, visiblement bloqués à l'étape finale du bourgeonnement (Gottlinger et al. 1991). Deux motifs de p6 sont impliqués dans cette fonction, le motif P(T/S)APP (Gottlinger et al. 1991; Huang et al. 1995) et le motif YPLTSL (Strack et al. 2003; von Schwedler et al. 2003).

## 6.3.2 Structure et maturation des glycoprotéines de l'enveloppe virale

Les deux glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (gp120 et gp41) sont synthétisées sous forme du précurseur gp160 (voir Figure 6) au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Schwartz et al. 1990). La gp160 est une glycoprotéine membranaire de type I qui possède un peptide signal qui lui permet d'être insérée dans les membranes du RE lors de la traduction. Le peptide signal est ensuite clivé et le précurseur est glycosylé sur 24 asparagines (N-glycosylation) (Abeijon and Hirschberg 1990).

**Figure 6: Schéma du précurseur de l'enveloppe virale.** Les sous-unités de surface (gp120) et transmembranaire (gp41) sont représentées ainsi que les différentes régions importantes dans celles-ci.



L'association de la gp160 avec des chaperonnes du RE telles que BiP, calréticuline et calnexine est nécessaire à son repliement adéquat et à son oligomérisation sous forme de trimère (Willey et al. 1988; Earl et al. 1991; Otteken and Moss 1996). Les trimères sont ensuite transportés à l'appareil de Golgi où ils sont clivés en portions gp120 et gp41 par des proprotéines convertases cellulaires comme la furine (Hallenberger et al. 1992; Decroly et al. 1994; Decroly et al. 1997). Lors du clivage de la gp160, la structure trimérique est maintenue et la gp120 reste associée à la gp41 via un lien non-covalent (Center et al. 2002). Enfin, le clivage de la gp160 est nécessaire pour la fusion virale et donc pour l'infectivité (McCune et al. 1988; Freed et al. 1989).

La protéine de surface (gp120) est composée de cinq régions hypervariables (V1 à V5) et de cinq régions conservées (C1 à C5) (Starcich et al. 1986). La boucle V3 est exposée suite à la liaison de la gp120 avec le récepteur CD4 et cette région est la principale responsable du tropisme cellulaire (Hwang et al. 1991; Shioda et al. 1991).

La gp41 est composée de l'ectodomaine en N-terminal, du domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. À l'extrémité N-terminale de l'ectodomaine se trouve le peptide fusogénique de la gp41 qui est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire (Freed et al. 1990; Nieva et al. 1994). L'ectodomaine est formé de deux hélices *alpha* anti-parallèles qui forment une structure très compacte composée de six hélices sous la forme trimérique. La portion N-terminale de ces hélices (contenant le peptide fusogénique) se retrouve enfouie à l'intérieur de cette structure (Chan et al. 1997; Tan et al. 1997; Weissenhorn et al. 1997; Caffrey et al. 1998). L'exposition du peptide de fusion n'a lieu que si l'enveloppe interagit avec CD4 (Furuta et al. 1998).

La portion transmembranaire de la gp41 est nécessaire à l'ancrage des glycoprotéines d'enveloppe dans la membrane virale (Gabuzda et al. 1991) et pourrait aussi jouer un rôle controversé lors de la fusion (Helseth et al. 1991; Owens et al. 1994; Wilk et al. 1996; Miyauchi et al. 2005; Welman et al. 2007). Enfin, pour que les particules virales produites soient infectieuses, elles doivent incorporer efficacement les glycoprotéines d'enveloppe virales à leur surface.

## 6.4 Assemblage, bourgeonnement et sortie virale

L'assemblage des nouvelles particules virales est un processus complexe qui nécessite la dimérisation et la multimérisation de Gag, le recrutement de l'ARN génomique par Gag et le ciblage de Gag complexé à l'ARN, de Gag/Pol et des glycoprotéines d'enveloppe aux sites d'assemblage. L'assemblage a lieu principalement à la membrane plasmique et il semble que les particules virales soient rapidement internalisées dans des compartiments intra-cellulaires par la suite (Rudner et al. 2005; Harila et al. 2006; Jouvenet et al. 2006; Neil et al. 2006; Finzi et al. 2007). Toutefois, certaines études ont suggéré que l'assemblage puisse avoir lieu dans des compartiments endosomaux tardifs avant le bourgeonnement à la membrane plasmique (Nydegger et al. 2003; Pelchen-Matthews et al. 2003; Sherer et al. 2003; Lindwasser and Resh 2004; Ono and Freed 2004; Dong et al. 2005; Grigorov et al. 2006; Perlman and Resh 2006), mais l'apport de l'assemblage intracellulaire à la relâche de particules virales ne semble pas bien démontré jusqu'à présent.

Le Pr55Gag contient toutes les informations nécessaires à l'assemblage et le bourgeonnement de particules virales non-infectieuses appelées VLPs pour « viral like particles » (Gottlinger 2001). Trois domaines du précurseur Gag sont nécessaires à ce processus, il s'agit des domaines M, I et L dont les différentes fonctions sont expliquées ci-dessous.

### 6.4.1 Ciblage aux membranes : Domaine M

Le domaine M fait partie de la MA et comprend les premiers 32 acides aminés de cette dernière. Ce domaine est responsable de l'attachement du précurseur Gag aux membranes comme expliqué à la section 6.3.1. Toutefois, la MA possède un autre signal d'association aux membranes qui est composé de résidus hydrophobes (positions 6 à 8) et d'une région basique (positions 26 à 32) qui est nécessaire pour ancrer fermement le précurseur Gag aux membranes (Hermida-Matsumoto and Resh 1999; Ono and Freed 1999; Paillart and Gottlinger 1999). L'association de Gag aux membranes est nécessaire pour la production virale (Gottlinger 2001).



#### 6.4.2 Multimérisation : Domaine I

Le domaine I est impliqué dans la multimérisation du précurseur Gag et est représenté par la portion NC de Pr55Gag. La capacité de la NC à lier l'ARN est nécessaire à l'assemblage de Gag (Sandefur et al. 2000; Khorchid et al. 2002). Le processus exact de l'assemblage de Gag n'est pas encore tout à fait connu, toutefois, il semble que la liaison de la NC à l'ARN promouvoit la dimérisation et par la suite, la multimérisation de Pr55Gag (Alfadhli et al. 2005).

#### 6.4.3 Bourgeonnement : Domaine L

Le domaine L retrouvé dans la portion p6 du précurseur Gag est impliqué dans les dernières étapes de l'assemblage lors du bourgeonnement des particules virales à partir de la membrane cellulaire (Gottlinger et al. 1991).

Le mécanisme exact impliqué dans le bourgeonnement et la relâche extracellulaire des particules virales reste encore mal défini. Toutefois, deux motifs de la protéine p6 sont impliqués dans le recrutement de protéines cellulaires nécessaires au bourgeonnement. Le motif P(T/S)APP de p6 fait partie de domaines (domaines L ou « late domains ») qui sont connus chez les rétrovirus comme étant nécessaires aux étapes tardives du bourgeonnement (Demirov and Freed 2004; Morita and Sundquist 2004; Bieniasz 2006). Ce motif sert à recruter la protéine Tsg101 qui est un composant du complexe ESCRTI (« endosomal sorting complexes required for transport I ») (Garrus et al. 2001; VerPlank et al. 2001). ESCRTI sert normalement à reconnaître les protéines qui doivent être amenées vers les corps multivésiculaires. Il a été démontré que l'interaction entre p6 et Tsg101 était nécessaire pour l'étape ultime de la relâche virale, notamment l'étape de fission de l'enveloppe virale de la membrane plasmique (Garrus et al. 2001; Martin-Serrano et al. 2001; Demirov et al. 2002). Le rôle de p6 est donc de recruter Tsg101 dans le but d'utiliser la machinerie cellulaire pour permettre le bourgeonnement viral.

Le motif YPLTSL de p6 permet le recrutement de la protéine AIP1 (Strack et al. 2003; von Schwedler et al. 2003) qui est aussi impliquée dans la formation des vésicules à l'intérieur des corps multivésiculaires (Nikko et al. 2003; Odorizzi et al. 2003). Enfin, les protéines Tsg101 et AIP1 interagissent entre elles via un motif PTAP de AIP1 (Strack et al. 2003; von Schwedler et al. 2003).

## 7. Les protéines accessoires

Les protéines accessoires du VIH-1 sont impliquées dans différents aspects du cycle de réplication viral et sont aussi impliquées dans des mécanismes d'évasion du système immunitaire. Il est intéressant de noter qu'aucune de ces protéines n'a d'activité enzymatique intrinsèque. Elles semblent plutôt agir comme des adaptateurs capables de recruter plusieurs protéines cellulaires afin de moduler leur fonction, d'induire leur dégradation ou de modifier leur emplacement dans la cellule. Il est d'ailleurs remarquable que plusieurs de ces protéines accessoires utilisent le système cellulaire ubiquitine-protéasome dans le but d'induire la dégradation de substrats cellulaires qui autrement, seraient capables de limiter la propagation virale. Un aperçu de la fonction de chacune de ces protéines est présenté dans les sections suivantes.

### 7.1 Nef

Nef (« negative factor ») est une protéine myristylée d'environ 27 kDa qui s'associe à la face cytoplasmique des membranes cellulaires (Fackler et al. 1997). Malgré le nom qui lui a été donné, Nef affecte positivement la réplication virale et l'infectivité (Miller et al. 1994a; Miller et al. 1994b). Elle est une des premières protéines à être produite pendant l'infection et elle a plusieurs fonctions.

Nef augmente l'infection par le VIH-1 en activant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui les rend plus susceptibles à l'infection. Pour ce faire, Nef altère la transduction de signaux via le récepteur T (Skowronski et al. 1993; Baur et al. 1994). L'interaction de Nef avec la voie de signalisation du récepteur T induit aussi l'augmentation de l'expression du ligand Fas (FasL) à la surface cellulaire ce qui pourrait protéger la cellule infectée en induisant l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) voisins de cette cellule (Xu et al. 1999).

Afin de protéger la cellule infectée de l'apoptose via les voies FasL et TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor »), Nef se lie et supprime l'activité de ASK1, une kinase cellulaire qui est responsable de la transduction de signaux pro-apoptiques à partir de FasL et du récepteur à TNF (Badley et al. 1997; Geleziunas et al. 2001). Nef inhibe aussi l'apoptose par d'autres mécanismes (Wolf et al. 2001). De plus, Nef diminue la formation des

synapses immunologiques en agissant sur le trafic du récepteur T (TCR-CD3) à partir de la membrane cellulaire (Thoulouze et al. 2006).

Nef augmente la production de particules virales infectieuses (Fauci 1988; Goldsmith et al. 1995) par la diminution des niveaux de CD4 à la surface de la cellule infectée (fonction décrite aux sections 8.1 et 8.2). Toutefois, il semble que Nef augmente l'infectivité des particules virales par un autre mécanisme qui est indépendant de CD4 (Goldsmith et al. 1995; Madrid et al. 2005). De récentes données montrent que Nef interagit avec la dynamine 2, une GTPase qui est nécessaire à l'endocytose dépendante de la clathrine, et que cette interaction est nécessaire à l'augmentation de l'infectivité par Nef (Pizzato et al. 2007). Par ailleurs, il a été récemment démontré que la protéine Nef de certains isolats de VIS, mais aussi du VIH-1 et du VIH-2 pourrait contrecarrer l'effet de la protéine BST2 d'origine simienne, mais non d'origine humaine (Jia et al. 2009; Zhang et al. 2009). BST2 est une protéine cellulaire qui trappe les virus à la surface de la membrane plasmique, ce qui empêche leur relâche dans le milieu extracellulaire (voir section 7.4.2).

Nef induit la régulation négative des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) à partir de la surface des cellules infectées (Schwartz et al. 1996). Ce processus représente un important mécanisme d'évasion de l'attaque par les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Collins et al. 1998). Toutefois les cellules infectées qui n'ont pas suffisamment de CMHI à leur surface deviennent des cibles pour les cellules tueuses naturelles « NK » («natural killer») (Natarajan et al. 2002). Pour éviter ce problème, Nef induit préférentiellement la régulation négative des allotypes HLA-A et HLA-B du CMHI tout en ayant aucun effet sur les allotypes HLA-C et HLA-E (Cohen et al. 1999; Williams et al. 2002). La présence des molécules de type C et E à la surface cellulaire représente un signal inhibiteur pour les cellules NK (Cohen et al. 1999). Ainsi, Nef protège la cellule infectée contre l'immunité cellulaire acquise, mais aussi contre l'immunité cellulaire innée.

Nef pourrait favoriser la propagation virale en agissant sur les cellules dendritiques. Ces cellules capturent le virus via le récepteur DCSIGN et peuvent ainsi transmettre le virus aux cellules cibles du VIH-1 sans devenir infectées de façon productive. Par contre, dans certaines circonstances, les cellules dendritiques peuvent être infectées (Burleigh et al. 2006; Granelli-Piperno et al. 2006) et il a été démontré dans des co-cultures de cellules dendritiques et de cellules T que Nef augmente l'expression de DCSIGN afin de promouvoir la propagation virale (Sol-Foulon et al. 2002).

Enfin, dans les macrophages, Nef induit la production de cytokines MIP1 $\alpha$  (« macrophage inflammatory protein » 1 $\alpha$ ) et MIP1 $\beta$  en plus d'autres facteurs solubles afin de recruter les cellules T et faciliter la transmission du virus (Swingler et al. 1999; Swingler et al. 2003).

## 7.2 Vpr

Vpr (« viral protein R ») est une protéine de 96 acides aminés qui est incorporée dans la particule virale via son interaction avec un motif di-leucine présent dans la portion C-terminale de la protéine p6 (Accola et al. 1999; Bachand et al. 1999; Selig et al. 1999). Vpr est retrouvée dans la capsid du virus (Accola et al. 2000a; Welker et al. 2000) où elle est fortement associée avec l'ARN génomique (Zhang et al. 1998; de Rocquigny et al. 2000). Elle est aussi retrouvée libre dans le sérum et le fluide cérébro-spinal des patients sidéens (Le Rouzic and Benichou 2005). Il est à noter que les fonctions principales de Vpr sont ségréguées en deux protéines distinctes dans la lignée VIH-2/VISm/VISmac chez qui la protéine Vpr est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en G2 alors que la protéine Vpx est nécessaire à l'infection productive des macrophages (Fletcher et al. 1996; Sleight et al. 1998), fonctions qui seront discutées ci-dessous.

Il est généralement accepté que Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 par un processus qui ressemble à la réponse cellulaire au stress répliatif ou aux dommages à l'ADN impliquant la kinase ATR (Roshal et al. 2003; Zimmerman et al. 2004; Lai et al. 2005) et/ou ATM (Tachiwana et al. 2006; Nakai-Murakami et al. 2007). L'association de Vpr avec l'ubiquitine ligase (E3) « Cullin4A-DDB1 » via la protéine DCAF1 (« DDB1-cullin4-associated factor 1 », originellement appelée VprBP pour « Vpr binding protein ») (Belzile et al. 2007; DeHart et al. 2007; Hrecka et al. 2007; Le Rouzic et al. 2007; Schrofelbauer et al. 2007; Tan et al. 2007; Wen et al. 2007) est nécessaire à sa fonction d'arrêt de cycle en G2 (Belzile et al. 2007; Dehart and Planelles 2008). Vpr pourrait donc agir en tant que connecteur entre la E3 et un facteur cellulaire encore inconnu dont la dégradation ou la modulation de son activité par ubiquitination activerait la voie ATR menant à un arrêt de cycle en phase G2. Cet arrêt de cycle pourrait être important pour la pathogenèse virale puisque la transcription est plus active en G2, ce qui aurait pour effet d'augmenter la production virale (Goh et al. 1998). Pour terminer, d'autres études ont

suggéré que l'arrêt du cycle cellulaire en G2 par Vpr implique des facteurs cellulaires différents de ceux mentionnés plus haut, comme par exemple la protéine d'échafaudage 14-3-3 (Kino et al. 2005; Bolton et al. 2008).

Vpr est importante pour permettre au virus de se répliquer dans les cellules complètement différenciées ou quiescentes en facilitant l'import nucléaire du CPI (Heinzinger et al. 1994; Connor et al. 1995; Gallay et al. 1996) par son interaction avec la machinerie de transport cellulaire qui régule le trafic noyau-cytoplasme (Fouchier et al. 1998; Popov et al. 1998a; Popov et al. 1998b; Vodicka et al. 1998; Le Rouzic et al. 2002).

Malgré les données suggérant que Vpr facilite l'import nucléaire du CPI dans les cellules quiescentes, des résultats ont montré que Vpr peut faciliter l'infection de macrophages de façon indépendante de sa stimulation de l'import nucléaire du CPI (Yamashita and Emerman 2005). D'autres données concernant cette fonction de Vpr ont été obtenues grâce à l'étude de Vpx. Vpx pourrait saturer un facteur de restriction retrouvé chez les macrophages et les cellules dendritiques qui agirait à une étape précoce du cycle de réplication virale (Goujon et al. 2007; Sharova et al. 2008). Par le recrutement de la même E3 que Vpr, Vpx induirait la dégradation du facteur de restriction, facilitant ainsi l'infection de macrophages en permettant de compléter la transcription inverse du génome viral (Le Rouzic et al. 2007; Sharova et al. 2008; Srivastava et al. 2008). Jusqu'à maintenant, il n'est pas certain que la protéine Vpr interagisse avec ce même facteur de restriction dans les macrophages (Malim and Emerman 2008).

Il est toutefois connu que Vpr joue un rôle dans le processus de rétrotranscription. En plus d'avoir un rôle dans l'initiation de ce processus (Stark and Hay 1998), Vpr est importante pour augmenter la fidélité de la TI (Mansky and Temin 1995; Mansky 1996; Chen et al. 2004). Cette fonction de Vpr semble corrélée avec son interaction avec la UNG2 nucléaire (« uracyl DNA glycosylase 2 ») (Mansky et al. 2000). Paradoxalement, Vpr semble induire la dégradation de UNG (Schrofelbauer et al. 2005).

Pour terminer, Vpr est reconnue pour causer l'apoptose ou la nécrose des cellules (Muthumani et al. 2005; Sakai et al. 2006)(revue dans (Le Rouzic and Benichou 2005)). Il est suggéré que la toxicité de Vpr soit reliée à sa fonction d'arrêter les cellules en phase G2 (Andersen et al. 2006). Toutefois, il semble que ces deux processus soient distincts dans certains systèmes de culture cellulaire (Bolton and Lenardo 2007).

### 7.3 Vif

L'étape de transcription inverse est la cible d'un facteur de restriction cellulaire appelé APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G ») qui est incorporé dans la particule virale par une combinaison d'interactions avec la protéine NC du virus (Alce and Popik 2004; Cen et al. 2004; Douaisi et al. 2004; Schafer et al. 2004) et avec l'ARN (Schafer et al. 2004). Sa présence chez les cellules productrices se traduit par une activité anti-rétrovirale lorsque la protéine virale Vif (« viral infectivity factor ») est absente (Sheehy et al. 2002). APOBEC3G a une activité cytosine déaminase (Harris and Liddament 2004) qui induit une hypermutation du génome viral nouvellement synthétisé résultant en la création de codons stop ou de transitions G-A et possiblement en la dégradation de l'ADN rétrotranscrit (Harris et al. 2003; Lecossier et al. 2003; Mangeat et al. 2003; Zhang et al. 2003; Huthoff and Malim 2005).

La protéine Vif supprime l'activité antivirale d'APOBEC3G en induisant sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome (Marin et al. 2003; Yu et al. 2003; Mehle et al. 2004) ce qui a pour effet d'empêcher son incorporation dans les particules virales nouvellement produites. Pour induire la dégradation d'APOBEC3G, Vif recrute plusieurs composants d'une ubiquitine ligase à base de culline (« Cul5-elonginB-elonginC-Rbx1 ») qui induit la poly-ubiquitination d'APOBEC et ultimement, sa dégradation par le protéasome (Mehle et al. 2004; Yu et al. 2004). La fonction de Vif est spécifique à l'espèce que le virus infecte (Gaddis et al. 2004). Cette spécificité est due à la capacité de Vif à se lier ou non aux protéines APOBEC3G des différentes espèces (Holmes et al. 2007b). Une autre cytosine déaminase est capable d'inhiber la réplication virale. En effet, il a été démontré qu'APOBEC3F a aussi une activité anti-rétrovirale efficace (Holmes et al. 2007b) qui est contrecarrée par Vif (Liu et al. 2005).

L'activité antivirale d'APOBEC3G ou 3F ne dépend pas seulement de leur activité déaminase. L'infectivité des virus est réduite même en présence de protéines APOBEC déficientes pour leur capacité d'édition de l'ADN (Newman et al. 2005). Il semble que ces protéines affectent l'étape de transcription inverse et l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire (Holmes et al. 2007a; Iwatani et al. 2007; Mbisa et al. 2007).

Vif est incorporée dans la particule virale et coupée par la protéase virale. Ce processus serait important pour la production de particules virales infectieuses (Khan et al. 2002). Vif pourrait aussi stabiliser la nucléocapside du virus par son interaction avec la

région 5' du génome (Hoglund et al. 1994; Simon and Malim 1996; Ohagen and Gabuzda 2000; Henriët et al. 2005). Vif module l'activité de la TI soit en stimulant la liaison de la TI et de l'amorce sur le génome, soit en augmentant le taux de polymérisation de la TI (Cancio et al. 2004). Enfin, des résultats récents suggèrent que Vif puisse induire un arrêt de cycle en G2 (Wang et al. 2007a). Paradoxalement, le même groupe a démontré que Vif induirait la dégradation de Vpr lors des phases précoces du cycle de réplication viral, entraînant ainsi une diminution de l'arrêt de cycle en G2 normalement induit par Vpr (Wang et al. 2008).

## 7.4 Vpu

La protéine Vpu (« viral protein U ») et ses fonctions a été le sujet d'une revue dont j'étais le premier auteur qui a été publiée en 2004 dans « Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders ». Cette revue est présentée ci-dessous et elle sera suivie de la mise à jour des connaissances sur les fonctions de cette protéine.

Les numéros de figures ont été modifiés afin de faire suite aux figures présentées dans l'introduction et sont donc listées dans la liste de figures au début de cette thèse. Le format des références a été ajusté afin qu'elles soient insérées dans la bibliographie finale de cette thèse.

### 7.4.1 Article 1 : Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions

## **RECENT ADVANCES IN THE UNDERSTANDING OF HIV-1 VPU ACCESSORY PROTEIN FUNCTIONS**

Julie Binette and \*Éric A. Cohen

Laboratory of Human Retrovirology, Department of Microbiology and Immunology  
Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Canada, H3C 3J7

\*To whom correspondence should be sent

KEYWORDS: HIV-1, Vpu, CD4 degradation, viral release, viral spread

## ABSTRACT

HIV-1 encodes a number of accessory proteins, which are not commonly found in other retroviruses. These proteins, which include Vif, Vpr, Vpu and Nef, act as multifunctional adapters capable of recruiting and modulating basic host cell processes to optimize wide-ranging aspects of viral replication. This review describes our current understanding of how the Vpu accessory protein functions to modulate HIV-1 particle release and CD4 receptor expression during HIV-1 infection and underlines the potential opportunities afforded by this viral protein for therapeutic intervention.

## INTRODUCTION

One of the defining features of primate lentiviruses, including human immunodeficiency virus- type 1 (HIV-1), is that they encode a number of proteins, the so-called accessory proteins, which are not commonly found in other retroviruses. These proteins, which include Vif, Vpr, Vpu and Nef, are not essential for viral replication in all cell culture conditions as their name suggests but nonetheless, modulate replication, viral spread and host cell survival in specific cell types or cellular states. Indeed, *in vivo* studies have clearly demonstrated that accessory proteins regulate the infectious and pathogenic process of the virus and as such can dramatically alter the course and severity of viral infection upon their inactivation (Greene and Peterlin 2002). While in many cases the molecular basis of accessory protein function is not fully understood, it appears that these viral proteins share a common mechanistic strategy in that they are generally devoided of enzymatic activity. Instead, they act as multifunctional adapters capable of recruiting and modulating basic host cell processes to optimize wide-ranging aspects of viral replication including infectivity (Vif, Nef and Vpu), gene expression (Vpr) and progeny viral production (Vpu) (Bour and Strebel 2003). The goal of the present review is to describe our current understanding of how the Vpu accessory protein functions to modulate HIV-1 replication and pathogenesis as well as to underline the potential opportunities afforded by Vpu for therapeutic intervention.

The *vpu* gene is unique to HIV-1 and is not found in HIV-2 and most simian immunodeficiency viruses (SIV) except for some HIV-1 related monkey isolates such as SIVcpz (chimpanzee), SIVgsn (greater spot-nosed monkey) and the newly isolated SIVmon

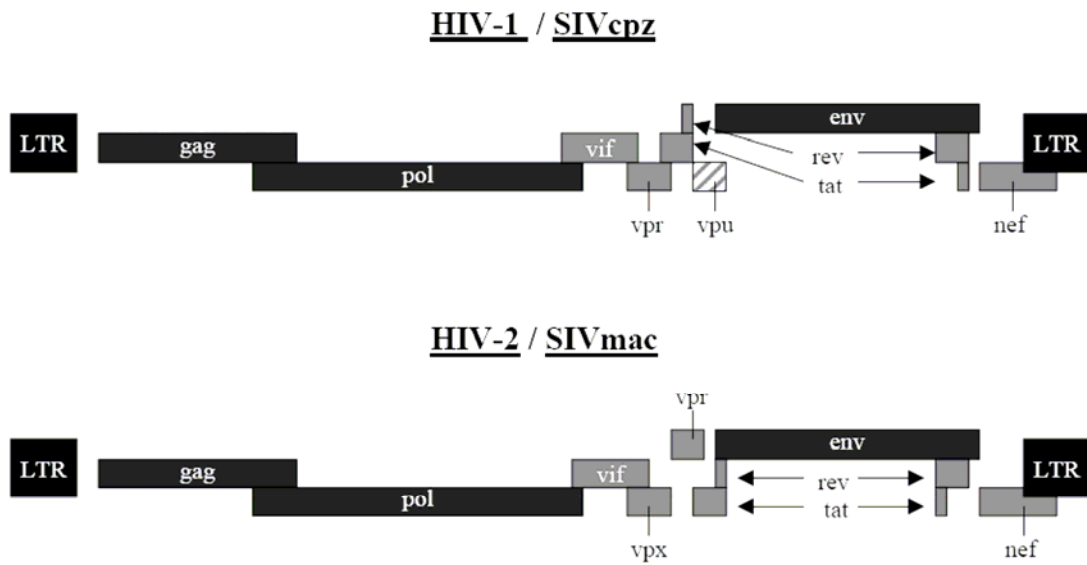


(mona monkey), and SIV<sub>mus</sub> (mustached monkey) (Fig.(7)) (Cohen et al. 1988; Strebel et al. 1988; Huet et al. 1990; Courgnaud et al. 2002; Courgnaud et al. 2003). The protein is translated from a Rev-dependent bicistronic mRNA, which also encodes the viral envelope glycoprotein (Env). This genetic organization is thought to lead to the coordinated expression of Vpu and Env during HIV-1 replication with Env glycoproteins being translated by leaky scanning of the Vpu initiation codon (Schwartz et al. 1990). Interestingly, several laboratory adapted strains and primary isolates of HIV-1 harbour defective *vpu* gene because of the presence of mutated initiation codons or internal deletions (Kuiken et al. 2000), raising the possibility that in some physiological or cell culture conditions, inactivation of the *vpu* gene or regulation of Vpu biological activities may confer a selective advantage to the virus (Schubert et al. 1999; Gummuluru et al. 2000; Bour and Strebel 2003).

## VPU STRUCTURE

HIV-1 Vpu is an 81-amino acids class I integral membrane protein of 16-kDa capable of homo-oligomerization (Cohen et al. 1988; Strebel et al. 1988; Maldarelli et al. 1993). The protein consists of an N-terminal hydrophobic membrane anchor domain of 27 amino acids and a charged C-terminal hydrophilic domain of 54 residues that extends into the cytoplasm (Maldarelli et al. 1993; Wray et al. 1995) (Fig.(8)). This cytosolic domain contains a highly conserved dodecapeptide sequence encompassing residues 47-58, which comprises a pair of serine residues (S<sub>52</sub> and S<sub>56</sub>) that are phosphorylated by casein kinase II (Schubert et al. 1992; Schubert and Strebel 1994; Friberg et al. 1995). Spectroscopic investigations attempting to achieve a structural model of the protein have relied initially on partial structures using synthetic peptides corresponding to the C-terminal hydrophilic domain or fragments derived from it. Using circular dichroism (CD) spectroscopy and/or proton nuclear magnetic resonance (NMR) in solution, several studies (Henklein et al. 1993; Wray et al. 1995; Federau et al. 1996) have reported similar putative structures for the cytosolic hydrophilic domain of Vpu that can be summarized as follows: an  $\alpha$ -helical motif from residues 37-51, an interconnecting flexible loop from residues 52-56 containing the two phosphoacceptor sites and a second  $\alpha$ -helix from residues 57-72 followed by a turn motif from residues 73-78 (Fig.(8)). Vpu helix 1 is amphipatic with hydrophobic, basic (positively charged) and acidic (negatively charged) residues clustered along the axis of the

**Figure 7:** Genomic organization of HIV-1/SIVcpz and HIV-2/SIVmac showing that HIV-1/SIVcpz have a vpu coding region in their genome that is not present in HIV-2/SIVmac.

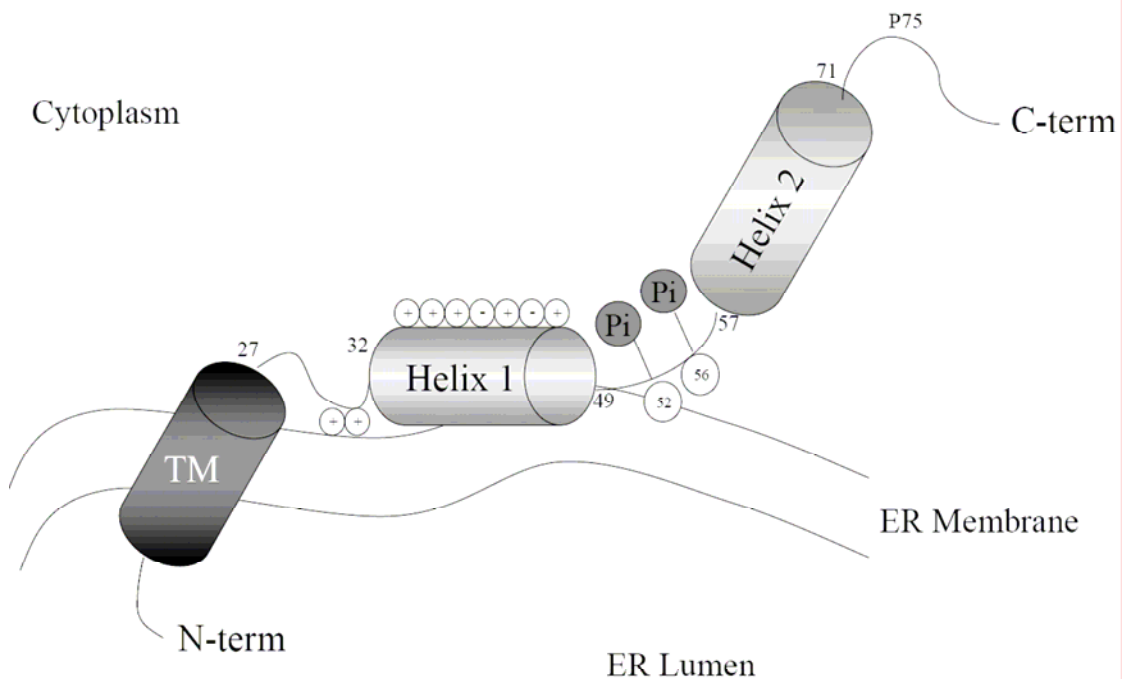


**Figure 8 :** Alignment of the consensus Vpu sequences from the major clades of HIV-1 and SIVcpz as previously described (Kuiken et al. 2000). The structural domains of Vpu are shown as well as the phosphorylation sites, marked by a circled P. The well-conserved dodecapeptide domain of the protein is in bold. A dot represent an absence of amino acid at this position compared with the other consensus sequences and the interrogation mark is placed when no amino acid can be selected as a consensus in all the representative isolates of this clade.

	<b>Transmembrane</b>	
	1 ————— 27	
HIV-1 pNL4-3	M Q P I . . . . . P I V A I V A L V V A I I I A I V V W S I V I I E Y . R K	
HIV-1 Consensus A	M S P L ? . . . . ? ? E I ? A I V G L I V A L I L A I V V W T I V G I E Y . K K	
HIV-1 Consensus B	M Q P L . . . . . Q I L A I V A L V V ? A I I A I V V W T I V F I E Y . R K	
HIV-1 Consensus C	M ? D L L A ? K V D Y R L G V G A L I V A L I I A I V V W T I V Y I E Y . R K	
HIV-1 Consensus D	M Q P L . . . . . E I L A I V A L V V A L I L A I V V W T I V F I E ? . R R	
SIVcpz Consensus	M L ? W . . . . . E Q I G L ? A L G I E ? I I ? I V ? W G ? A ? K K W ? K ?	
	<b><math>\alpha</math>-helix 1</b>	
	32 ————— 49	(P) (P)
HIV-1 pNL4-3	I L R Q . . R K I D R . L I D R L I E R A E D S G N E S	
HIV-1 Consensus A	L L K Q . . R K I D R . L I E R I R E R A E D S G N E S	
HIV-1 Consensus B	I L R Q . . R K I D R . L I D R I R E R A E D S G N E S	
HIV-1 Consensus C	L L R Q . . R K I D W . L ? K R I R E R A E D S G N E S	
HIV-1 Consensus D	I K R Q . . R K I D W . L I D R I R E R A E D S G N E S	
SIVcpz Consensus	K E E ? N R ? Q ? I R ? L ? E R I R ? R Q E D S G N E S	
	<b><math>\alpha</math>-helix 2</b>	
	57 ————— 71	
HIV-1 pNL4-3	E G . . . E V S A L V E M G V E M G H H A . P W D . I D D L	82
HIV-1 Consensus A	D G D T E E L S ? L . . . . ? E M G N Y D . L G D . D N N L	81
HIV-1 Consensus B	E G D Q E E L S A L . . . . V E M G H H A . P W D . V D D L	81
HIV-1 Consensus C	E G D T E E L S T M . . . . V D M G H L R . L L D . V N D L	86
HIV-1 Consensus D	E G D K E E L S ? L . . . . V E M G H H A . P W D . V D D ? L	81
SIVcpz Consensus	D G E E E ? Q L D . . . . . ? ? ? H ? N G . F D N P M F D W	85

helix. Although Vpu helix 2 displays a degree of amphipathicity, it is less striking than helix 1. While most studies regarding Vpu structure agree that the cytoplasmic domain of Vpu is composed of two amphipathic  $\alpha$ -helices separated by a flexible segment, the extent of each  $\alpha$ -helix as well as the length of the linker region vary according with how Vpu products were produced, the properties of the resuspending solution as well as the type of spectroscopic analysis used (Federau et al. 1996; Willbold et al. 1997; Coadou et al. 2002; Ma et al. 2002). More recent investigations have used solid-state NMR (SSNMR) studies on lipid bilayer systems to get a better understanding of Vpu structure in a more physiological environment. Spectra obtained by SSNMR of uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled full length Vpu or truncated forms of the protein reveal that the transmembrane (TM) domain of Vpu forms a stable helical structure perpendicular to the membrane surface with a tilt angle of approximately  $15\text{-}20^\circ$  (Marassi et al. 1999; Wray et al. 1999). For a complete review reporting the gain of knowledge about Vpu structure in a chronological order, we refer the reader to a recent review article from WB Fisher (Fischer 2003). A model of Vpu topology integrating all available structural data has recently been proposed by Bour and Strebel (Bour and Strebel 2003) and is depicted in Fig.(9). The N-terminal TM anchor domain forms a stable helical structure connected to the cytoplasmic domain by a flexible unstructured loop. The cytoplasmic  $\alpha$ -helix 1 is aligned parallel to the membrane surface with its hydrophobic side partially buried into the lipid bilayer and its hydrophilic side exposed toward the cytoplasm. The flexible arm region interconnecting the two cytoplasmic helices is believed to be oriented away from the negatively charged lipid surface because of the presence of the negative charge of the two conserved phosphoserine residues. Although several structural studies have established that the second cytoplasmic helix is also aligned parallel to the membrane (Marassi et al. 1999; Zheng et al. 2001; Zheng et al. 2003), other evidence, such as the strong negative electrostatic charge of helix 2 and the presence of two negatively charged phosphoserine residues in close proximity, point toward a model whereby helix 2 extends away from the negatively charged membrane surface (Bour and Strebel 2003). The current models of Vpu tertiary structure and topology in a membrane environment do not take into account the fact that Vpu is capable of forming homo-oligomers (Maldarelli et al. 1993) and that Vpu is known to interact with host cell factors such as CD4 (Bour et al. 1995b),  $\beta$ -TrCP (beta transducin-

**Figure 9 :** Secondary and tertiary structure of Vpu showing the N-terminal TM alpha-helix as well as the cytosolic domain of the protein composed of two amphipatic alpha-helices. The numbers represent the amino acids position and the phosphorylation sites in positions 52 and 56 of the protein are represented by “Pi”. The hydrophobic part of helix 1 is partially buried in the membrane and its hydrophilic amino acids (represented by + and – signs) are pointing toward the cytoplasm. The proline residue at position 75 induces a turn in the C-terminal cytosolic tail.



repeat containing protein) (Margottin et al. 1998), UBP (Vpu binding protein) (Callahan et al. 1998) and the TASK-1 (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup>) ion channel (Hsu et al. 2004). It is likely that these protein interactions will have a significant impact on the overall conformation of Vpu in membranes and as such will need to be addressed in future structural models of Vpu.

## VPU BIOLOGICAL FUNCTIONS

Vpu has two main biological functions, during infection of HIV-1 target cells in tissue culture systems: 1) the protein induces a rapid degradation of the viral receptor CD4 retained in a complex with the Env precursor gp160 in the endoplasmic reticulum (ER) (Willey et al. 1992a); and 2) Vpu promotes efficient release of progeny HIV-1 viruses in different human cell types, including T cells and macrophages (Strebel et al. 1988; Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990; Schubert et al. 1995). Vpu has also been reported to interfere with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules (Kerkau et al. 1997) but this function has not been analyzed further.

### 1. CD4 receptor degradation mediated by Vpu

Despite the critical role played by the CD4 receptor during viral entry, it is well established that HIV-1, like many enveloped viruses, down-regulates the cell surface expression of its cognate receptor. However, although this effect is achieved by most viruses through simple retention of Env glycoprotein-receptor complexes in the ER (Bour et al. 1995a), HIV-1 has developed a more complex strategy, engaging two additional proteins, Nef and Vpu, besides Env to efficiently down-regulate its primary receptor (Chen et al. 1996). This functional convergence, involving several viral proteins with redundant mechanisms, implies that cell surface CD4 down-regulation must confer to HIV-1 a selective advantage during infection of target cells and as such must represent an important determinant for viral pathogenesis. In fact, several studies have provided strong evidence indicating that CD4 down-regulation plays an important role in SIV and HIV-1 pathogenesis. However, it is only more recently that a series of studies have reported an enhancing effect of CD4 down-regulation on HIV-1 replication. Indeed, evidence obtained

*in vivo* and in tissue culture systems have highlighted the importance of cell surface CD4 down-regulation in augmenting viral production and infectivity, suggesting that this function is likely to contribute to HIV-1 pathogenicity by facilitating viral spread *in vivo*. For a complete review describing recent advances in our understanding of the role of CD4 down-regulation during HIV-1 infection, we refer the reader to recent reviews published on the subject (Lama 2003; Levesque et al. 2004).

Nef, Vpu and Env have a profound effect on CD4 trafficking and catabolism and act at different stages of the infection cycle. Early in infection, Nef removes CD4 molecules that are already present at the cell surface by enhancing their endocytosis and subsequent degradation in lysosomes (Schwartz et al. 1995; Foti et al. 1997; Mangasarian et al. 1997; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998; Piguet et al. 1999). At later stages of the infection, the envelope precursor gp160, through its high receptor binding affinity and inefficient transport through the vesicular transport pathway (Willey et al. 1988), sequesters newly synthesized CD4 in the ER in the form of Env-CD4 complexes and prevents their transport and maturation to the cell surface (Buonocore and Rose 1990; Crise et al. 1990; Jabbar and Nayak 1990; Bour et al. 1991). One caveat of this strategy is that the formation of Env-CD4 complexes in the ER has the potential to block the transport and maturation of not only CD4 but also Env glycoprotein itself with potential deleterious consequences on the assembly of infectious viral particles. The accessory protein Vpu was found to induce a rapid degradation of CD4 molecules bound to gp160 in the ER (Willey et al. 1992b). This finding raised the possibility that Vpu not only contributes to CD4 down-regulation by targeting CD4 molecules bound to gp160, but was also important for the release of gp160 and its subsequent transport and incorporation into progeny virions (Willey et al. 1992b). Interestingly, two recent reports have indeed highlighted the importance of Vpu-mediated CD4 degradation for HIV-1 infectivity (Levesque et al. 2003; Tanaka et al. 2003). However, these studies could not correlate the effect of Vpu-mediated CD4 degradation to difference in the level of envelope glycoproteins incorporated into progeny virions. Rather, our laboratory found that accumulation of CD4 at the cell surface of Vpu-deficient HIV-1 producing cells leads to efficient recruitment of CD4 into virions while at the same time promoting the formation of non-functional gp120-CD4 complexes that interfered with viral infectivity (Levesque et al. 2003). Furthermore, accumulation of CD4 at the cell surface was also found to affect Vpu-mediated viral release. Bour and coworkers reported that maintenance of CD4 surface expression in HIV-1 transfected HeLa cells inhibited HIV-1

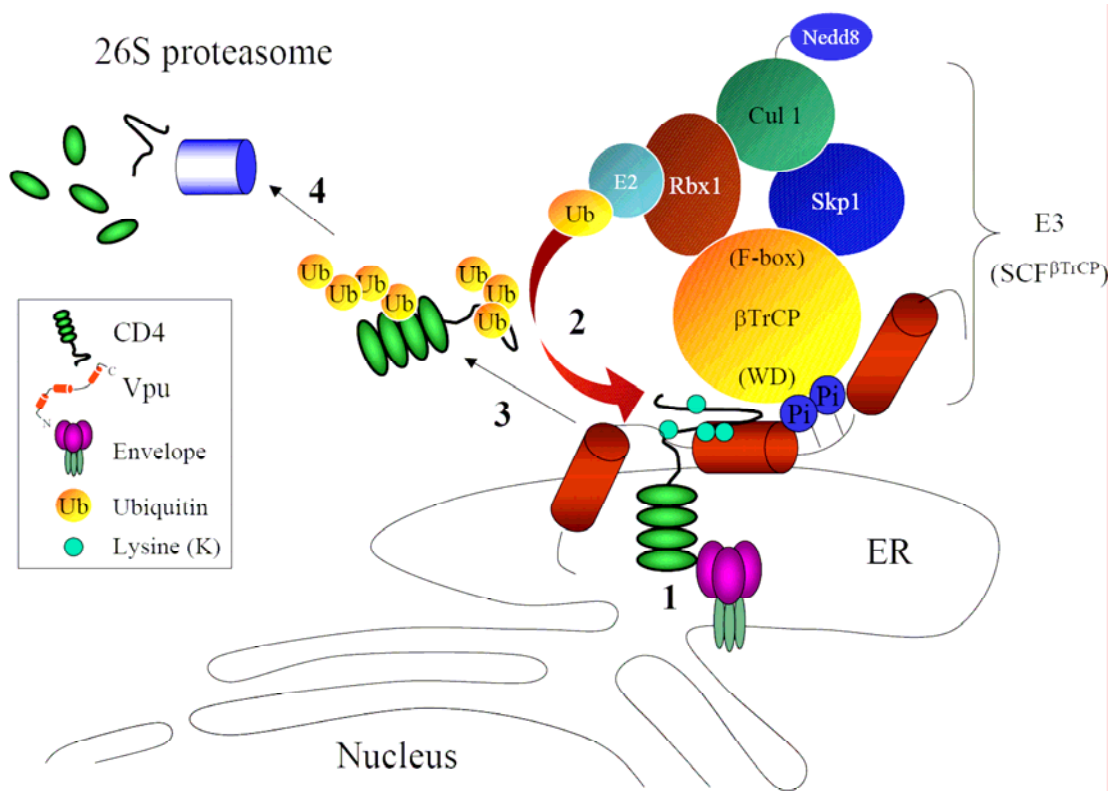
particle release in an Env-independent manner (Bour et al. 1999). The finding that CD4 had no significant effect on particle release by a Vpu-deficient virus led these authors to suggest that CD4 acts by inhibiting the particle release promoting activity of Vpu. Overall these studies indicate that Vpu, through its ability to mediate the degradation of the CD4 receptor, is required for the production of fully infectious viral particles.

From a mechanistic point of view, HIV-1 Env is not absolutely required for Vpu-mediated CD4 degradation. The role of Env appears to be limited to its ability to retain CD4 in the ER, given that efficient CD4 degradation can be observed in the absence of Env as long as CD4 is retained in the ER through the presence of an ER retention sequence or treatment of cells with Brefeldin A (BFA), a fungal metabolite known to block protein sorting from the ER to the Golgi apparatus (Willey et al. 1992a; Lenburg and Landau 1993). The importance of ER localization for CD4 susceptibility to Vpu-mediated degradation suggests that cellular factors essential for CD4 degradation are associated with the ER (Chen et al. 1993). The degradation of CD4 mediated by Vpu involves multiple steps that are initiated by the direct physical binding of Vpu to the cytoplasmic tail of CD4 in the ER (Bour et al. 1995b). The interaction of Vpu to CD4 is essential for Vpu-mediated CD4 degradation since CD4 mutants harbouring deletions in their cytoplasmic tails that prevent interaction with Vpu are not degraded by Vpu. Mutational and deletion analysis of CD4 have delineated a domain of CD4, encompassing residues 416-419 (EKKT) as well as an  $\alpha$ -helix located in the proximal region of the viral receptor cytoplasmic region, that is required for CD4 degradation and Vpu binding (Lenburg and Landau 1993; Vincent et al. 1993; Willey et al. 1994; Bour et al. 1995b; Yao et al. 1995; Tiganos et al. 1997). Structure-function relationship studies performed in our laboratory indicate that mutations disturbing the first cytoplasmic  $\alpha$ -helix of Vpu or affecting the hydrophobic interface within this amphipatic helix interfere with the binding to CD4 ((Tiganos et al. 1997) Binette, J. and Cohen, E.A. unpublished data), thus suggesting that the first cytoplasmic helical structure of Vpu might contribute to the interaction of the protein with the cytoplasmic tail of CD4. Although the binding of Vpu to CD4 is necessary to induce CD4 degradation it is not sufficient. Indeed, experiments performed with phosphorylation-defective mutants of Vpu clearly showed that while these mutants were unable to induce CD4 degradation (Schubert and Strebel 1994; Paul and Jabbar 1997), they retained their capacity to interact with CD4 like wild type Vpu (Margottin et al. 1998). Studies aimed at



identifying Vpu partners by two-hybrid screens led to the identification of a host cell co-factor,  $\beta$ TrCP, which plays a critical role in Vpu-mediated CD4 degradation (Margottin et al. 1998). The human F-box protein,  $\beta$ TrCP, functions as a substrate recognition factor for the multisubunit ubiquitin ligase (E3) SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> involved in the ubiquitin conjugating pathway. SCF complexes are highly conserved from yeast to human and consist of Cull1/Cdc53p, Hrt1p/Roc1/Rbx1 and Skp1 (Deshaies 1999).  $\beta$ TrCP is linked to the SCF complex by binding to Skp1 through its N-terminal F-box motif and interacts with Vpu in a phosphorylation-dependent manner through its C-terminal WD repeat region (Fig.(10)) (Margottin et al. 1998). These findings established for the first time a link between the machinery responsible for the ubiquitination of proteins destined for degradation by the proteasome and the enhanced degradation of CD4 in presence of Vpu. Indeed, further evidence for an involvement of the ubiquitin-proteasome system in Vpu-mediated CD4 degradation was also reported: 1) Vpu-mediated CD4 degradation was not observed in a mammalian cell line expressing a temperature-sensitive ubiquitin activating enzyme (E1), a key component of the machinery involved in the covalent attachment of ubiquitin to target proteins; 2) overexpression of a mutant ubiquitin (UbK48/R), which prevents the formation of a poly-ubiquitin chain, impaired Vpu-mediated CD4 degradation (Schubert et al. 1998); 3) Vpu-mediated CD4 degradation was sensitive to specific proteasome inhibitors (Fujita et al. 1997; Schubert et al. 1998). Overall, the results of these studies are consistent with a model whereby Vpu acts as an adaptor for the proteasomal degradation of CD4 by recruiting CD4 and  $\beta$ TrCP, the receptor component of the multi-subunit SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> ubiquitin ligase complex. Interestingly,  $\beta$ TrCP is also involved in the ubiquitination and proteasome targeting of cellular proteins such as  $\beta$ -catenin (Hart et al. 1999; Winston et al. 1999b), a member of the Wnt (Wingless-type) signalling pathway involved in development and tumour progression and the NF $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$  (Yaron et al. 1998; Spencer et al. 1999; Winston et al. 1999b). The motif for the recognition of these cellular substrates by  $\beta$ TrCP is similar to the one found in the conserved dodecapeptide sequence of Vpu and consists of two phosphoserine residues present in a conserved motif, DS<sup>P</sup>G $\Psi$ XS<sup>P</sup>; where S<sup>P</sup> represent a phosphoserine,  $\Psi$  stands for a hydrophobic residue, and X corresponds to any residue. Serine phosphorylation constitutes a key regulatory signal for the recognition and degradation of SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> substrates. For instance, I $\kappa$ B $\alpha$  is phosphorylated on serine residues found in the DS<sup>P</sup><sub>32</sub>GXXS<sup>P</sup><sub>36</sub> motif by the I $\kappa$ B kinase complex (IKK) activated through

**Figure 10 :** Model of the CD4 degradation mediated by Vpu. (1) The gp160 (Env) interacts with CD4 via its high affinity receptor-binding domain, trapping CD4 in the ER. (2) Vpu interacts with the CD4 cytoplasmic tail presumably via a domain located in the first helix of the Vpu cytosolic domain. Vpu recruits  $\beta$ TrCP, the specificity component of an ubiquitin ligase complex (E3) that recognizes a consensus site in Vpu comprising the two phosphoserines at positions 52 and 56 (Pi). The interaction between Vpu and  $\beta$ TrCP recruits Skp1p and the remaining components of the E3 complex  $SCF^{\beta TrCP}$ , including an activated ubiquitin (Ub) molecule that is bound to an E2 (Ub conjugating enzyme). CD4 is poly-ubiquitinated by this E3 complex on lysine residues (small blue circles) present in its cytoplasmic tail. (3) Following ubiquitination, CD4 undergoes a dislocation step from the ER to the cytoplasm and is thought to be poly-ubiquitinated at other lysine residue acceptor sites. (4) Dislocated ubiquitinated forms of CD4 become targets for degradation by the cytosolic 26S proteasome.



various signalling events, such as those induced by TNF $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  is subsequently ubiquitinated and degraded in the cytoplasm through a process mediated by  $\beta$ TrCP, resulting in NF $\kappa$ B nuclear translocation and transcription stimulation of target genes (Karin 1999).

In contrast to other known substrates of SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup>, which are targeted for degradation upon direct binding to the WD domain of  $\beta$ TrCP, Vpu itself is not degraded and remains stable throughout the process of CD4 degradation. Indeed, it is CD4 molecules bound to Vpu that are targeted for degradation instead (Chen et al. 1993; Tiganos et al. 1997). The molecular mechanism allowing Vpu to prevent its own degradation following its binding to  $\beta$ TrCP remains an open question. It is possible that Vpu has the ability to mask its lysine residues that might constitute potential targets for ubiquitination upon recruitment of  $\beta$ TrCP, while efficiently exposing those present in CD4 to the ubiquitin conjugating enzyme (E2). This unique property that distinguishes Vpu from other known substrates of  $\beta$ TrCP has major consequences on SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> functions given Vpu ability to efficiently bind and sequester the mostly nuclear  $\beta$ TrCP protein in the cytoplasm of HIV-1 infected cells (Bour et al. 2001; Besnard-Guerin et al. 2004). Indeed, several studies reported that Vpu exerts a generalized *trans* dominant inhibitory effect on multiple substrates of SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> by impairing their degradation by the ubiquitin-proteasome degradative machinery (Akari et al. 2001; Bour et al. 2001; Besnard-Guerin et al. 2004). For instance, Vpu was shown to block I $\kappa$ B $\alpha$  degradation mediated by TNF $\alpha$  signaling and, as a result, induced apoptosis (Akari et al. 2001; Bour et al. 2001; Besnard-Guerin et al. 2004). More recently, it was shown that Vpu expression impaired  $\beta$ -catenin degradation and upregulated its transcriptional activity (Besnard-Guerin et al. 2004). These inhibitory effects of Vpu on I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -catenin activities required that Vpu contained an intact phosphorylation motif and retained its ability to bind and sequester  $\beta$ TrCP in the cytoplasm (Bour et al. 2001; Besnard-Guerin et al. 2004). This generalized inhibition of the SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> complexes and the resulting accumulation of undegraded substrates is likely to have major consequences on various functions and signaling pathways in HIV-1 infected cells and may contribute to HIV-1 pathogenesis. The dysregulation of NF $\kappa$ B activity by Vpu should have pleiotropic consequences on the multiple signaling pathways controlled by this master transcription factor such as TNF $\alpha$ , interleukin-1 and Toll-like receptors pathways. Given that all these pathways are involved in innate immunity, Vpu may provide HIV-1 with

means to evade these immunity responses. In fact, Vpu was recently shown to inhibit Toll-dependent immune responses when expressed in *Drosophila* fat-body cells (Leulier et al. 2003). Furthermore, by inhibiting NF $\kappa$ B activity, Vpu may contribute to the induction of apoptosis in HIV-1 infected cells since NF $\kappa$ B activation protects most cells from apoptosis by controlling the expression of anti-apoptotic genes (Barkett and Gilmore 1999; Pahl 1999). In this regard, Vpu is reported to induce apoptosis and this effect is amplified by TNF $\alpha$  treatment (Casella et al. 1999; Akari et al. 2001). The accumulation and constitutive up-regulation of  $\beta$ -catenin in HIV-1 infected cells expressing Vpu can also have major consequences given that this protein plays a pivotal role in processes such as cell adhesion and gene expression (Willert and Nusse 1998; Novak and Dedhar 1999). Abnormal accumulation of  $\beta$ -catenin has been linked with various types of cancer and results in the transcriptional activation of several target genes with oncogenic effects. Consequently, Vpu may contribute to the development of tumors in AIDS patient by promoting the accumulation of  $\beta$ -catenin during chronic HIV-1 infection. Clearly, the effects of Vpu on other substrates of SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> merit further investigation since their accumulation can perturb basic cellular processes and as such, contribute to HIV-1 pathogenesis.

Although the molecular machinery that is recruited by Vpu to target CD4 for degradation is now reasonably well defined, several aspects of Vpu-mediated CD4 degradation remained unclear until recently. In particular, direct evidence of CD4 ubiquitination in presence of Vpu was not available. Furthermore, it was unclear whether ER-associated CD4 encountered the cytoplasmic proteasome by a process involving a dislocation of CD4 from the ER to the cytoplasm, a mechanism used by human cytomegalovirus (HCMV) US2 and US11 proteins to target newly synthesized MHC-I heavy-chain for rapid degradation by the proteasome (Wiertz et al. 1996a; Wiertz et al. 1996b). Recently, Meusser and Sommer have reconstituted the process of Vpu-mediated CD4 degradation in *S. cerevisiae* by expressing human CD4 together with Vpu and human  $\beta$ TrCP and have provided direct evidence demonstrating that CD4 is *trans*-ubiquitinated by SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> in response to the expression of Vpu (Meusser and Sommer 2004). Vpu-mediated proteolysis of CD4 involved dislocation of ubiquitinated intermediates in the cytosol and this process relied strictly on prior ubiquitination of CD4 at cytosolic residues (Fig.(10)). The cytosolic tail of CD4 contains four lysine residues, which are thought to serve as acceptor sites for ubiquitination. When all four cytosolic lysine residues were replaced by

arginine, Vpu could not induce degradation of CD4 nor mediate its poly-ubiquitination. Indeed, the CD4 mutant lacking cytosolic lysine residues, in contrast to the wild type CD4, did not display ubiquitinated intermediates associated to cellular membranes nor exhibited any accumulation of ubiquitinated forms of CD4 in the cytosol. These findings suggest that ubiquitin conjugation of lysine residues accessible from the cytosol may constitute a very early step of Vpu-mediated CD4 degradation and as such must precede dislocation of CD4 from the ER membrane. These results are consistent with observations made by Schubert and coworkers, which indicated that CD4 cytosolic lysine residues were necessary for Vpu-mediated degradation of CD4 in Hela cells (Schubert et al. 1998). The mechanism by which Vpu mediates CD4 degradation in the ER thus appears to display a fundamental difference compared to the cellular ER-associated protein degradation (ERAD) (Rabinovich et al. 2002; Flierman et al. 2003; Kostova and Wolf 2003) but also to US11- and US2-mediated degradation of MHC-I heavy chains in cells infected with HCMV (Furman and Ploegh 2002) whose degradation process involves transport of the luminal parts of the protein into the cytosol prior to modification with ubiquitin. It remains to be determined if the mechanism of Vpu-mediated CD4 degradation in HIV-1 target cells will reflect the observations made in the yeast system by Meusser and Sommer (Meusser and Sommer 2004) given that: 1) CD4 is not normally expressed in yeast and indeed was subject to substantial degradation by the cellular ERAD system in the absence of Vpu, a situation not normally observed in human cells where endogenously or exogenously-expressed CD4 molecules remain stable (half-life of approximately 5 to 6 hrs) even when they accumulate in the ER; 2) Vpu-mediated CD4 degradation was analyzed in yeast without having to retain CD4 in the ER through co-expression of Env glycoproteins as it is usually required in HIV-1 human target cells. More studies in this area will not only shed light on the molecular mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation but will also enhance our understanding of basic processes involved in the protein quality control pathway in the ER.

## 2. Vpu-mediated enhancement of viral release

Another function of Vpu is to increase the release of progeny viruses from HIV-1 infected cells (Strebel et al. 1988; Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990). This phenotype is supported by electron microscopic studies, which revealed an accumulation of budding virions still tethered to the plasma membrane of infected T cells in the absence of

Vpu (Klimkait et al. 1990; Yao et al. 1993). The inefficient release of progeny virions observed in the absence of Vpu appears to be caused by a defect in the detachment process. In addition, Vpu may be involved in the proper assembly of virions as aberrant budding structures are frequently observed in the absence of Vpu (Klimkait et al. 1990; Yao et al. 1993). Furthermore, a lack of Vpu leads to an increased frequency of virus budding in intracellular compartments rather than at the plasma membrane (Klimkait et al. 1990). However, it is not clear whether this phenomenon results from endocytosis of unreleased viral particles still tethered at the plasma membrane back into the cell in the absence of Vpu or, alternatively, results from impaired targeting of Gag polyprotein precursor to the plasma membrane.

The effect of Vpu on viral release appears to be mechanistically distinct from Vpu-mediated degradation of CD4 since augmented virion release by Vpu can be observed even in the absence of the envelope glycoprotein and CD4 (Yao et al. 1992; Geraghty and Panganiban 1993). Furthermore, while Vpu-mediated degradation of CD4 occurs in the ER, Vpu-mediated enhancement of virion release appears to take place from a post-ER compartment, suggesting that these two functions may occur in two separate cellular compartments (Schubert and Strebel 1994). Moreover, mutagenic studies have shown that Vpu biological activities involve two distinct structural domains. The CD4 degradative capacity of Vpu is modulated by sequences present in the cytoplasmic domain of the protein and requires its phosphorylation (Friborg et al. 1995; Schubert et al. 1996a). Conversely, the virus release function of Vpu seems to be modulated by the N-terminal TM region of the protein (Schubert et al. 1996a; Paul et al. 1998; Tiganos et al. 1998) and is only partially affected by mutations preventing Vpu phosphorylation (Friborg et al. 1995).

In contrast to Vpu-mediated degradation of CD4, which involves a fairly well defined cellular machinery, relatively little is known about how Vpu enhances HIV-1 release. The fact that Vpu can significantly enhance viral particle production by Gag proteins from retroviruses distantly related to HIV-1, such as Visna and Moloney murine leukemia virus, suggested that the effect of Vpu was unlikely to require highly specific interactions with Gag proteins (Gottlinger et al. 1993). Rather, these observations were consistent with a model where Vpu enhances retroviral budding indirectly through modification of the cellular environment. This possibility was supported by the finding that Vpu displays structural similarity with the influenza M2 ion channel protein and could self-assemble into homo-oligomeric complexes that could function as ion-conducting pores in

artificial lipid bilayers and amphibian oocytes (Maldarelli et al. 1993; Ewart et al. 1996; Schubert et al. 1996b). These observations lead to the hypothesis that Vpu may enhance viral release through an ion channel activity (Maldarelli et al. 1993; Ewart et al. 1996; Schubert et al. 1996b). The fact that Vpu mutant bearing a TM domain with a scrambled amino acid sequence lacked ion channel activity and was unable to enhance viral release while keeping the capacity to efficiently degrade CD4 suggested that these two activities were functionally related (Schubert et al. 1996b). However, there is still some questions remaining about the specificity of Vpu ion channel activity (Coady et al. 1998) and, importantly, it is unclear how Vpu as an ion channel could regulate the release of viral particles. Nevertheless, the fact that amiloride derivatives 5-(*N,N*,-hexamethylene) amiloride and 5-(*N,N*,-dimethyl) amiloride block ion channel activity and inhibit enhancement of viral-like particles release provide further evidence linking ion channel activity to virus release (Ewart et al. 2002).

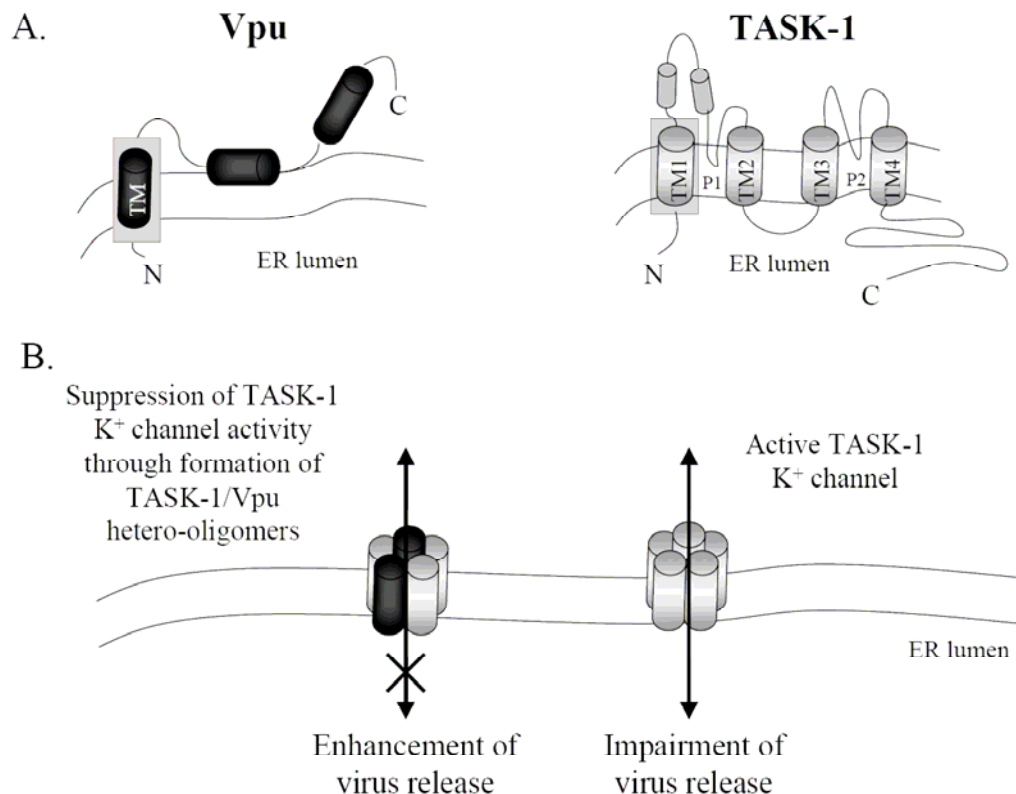
Curiously, the effect of Vpu on progeny virus release is cell-type-dependent and appears to be influenced by the rate of cell proliferation (Gottlinger et al. 1993; Geraghty et al. 1994; Sakai et al. 1995; Deora and Ratner 2001). A strong effect on viral particle release was observed in human epithelial cell lines (Gottlinger et al. 1993), T cell lines (Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990), primary T lymphocytes and primary macrophages (Schubert et al. 1995). In contrast, simian cells such as CV-1 and Cos cells allowed efficient viral particle release in absence of Vpu, and enhancement of virus production by Vpu was not observed in these cells (Geraghty et al. 1994; Sakai et al. 1995). Interestingly, recent work from Varthakavi and coworkers has provided convincing evidence pointing to the existence of a cellular factor that restricts HIV-1 release in human cells in the absence of Vpu (Varthakavi et al. 2003). This study further revealed that the cellular restriction to viral particle release in human cells is overcome by Vpu. These findings are consistent with a model where Vpu enhances viral release by counteracting a human host cell restriction factor that interferes with HIV-1 particle release. Interestingly, Vpu has been shown to interact with two cellular proteins whose expression or/and activity appear to inhibit viral release, albeit by distinct mechanisms. First, Vpu was shown to interact with a novel cellular protein designated UBP (Vpu-binding protein), which appears to be involved in viral assembly and release (Callahan et al. 1998). UBP is a 41-kDa protein, which belongs to the tetratricopeptide repeat protein family, whose characteristics include the presence of four copies of a degenerate 34-amino acids sequence (tetratricopeptide repeat

or TPR) involved in protein interaction. Interestingly, UBP also interacts with the 55-kDa HIV-1 Gag precursor, although binding of UBP to Vpu or Gag appears to be competitive rather than cooperative. Moreover, overexpression of UBP was found to abrogate the ability of Vpu to promote viral particle release, suggesting that UBP is a negative factor of virus assembly that may need to be displaced from Gag or inhibited by Vpu. Interestingly, analysis of the cellular distribution of UBP and Gag in the presence and absence of Vpu indicates that Vpu redistributes both Gag and UBP from the cytoplasm to location near the cell periphery (Handley et al. 2001). These observations combined with earlier studies which provided evidence that Vpu action may be mediated by allowing the Gag precursor to efficiently associate with the plasma membrane (Deora et al. 2000), suggest that Vpu may enhance viral particle release by facilitating the transport of the Gag precursor to the plasma membrane, perhaps to specific membrane micro-domains such as the cholesterol-rich lipid rafts, which have been reported to support efficient Gag assembly and release (Nguyen and Hildreth 2000; Lindwasser and Resh 2001; Ono and Freed 2001). Interestingly, Accola and coworkers showed that the minimal assembly-competent form of Gag that remains responsive to Vpu retains only the myristyl anchor and the C-terminal CA-p2 domain of Pr55<sup>gag</sup>, indicating that neither MA, the N-terminal domain of CA, NC nor p6 are required for Vpu-mediated enhancement of viral particle release (Accola et al. 2000b).

The second host factor, whose expression inhibits HIV-1 release, is an acid-sensitive K<sup>+</sup> channel-forming protein called TASK-1 that exhibits background conductance. The protein was identified by Hsu and coworkers who hypothesized that the mammalian K<sup>+</sup> channel could form hetero-oligomers with HIV-1 Vpu given their structural homology (Fig.(11)) (Hsu et al. 2004). They indeed found that TASK-1 interacted physically with Vpu in 293T cells expressing both proteins, in infected CD4<sup>+</sup> T cells as well as in lymphoid tissues isolated from AIDS patients. Functionally, Vpu expression suppressed TASK-1-specific current in a dose-dependent manner. Interestingly, an N-terminal TM-containing fragment of TASK-1, designated Tm1, mimicked the suppressing effect of Vpu on TASK-1-specific current and surprisingly, rescued the release of Vpu-defective virus as well as native Vpu. Intriguingly, the suppressing effect of Vpu on TASK-1 conductance appears to result not only from the formation of defective hetero-complexes between Vpu and TASK-1 but also from an acceleration of TASK-1 degradation during HIV-1 infection. The mechanism underlying Vpu-mediated degradation of TASK-1 remains unclear but could possibly involve the recruitment of the ubiquitin-proteasome machinery through Vpu



**Figure 11** : Model for the suppression of TASK-1 ion channel activity by Vpu and its resulting effect on viral release. A. Schematic representations of Vpu and TASK-1 proteins. The shaded box highlights the TM domain of each protein that display significant structural homology. B. When TASK-1 (in pale grey) ion channel activity is functional, it interferes with a late step of viral release, leading to a significant impairment of viral release. Based on recent results [30], Vpu (in dark grey) can overcome this effect of TASK-1 by suppressing TASK-1-specific ion channel activity through the formation of non-functional hetero-oligomers with the TM1 domain. Suppression of TASK-1 ion channel activity leads to enhancement of viral release.



ability to interact with SCF<sup>βTrCP</sup>. Taken together, these findings raise the possibility that Vpu might enhance HIV-1 release by altering the activity of the TASK-1 K<sup>+</sup> channel and not from its reported intrinsic ion channel activity as was previously thought. The issue of how suppression of TASK-1 ion channel activity by Vpu enhances viral release remains unclear at this point. It is possible that changes in the electrical potential at the plasma membrane may affect the fluidity and structure of the plasma membrane, the conformation of membrane proteins as well as intracellular ion homeostasis, thus enabling efficient release of viral particles. More studies will be required to understand how disruption of the cellular pathway for K<sup>+</sup> channel biogenesis by Vpu influences the release of HIV-1 particles. Another important aspect that will need to be addressed is whether the cell-type-dependent effect of Vpu reported by Varthakavi and coworkers can be correlated with the expression or activity of TASK-1. While HIV-1 requires Vpu to efficiently replicate in human cells, most SIV species do not require Vpu for replication in their host primate species. However, several HIV-2 isolates have been shown to encode envelope glycoproteins that promote viral particle release in a manner indistinguishable from that of HIV-1 Vpu (Bour et al. 1996; Bour and Strebel 1996). The HIV-2 Env Vpu-like activity appears to be associated with the gp36 TM subunit (Ritter et al. 1996; Bour et al. 2003). Both HIV-1 Vpu and the Env glycoprotein of HIV-2 were found to cross-functionally enhance the release of HIV-1, HIV-2 and SIV particles in human epithelial cells, thus suggesting that they might function through a common mechanism. It will be interesting to determine whether the HIV-2 TM glycoprotein has the ability to interfere with TASK-1 ion channel activity and as a result, enhance HIV-2 particle release. Clearly, the identification of TASK-1 as a host cell effector possibly regulating the detachment step of HIV-1 viral release, is opening new areas of research that have the potential to provide not only a better understanding of the basic processes involved in retroviral release but also novel opportunities for therapeutic intervention.

#### IMPORTANCE OF A FUNCTIONAL *VPU* GENE FOR HIV-1 PATHOGENESIS *IN VIVO*

Studies aimed at evaluating the importance of Vpu in HIV-1 pathogenesis *in vivo* have focused initially on characterizing genetically *vpu* sequence isolated from HIV-1 infected individuals who remain asymptomatic despite prolonged infection, the so-called

long term non-progressors (LNTP). Phylogenetic analysis of *vpu* sequences isolated from both LNTP and AIDS patients revealed that most of the clones contained an intact open reading frame with no gross deletion or insertion, thus suggesting that non progression was not likely to be explained by deletion or gross sequence abnormality in *vpu* (Cornelissen et al. 1997; Zheng et al. 2003). However, the possibility that subtle polymorphisms potentially affecting the functions of Vpu might contribute to disease progression, as was recently shown for Vpr (Somasundaran et al. 2002; Lum et al. 2003), was not addressed by these studies and therefore cannot be eliminated. Indeed, *in vivo* studies performed in pig-tailed macaques using SIV/HIV chimeric virus (SHIV) have provided the strongest line of evidence pointing to a significant role of Vpu in HIV-1 pathogenesis. First, the presence of Vpu was associated with increased viral loads in cynomolgus monkeys infected with SHIV virus (Li et al. 1995). The level of viral RNA in plasma during acute infection and the frequency of virus isolation were consistently higher for the Vpu-positive viruses. Furthermore, using a highly pathogenic SHIV variant that was isolated upon sequential passages in macaques, McCormick-Davis and coworkers found an association between the reversion of the *vpu* gene to an open reading frame and the selection of virus strains able to cause elimination of CD4<sup>+</sup> T cells and a profound loss of immunocompetence (McCormick-Davis et al. 1998). Subsequent studies using a pathogenic molecular clone showed that an intact *vpu* contributed to the CD4<sup>+</sup> T cell loss that occurred during infection with the pathogenic SHIV (Stephens et al. 2002) and that disease in macaques only occurred if compensating substitutions occurred in the *env* and *nef* genes (McCormick-Davis et al. 2000; Singh et al. 2001). Current evidence suggest that Vpu, by increasing viral loads in infected animals, contributes to viral spread, which in turn leads to increased rate of mutation in the *env* and *nef* genes. Accumulation of mutations in *env* appears to allow rapid selection of neutralization-escape variants responsible for driving disease progression (Narayan et al. 1999). Interestingly, the presence of an intact phosphorylation site in Vpu, necessary to mediate CD4 degradation, has been shown to be important for the capacity of SHIV<sub>KU-1bMC33</sub> to cause CD4<sup>+</sup> T cell loss in pig-tailed macaques (Singh et al. 2003). When the mutant virus (SHIV<sub>S52,56G</sub>) was inoculated to four pig-tailed macaques, only one showed a rapid loss in the circulating CD4<sup>+</sup> T cells, a wasting syndrome and lesions in lymphoid tissues that were typical for macaques inoculated with pathogenic parental SHIV. Sequence analysis of the *vpu* open reading frame of viral DNA from PBMCs of this animal revealed a reversion of the Vpu sequence from glycines in positions 52 and 56 to serines. The

remaining macaques had symptoms resembling the ones obtained when inoculating a SHIV lacking *vpu* and sequence analysis revealed no reversion of the *vpu* coding sequence. Furthermore, compensating mutations in *env* and *nef* were not observed after inoculation with SHIV<sub>S52,56G</sub>. Overall, these results using the SHIV model suggest that Vpu may contribute to SHIV and HIV-1 pathogenesis by promoting the generation of variants exhibiting increased fitness and pathogenic potential through its ability to raise viral loads and facilitate viral spread during infection. In this regard, it is interesting to note that HIV-2, a closely related lentivirus with less severe pathogenesis and disease outcome and whose propagation remained confined to specific regions of Africa, lacks expression of a Vpu protein.

## CONCLUSION

Although Vpu is an accessory protein that is not essential for the infection of CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*, it is probably an important pathogenic determinant for HIV-1 infection *in vivo*. Like the other accessory proteins, Vpu acts as a connector with various specialized metabolic pathways in the infected host cells to optimize viral replication. A detailed knowledge of the interactions between Vpu and its cellular partners and of the mechanisms that allow this protein to enhance viral particle production, to down-regulate cell surface CD4, and to raise viral load *in vivo*, could help in the design of novel therapeutic approaches that may complement the currently used combination therapies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Andrés Finzi for critical reading of the manuscript. Julie Binette is a recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Éric A. Cohen is the recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and FRSQ to EAC.

#### 7.4.2 Mise à jour des connaissances sur Vpu

##### Présence du gène *vpu* chez les VIS

En plus de la présence du gène *vpu* chez les VIScpz, VISgsn, VISmon et VISmus, le gène *vpu* a été retrouvé chez le VISden qui infecte les singes mone de Dent (« Dent's mona monkey ») (Dazza et al. 2005).

##### Structure

Selon bien des modèles structuraux, Vpu serait capable d'homo-oligomérisation. Or, une étude récente a apporté des preuves biochimiques de la présence d'oligomères de Vpu (Hussain et al. 2007). En effet, cette étude a confirmé que des pentamères de Vpu ou de son domaine transmembranaire sont retrouvés en équilibre stable avec les monomères en solution *in vitro*. De plus, il a été montré par FRET (« fluorescence resonance energy transfer ») dans des cellules vivantes que l'oligomérisation de Vpu semble avoir lieu dans la région du Golgi et de certaines vésicules intra-cellulaires, mais pas au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Hussain et al. 2007). Sachant que la fonction de facilitation de la relâche virale par Vpu nécessite la localisation de la protéine dans un compartiment post-RE (Schubert and Strebel 1994) qui est probablement le réseau *trans* de l'appareil de Golgi (« *trans*-golgi network » ou TGN) (Dube et al. 2009), ces évidences pourraient suggérer un lien entre l'oligomérisation de la protéine et son activité d'augmentation de la relâche virale.

##### Dégradation du CD4 par Vpu

La capacité à induire la dégradation de CD4 de protéines Vpu provenant d'isolats de VIH-1 de sous-types B et C ainsi que de quatre isolats de VIScpz a été évaluée (Gomez et al. 2005). Ces allèles de Vpu avaient tous la capacité de diminuer l'expression de surface de CD4 et d'induire sa dégradation même si trois des quatre Vpu provenant des isolats du VIScpz ne contenaient qu'un seul site de phosphorylation par la caséine kinase II (Gomez et al. 2005). La capacité de ces Vpu de recruter  $\beta$ -TrCP n'a toutefois pas été évaluée.

L'importance de la fonction de dégradation du CD4 par la protéine Vpu a été étudiée par le même groupe de recherche (Hill et al. 2008). Tout d'abord, il a été démontré que la protéine Vpu d'un sous-type C du VIH-1 était moins efficace pour diminuer l'expression de surface de CD4 que la protéine Vpu d'un sous-type B. Ensuite, le remplacement du gène *vpu* du sous-type B par celui du sous-type C dans le virus modèle

SHIV a pour effet de ralentir la disparition des cellules T CD4<sup>+</sup> (Hill et al. 2008). Toutefois, comme la protéine Vpu du sous-type C semble moins efficace pour augmenter la relâche virale que celle du sous-type B (Ruiz et al. 2008), il n'est pas clair que la différence de pathogénicité des SHIV avec la protéine Vpu du sous-type C soit due à un défaut au niveau de la dégradation de CD4 par Vpu.

#### Fonction d'augmentation de la relâche virale

Récemment, un facteur cellulaire responsable de l'inhibition de la relâche en absence de Vpu a été identifié. En effet, il a été démontré que l'interféron  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) induit de façon drastique l'attachement des particules virales complètement assemblées à la surface des cellules infectées, ce qui se traduit en une inhibition de la relâche du VIH-1 en absence de Vpu (Neil et al. 2007). Il semble donc que l'expression du facteur de restriction de la relâche virale soit induite par l'IFN $\alpha$ . En bloquant l'effet de ce facteur de restriction, Vpu pourrait donc contrecarrer une réponse immunitaire innée de l'hôte contre le VIH-1.

Deux groupes de recherche différents ont identifié récemment ce facteur cellulaire bloquant la relâche virale en absence de Vpu. Il s'agit de la protéine BST2 (« B cell stromal factor 2 »)/CD317/HM1.24, aussi appelée « tetherin » (Neil et al. 2008; Van Damme et al. 2008). BST2 est une protéine transmembranaire de type II, possédant un domaine transmembranaire en N-terminal et une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) permettant à son domaine C-terminal de s'ancrer lui aussi aux membranes (Kupzig et al. 2003). BST2 est exprimée constitutivement chez les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules T activées (Vidal-Laliena et al. 2005; Blasius et al. 2006). Son expression est toutefois induite de façon ubiquitaire par l'IFN $\alpha$  (Goto et al. 1994; Blasius et al. 2006). Elle est impliquée entre autres dans le développement précoce des cellules pré-B (Ishikawa et al. 1995).

BST2 semble être impliquée dans l'attachement des virions à la membrane plasmique suite à leur bourgeonnement complet en absence de Vpu (Neil et al. 2006). Le défaut de relâche virale en absence de Vpu est donc fondamentalement différent de celui observé avec des mutants de p6 où la membrane des virus en train de bourgeonner reste attachée à la membrane cellulaire (Gottlinger et al. 1991). De plus, il semble que le défaut de relâche des particules virales en absence de Vpu ne soit pas dû seulement à l'association forte entre les virions et la membrane plasmique, mais soit aussi causé par leur internalisation subséquente dans les endosomes (Neil et al. 2006).

Il est connu que la rétention de Vpu au niveau du RE interfère avec l'activité d'augmentation de relâche de Vpu (Schubert and Strebel 1994). De plus, plusieurs groupes de recherche ont montré que Vpu se localise au même endroit que BST2 dans la cellule (Neil et al. 2008; Van Damme et al. 2008; Dube et al. 2009). Enfin, notre groupe de recherche a démontré récemment que Vpu se déplace entre le TGN et les endosomes, mais qu'une grande proportion de Vpu du sous-type B se localise au TGN, tout comme BST2 (Dube et al. 2009). Il a été montré dans la même étude que la localisation de Vpu dans le TGN est nécessaire pour contrer l'activité de BST2 (Dube et al. 2009).

Il est intéressant de remarquer par ailleurs que la protéine Vpu du sous-type C (qui a une moins grande capacité à augmenter la relâche virale) semble être localisée dans le Golgi, mais principalement à la membrane plasmique (Pacyniak et al. 2005). Il semble qu'un motif présent dans la protéine Vpu du sous-type C empêche la protéine d'être recyclée efficacement à partir de la membrane plasmique vers des compartiments intracellulaires, ce qui pourrait expliquer sa capacité moindre à augmenter la relâche virale comparativement au sous-type B (Ruiz et al. 2008). À cet effet, le blocage de la voie de recyclage des protéines prévient l'effet de Vpu sur la relâche virale (Varthakavi et al. 2006).

Même si on sait que Vpu doit être localisé au TGN pour contrer l'activité de BST2, le mécanisme sous-jacent à l'inhibition de l'activité de BST2 par Vpu est encore controversé. En effet, même si plusieurs groupes de recherche ont montré que Vpu semble diminuer les niveaux d'expression de surface ou totaux de BST2 (Bartee et al. 2006; Van Damme et al. 2008; Miyagi et al. 2009) ainsi que sa co-localisation avec la protéine Gag (Neil et al. 2008), certains ont suggéré que l'effet de Vpu n'implique pas nécessairement la diminution d'expression de BST2 (Miyagi et al. 2009). De plus, il a été suggéré que Vpu pourrait induire la dégradation de BST2 par le protéasome (Gupta et al. 2009) et que cette dégradation implique la protéine  $\beta$ -TrCP (Douglas et al. 2009; Goffinet et al. 2009). Un autre groupe a toutefois suggéré que Vpu utilise sa liaison au complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> et la protéine AP-2 afin d'induire un changement de localisation intra-cellulaire de BST2 et sa dégradation partielle dans les lysosomes (Mitchell et al. 2009).

Il semble clair toutefois que l'effet de Vpu dépend de l'espèce d'où provient BST2. En effet, Vpu semble pouvoir contrer l'activité des protéines BST2 d'humain et de

chimpanzé seulement et cette dépendance à l'espèce semble corrélérer avec le domaine transmembranaire de BST2 (Gupta et al. 2009; McNatt et al. 2009; Rong et al. 2009).

Une autre étude montre un aspect différent de l'effet de Vpu sur la relâche. La  $\beta$ -caténine fait le lien entre la molécule d'adhésion cellulaire E-cadherin et le réseau de microfilaments du cytosquelette cellulaire (Ozawa et al. 1989; Dietrich et al. 2002). Les auteurs de cette étude suggèrent que par sa modulation de l'expression de certains substrats de  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -caténine et Snail qui est un répresseur de la E-cadherin), Vpu augmenterait la relâche en diminuant les niveaux de E-cadherin via la stabilisation du répresseur Snail ou en inhibant son interaction avec la  $\beta$ -caténine (Salim and Ratner 2008).

### Régulation de Vpu

Il est connu que Vpu n'est pas dégradée pendant le processus de la dégradation du récepteur CD4 via le recrutement de la protéine cellulaire  $\beta$ -TrCP (Schubert and Strebel 1994; Margottin et al. 1998). Toutefois, des évidences récentes suggèrent un mode de régulation de l'expression de Vpu indépendant de  $\beta$ -TrCP et dépendant du cycle cellulaire (Estrabaud et al. 2007). Cette régulation serait dépendante de la phosphorylation de Vpu sur la sérine en position 61 et aurait lieu durant la mitose. De plus, la mutation de cette sérine aurait pour effet de stabiliser la protéine, favorisant par le fait même son activité d'augmentation de la relâche virale. Les auteurs suggèrent de plus que la phosphorylation différentielle de Vpu sur la sérine 61 pourrait déterminer si Vpu agit comme adaptateur entre  $\beta$ -TrCP et CD4 ou comme substrat pour une ubiquitine ligase cellulaire encore inconnue (Estrabaud et al. 2007).

### Vpu et pathogenèse virale

Une étude publiée récemment fait état d'une autre fonction pour Vpu. Il semblerait que Vpu soit capable d'interagir avec la chaîne invariante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) aussi nommée CD74 ou Ii (Hussain et al. 2008). Cette interaction résulte en une diminution de l'expression de surface des molécules du CMHII qui corrèle avec une diminution de la présentation antigénique aux cellules T en culture (Hussain et al. 2008). Il est donc possible que Vpu contribue à la persistance virale en atténuant la réponse immunitaire.



## 8. Régulation négative du CD4 par le VIH-1

La fonction de la molécule CD4 dans la réplication du VIH-1 et le mécanisme de sa régulation négative par différentes protéines du VIH-1 a fait l'objet d'une revue publiée dans « Current HIV Research » en 2004 dont j'étais l'un des principaux auteurs. Karine Levesque, Andrés Finzi et moi-même avons contribué également à l'écriture de cette revue. J'ai écrit la partie sur la dégradation du CD4 par la protéine Vpu du VIH-1. Les trois autres auteurs ont donné leur accord afin que j'inclue cette revue dans mon introduction de thèse. Voici donc l'article en question.

Les numéros de figures ont été modifiés afin de faire suite aux figures présentées dans l'introduction et sont donc listées dans la liste de figures au début de cette thèse. Le format des références a été ajusté afin qu'elles soient insérées dans la bibliographie finale de cette thèse.

8.1 Article 2 : Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection.

### **ROLE OF CD4 RECEPTOR DOWN-REGULATION DURING HIV-1 INFECTION**

**Karine Levesque<sup>1</sup>, Andrés Finzi<sup>1</sup>, Julie Binette<sup>1</sup> and Éric A. Cohen\***

Laboratory of Human Retrovirology, Department of Microbiology and Immunology

Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre Ville, Montreal, Canada, H3C 3J7

1 These authors contributed equally to this work

- To whom correspondence should be sent

KEYWORDS: HIV-1, CD4 down-regulation, Nef, Env, Vpu, replication, pathogenesis  
ABSTRACT

Human immunodeficiency virus has evolved several redundant mechanisms to remove its receptor, the CD4 molecule, from the cell surface. Indeed, HIV-1 encodes three proteins, Nef, Vpu and Env, that have a profound effect on CD4 trafficking and catabolism. Given this functional convergence, it is believed that cell surface CD4 regulation constitutes an important determinant of viral replication and pathogenesis *in vivo*. This review highlights recent progress made in our understanding of the molecular mechanisms underlying the down-regulation of the CD4 receptor by HIV-1 and describes our current comprehension of the role of CD4 down-regulation during HIV-1 infection.

## INTRODUCTION

Human cells expressing the CD4 surface protein are primary targets for human immunodeficiency virus (HIV) infection. Viral entry is initiated when trimeric surface gp120 protein (SU) on the virion engages CD4 on the host cell, inducing conformational changes that promote binding to specific chemokine receptors. Despite the essential role played by CD4 during viral entry, HIV infection induces a rapid and potent down-regulation of CD4 molecules expressed at the cell surface. Indeed, HIV-1 encodes three proteins that have a profound effect on CD4 trafficking and catabolism. Early in infection, the Nef accessory protein down-modulates CD4 molecules that are already present at the cell surface by accelerating their endocytosis and subsequent degradation in lysosomes. At later stages of infection, the envelope gp160 precursor, through its high receptor binding affinity, retains newly synthesized CD4 in the endoplasmic reticulum (ER). Finally, the accessory viral protein U (Vpu) regulates the half-life of CD4 by inducing the degradation of viral receptors complexed to Env-gp160 precursors in the ER, thereby releasing gp160 and allowing its maturation and transport through the vesicular sorting pathway. Since HIV-1 has evolved several redundant mechanisms to remove its own receptor from the cell surface, it is believed that CD4 down-regulation confers a selective replicative advantage to the virus *in vivo*. This review highlights recent advances in our understanding of the multiple molecular mechanisms underlying the down-regulation of the CD4 receptor by HIV-1 and describes our current understanding of the role of CD4 down-regulation during HIV-1 infection.

## THE CD4 RECEPTOR

The CD4 antigen is a type I integral membrane glycoprotein of 55-kDa that is expressed primarily at the surface of class II major histocompatibility complex (MHC-II)-restricted T lymphocytes, thymocytes, and cells of the macrophage-monocyte lineage. It consists of an N-terminal extracellular domain, a membrane-spanning region and a short cytoplasmic tail that harbours two cysteine residues (C<sub>420</sub> and C<sub>422</sub>) responsible for the physical association of CD4 with the Src family protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> (Maddon et al. 1985; Shaw et al. 1989).

The CD4 molecule plays a key role in the development and activation of helper T cells. During the antigenic response, the physiological role of CD4 is to stabilize interactions between T cells and antigen-presenting cells (Doyle and Strominger 1987) and to transduce a signal, critical for antigen responsiveness of CD4<sup>+</sup> T cells, upon binding to nonpolymorphic regions of the MHC-II molecule (Gay et al. 1987; Sleckman et al. 1987; Cammarota et al. 1992; Konig et al. 1992). The initiation of the signal transduction cascade that ultimately leads to full activation of T cells occurs mainly through the association of CD4 with p56<sup>lck</sup> (Julius et al. 1991; Miceli and Parnes 1993). Recent evidence indicates that both CD4 and p56<sup>lck</sup> accumulate preferentially in subdomains of the plasma membrane designated as lipid rafts (Millan et al. 1999). These microdomains, which are primarily composed of sphingolipids and cholesterol, are enriched with molecules involved in T cell activation such as GPI-linked proteins, surface receptors and tyrosine kinases, suggesting that lipid rafts may serve as the functional modules for signal transduction and membrane trafficking (Brown and Rose 1992; Simons and Ikonen 1997).

In T lymphocytes, CD4 is normally retained at the cell surface through association with p56<sup>lck</sup>. Upon T cell activation by antigen presenting cells, antibody-mediated cross-linking of cell surface protein or treatment of cells with phorbol ester, CD4 endocytosis is induced (Pelchen-Matthews et al. 1993). CD4 internalisation involves dissociation of p56<sup>lck</sup> and the activation of an endocytosis signal in the cytoplasmic domain of CD4. This signal consists of a dileucine motif (L<sub>413</sub>L<sub>414</sub>), but is only active when adjacent serine residues (S<sub>408</sub> and/or S<sub>415</sub>) are phosphorylated (Pitcher et al. 1999). CD4 internalization into clathrin-coated vesicles is triggered when AP-2 clathrin adaptor complexes, which are heterotetrameric protein complexes that regulate the assembly of clathrin-coated pits at the cell surface, interact with the CD4 dileucine signal (Pitcher et al. 1999). Within endosomes,

CD4 is either recycled back to the cell surface, possibly following dephosphorylation, or is sorted to late endosomes/lysosomes where it is degraded (Pelchen-Matthews et al. 1993).

The CD4 molecule is the primary receptor for HIV entry, thus explaining the propensity of this virus to infect certain T-cells and macrophages, ultimately leading to immune dysfunction (Dalgleish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). Entry of HIV-1 into susceptible cells is a multiphasic process that is initiated by the high affinity (< 10 nM) interaction occurring between CD4 and the trimeric viral envelope glycoprotein gp120 (Moore 1990). Conformational changes of gp120 upon CD4 binding trigger interactions of gp120 with HIV-1 co-receptors, CCR5 or CXCR4 chemokine receptors (Moore et al. 1997). Subsequently, this binding to co-receptors exposes the Env gp41 transmembrane glycoprotein and promotes fusion of viral and cellular membranes. Despite the critical role played by the CD4 receptor during viral entry, it is well established that HIV-1, like many enveloped viruses, down-regulates the cell surface expression of its cognate receptor (Dalgleish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). However, although this effect is achieved by most viruses through simple retention of Env-receptor complexes in the ER (Bour et al. 1995b), HIV-1 has developed a more complex strategy, engaging two additional proteins, Nef and Vpu, besides Env to efficiently down-regulate the CD4 receptor (Chen et al. 1996).

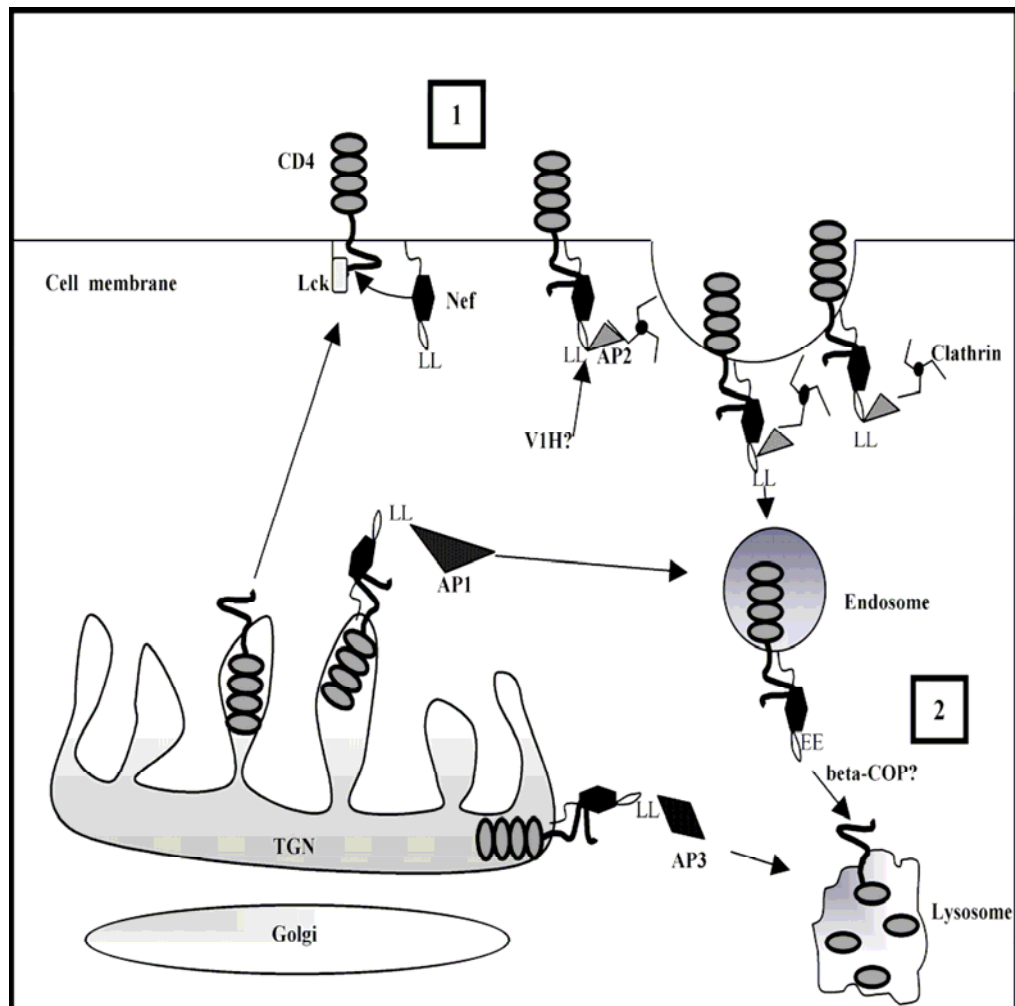
## NEF

Nef is a small (27-kDa) myristoylated protein that is abundantly expressed in the early stages of viral replication (Klotman et al. 1991). Several evidence indicate that Nef is a key factor of viral progression and pathogenesis. First, subset of individuals that do not show any sign of disease after long period of HIV infection, the so-called long-term nonprogressors (LTNPs) individuals, harbors Nef-deleted virus. Second, rhesus macaques infected with Nef-defective simian immunodeficiency virus (SIV) display low-level viral replication and show a severely delayed course of disease progression (Kestler et al. 1991; Deacon et al. 1995). Furthermore, expression of Nef in transgenic mice induces some of the pathologies associated with HIV-1 infection and acquired immune deficiency syndrome (AIDS), including immunodeficiency and depletion of CD4-positive cells (Hanna et al. 1998). Nef has been associated to several functions *in vitro*, ranging from the down-modulation of specific membrane receptors, the perturbation of signaling pathways, and the stimulation of virion infectivity (for a review: (Arold and Baur 2001; Geyer et al. 2001)). However, the best characterized of its effects are its ability to down-modulate cell surface

expression of the virus receptor CD4 and class I major histocompatibility complex (MHC-I).

The cell surface CD4 down-regulation induced by Nef is believed to involve two-steps, which include: 1) enhanced rate of receptor internalization which results in the formation of CD4-specific endocytic vesicles and the accumulation of CD4 in early endosomes; and 2) efficient transport of CD4 to lysosomes where the receptor is degraded (Schwartz et al. 1995; Foti et al. 1997; Mangasarian et al. 1997; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998; Piguet et al. 1999). As described in Figure 12, this two-step process mediated by Nef reflects the sequential involvement and recruitment of specific components of the protein trafficking and sorting machineries (Benichou et al. 1994; Greenberg et al. 1997; Bresnahan et al. 1998; Lu et al. 1998; Piguet et al. 1998; Lock et al. 1999). In order to induce CD4 internalization, Nef first mediates the dissociation of p56<sup>lck</sup> from CD4 by a mechanism that is still not understood but that does not involve CD4 phosphorylation (Garcia and Miller 1991; Rhee and Marsh 1994). A direct interaction between Nef and a region located in the cytoplasmic domain of CD4 (residues 407-418) that includes the nascent endocytosis motif (L<sub>413</sub>L<sub>414</sub>) is believed to take place, although this interaction has been difficult to demonstrate and is likely to be of low affinity (Harris and Neil 1994; Rossi et al. 1996; Preusser et al. 2001). The Nef residues involved in this interaction were mapped to a pocket formed of distant residues, including WLE<sub>57-59</sub>, GGL<sub>95-97</sub> and L<sub>110</sub> (Harris and Neil 1994; Grzesiek et al. 1996; Rossi et al. 1996). Nef has also the ability to interact with clathrin adaptor complexes (AP). These heterotetrameric protein complexes recruit integral membrane proteins bearing tyrosine (YXXΦ, where X is any residue and Φ is a hydrophobic amino acid) or dileucine-based sorting signals and regulate the assembly of clathrin-coated pits at the cell surface (AP-2), the *trans*-Golgi network (TGN) (AP-1 and AP-3), and early endosomes (AP-3) (Bonifacino and Traub 2003). HIV-1 Nef contains such a sorting dileucine motif (L<sub>164</sub>L<sub>165</sub>) in its C-terminal flexible loop and it is believed that this motif is involved in the association of Nef with both AP-1 and AP-2 adaptor complexes. Association with AP-2 is believed to enhance endocytosis of cell surface CD4, while interaction with AP-1 may influence sorting of newly synthesized CD4 from the TGN to endosomes (Greenberg et al. 1997; Piguet et al. 1998) (Fig. 12). Interestingly, even though both HIV-1 and SIV/HIV-2 Nef appear to mediate the internalization of CD4 by interacting with components of the AP complex, it

**Figure 12 :** (1) Nef triggers the rapid endocytosis of CD4 at the plasma membrane by connecting CD4 and clathrin coated pits. Interaction of Nef with clathrin adaptor protein complex AP2 (directly or via the H subunit of the vacuolar ATPase (V1H)) via a dileucine sorting motif ( $L_{164}L_{165}$ ) directs CD4 from the plasma membrane to the endosomal compartment. Nef can also direct CD4 from the *trans*-Golgi network (TGN) to endosomes presumably via AP1. (2) The targeting of CD4 from endosomes to lysosomes presumably involves the recruitment of  $\beta$ -COP by Nef via a di-acidic motif ( $E_{154}E_{155}$ ). Nef can also directly target CD4 from TGN to lysosomes via AP3.



seems that differences do exist at the level of the type of sorting signals and AP effectors involved. Sequences found to be important for CD4 down-regulation by SIV Nef are located in the N-terminus of the protein and harbour two motifs containing YXX $\Phi$  type signals that were shown to efficiently bind, at least *in vitro*, the  $\mu$  subunit of AP-1 and AP-2 (Piguet et al. 1998). By contrast, HIV-1 Nef lacks the N-terminal YXX $\Phi$  signal and instead appears to bind adaptors through a dileucine-containing sequence as mentioned earlier. Indeed, the  $\mu$  subunit of AP-1, which mediates sorting events between the TGN and the endosomal-lysosomal compartment, was reported to directly interact and to co-localize with HIV-1 Nef (Bresnahan et al. 1998; Le Gall et al. 1998; Craig et al. 2000). It is believed that this interaction may influence sorting of newly synthesized CD4 from the TGN to endosomes (Piguet et al. 1998). This could explain how HIV-1 Nef prevents CD4 transport from the TGN to the cell surface (Aiken et al. 1994; Mangasarian et al. 1997). Furthermore, AP-3 was also recently reported to co-localize with HIV-1 Nef in a juxtannuclear region near the center of the cell and was indeed proposed to direct the sorting of CD4 from TGN to lysosomes where degradation of the receptor occurs (Craig et al. 2000). So, given the fact that the  $\mu$  subunit of AP-2 was reported to associate with HIV-1 Nef with a much lesser degree than AP1 (Bresnahan et al. 1998; Le Gall et al. 1998; Craig et al. 2000) it is possible that sorting in the Golgi complex may have a more dominant role in HIV-1-mediated CD4 down-modulation, whereas enhanced endocytosis at the cell surface may be more important for HIV-2 and SIV Nef. Alternatively, the weak affinity observed between HIV-1 Nef and AP2 may suggest that in contrast to SIV Nef, the interaction is indirect and requires a bridging co-factor. The human homologue of the yeast *VMA13* gene which encodes the subunit H of the vacuolar ATPase (V1H) could be a candidate to link Nef to the AP complex (Lu et al. 1998) (Fig. 12). Indeed, direct interactions between Nef and V1H were correlated with the ability of Nef to internalize CD4 suggesting that V1H could connect Nef to the endocytic machinery (Lu et al. 1998; Geyer et al. 2002). Interestingly, V1H was recently shown to bind to the medium chain of AP-2 both *in vitro* and *in vivo* (Geyer et al. 2002).

In addition to enhancing CD4 endocytosis, Nef also appears to target the receptor from early endosomes to the late degradation compartments by the recruitment of the  $\beta$ -subunit of the endosomal COP-I coatomer ( $\beta$ -COP) (Fig. 12). The early demonstration that Nef interacted with  $\beta$ -COP in yeast two-hybrid assay (Benichou et al. 1994) and the

subsequent indication that a  $\beta$ -COP-containing subcomplex of coatamer is involved in the transport from early to late endosomes both *in vitro* and *in vivo* (Aniento et al. 1996) suggested how Nef might influence CD4 sorting in late endosomes. Indeed, a di-acidic (E<sub>154</sub>E<sub>155</sub>) motif adjacent to the di-leucine (L<sub>164</sub>L<sub>165</sub>)-containing motif in the C-terminal loop of Nef was proposed to function as a lysosomal targeting signal through the binding of  $\beta$ -COP in endosomes (Piguet et al. 1999). However, a recent report (Janvier et al. 2001) indicates that these residues are not involved in the binding to  $\beta$ -COP nor in Nef-mediated CD4 down-regulation. Additional studies will be required to characterize the residues of Nef necessary for binding to  $\beta$ -COP and to confirm the relevance of this interaction in Nef-mediated CD4 down-modulation.

## VPU

Besides the role of Nef in the down-regulation of cell surface CD4, HIV-1 codes for another protein, Vpu, which is implicated in the degradation of newly synthesized CD4 in combination with the function of the Env protein (Chen et al. 1996). The HIV-1 *vpu* gene encodes for an 81 amino acids protein that is not expressed by HIV-2 or most SIVs except for some HIV-1-related monkey isolates such as SIVcpz and the newly isolated SIVgsn (Cohen et al. 1988; Strebel et al. 1988; Huet et al. 1990; Courgnaud et al. 2002). Vpu expression is coordinately regulated with the envelope glycoprotein precursor, gp160, as both Vpu and gp160 are translated from the same bicistronic Rev-dependent mRNA by leaky scanning of the Vpu initiation codon (Schwartz et al. 1990). The protein has the topology of a class I integral membrane protein with an N-terminal hydrophobic region of 27 amino acids, which constitutes the membrane-spanning domain, and a charged C-terminal hydrophilic domain of 54 residues facing the cytoplasm (Maldarelli et al. 1993). Vpu appears to be primarily expressed on intracellular membranes, presumably at the level of the ER and the Golgi, although electron-microscopy studies of HIV-1 infected cells have revealed that the protein can also be detected in association with the plasma membrane (Yao, X-J and Cohen, E.A, unpublished data). Biochemical studies have shown that the protein is post-translationally phosphorylated (Strebel et al. 1989; Schubert et al. 1992; Schubert and Strebel 1994; Friberg et al. 1995) and is capable of forming homo-oligomers (Maldarelli et al. 1993). In tissue culture, Vpu displays two principal biological activities, which are functionally and genetically distinguishable: 1) it enhances the release of virions from the cell surface (Strebel et al. 1988; Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990; Schubert et al. 1996a) and 2) it



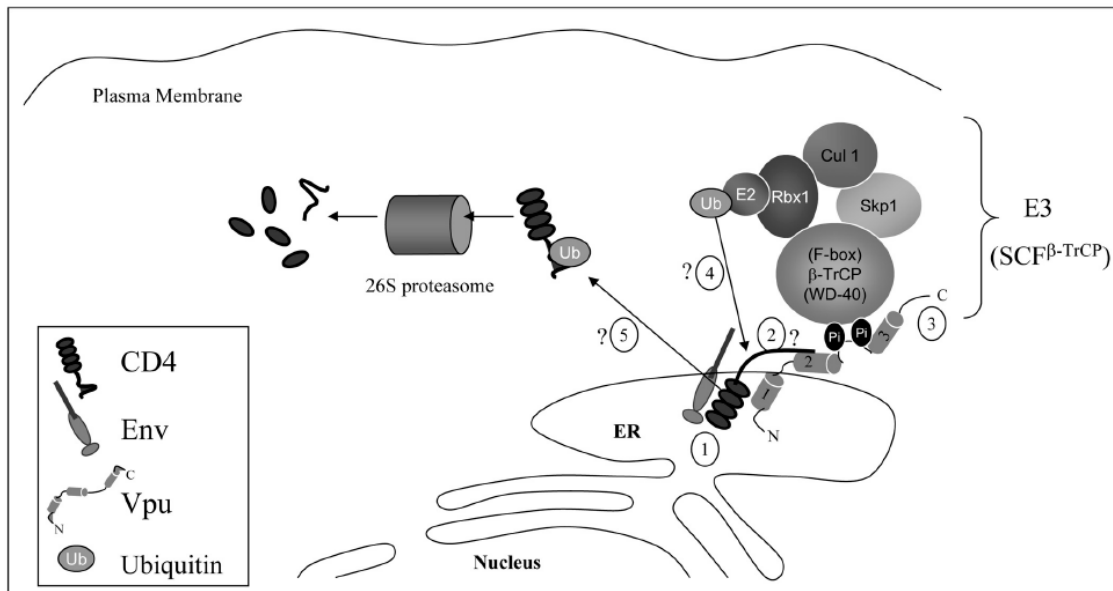
induces the degradation of CD4 molecules trapped in intracellular complexes with Env in the ER (Willey et al. 1992b). These two biological activities involve two separable domains in the Vpu protein. The N-terminal membrane spanning domain is believed to mediate the enhancement of viral particle release (Schubert et al. 1996a; Paul et al. 1998; Tiganos et al. 1998) while the cytoplasmic domain is thought to be responsible for degradation of the CD4 receptor (Chen et al. 1993; Schubert et al. 1996a; Tiganos et al. 1997).

During the late stages of HIV-1 infection, simultaneous expression of both the CD4 receptor and the viral envelope glycoprotein precursor in the ER leads to the formation of gp160-CD4 complexes that sequester both proteins in this compartment (Buonocore and Rose 1990; Crise et al. 1990; Jabbar and Nayak 1990; Bour et al. 1991). Like in other viral systems, retention of the CD4 receptor in the ER through the high receptor binding affinity of the Env gp160 precursor contributes to the reduction of cell surface CD4 receptor levels by blocking the transport of CD4 molecules to the plasma membrane (Stevenson et al. 1988; Crise et al. 1990; Jabbar and Nayak 1990). This ER retention of CD4 is believed to result from the very inefficient transport of gp160 itself and thus increases in importance late in infection when the viral glycoprotein gp160 precursor is expressed at high levels (Willey et al. 1988). Initially, Willey et al. found that Vpu induces the rapid degradation of CD4 molecules complexed to gp160 in the ER (Willey et al. 1992b). This finding raised the possibility that Vpu not only contributes to CD4 receptor down-regulation by specifically targeting CD4 molecules complexed to gp160 but also stimulates the release of gp160 and enhances its maturation, trafficking and incorporation into progeny virions, thereby affecting assembly of infectious particles (Willey et al. 1992b; Kimura et al. 1994; Vincent and Abdul Jabbar 1995). Although several reports have provided evidence indicating that HIV-1 gp160 is released more efficiently from the ER upon Vpu-mediated CD4 degradation (Willey et al. 1992b; Vincent and Abdul Jabbar 1995), recent data indicate that this does not translate into more Env glycoproteins being incorporated into nascent viral particles. Analysis of virions released from cells expressing Vpu<sup>+</sup> or Vpu-defective HIV-1 provirus did not reveal any significant difference in the levels of incorporated Env glycoproteins (Levesque et al. 2003; Tanaka et al. 2003). Current evidence indicates that HIV-1 Env is not directly involved in Vpu-mediated CD4 degradation. The role of Env appears limited to its ability to retain CD4 in the ER given that efficient CD4 degradation can be observed in the absence of Env as long as CD4 is retained in the ER by means of an ER retention signal or treatment of cells with Brefeldin A (BFA), a fungal metabolite

known to block protein sorting from the ER to the Golgi apparatus (Willey et al. 1992a; Lenburg and Landau 1993). Under these conditions, Vpu mediates a rapid degradation of CD4 in the ER with CD4 half-life being reduced from 6h to approximately 15 min (Willey et al. 1992a). Nevertheless, the fact that CD4 localization in the ER is a pre-requisite for Vpu-mediated degradation suggests that cellular factors essential for CD4 degradation are located in the ER (Chen et al. 1993).

Vpu-mediated CD4 degradation is a multistep process that is triggered by the direct physical binding of Vpu to the cytoplasmic tail of CD4 (Bour et al. 1995b) (Fig. 13). Mutational and deletion analysis of the cytoplasmic tail of CD4 have delineated a Vpu-responsive sequence encompassing residues 416-419 (EKKT) as well as an alpha helix structure located in the proximal region of the viral receptor cytoplasmic tail (Lenburg and Landau 1993; Vincent et al. 1993; Willey et al. 1994; Yao et al. 1995). Although some studies have suggested that the transmembrane (TM) region of CD4 may also contribute to CD4 sensitivity to Vpu-induced degradation, the precise role of this domain remains to be defined (Buonocore et al. 1994; Raja et al. 1994; Willey et al. 1994). Structural analysis of Vpu indicates that the cytoplasmic domain of the protein consists of two discrete amphipathic alpha helices, encompassing amino acid positions 35-50 (helix 2) and 58-70 (helix 3), respectively, joined together by a short flexible hinge region containing two highly conserved serine residues (S<sub>52</sub> and S<sub>56</sub>) that are phosphorylated by the ubiquitous casein kinase II in HIV-1-infected human cells (Schubert et al. 1994; Wray et al. 1995; Federau et al. 1996; Henklein et al. 2000). Towards the C-terminal end, another short helix or a turn appears to exist depending on the experimental conditions that are used (Federau et al. 1996; Willbold et al. 1997). Structure-function relationship studies performed in our laboratory indicate that mutations affecting the integrity of the first cytoplasmic alpha-helix of Vpu or the hydrophobic interface within this amphipathic helical structure, interfere with the binding to CD4 (Tiganos et al. 1997) (Binette, J. and Cohen, E.A unpublished data), thus suggesting that the first cytoplasmic helix of Vpu is involved in the direct physical interaction with CD4. Although the binding of Vpu to CD4 is necessary to induce degradation, it is not sufficient (Bour et al. 1995b). Conversely, phosphorylation of Vpu at S<sub>52</sub> and S<sub>56</sub>, while not required for CD4 binding is essential for Vpu-mediated CD4 degradation and is indeed involved in the recruitment of a cellular co-factor, human beta transducin-repeat containing protein (h-βTrCP), which corresponds to the specificity component of an E3 ubiquitin ligase complex (SCF<sup>β-TrCP</sup>) implicated in the ubiquitin-

**Figure 13 : Model of the CD4 degradation mediated by Vpu.** (1) The gp160 (Env) interacts with CD4 via its high affinity receptor binding domain, trapping CD4 in the ER. (2) Vpu interacts with CD4 cytoplasmic tail presumably via a domain located in the first helix of Vpu cytoplasmic domain (helix 2). (3) Vpu binds  $\beta$ -TrCP, the specificity component of an ubiquitin ligase complex (E3) that recognizes a consensus site in Vpu comprising the two phosphoserines at positions 52 and 56 (Pi). The interaction between Vpu and  $\beta$ -TrCP recruits Skp1p and the remaining components of the E3 complex  $SCF^{\beta-TrCP}$ , including an E2 that is bound to activated ubiquitin (Ub) molecules. (4) It is believed that CD4 is mono- or poly-ubiquitinated by this E3 complex once it is bound to Vpu. (5) Following ubiquitination, CD4 is possibly retranslocated to the cytoplasm where degradation by the 26S proteasome occurs.



conjugating pathway (Margottin et al. 1998). h- $\beta$ TrCP contains a WD-40 repeat region, which recognizes Vpu in a phosphorylation-dependent manner and an F-box domain, which recruits Skp1 a component of the E3 ubiquitin ligase complex responsible for the ubiquitination of protein destined for degradation (Bai et al. 1996) (Fig. 13). These findings combined with the demonstrated sensitivity of Vpu-mediated CD4 degradation to specific proteasome inhibitors and the requirement of an intact ubiquitin-conjugating system strongly suggest that Vpu targets CD4 to proteolysis by acting as a connector between the viral receptor and the ubiquitin-proteasome degradative machinery (Fujita et al. 1997; Schubert et al. 1998). Interestingly, a number of cellular proteins, such as the Wnt signalling pathway intermediate,  $\beta$ -catenin, and the NF $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$ , are targeted to degradation by the proteasome through pathways involving the SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 complex also involved in CD4 degradation (Winston et al. 1999a; Winston et al. 1999b; Wu et al. 2003a). The motif recognized by h- $\beta$ TrCP in these proteins contains a pair of phosphoserine residues similar to those found in Vpu and corresponds to the consensus motif: DSG $\Phi$ XS; where S is a phosphoserine. Following phosphorylation of serine residues found within this consensus motif, I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -catenin are ubiquitinated at specific lysine residues and targeted for degradation by the proteasome through a process that is mediated by h- $\beta$ TrCP (Winston et al. 1999b). In this regard, Vpu is different from other known substrates of h- $\beta$ TrCP since it is resistant to degradation and indeed remains stable throughout the process of CD4 degradation (Chen et al. 1993; Tiganos et al. 1997). The molecular mechanism allowing Vpu to prevent its own degradation following recruitment of h- $\beta$ TrCP remains not understood. It is possible that Vpu has the capacity to mask its lysine residues that might constitute potential target for ubiquitination upon recruitment of SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>, while efficiently expose those present in the cytoplasmic domain of CD4 (Fig. 13). Although the molecular machinery that is recruited by Vpu to target CD4 for degradation is now reasonably well defined, it remains unclear how ER-associated CD4 encounters cytoplasmic proteasome complexes. Whether Vpu action involves a retrotranslocation of CD4 from the ER to the cytoplasm, a mechanism used by human cytomegalovirus US2 and US11 proteins to target newly synthesized MHC-I heavy chain for rapid degradation by the proteasome (Wiertz et al. 1996a; Wiertz et al. 1996b), a direct degradation of the cytoplasmic tail of CD4 by the proteasome, or a different undefined mechanism remains to be determined. Furthermore, it still remains unclear whether interaction of Vpu with CD4 and subsequent recruitment of

the ubiquitin-proteasome pathway through h- $\beta$ TrCP are sufficient to induce CD4 degradation. In that regard, the role of Vpu multimerization in this process remains undefined. Mutational analysis of the Vpu amphipatic alpha helices reveals that several Vpu mutants that are still capable of interacting with CD4 and h- $\beta$ TrCP like wild type Vpu, are unable to mediate CD4 degradation (Binette, J. and Cohen, E.A, unpublished data), thus suggesting that Vpu action on CD4 involves very likely other steps or perhaps other co-factors. Finally, it remains not clear at present whether CD4 needs to be mono-ubiquitinated or poly-ubiquitinated in order to be degraded by the proteasome since direct evidence of ubiquitinated forms of CD4 in presence of Vpu is still lacking. More studies in this area will not only shed light on the molecular mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation but will also enhance our understanding of basic processes involved in ER-associated degradation (ERAD) of proteins.

#### **FUNCTIONAL ROLE OF CELL SURFACE CD4 DOWN-REGULATION DURING HIV-1 INFECTION.**

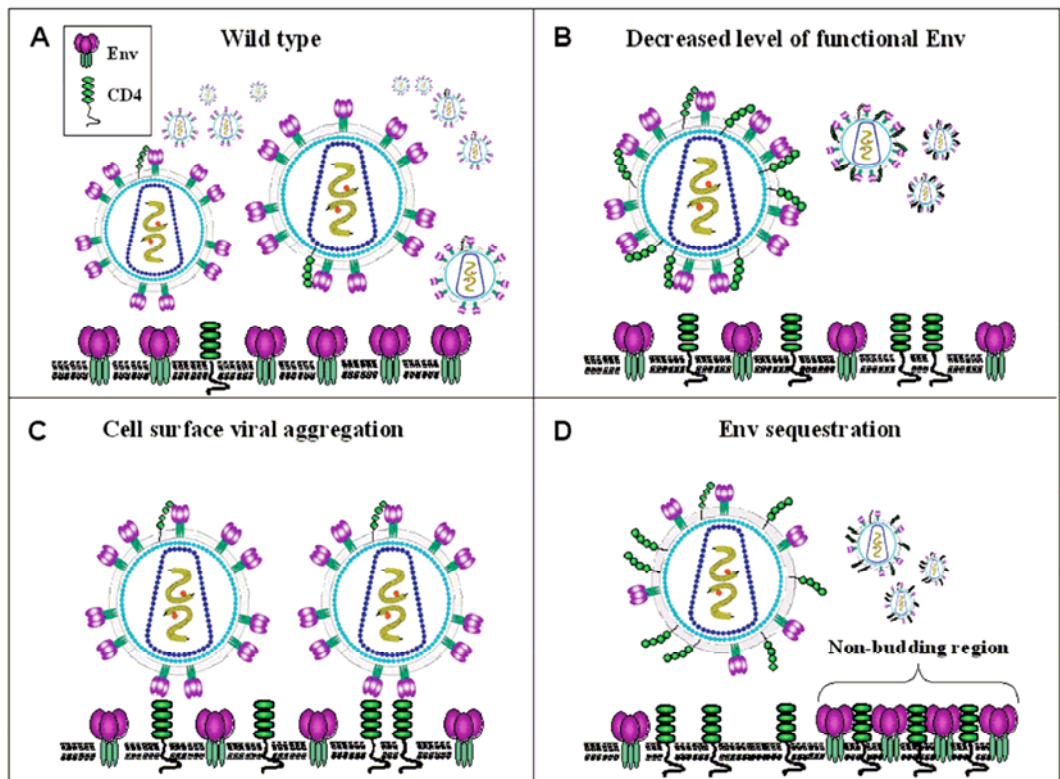
The fact that CD4 down-regulation is mediated by multiple gene function during HIV-1 infection implies that cell surface CD4 regulation must be an important determinant for viral replication and pathogenesis. Studies with monkeys have specifically evaluated the role of CD4 down-modulation in SIV pathogenesis *in vivo*. Mutations that interfere with Nef ability to down-regulate CD4 were found to strongly reduce viremia in infected monkeys and indeed reverted efficiently to restore the CD4 down-modulation function (Iafrate et al. 2000). Furthermore, a recent study using the simian-human immunodeficiency virus (SHIV) / pig-tailed macaque model has demonstrated that mutations of Vpu at sites which are critical for the protein ability to degrade CD4, attenuate virus pathogenicity or revert to wild type sequence (Singh et al. 2003). Several observations also support an important role of CD4 down-regulation in HIV-1 pathogenesis. One study has shown that Nef alleles isolated from LTNPs are less efficient in CD4 down-regulation than those found in progressors and asymptomatic carriers (Tobieme et al. 2002). Another study analyzed the modulation of HIV-1 Nef functions during progression to disease. Late Nef alleles isolated after progression to AIDS showed an enhanced ability to down-

modulate CD4 as compared to Nef alleles isolated at early stages of infection (Carl et al. 2001). However, it is only more recently that a series of studies have reported an enhancing effect of CD4 down-regulation on HIV-1 replication using *in vitro* as well as *in vivo* models. Using HIV-1 virus harbouring well-defined Nef mutants, Lundquist and colleagues observed a strong correlation between the ability of Nef to down-regulate CD4 during acute HIV-1 infection of activated primary T cells lymphocytes and HIV-1 replication efficiency in T cells (Lundquist et al. 2002). Furthermore, Glushakova and colleagues recently reported that CD4 down-regulation by HIV-1 Nef correlated with the efficiency of viral replication and the severity of CD4<sup>+</sup> T cell depletion in lymphoid cell histocultures (Glushakova et al. 2001). Stoddart and colleagues evaluated the pathogenic potential of recombinant viruses that are specifically impaired for Nef-mediated CD4 down-regulation in severe combined immunodeficiency (SCID) mice implanted with human foetal thymus and liver, a model in which virus-mediated depletion of thymocytes is known to be Nef-dependent, and found that these viruses displayed attenuated pathogenicity, as measured by thymocyte depletion. However, in this model, the change of cytopathicity associated with the loss of Nef-mediated CD4 down-regulation did not significantly correlate with changes in the replication of mutant viruses in activated PBMC (Stoddart et al. 2003).

More recently, Arganaraz and colleagues have analyzed in detail the CD4 down-modulating activity of primary *nef* alleles obtained during asymptomatic infection or after progression to AIDS and found that genetic variation in *nef* occurring during progression to disease conferred stronger CD4 down-modulating properties to the virus (Arganaraz et al. 2003). Importantly this study revealed that HIV-1 strains carrying late *nef* alleles with increased CD4 down-modulating activities displayed infectivity and viral replication properties significantly enhanced when compared with early versions of *nef*, suggesting that mutations in *nef* selected during disease progression may impact the outcome of disease by enhancing the replicative and pathogenic properties of HIV-1.

Interestingly, several recent reports have highlighted the importance of cell surface CD4 down-regulation by Nef or/and Vpu in augmenting viral production and infectivity in cell culture systems (Lama et al. 1999; Ross et al. 1999; Cortes et al. 2002; Lundquist et al. 2002; Arganaraz et al. 2003; Levesque et al. 2003; Tanaka et al. 2003) (Fig. 14). Ross and colleagues reported that overexpression of CD4 in HIV-1-transfected human embryonic kidney cells (293T) leads to a significant reduction of the overall amounts of virus released. Given than this CD4-mediated inhibition of viral release was dependent on the specific

**Figure 14 : Different proposed models of CD4-mediated inhibition of HIV-1 infectivity.** A) In the course of wild type virus infection, both Nef and Vpu contribute to CD4 down-modulation thus decreasing dramatically its cell surface expression and virion incorporation during viral morphogenesis. Consequently, fully infectious particles are efficiently released from the infected cells. B) In the absence of Vpu expression, the CD4 molecule is being incorporated into the nascent viral particle due to its increased expression at the cell surface. This ultimately results in a viral infectivity impairment that is mechanistically explained by the formation of CD4/gp120 complexes at the surface of the virion. C) In the absence of Vpu and/or Nef, CD4 levels are markedly increased at the cell surface. The aggregation model proposes that high cell surface CD4 expression inhibits HIV-1 progeny virion release from the infected cells by trapping the virus at the cell surface. D) In the absence of Nef and Vpu, high cell surface CD4 expression induce a reduction in the infectivity potential of released virions by sequestering the viral Env by CD4 into non-budding area of the plasma membrane. While CD4 is well incorporated into nascent virions, it also blocks efficiently Env incorporation in the budding virions.



interaction between CD4 and the viral envelope glycoprotein precursor and was relieved by Nef, they proposed that CD4 down-regulation prevents trapping and aggregation of nascent progeny virion at the cell surface, an effect reminiscent of the function of the influenza virus neuraminidase protein (Palese et al. 1974) (Fig. 14C). Although this effect of cell surface CD4 on viral release was observed in conditions where CD4 was overexpressed, it is unclear whether physiological levels of surface CD4 would exert a similar effect in HIV target cells (Harris 1999). A second report showed that expression of high levels of CD4 at the cell surface of 293T cells induced a drastic reduction in the infectivity of released virion (Lama et al. 1999). Viral particles produced in the absence of Nef or/and Vpu were found to be less infectious because they incorporate fewer envelope glycoproteins and substantial amounts of CD4 molecules (Lama et al. 1999). More recently, Cortes and colleagues extended these studies to Jurkat T cell lines and found that physiological levels of surface CD4 interfere in an Env-dependent manner with the infectivity of released virus, presumably because less Env glycoproteins were incorporated into viral particles (Cortes et al. 2002). These authors proposed that accumulation of CD4 at the cell surface may alter virus infectivity by a mechanism involving primarily recruitment and sequestration of gp120 molecules away from budding sites, which are believed to be associated with lipid rafts at the cell plasma membrane (Lama et al. 1999; Nguyen and Hildreth 2000; Ono and Freed 2001; Cortes et al. 2002; Arganaraz et al. 2003) (Fig. 14D). This effect of CD4 down-regulation on HIV-1 infectivity was recently confirmed by two different groups using HIV-1 isogenic except for the expression of Vpu or/and Nef (Levesque et al. 2003; Tanaka et al. 2003). However, these studies could not correlate the effect of CD4 down-regulation on viral infectivity to difference in the level of envelope glycoproteins incorporated into progeny virions. Rather, our laboratory found that accumulation of CD4 at the cell surface of Vpu-deficient HIV-1 producing cells leads to efficient recruitment of CD4 into virions while at the same time promoting the formation of nonfunctional gp120-CD4 complexes at the virion surface (Levesque et al. 2003) (Fig. 14D). The most obvious model that emerges from our data is that accumulation of CD4 at the cell surface and subsequent recruitment into HIV-1 viral particles affects virion infectivity by forming complexes with gp120 at the virion surface thereby saturating CD4 binding sites on gp120 molecules and decreasing the level of functional Env at the virion surface. The discrepancy regarding the level of Env glycoproteins incorporated in the presence or absence of Nef or/and Vpu is unclear at this point. One possibility is that the mechanism by which Nef and Vpu contribute to viral



infectivity may be distinct but complementary, although Tanaka and colleagues failed to observe an effect on Env incorporation in virions using Vpu or/and Nef mutations (Tanaka et al. 2003). Clearly, more studies are required to better understand the molecular mechanism underlying the effect of Vpu and Nef-mediated down-regulation of cell surface CD4 on viral infectivity. Nevertheless, the fact that both Vpu and Nef were found to be required for production of fully infectious HIV-1 viral particles in CD4<sup>+</sup> T cells and activated primary cells suggest that these accessory proteins through their ability to downregulate CD4, are therefore likely to facilitate viral spread *in vivo* and thus contribute to HIV-1 pathogenicity. Additional studies will also be required in more physiological models to establish whether the correlation existing between CD4 down-regulation and pathogenicity is linked to enhanced viral replication and spread.

There are other plausible reasons why CD4 down-modulation may be beneficial to HIV-1. Elimination of the virus receptor at the cell surface to prevent reinfection has been demonstrated with some retroviruses (Bour et al. 1995a) including HIV (Benson et al. 1993; Little et al. 1994; Volsky et al. 1996; Tanaka et al. 2003). It has been reported that reinfection of HIV-1 infected T cells leads to accumulation of proviral DNA which was toxic to cells (Pauza et al. 1990; Bergeron and Sodroski 1992; Robinson and Zinkus 1992); thus there might be a selective advantage for the virus to inhibit superinfection although this phenomenon is unlikely to be relevant in the periphery *in vivo* and is likely to be more important in HIV-1-infected lymph nodes where there are high levels of virus. Additionally, there is evidence that signal transduced through binding to CD4 or through CD4 oligomerisation at the cell surface may negatively regulate HIV-1-LTR directed gene expression or may induce apoptosis and cytopathic effects (Tremblay et al. 1994). Presumably, one effect of cell surface CD4 down-regulation would be to prevent the transduction of these signals before production and release of new progeny virions occurs. However, there is still some controversy as to whether these transduced signals are of negative or positive nature (Benkirane et al. 1994; Tremblay et al. 1994). Finally, it has been proposed that the CD4-associated protein tyrosine kinase, p56<sup>lck</sup>, could be released following Nef-mediated removal of CD4 from the cell surface, and thus be available to phosphorylate various substrates such as the T-cell receptor  $\zeta$  chain. Such event, by modifying the overall state of T-cell activation, could establish an intracellular environment more appropriate for HIV-1 replication. So although recent reports have highlighted the importance of cell surface CD4 down-regulation in augmenting viral production and

infectivity (Cortes et al. 2002; Arganaraz et al. 2003), the other potential consequences of CD4 down-regulation merit further investigation.

## CONCLUSION

HIV-1 induced CD4 down-regulation is believed to be an important determinant governing viral replication and pathogenicity *in vivo*. Up to now, this HIV-1 function has not been targeted for therapeutic intervention. Given the accumulating evidence pointing toward an important role for CD4 down-modulation in pathogenesis *in vivo*, it is increasingly believed that drugs inhibiting this function might alter the course of the disease and provide clinical benefits for HIV-1 infected individuals.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jacques Thibodeau for discussions. Éric A. Cohen is the recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Canadian Network for Vaccine and Immunotherapeutics to EAC.

## 8.2 Mise à jour des connaissances

Depuis la parution de cette revue, certaines données importantes concernant la molécule CD4 et sa dégradation par le VIH-1 ont été publiées dans la littérature. De plus, certaines données qui n'avaient pas été incluses dans cette revue pourraient avoir une certaine importance à la lumière des résultats qui seront présentés dans cette thèse. Cette section se veut donc une mise à jour et un complément des données présentées dans la revue que nous avons publié en 2004.

### Rôle de la dégradation de CD4 par le VIH-1

En plus d'augmenter l'infectivité des particules virales, de récentes données ont démontré que la dégradation du récepteur CD4 par le VIH-1 est nécessaire afin d'éviter que les cellules soient surinfectées (Wildum et al. 2006). Il semble que la surinfection des cellules par le VIH-1 pourrait augmenter leur apoptose. La régulation négative du CD4

allongerait donc la durée de production virale par une cellule en empêchant son apoptose prématurée (Wildum et al. 2006).

### Mécanismes impliqués dans la régulation négative de l'expression de surface de CD4 par la protéine Nef

Depuis plusieurs années, un débat existe en ce qui concerne la voie utilisée par Nef pour induire une diminution du niveau de molécules CD4 présentes à la surface des cellules infectées. L'un de ces modèles propose que Nef induit l'internalisation par endocytose des molécules de CD4 qui sont déjà présentes à la surface, favorisant ainsi leur dégradation via la voie lysosomale (Aiken et al. 1994; Rhee and Marsh 1994; Bresnahan et al. 1998). L'autre modèle propose que Nef interfère avec le transport des molécules de CD4 nouvellement synthétisées à partir du TGN jusqu'à la membrane plasmique (Mangasarian et al. 1997; Ross et al. 1999).

Des résultats récents ont permis de démontrer que la voie d'endocytose de CD4 à partir de la membrane plasmique semble être prédominante (Chaudhuri et al. 2007). Les auteurs ont démontré que Nef interagit directement avec AP-2 (impliquée dans l'internalisation des protéines à partir de la membrane plasmique). Finalement, d'autres évidences récentes ont démontré que le motif di-acidique de Nef (DD174-175), connu pour être important pour la régulation négative de CD4 par Nef, est impliqué dans la liaison directe avec AP-2 (Lindwasser et al. 2008). Ces données suggèrent fortement que Nef régule négativement CD4 par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et de AP-2.

Enfin, il a été démontré récemment que Nef, en plus d'induire l'internalisation du CD4, semble amener le CD4 internalisé vers les MVBs (« multivesicular bodies ») pour qu'il soit livré aux lysosomes par la suite afin d'être dégradé et que ce processus est indépendant de l'internalisation du CD4 à partir de la membrane plasmique (daSilva et al. 2009). Ce processus impliquerait la machinerie ESCRT qui est utilisée par la cellule pour cibler vers les MVBs les protéines membranaires qui ont subi une internalisation dépendante de l'ubiquitination dans le but d'induire leur dégradation subséquente dans les lysosomes (Katzmann et al. 2002; Hurley 2008). Étonnamment, il semble que Nef et CD4 soient ubiquitinés sur des lysines pendant ce processus mais que cette ubiquitination ne soit pas nécessaire au ciblage de CD4 aux MVBs (daSilva et al. 2009).

### Protéines cellulaires impliquées dans la dégradation de CD4 induite par Vpu

Les cellules de mammifères possèdent un homologue de  $\beta$ -TrCP qui se nomme HOS ou  $\beta$ -TrCP2 (Cenciarelli et al. 1999; Fuchs et al. 1999; Koike et al. 2000). Une étude récente ((Butticaz et al. 2007)) a démontré que  $\beta$ -TrCP2 pouvait aussi lier Vpu et que la régulation négative des deux isoformes par des siRNAs était nécessaire afin de bloquer la dégradation de CD4 induite par Vpu. Ces données suggèrent fortement que  $\beta$ -TrCP2 puisse également être impliqué dans la dégradation de CD4 par Vpu.

## **9. Système ubiquitine-protéasome et mécanismes de dégradation des protéines au niveau du réticulum endoplasmique**

Le VIH-1 code pour plusieurs protéines accessoires qui interagissent avec des protéines cellulaires impliquées dans la voie de dégradation ubiquitine-protéasome. Ces protéines virales n'ont aucune fonction enzymatique, mais servent d'adaptateurs entre des ubiquitine ligases et des substrats cellulaires. Par exemple, il semble que Vpr induit la dégradation de plusieurs substrats via le recrutement d'une ubiquitine ligase cellulaire (voir section 7.2). Les différentes fonctions associées à Vpr seraient donc le reflet de la dégradation par cette E3 cellulaire de substrats différents. Vif recrute une autre ubiquitine ligase afin d'induire la dégradation d'APOBEC3G et APOBEC3F (voir section 7.3). Enfin, Vpu recrute aussi une ubiquitine ligase cellulaire afin d'induire la dégradation de CD4 (voir section 7.4). Le système ubiquitine-protéasome semble donc être d'une grande importance pour la réplication du VIH-1, sa transmission d'une cellule à l'autre et sa persistance dans l'organisme.

Bien que le VIH-1 ait évolué pour contrer les défenses antivirales cellulaires via l'utilisation du système ubiquitine-protéasome à son avantage, il n'en demeure pas moins que ce système semble aussi impliqué dans la défense antivirale cellulaire. Par exemple, il semble que la défense cellulaire induite par l'ARN viral soit régulée, entre autres, par plusieurs protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome (Komuro et al. 2008). Plus spécifiquement, il a été démontré que l'inhibition de la réplication du VIH-1 dans les cellules de singes par la protéine TRIM5 $\alpha$  impliquerait la dégradation de TRIM5 $\alpha$  par le système ubiquitine-protéasome (Wu et al. 2006; Campbell et al. 2008). Le mécanisme exact impliqué dans ce phénomène reste toutefois encore inconnu.

Comme Vpu induit la dégradation de CD4 au niveau du RE et que le processus nécessite le système ubiquitine-protéasome, il sera question dans cette section de la dégradation des protéines au niveau du RE. En effet, une bonne connaissance des mécanismes impliqués dans le contrôle de qualité des protéines au niveau du RE est utile pour la compréhension du processus de dégradation de CD4 par Vpu.

Dans les cellules eucaryotes, les protéines qui doivent être sécrétées ou qui possèdent des domaines transmembranaires sont traduites au niveau du RE où elles subissent plusieurs étapes de maturation. Les cellules ajustent la capacité de repliement des protéines au niveau du RE en fonction des besoins afin de s'assurer que les protéines sécrétées ou présentes à la surface cellulaire soient repliées et/ou assemblées de façon fidèle (Ron and Walter 2007). Parfois, ce processus n'est pas suffisant et la dégradation des protéines par la voie ERAD (« ER associated degradation ») ou par autophagie est alors nécessaire. Dans les prochaines sections, les différents processus impliqués dans la voie ERAD seront présentés.

## 9.1 Dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD)

Ce type de dégradation nécessite que les protéines à être détruites soient reconnues, amenées au cytoplasme par un processus appelé rétrotranslocation ou dislocation et enfin, dégradées via le système ubiquitine-protéasome. Les différents acteurs impliqués dans ces étapes seront présentés dans les sections suivantes.

### 9.1.1 Reconnaissance des substrats du ERAD et ciblage vers la machinerie cytoplasmique de dégradation.

Les protéines mal-repliées sont associées avec les chaperonnes luménales BiP (« binding immunoglobulin protein ») et PDI (« protein disulfide isomerase ») qui vont les livrer à des complexes responsables du contrôle de qualité devant les exporter hors du RE et ensuite au protéasome (Gillece et al. 1999; Nishikawa et al. 2001; Tsai et al. 2002; Nakatsukasa and Brodsky 2008).

Dans le cas des glycoprotéines, ces processus impliquent la reconnaissance de formes modifiées des sucres liés aux asparagines des protéines (« N-linked glycans ») par

des chaperonnes de type lectine (telles que EDEM et Yos9 par exemple) (Hosokawa et al. 2001; Ellgaard and Helenius 2003; Molinari et al. 2003; Oda et al. 2003; Caramelo and Parodi 2007; Hebert and Molinari 2007). La protéine Yos9 semble faire le lien entre la sélection des substrats et la rétrotranslocation (Bhamidipati et al. 2005; Kim et al. 2005; Szathmary et al. 2005).

La dégradation des protéines non-glycosylées est encore mal connue et pourrait nécessiter la protéine Herp (« homocysteine-induced ER protein »). Herp est une protéine cytoplasmique associée aux membranes. La diminution de l'expression de Herp inhibe la dégradation de substrats non glycosylés, mais pas celle des substrats dépendant de la calnexine, suggérant ainsi qu'il y a une distinction dans les voies empruntées par les protéines glycosylées et non-glycosylées pour leur dégradation (Okuda-Shimizu and Hendershot 2007). Herp s'associe directement avec Hrd1 (une E3 ligase membranaire) (Schulze et al. 2005) et augmente la dégradation de certains substrats par son association avec des ubiquilines (Kim et al. 2008). Les ubiquilines sont des protéines cytosoliques qui escortent les protéines ubiquitinées vers le protéasome (Verma et al. 2004). Il est important de noter ici que la dégradation de CD4 par Vpu est indépendante de la glycosylation de CD4 (Chen et al. 1993).

### 9.1.2 Rétrotranslocation et système ubiquitine-protéasome

Les substrats du ERAD doivent être ubiquitinés afin d'être dégradés par le protéasome 26S. Comme la machinerie d'ubiquitination est cytoplasmique, les protéines qui n'ont pas de domaine cytoplasmique doivent obligatoirement être rétrotransloquées vers le cytoplasme avant d'être ubiquitinées et dégradées. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer comment les protéines transmembranaires sont dégradées (Nakatsukasa and Brodsky 2008) et il semble que le mécanisme diffère d'un substrat à un autre. Certains substrats transmembranaires sont retrouvés dans le cytoplasme lorsque la fonction du protéasome est inhibée (Wiertz et al. 1996a; Johnston et al. 1998; Nakatsukasa et al. 2008), démontrant que ces protéines sont complètement disloquées avant d'être dégradées.

### Ubiquitination

Les protéines dégradées par ERAD sont généralement poly-ubiquitinées (via la lysine 48 de l'ubiquitine) sur des lysines par l'attachement de chaîne de poly-ubiquitines sur celles-ci (Coux and Piechaczyk 2000). L'attachement de l'ubiquitine peut aussi avoir lieu en N-terminal de la protéine (Ciechanover and Ben-Saadon 2004) et il y a maintenant plusieurs évidences que l'ubiquitination peut avoir lieu sur des résidus non-lysines tels que la sérine, la thréonine et la cystéine (voir section 9.1.4.2.2 plus bas).

L'ubiquitine doit être activée par une enzyme d'activation (E1) et est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison (E2) qui catalyse le transfert de l'Ub sur le substrat devant être ubiquitiné. La spécificité du processus d'ubiquitination est conférée par une troisième protéine, ou un complexe protéique, appelé l'ubiquitine ligase (E3) qui reconnaît le substrat de façon spécifique (Scheffner et al. 1995; Hershko and Ciechanover 1998; Weissman 2001; Glickman and Ciechanover 2002). La E2 est généralement retrouvée au sein du complexe E3. Un autre type d'enzyme (E4), aurait pour fonction d'allonger les chaînes de poly-ubiquitine de certains substrats (Koegl et al. 1999).

Les E3 impliquées dans la dégradation ERAD sont généralement associées à la membrane du RE. Toutefois, les E3 cytosoliques de mammifères Parkin et CHIP sont impliquées dans la dégradation ERAD de leurs substrats respectifs (Pael-R et CFTRdeltaF508) (Imai et al. 2001; Younger et al. 2006). Certains membres de la famille des E3 cytosoliques SCF, dont il sera question à la section 10.1, sont aussi impliqués dans la dégradation ERAD de certaines glycoprotéines (Yoshida et al. 2003; Yoshida et al. 2005).

### Rétrotranslocation

La nature du pore de rétrotranslocation est encore controversée. Plusieurs candidats semblent être impliqués dans la rétrotranslocation de différents substrats.

Plusieurs évidences montrent que le pore de rétrotranslocation pourrait être composé de la protéine Sec61 qui est normalement requise pour la translocation cotraductionnelle des polypeptides dans le RE (Johnson and Haigh 2000; Rapoport 2007). Il a été proposé, entre autres, qu'une protéine appelée p58 serait responsable du changement de fonction de Sec61, inversant ainsi son mode d'action « normal » pour la rendre capable de rétrotranslocation (Oyadomari et al. 2006). Malgré les données démontrant l'implication de Sec61 dans la dégradation de plusieurs substrats (Wiertz et al. 1996b; Pilon et al. 1997;

Plempner et al. 1997; Schmitz et al. 2000; Kalies et al. 2005), il semble évident que Sec61 n'est pas requise pour la rétrotranslocation de tous les substrats de ERAD. Par ailleurs, des levures dont le gène *sec61* est muté sont capables de dégrader des protéines membranaires par ERAD de façon efficace, ce qui suggère que chez la levure, Sec61 pourrait être impliquée exclusivement dans la rétrotranslocation des substrats luminaux du RE (Huyer et al. 2004; Sato and Hampton 2006).

La protéine Der1 (retrouvée chez la levure) est un autre candidat potentiel pour le pore de dislocation. Un des trois homologues de Der1 chez les cellules de mammifères, Derlin-1, a été retrouvé en complexe avec des facteurs membranaires, cytoplasmiques et des substrats de ERAD tels que la chaîne lourde du CMHI par exemple (Lilley and Ploegh 2004; Ye et al. 2004; Katiyar et al. 2005; Lilley and Ploegh 2005a; Schulze et al. 2005; Ye et al. 2005; Younger et al. 2006; Okuda-Shimizu and Hendershot 2007). Un autre indice tendant à prouver que Derlin-1 puisse servir de pore de dislocation lors du mécanisme ERAD est que les protéines Derlin-1, Derlin-2 et Derlin-3 semblent toutes impliquées, lors de processus non-reliés au ERAD, dans des mécanismes de rétrotranslocation (Lilley et al. 2006; Oda et al. 2006; Bernardi et al. 2008). Ceci suggère que la structure de cette famille de protéine soit adaptée au processus de dislocation.

Les derniers candidats pour la rétrotranslocation sont les ubiquitine ligases associées à la membrane du RE telles que Hrd1 (« HmgCoA reductase degradation ») et Doa10 (« degradation of alpha2 ») chez la levure et gp78 chez les mammifères qui possèdent plusieurs domaines transmembranaires (Hampton et al. 1996; Deak and Wolf 2001; Zhong et al. 2004; Kreft et al. 2006). Il a été suggéré que ces ubiquitine ligases puissent servir à la fois de pore de dislocation et de machinerie d'ubiquitination des protéines, créant ainsi un lien entre les deux phénomènes (Nakatsukasa and Brodsky 2008).

Un dernier modèle suggère que la rétrotranslocation nécessite la formation de vésicules de lipides à partir de la membrane du RE qui pourraient contenir autant des protéines luminales que des protéines transmembranaires (Ploegh 2007).

La fonction d'une AAA-ATPase nommée Cdc48 chez la levure et p97 chez les mammifères semble nécessaire afin de compléter le processus de rétrotranslocation (Jarosch et al. 2002). La fonction de p97 consiste à fournir l'énergie nécessaire à la dislocation par l'hydrolyse de l'ATP (Ye et al. 2001; Jarosch et al. 2002; Rabinovich et al. 2002). Par contre, la dislocation de certaines protéines solubles utilise l'énergie générée par



la sous-unité 19S du protéasome (Werner et al. 1996; Lee et al. 2004; Wahlman et al. 2007).

La protéine p97 est retrouvée en association avec des co-facteurs (Ufd1 et Npl4) qui peuvent reconnaître l'ubiquitine liée sur les protéines qui sont ubiquitinées avant ou pendant la dislocation (Meyer et al. 2000; Meyer et al. 2002). Cette reconnaissance de l'ubiquitine sur les substrats du ERAD pourrait faciliter le processus de dislocation (Ye et al. 2001; Jarosch et al. 2002; Rabinovich et al. 2002; Ye et al. 2003; Jentsch and Rumpf 2007). Toutefois, l'ubiquitination du substrat avant sa dislocation n'est pas toujours nécessaire. Par exemple, lors du processus de dégradation de la chaîne lourde (CL) du CMHI par la protéine US2 du virus HCMV (voir section 9.1.4.1.1), l'ubiquitination de la CL sur des lysines luménales est nécessaire à la rétro-translocation de la protéine. Par contre, la protéine US11 du HCMV (voir section 9.1.4.1.2) induit la dislocation de la CL du CMHI par un processus indépendant de son ubiquitination (Hassink et al. 2006).

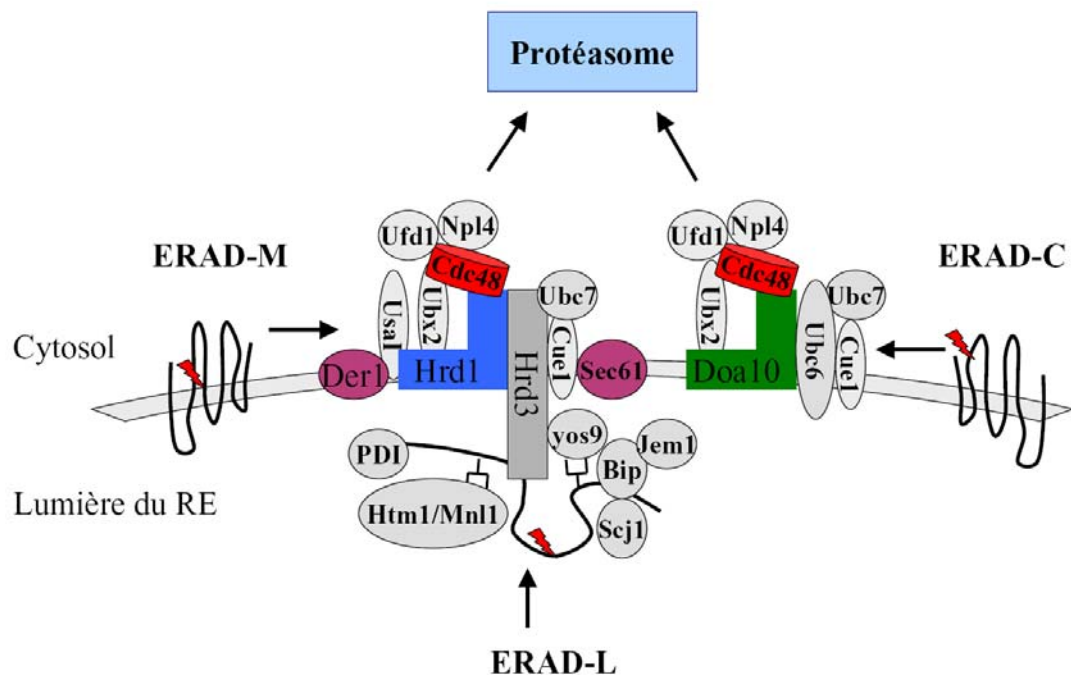
#### Ciblage vers le protéasome

Une fois la protéine rétrotransloquée et ubiquitinée, elle doit être ciblée vers le protéasome 26S pour être dégradée. Il semble qu'une série de protéines capables de lier l'ubiquitine servent d'escorte pour amener la protéine vers le protéasome (Elsasser and Finley 2005; Raasi and Wolf 2007). La p97 est un de ces facteurs qui agit en collaboration avec ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 (Ye et al. 2001; Jarosch et al. 2002; Rabinovich et al. 2002; Jentsch and Rumpf 2007). De plus, il a été montré que la fonction d'une dé-ubiquitinase associée à p97, la protéine ataxin-3 (atx3) est nécessaire à la dégradation de certains substrats dépendants de p97 (Wang et al. 2006a).

#### 9.1.3 Différents types d'ERAD et protéines impliquées

Trois types d'ERAD distincts (ERAD-L, ERAD-M et ERAD-C) ont été caractérisés surtout chez la levure *S. cerevisiae* (Huyer et al. 2004; Vashist and Ng 2004; Carvalho et al. 2006; Denic et al. 2006) selon la position du domaine de la protéine qui est endommagé ou mal-replié (domaine luménal (L), membranaire (M) ou cytoplasmique (C)). Une revue récente a permis de faire la synthèse des connaissances acquises jusqu'à maintenant (Nakatsukasa and Brodsky 2008). Un schéma des différentes voies est présenté à la Figure 15.

**Figure 15 : Schéma des différents types d'ERAD.** Les substrats du ERAD-L sont reconnus par des chaperonnes luminales du RE des familles hsp70/hsp40 (Kar2, Jem1 et Scj1) en plus de PDI, des lectines telles que Yos9 et Htm1/Mnl1 et aussi par le domaine luminal de la protéine transmembranaire Hrd3 qui est un co-facteur de la E3 Hrd1 qui est impliquée dans leur ubiquitination et peut-être aussi leur rétrotranslocation. Il semble que Sec61 soit aussi impliqué dans la dislocation de certains substrats du ERAD-L. Les substrats du ERAD-M sont peut-être reconnus directement par la E3 Hrd1 et utilisent ultimement la même machinerie de rétrotranslocation et ubiquitination que le ERAD-L. Les substrats du ERAD-C sont reconnus par les chaperonnes cytosoliques des familles hsp70/hsp40 (Ssa1, Ydj1 et Hlj1), mais aussi par la E3 Doa10.



Les substrats du ERAD-L sont généralement des protéines luménales, mais il se peut que cette voie s'étende à la dégradation des protéines transmembranaires dont le domaine luméral est affecté. Ces substrats doivent obligatoirement être rétrotransloqués avant d'être ubiquitinés et dégradés. Ils sont reconnus par des chaperonnes lumérales du RE des familles hsp70/hsp40 en plus de PDI, des lectines et aussi par le domaine luméral de la protéine transmembranaire Hrd3. L'ubiquitine ligase transmembranaire Hrd1 est impliquée dans l'ubiquitination des substrats du ERAD-L et il se peut qu'elle soit responsable de leur rétrotranslocation. Toutefois, une étude récente a démontré que la protéine Sec61p est nécessaire pour la rétrotranslocation de certains substrats du ERAD-L (Willer et al. 2008). Les substrats du ERAD-M semblent être reconnus directement par Hrd1 et ubiquitinés par cette dernière (Sato et al. 2009). Les substrats du ERAD-C sont reconnus par les chaperonnes cytosoliques des familles hsp70/hsp40, mais aussi par la E3 ligase Doa10. Ces trois voies nécessitent la fonction de l'ATPase Cdc48 et ses co-facteurs (Carvalho et al. 2006).

Les différences les plus frappantes concernent le type de E3 qui est utilisé pour chacune des voies. Le ERAD-M et le ERAD-L utilisent Hrd1 en association avec son co-facteur Hrd3 en plus de la protéine Der1. Le ERAD-C toutefois utilise Doa10 comme ubiquitine ligase (Carvalho et al. 2006; Nakatsukasa and Brodsky 2008).

Même si plusieurs distinctions ont pu être faites entre ces différentes voies de dégradation chez la levure, il semble que le système ERAD soit encore plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, plusieurs évidences suggèrent que ces différentes voies peuvent se recouper chez la levure (Huyer et al. 2004; Kota et al. 2007; Nakatsukasa et al. 2008). De plus, vu la multiplication des homologues humains des quelques facteurs du ERAD qui ont été retrouvés chez la levure (E2, E3, chaperonnes, etc), il est fort probable que le processus de dégradation ERAD chez l'homme soit plus spécifique pour chaque substrat et non généralisable pour un ensemble de substrats luméraux, cytosoliques ou membranaires (Vembar and Brodsky 2008).

Il reste encore beaucoup de travail à faire afin d'élucider les mécanismes sous-jacents à la dégradation ERAD dans les cellules humaines. Comme plusieurs protéines virales utilisent ce système pour induire la dégradation de protéines cellulaires, l'étude de leur mécanisme d'action pourrait permettre de mieux comprendre ce processus dans les cellules humaines et de découvrir de nouveaux facteurs cellulaires impliqués dans la dégradation ERAD ainsi que leur fonction.

#### 9.1.4 Exemples de l'utilisation du système ubiquitine-protéasome par des protéines virales

Les virus utilisent souvent des ubiquitine ligases cellulaires afin de modifier le trafic intracellulaire, de séquestrer à l'intérieur de la cellule ou de détruire des protéines qui pourraient nuire à leur réplication et dissémination. Certains exemples seront présentés ici. (Pour une revue extensive, voir les références (Shackelford and Pagano 2005; Barry and Fruh 2006; Gao and Luo 2006)).

Le premier exemple découvert est la protéine E6 du papillomavirus humain qui induit la dégradation du suppresseur de tumeur p53 par le système ubiquitine-protéasome en recrutant une E3 cellulaire (Scheffner et al. 1993). On peut citer aussi la dégradation de la protéine STAT1 par la protéine V des paramyxovirus dans le but d'échapper à la réponse interféron (Gotoh et al. 2002) et la protéine Vif du VIH-1 qui cible certaines protéines APOBEC pour induire leur dégradation (voir section 7.3).

En plus du recrutement de E3 ligases cellulaires par des protéines virales, certains virus codent eux-mêmes pour des E3 virales. C'est le cas du virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) qui code pour les E3 virales MIR1 et MIR2 (« modulators of immune recognition ») qui induisent la diminution de l'expression de surface du CMHI (Coscoy and Ganem 2000; Ishido et al. 2000; Stevenson et al. 2000; Coscoy et al. 2001). Enfin, le  $\gamma$ -herpesvirus de souris 68 induit la dégradation de la chaîne lourde (CL) du CMHI via son ubiquitine ligase mk3 par un processus ressemblant au ERAD (Boname and Stevenson 2001; Yu et al. 2002). Ces mécanismes sont importants pour diminuer la présentation des antigènes viraux par le CMHI afin d'échapper à la surveillance immunologique de l'hôte (Furman and Ploegh 2002).

Un des processus viraux les plus étudiés concernant l'utilisation d'ERAD par des protéines virales est la dégradation de la CL du CMHI par deux protéines du cytomégalovirus humain (HCMV).

##### 9.1.4.1 Cytomégalovirus humain (HCMV) et dégradation de la chaîne lourde du CMHI

Les protéines US2 et US11 du HCMV préviennent l'expression de surface du CMHI en induisant un processus ERAD conduisant à la dégradation par le protéasome de la CL du CMHI (Wiertz et al. 1996a; Wiertz et al. 1996b). Les deux protéines induisent la

dislocation de la CL par un processus impliquant p97 (Ye et al. 2001). La CL est alors déglycosylée par des N-glycanases et dégradée par le protéasome et on peut observer les CL déglycosylées s'accumulant dans le cytoplasme lorsque le protéasome est inhibé (Wiertz et al. 1996a; Wiertz et al. 1996b; Hirsch et al. 2003).

Dans les deux cas, l'ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitination des CL n'a pas encore été identifiée. La majorité des CL poly-ubiquitinées se retrouvent solubles dans le cytosol, mais une petite fraction est associée aux membranes (Shamu et al. 1999). Toutefois, lorsque le protéasome est inhibé, la majorité des CL retrouvées au cytosol ne sont pas ubiquitinées (Wiertz et al. 1996a; Shamu et al. 1999), probablement parce qu'elles ont été dé-ubiquitinées après la dislocation (Flierman et al. 2003). Enfin, la dégradation de la CL par US2 et US11 ne nécessite pas la présence de lysines dans sa queue cytosolique (Shamu et al. 1999; Furman et al. 2003).

#### 9.1.4.1.1 La protéine US2 du HCMV

La protéine US2 est une protéine transmembranaire de type I retrouvée au RE (Wiertz et al. 1996b). Elle forme un complexe avec le domaine luménal des molécules du CMHI (Gewurz et al. 2001a). Il semble que des chaperonnes du RE s'associent avec la CL en présence de US2, suggérant ainsi leur rôle dans la dégradation par US2 (Oresic and Tortorella 2008). Il a déjà été montré que la queue cytoplasmique de la CL n'était pas nécessaire pour la dislocation induite par US2 (Gewurz et al. 2001b; Barel et al. 2003b; Furman et al. 2003). Toutefois, le processus nécessite la présence de lysines dans la portion luménale de la CL (Hassink et al. 2006). Ces résultats suggèrent fortement que la dislocation de la CL par US2 dépende de la présence de lysines situées dans le domaine luménal de la CL et par conséquent, de la rétro-translocation de la CL dans le cytoplasme avant son ubiquitination et sa dégradation. L'identité du pore de dislocation impliqué dans le processus induit par US2 reste encore inconnue.

#### 9.1.4.1.2 La protéine US11 du HCMV

La protéine US11 est aussi une protéine transmembranaire de type I localisée au RE (Wiertz et al. 1996a). Elle interagit avec le domaine luménal du CMHI. Contrairement à

US2, la queue cytoplasmique de la CL du CMHI est requise pour la dégradation induite par US11 (Story et al. 1999; Barel et al. 2003a) même si sa séquence spécifique ne semble pas avoir d'importance (Barel et al. 2003a; Lilley and Ploegh 2005b). Des résultats récents suggèrent que la dislocation de la CL par US11 ne dépende pas de l'ubiquitination de la protéine. Toutefois, la dégradation subséquente de la CL par le protéasome est affectée lorsque toutes les lysines luménale et cytoplasmiques sont mutées (Hassink et al. 2006). De plus, la dislocation de la CL par US11 nécessite la protéine Derlin-1 qui pourrait agir en tant que pore (Lilley and Ploegh 2004; Ye et al. 2004).

#### 9.1.4.2 $\gamma$ -herpesvirus de souris et dégradation de la chaîne lourde du CMHI

Un autre virus herpes possède une stratégie d'évasion de la détection des cellules infectées par les cellules T CD8<sup>+</sup> et il s'agit du  $\gamma$ -herpesvirus 68 de souris ( $\gamma$ HV68). À la différence de la dégradation de la CL du CMHI par les protéines US2 et US11, le  $\gamma$ HV68 possède une E3 virale de type RING-CH ou PHD/LAP (voir section 10.1) appelée mk3 (Virgin et al. 1997) qui induit l'ubiquitination de la CL du CMHI et sa dégradation subséquente par le protéasome (Boname and Stevenson 2001; Yu et al. 2002).

##### 9.1.4.2.1 La protéine mk3

La protéine mk3 est très semblable à deux protéines (MIR1 (« modulator of immune recognition 1 ») et MIR2) codées par le virus KSHV qui sont aussi deux ubiquitine ligases à RING-CH (Russo et al. 1996; Virgin et al. 1997). Il semble que mk3 soit associée avec p97 et Derlin-1, suggérant ainsi que cette protéine exploite elle aussi les mécanismes du processus ERAD (Wang et al. 2006b). Toutefois, le mécanisme exact de la dégradation de la CL par mK3 reste encore à déterminer.

## 9.2 Ubiquitination sur des résidus non-lysines

Il a été montré récemment qu'une molécule de CL qui ne contient aucune lysine cytoplasmique peut être ubiquitinée sur des thréonines ou sérines contenues dans sa queue cytosolique en présence de la protéine virale mk3 (Wang et al. 2007a). Contrairement à

l'ubiquitination sur des lysines, qui se fait via un lien amide, la protéine mk3 semble pouvoir catalyser la liaison de l'Ub sur les sérines ou thréonines par un lien ester (Wang et al. 2007b). Ces résultats impliquent un mécanisme d'attachement de l'ubiquitine, par une E3 virale, sur des résidus non-lysine induisant la dégradation d'une protéine par un processus ERAD.

L'ubiquitination sur des résidus autres que lysine avait déjà été rapportée pour une autre E3 virale, la protéine MIR1 du KSHV dont il a été question plus haut. En effet, il semble que cette E3 virale soit capable d'attacher l'ubiquitine sur les cystéines présentes dans la queue cytosolique de la CL du CMHI et que cette ubiquitination soit suffisante pour induire l'internalisation par endocytose de la CL et sa dégradation dans les lysosomes (Cadwell and Coscoy 2005). L'attachement de l'ubiquitine sur des cystéines est possible par un lien thiol-ester entre l'Ub et la cystéine du substrat. Ce type de lien est semblable à celui utilisé par les E1 et E2 pour lier l'Ub (Cadwell and Coscoy 2005). Le processus induit par MIR1 implique toutefois la mono-ubiquitination de la CL du CMHI et ne permet pas sa dégradation par le protéasome au niveau du RE. Récemment, il a été démontré que la protéine MIR2 du KSHV a aussi la capacité d'ubiquitiner des résidus cystéines (Cadwell and Coscoy 2008).

L'attachement de l'Ub sur des résidus non-lysine n'est toutefois pas l'apanage des E3 virales. En effet, il existe des exemples où des protéines cellulaires sont ubiquitinées sur des résidus non-lysine de façon physiologique. Par exemple, l'induction de l'apoptose requiert la dégradation par le protéasome du fragment N-terminal de la protéine Bid (tBid-N) suite à sa poly-ubiquitination sur des résidus sérine, thréonine ou cystéine (Tait et al. 2007). Enfin, le recyclage du récepteur d'importation dans les peroxisomes Pex5p dépend de sa mono-ubiquitination sur une cystéine (Carvalho et al. 2007; Platta et al. 2007; Williams et al. 2008).

## 10. Ubiquitine ligases (E3)

Comme il a été brièvement mentionné à la section 9.1.2, la spécificité de l'ubiquitination dépend des ubiquitine ligases ou E3 qui reconnaissent le substrat de façon spécifique. Il a été estimé qu'environ 60-100 E3 sont retrouvées chez *S. cerevisiae* et que plus de 500 E3 sont codées par le génome humain (Kostova et al. 2007). Ces nombres

démontrent toute la complexité du processus d'ubiquitination des protéines et très peu d'entre elles sont bien caractérisées. Elles sont divisées en plusieurs familles qui sont présentées brièvement à la section suivante.

### 10.1 Familles d'ubiquitine ligases

La grande majorité des E3 connues fait partie de deux catégories principales, les E3 à domaine HECT (« homologous to E6-Associated Protein (E6AP) C-Terminus ») et les E3 à domaine RING (« really interesting new gene ») ou domaine ressemblant à RING (« RING finger-like »). Deux autres catégories ont été décrites plus récemment et il s'agit des E3 à boîte U (« U-box ») et des E3 PHD/LAP (« plant homeodomain / LRR and PDZ ») qui sont des motifs RING modifiés (Weissman 2001; Hatakeyama and Nakayama 2003; Kostova et al. 2007).

Les protéines à domaine HECT catalysent directement l'ubiquitination en formant elles-mêmes une liaison thiol-ester avec l'ubiquitine avant d'en assurer le transfert sur le substrat (Coux and Piechaczyk 2000; Ardley and Robinson 2005). Le domaine HECT, situé en C-terminal, représente le domaine catalytique de cette famille, tandis que la partie N-terminale est responsable de la reconnaissance des substrats (Coux and Piechaczyk 2000).

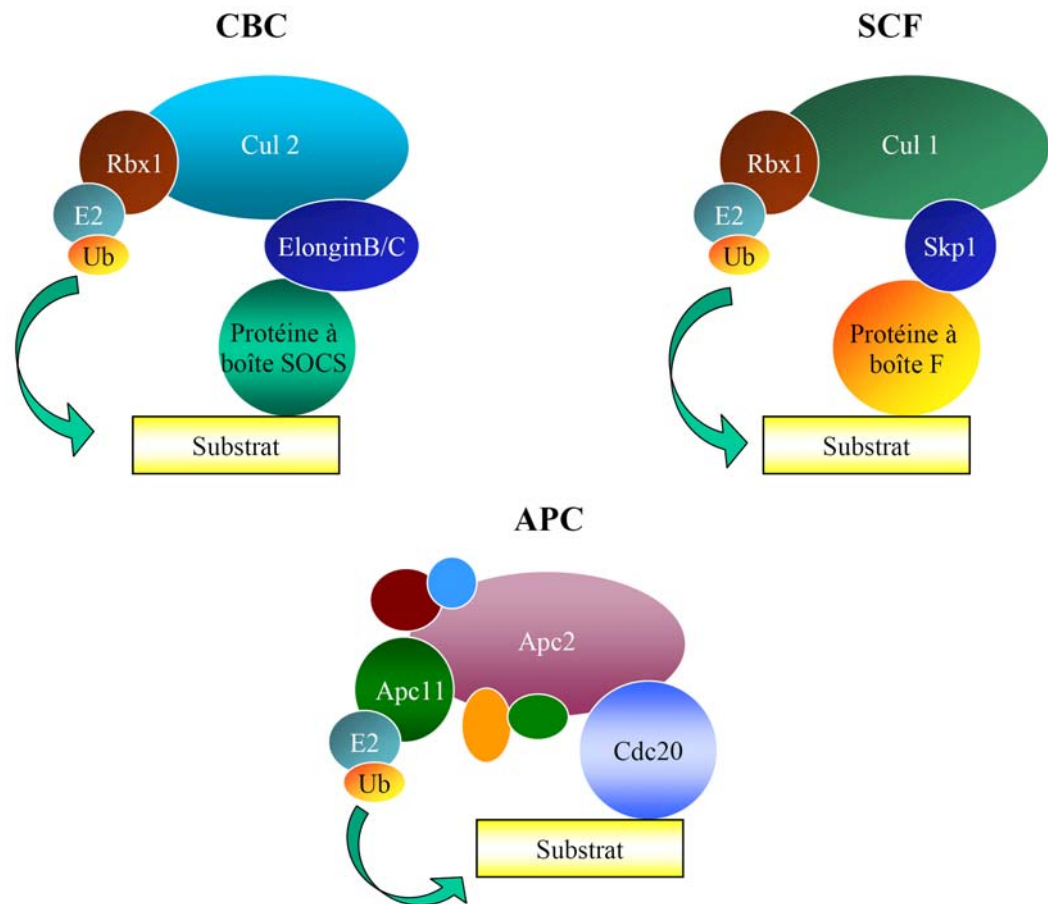
Les protéines à domaine RING facilitent le transfert de l'ubiquitine de la E2 au substrat en les amenant à proximité l'un de l'autre (Coux and Piechaczyk 2000; Ardley and Robinson 2005). Le domaine RING ou « ring finger » est un motif de longueur et de nature variable, défini par huit cystéines et histidines coordonnant deux atomes de zinc (Coux and Piechaczyk 2000). Toutefois, les E3 à boîte U ne nécessitent pas de zinc (Kostova et al. 2007). La plupart des E3 qui sont impliquées dans la dégradation ERAD font partie de la famille des E3 à domaine RING (Kostova et al. 2007). Plusieurs E3 à domaine RING font partie de gros complexes protéiques tels que les complexes APC (« anaphase promoting complex »), CBC (cullin 2-elongin B-elongin C) et SCF (« skp1-cullin-Fbox protein ») qui contiennent tous une protéine contenant un domaine RING qui permet l'ubiquitination des substrats liés au complexe (Coux and Piechaczyk 2000). La Figure 16 montre l'organisation de ces trois exemples de E3 modulaires.

L'une de ces E3 à domaine RING est la E3 SCF<sup>β-TrCP</sup> qui est impliquée dans la dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu du VIH-1.



L'organisation modulaire des complexes SCF leur permet d'ubiquitiner une grande quantité de substrats dépendamment des protéines F-box qui leur sont associés (Deshaies 1999). Les sous-unités adaptatrices à F-box ( $\beta$ -TrCP dans le cas de la dégradation de CD4 par Vpu) reconnaissent, d'un côté, les substrats grâce à des motifs d'interaction protéine-protéine comme les motifs WD40, LRR (« leucine-rich repeats ») ou un autre motif encore peu caractérisé et de l'autre côté, un complexe composé de trois sous-unités (Skp1, culline, Rbx1/Roc1) grâce à la boîte F qui lie Skp1 (Bai et al. 1996). Skp1 est une protéine adaptatrice, la culline (ou Cul1) est une protéine d'échafaudage sur laquelle plusieurs protéines peuvent s'assembler et Rbx1/Roc1 est la protéine à domaine RING qui permet de stimuler l'activité de la E2 (Coux and Piechaczyk 2000; Fujimuro et al. 2007). La structure du complexe SCF est présentée à la Figure 16.

**Figure 16 : Structure de trois types d'ubiquitine ligases modulaires.** L'ubiquitine ligase CBC forme un complexe avec la culline 2 (Cul2) et la protéine à domaine RING Rbx1 qui recrute et active la E2. La reconnaissance des substrats est faite par des protéines à boîte SOCS (« suppressor of cytokine signaling ») qui est un motif nécessaire pour l'interaction avec Elongin C. L'ubiquitine ligase SCF forme un complexe avec la culline 1 (Cul1) et Rbx1. La reconnaissance des substrats est effectuée via des protéines adaptatrices contenant une boîte F (« F-box ») qui interagit avec la protéine Skp1 du complexe SCF. Dans le cas de l'ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de CD4 induite par Vpu, la protéine à boîte F est  $\beta$ -TrCP et elle interagit avec Vpu via un motif WD-40. L'ubiquitine ligase APC contient au moins 11 sous-unités qui ne sont pas toutes représentées. Elle est activée par la sous-unité régulatrice Cdc20. Apc2 est un homologue des cullines et Apc11 est une protéine à domaine RING.



## 11. Problématique et objectifs du projet de recherche

Cette revue de la littérature a permis de constater que le mécanisme impliqué dans la dégradation du récepteur viral CD4 par la protéine Vpu du VIH-1 n'est pas très bien connu. En effet, il semble clair que le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans ce processus et que Vpu recrute la E3 SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> dans le but d'ubiquitiner CD4. Toutefois, les seules évidences directes de la poly-ubiquitination de CD4 par Vpu ont été obtenues en exprimant CD4 et la protéine  $\beta$ -TrCP humaine chez *S. cerevisiae* (Meusser and Sommer 2004). De plus, puisque CD4 doit être retenu au RE afin de permettre à Vpu d'induire sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome, il a été suggéré que le processus de dégradation de CD4 par Vpu implique un mécanisme semblable à ERAD. Toutefois, aucune autre évidence expérimentale n'est venue appuyer cette hypothèse.

Comme il a été mentionné dans cette introduction, la dégradation par ERAD implique généralement la dislocation des protéines du RE vers le cytoplasme afin de permettre leur ubiquitination. De plus, plusieurs facteurs cellulaires telles des chaperonnes et l'ATPase p97 sont impliquées dans la reconnaissance du substrat, sa dislocation et son acheminement vers le protéasome.

Il est connu que le processus de dégradation de CD4 induit par Vpu est indépendant de la calnexine (Schubert et al. 1998) et ne nécessite probablement pas l'interaction avec des chaperonnes de type lectine puisqu'un CD4 non-glycosylé est aussi bien dégradé par Vpu qu'un CD4 sauvage (Chen et al. 1993). De plus, deux études ont suggéré que l'ubiquitination sur des lysines présentes dans la queue cytoplasmique de CD4 représente une étape nécessaire dans le processus de dégradation par Vpu (Schubert et al. 1998; Meusser and Sommer 2004). Même si des substrats de ERAD transmembranaires doivent être disloqués afin d'être dégradés, il se pourrait que l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 implique une attaque directe du protéasome induisant sa dégradation. Alternativement, il se pourrait que l'ubiquitination déclenche un processus d'extraction du CD4 hors de la membrane du RE, le rendant ainsi disponible pour la dégradation via le protéasome. Il n'est donc toujours pas clair si la dislocation de CD4 est nécessaire à sa dégradation induite par Vpu.

Le premier objectif de ce projet était donc de déterminer si CD4 doit être poly-ubiquitiné en présence de Vpu pour être dégradé par le protéasome et déterminer comment CD4 vient en contact avec la machinerie de dégradation cytoplasmique. Nous avons donc

mis au point une technique nous permettant de mesurer les niveaux d'ubiquitination de CD4 dans des cellules humaines. Utilisant cette technique conjointement avec une technique de fractionnement cellulaire, nous avons pu examiner le mécanisme de la dégradation de CD4 induite par Vpu plus en profondeur. Nous avons tout d'abord déterminé si les lysines cytoplasmique de CD4 étaient nécessaires à la poly-ubiquitination de CD4 et à la dégradation induite par Vpu. Nous avons ensuite déterminé si la dégradation de CD4 induite par Vpu implique une étape de dislocation. Finalement, nous avons examiné le rôle de l'ATPase p97 dans la dégradation de CD4 par Vpu en testant l'effet d'un mutant transdominant négatif de cette protéine. La protéine p97 joue généralement un rôle central dans les processus cellulaires de dislocation. Le résultat de ces expériences a été publié en octobre 2007 et est présenté sous forme d'article au chapitre 2.

Selon nos résultats présentés au chapitre 2, l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 sur des lysines n'était pas essentielle à la dégradation induite par Vpu. Toutefois, la mutation de toutes les lysines cytoplasmiques de CD4 entraînait une diminution de la sensibilité de CD4 à Vpu. Or, sachant que l'ubiquitination sur des résidus non-lysine a été rapportée (Cadwell and Coscoy 2005; Wang et al. 2007b)(Cadwell et Coscoy 2008 ; Herr et al. 2009, le deuxième objectif de ce projet était de déterminer si l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 est nécessaire pour la dégradation induite par Vpu. Plus spécifiquement, nous voulions déterminer si Vpu peut induire la poly-ubiquitination de CD4 sur des résidus non-lysines de la queue cytoplasmique de CD4. À cette fin, nous avons effectué une étude mutagénique de la queue cytoplasmique de CD4 afin de déterminer si les résidus sérine, thréonine ou cystéine présents dans cette région de CD4 peuvent servir de sites d'ubiquitination potentiels en présence de Vpu. Ce travail, sous forme d'article en préparation, est présenté au chapitre 3.

Enfin, si le processus de dégradation de CD4 par Vpu implique certains mécanismes sous-jacents à ERAD, il est fort probable que des facteurs cellulaires normalement impliqués dans la voie ERAD soient requis pour la dégradation de CD4. Le troisième objectif de ce projet consistait donc à déterminer si Vpu interagit avec des facteurs cellulaires autres que  $\beta$ -TrCP dans le but d'induire la dégradation de CD4. Par une étude mutagénique de la protéine Vpu, nous avons tenté de déterminer l'importance de certaines régions de Vpu dans le processus de dégradation de CD4 dans le but d'obtenir des indices sur le recrutement potentiel de facteurs cellulaires par Vpu. Les résultats obtenus sont présentés au chapitre 4.

## CHAPITRE 2 : ARTICLE 3

Même si l'ubiquitine ligase recrutée par Vpu pour induire la dégradation du récepteur viral CD4 par le système ubiquitine protéasome est connue, plusieurs aspects de ce processus restent encore énigmatiques. Jusqu'à maintenant, il n'y avait pas d'évidence directe de la poly-ubiquitination de CD4 induite par Vpu dans des cellules humaines. De plus, le mécanisme permettant au CD4 transmembranaire d'être dégradé par le protéasome cytoplasmique (impliquant possiblement une étape de dislocation) n'était pas encore compris. Enfin, le rôle de l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 dans le processus de dégradation par Vpu n'était pas très clair, même si certaines évidences suggéraient que les lysines cytoplasmiques de CD4 étaient nécessaires à la dégradation induite par Vpu. Le but de cet article était donc de démontrer directement la poly-ubiquitination de CD4 induite par Vpu dans des cellules humaines, de vérifier la nécessité de l'ubiquitination sur les lysines de la queue cytoplasmique de CD4 pour sa dégradation en présence de Vpu et de déterminer à l'aide d'une technique de fractionnement cellulaire si la dégradation induite par Vpu implique une étape de dislocation de CD4.

Ce travail a été publié en octobre 2007 dans *Retrovirology*. 4(75)

# **Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum**

**Julie Binette<sup>1,2</sup>, Mathieu Dubé<sup>1,2</sup>, Johanne Mercier<sup>1</sup>, Dalia Halawani<sup>3</sup>, Martin Latterich<sup>4</sup> and Éric A. Cohen<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal,

<sup>3</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal

<sup>4</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal

Summary word count: 263

\*Corresponding author: Éric A. Cohen, Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7.

## ABSTRACT

**Background:** HIV-1 Vpu targets newly synthesized CD4 receptor for rapid degradation by a process reminiscent of endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation (ERAD). Vpu is thought to act as an adaptor protein, connecting CD4 to the ubiquitin (Ub)-proteasome degradative system through an interaction with  $\beta$ -TrCP, a component of the SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 Ub ligase complex.

**Results:** Here, we provide direct evidence indicating that Vpu promotes *trans*-ubiquitination of CD4 through recruitment of SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> in human cells. To examine whether Ub conjugation occurs on the cytosolic tail of CD4, we substituted all four Ub acceptor lysine residues for arginines. Replacement of cytosolic lysine residues reduced but did not prevent Vpu-mediated CD4 degradation and ubiquitination, suggesting that Vpu-mediated CD4 degradation is not entirely dependent on the ubiquitination of cytosolic lysines and as such might also involve ubiquitination of other sites. Cell fractionation studies revealed that Vpu enhanced the levels of ubiquitinated forms of CD4 detected in association with not only the ER membrane but also the cytosol. Interestingly, significant amounts of membrane-associated ubiquitinated CD4 appeared to be fully dislocated since they could be recovered following sodium carbonate salt treatment. Finally, expression of a transdominant negative mutant of the AAA ATPase Cdc48/p97 involved in the extraction of ERAD substrates from the ER membrane inhibited Vpu-mediated CD4 degradation.

**Conclusion:** Taken together, these results are consistent with a model whereby HIV-1 Vpu targets CD4 for degradation by an ERAD-like process involving most likely poly-ubiquitination of the CD4 cytosolic tail by SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> prior to dislocation of receptor molecules across the ER membrane by a process that depends on the AAA ATPase Cdc48/p97.

## BACKGROUND

CD4 is a 55-kDa class I integral membrane glycoprotein that serves as the primary co-receptor for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry into cells [1]. CD4 consists of a large luminal domain, a transmembrane portion, and a 38-residues cytoplasmic tail. It is expressed primarily on the surface of a subset of T lymphocytes that recognizes major histocompatibility complex (MHC) class II-associated peptides and plays a major role in the development and maintenance of the immune system.

Despite the critical role played by CD4 during HIV-1 entry, it is well established that HIV-1 down-regulates cell surface expression of its cognate receptor (reviewed in reference [2]). It is believed that this process prevents superinfection and promotes production of fully infectious virions [3, 4]. Down-regulation of CD4 in HIV-1-infected cells is mediated through different independent mechanisms involving the activity of three viral proteins: Nef, Env and Vpu. Early in infection, Nef removes CD4 molecules that are already present at the cell surface by enhancing their endocytosis and subsequent degradation in lysosomes [5]. At later stages of the infection, the envelope precursor gp160, through its high receptor binding affinity and inefficient vesicular transport [6], sequesters newly synthesized CD4 in the endoplasmic reticulum (ER) in the form of Env-CD4 complexes and prevents its transport and maturation to the cell surface [7]. The accessory protein Vpu induces a rapid degradation of newly synthesized CD4 molecules bound to gp160 in the ER [8].

Vpu is an 81-amino acids class I integral membrane protein of 16 kDa that is unique to HIV-1 and simian immunodeficiency virus isolated from chimpanzee (SIVcpz) and a few other monkey species ([9-11] and reviewed in reference [12]). The protein consists of an N-terminal hydrophobic membrane anchor domain of 27 amino acids and a charged C-terminal hydrophilic domain of 54 residues that extends into the cytoplasm [13]. This cytosolic domain contains a highly conserved dodecapeptide sequence encompassing residues 47-58 which comprises a pair of serine residues (S52 and S56) that are phosphorylated by casein kinase II [14, 15]. Besides its ability to mediate the rapid degradation of CD4 molecules complexed with Env gp160 in the ER, Vpu was also found to promote efficient release of progeny HIV-1 viruses in different human cell types, including T cells and macrophages, by a mechanism that appears to involve the inactivation



of a putative host cell factor that restricts viral particle release in a cell-type dependent manner [10, 16-19].

From a mechanistic point of view, HIV-1 Env is not absolutely required for Vpu-mediated CD4 degradation. The role of Env appears to be limited to its ability to retain CD4 in the ER, given that efficient CD4 degradation can be observed in the absence of Env as long as CD4 is retained in the ER through the presence of an ER retention sequence or treatment of cells with Brefeldin A (BFA), a fungal metabolite known to block protein sorting from the ER to the Golgi apparatus [20]. The degradation of CD4 mediated by Vpu involves multiple steps that are initiated by the direct physical binding of Vpu to the cytoplasmic tail of CD4 in the ER [21]. Although the binding of Vpu to CD4 is necessary to induce CD4 degradation, it is not sufficient. Indeed, studies aimed at identifying Vpu partners by two-hybrid screens led to the identification of a host cellular co-factor,  $\beta$ -TrCP, which plays a critical role in Vpu-mediated CD4 degradation by interacting with Vpu in a phosphorylation-dependent manner [22]. The human F-box protein  $\beta$ -TrCP functions as a substrate recognition receptor for the multi-subunit ubiquitin ligase (E3) SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> involved in the ubiquitin (Ub) conjugating pathway (reviewed in reference [23]). The interaction between Vpu and  $\beta$ -TrCP is essential for Vpu-mediated CD4 degradation since substitution mutations of Vpu phospho-acceptor sites, S52 and S56, prevent association with  $\beta$ -TrCP and abolish the effect of Vpu on CD4 turnover [22]. These findings have established a link between the machinery responsible for the ubiquitination of proteins destined for degradation by the proteasome and the enhanced CD4 turnover in presence of Vpu. Indeed, further lines of evidence for an involvement of the Ub-proteasome system in Vpu-mediated CD4 degradation were also reported: 1) Vpu-mediated CD4 degradation is not observed in a mammalian cell line expressing a temperature-sensitive Ub activating enzyme (E1), a key component of the machinery involved in the covalent attachment of Ub to target proteins [24]; 2) over-expression of a mutant Ub (Ub K48/R), which prevents the formation of poly-Ub chains, impairs Vpu-mediated CD4 degradation [24]; 3) Vpu-mediated CD4 degradation is inhibited by specific proteasome inhibitors [24].

Vpu-induced CD4 degradation is reminiscent of ER-associated protein degradation (ERAD), a quality control process in the ER that ensures that only proteins with a native folded conformation leave the organelle for other destinations across the secretory pathway [25]. Misfolded proteins that cannot reach their native state are transferred from the ER to

the cytosol by a multi-step process called retro-translocation or dislocation which is thought to involve pore complexes formed by proteins such as Derlin-1 [26, 27] or by multi-spanning transmembrane E3 ligases such as Hrd1 [28]. ERAD substrates exposed to the cytosol are acted upon by ER-associated components of the Ub conjugation machinery, extracted from the ER membrane by the AAA ATPase Cdc48/p97 and its associated cofactors Ufd1p and Np14p and degraded by the 26S proteasome (reviewed in reference [25]). This cellular pathway has been co-opted by some viruses to selectively destroy cellular proteins required for immune defense of the host. For example, two human cytomegalovirus (HCMV) proteins, US2 and US11, are able to target newly synthesized class I MHC (MHC-I) heavy chains (HC) for dislocation from the ER, leading to complete extraction of MHC-I HC from the ER membrane into the cytosol followed by proteasomal destruction [29, 30]. Most ERAD substrates are poly-ubiquitinated while undergoing dislocation although the details of recognition, timing and post-translational modification of dislocation substrates can vary depending on the substrates [31-33].

Although part of the molecular machinery that is recruited by Vpu to target CD4 for degradation is reasonably well defined, several aspects of Vpu-mediated CD4 degradation still remain unclear. In particular, direct evidence of CD4 ubiquitination in presence of Vpu in human cells has not been demonstrated. Furthermore, it is unclear whether ER-associated CD4 encounters the cytoplasmic proteasome by a process involving dislocation of CD4 molecules across the ER membrane as described for ERAD substrates. Finally, the role of CD4 ubiquitination in processes underlying Vpu-mediated CD4 degradation remains to be specified. Meusser and Sommer have reconstituted the process of Vpu-mediated CD4 degradation in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing human CD4 together with Vpu and human  $\beta$ -TrCP and have provided evidence suggesting that Vpu-mediated proteolysis strictly relies on ubiquitination of CD4 at cytosolic lysine residues prior to export of receptor molecules from the ER membrane [34].

In this study, we have analyzed the process of Vpu-mediated CD4 degradation in human cells. The data presented here provide evidence suggesting that Vpu promotes ubiquitination of CD4 cytosolic tail by SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> and mediates dislocation of the viral receptor across the ER membrane in human cells by a process that might depend on the AAA ATPase Cdc48/p97. Interestingly, in contrast to previous results, Vpu-mediated CD4 degradation and ubiquitination were not found to be entirely dependent on cytosolic lysine

residues, raising the possibility that ubiquitination at sites other than lysines might also be involved.

## RESULTS

### **Poly-ubiquitination of CD4 is required for Vpu-mediated CD4 degradation.**

In order to study processes involved in Vpu-mediated CD4 degradation, we established a transient expression system whereby CD4 and Vpu are expressed *in trans* in SV40-transformed human embryonic kidney fibroblasts (HEK 293T) cells. CD4- and Vpu-expressing cells were treated with BFA in order to retain CD4 in the ER before and during metabolic labeling. Pulse-chase radio-labeling analysis followed by immunoprecipitation with anti-CD4 antibodies was performed to ensure that CD4 was specifically degraded by Vpu in this system. Fig. 1 reveals that CD4 turnover was significantly accelerated in presence of Vpu. Furthermore, the effect of Vpu on CD4 was specific since expression of a phospho-acceptor sites mutant, Vpu S52,56/N, which is unable to interact with the E3 Ub ligase complex SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> [22] did not mediate CD4 degradation (Fig. 1A, compare lanes 5-8 with lanes 9-12 and Fig. 1B). Moreover, as previously reported [24, 35], addition of specific proteasome inhibitor, such as MG-132, to HEK 293T cells expressing CD4 and Vpu inhibited Vpu-mediated CD4 degradation (data not shown).

We also tested whether poly-ubiquitination of CD4 was required for Vpu-mediated CD4 degradation in HEK 293T cells. For this purpose, we co-expressed CD4 and Vpu with a N-terminal his(6)/c-myc tagged form of wild-type (wt) Ub or a N-terminal his(6)/c-myc tagged form of a transdominant negative (TDN) mutant of Ub, Ub K48/R, that is unable to form poly-Ub chains required for proteasomal degradation [36]. This Ub mutant acts as a chain terminator in the process of poly-ubiquitination since the Ub-acceptor lysine residue at position 48 is mutated for an arginine. In agreement with previous reported data [24], results of Fig. 1A (compare lanes 9-12 with lanes 17-20) and B reveal that expression of tagged-Ub K48/R markedly reduced the rate of Vpu-mediated CD4 degradation, thus suggesting that poly-ubiquitination of CD4 via K48 linkage of Ub moieties was required for Vpu-mediated CD4 degradation. Although expression of wt tagged-Ub had some attenuating effect on Vpu-mediated CD4 degradation (compare lanes 13-16 with lanes 9-12 and Fig. 1B), it was clearly less pronounced than with the TDN tagged-Ub K48/R mutant.

In that regard, wt tagged Ub has been previously reported to decrease the rate of degradation of some substrate by the Ub-proteasome system given that fusion of the his-myc tag at the N-terminal of Ub renders poly-Ub-protein conjugates less recognizable by the proteasome [37]. All of these results were also confirmed by analyzing steady-state levels of CD4 by western-blot in Vpu-expressing HEK 293T cells (Fig. 1C and D). Overall, these results provide evidence that this expression system in HEK 293T cells supports an efficient degradation of CD4 that is Vpu-specific, depends on the recruitment of  $\beta$ -TrCP, necessitates an active proteasome and requires poly-ubiquitination of CD4.

### **Vpu induces ubiquitination of CD4 molecules.**

Having established that over-expression of Ub K48/R inhibited Vpu-mediated CD4 degradation in HEK 293T cells, we investigated whether we could isolate and directly detect ubiquitinated forms of CD4 that are expected to accumulate under these conditions. Towards this goal, we first analyzed CD4 expression at steady state in Vpu/CD4 HEK 293T transfectants in presence or absence of tagged-Ub K48/R (Fig. 2A). In these experiments, transfected cells were treated with BFA during 2 h prior to lysis to retain newly synthesized CD4 in the ER. Fig. 2A reveals that CD4 levels at steady-state were significantly reduced in presence of Vpu (compare lanes 2 and 4). As expected, expression of tagged-Ub K48/R suppressed the effect of Vpu on CD4 and re-established the amounts of CD4 to levels comparable to those detected in absence of Vpu (compare lanes 5 and 2). To detect CD4-Ub conjugates, cell lysates were first immunoprecipitated with anti-CD4 polyclonal antibodies and the resulting CD4-containing immunocomplexes were subsequently analyzed for the presence of CD4-Ub conjugates by western-blot using anti-myc antibodies. Ubiquitinated forms of CD4 were detected as a typical smear in presence of Vpu (lane 5). Although background high molecular weight ubiquitinated forms of CD4 could still be detected in absence of Vpu (lane 3) or in presence of the non-functional Vpu S52,56/N mutant (lane 7), their levels were not as elevated as in presence of wt Vpu (lane 5). Indeed, quantitative analysis revealed that levels of CD4-Ub conjugates were approximately 6-fold higher in presence than in absence of a functional Vpu (Fig. 2B). The detection of a smear of high molecular weight proteins in presence of Vpu is suggestive of poly-ubiquitination of CD4. Poly-ubiquitination is still possible even if Ub K48/R is over-expressed because cells are expressing endogenous wt Ub that can initiate poly-Ub chains before a molecule of Ub K48/R can prematurely terminate the chain.

Finally, we examined whether we could extend this enhancing effect of Vpu on CD4 ubiquitination to a more physiological system where CD4 is retained in the ER through the formation of complexes with Env glycoproteins instead of BFA treatment. In this system, initially described by Willey and co-workers [20], Vpu and Env glycoproteins are co-expressed from a proviral construct while CD4, that is under HIV-1 long terminal repeat control (pHIV CD4) [24], is expressed only in cells expressing Vpu and Env. Results of Fig. 2C and D show that even in a system where CD4 is naturally retained in the ER through binding to HIV-1 Env, Vpu expression increases substantially (approximately 8-fold) the level of CD4 molecules undergoing ubiquitination (compare the levels of CD4-Ub conjugates in lanes 4 and 2 (upper panel) relative to their respective CD4 steady state levels (lower panel) and Fig. 2D).

Overall these results indicate that Vpu promotes poly-ubiquitination of CD4 molecules that are targeted for degradation by the proteasome through the recruitment of the SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 Ub ligase.

### **Vpu-mediated CD4 degradation and ubiquitination are not strictly dependent on CD4 cytosolic lysines**

CD4 contains four potential Ub acceptor lysine residues in its cytoplasmic domain. To determine whether ubiquitination of the cytosolic tail was required for Vpu-mediated CD4 degradation, we analyzed a CD4 mutant, CD4 KRcyto, in which all four cytoplasmic lysine residues were replaced by arginines. The stability of CD4 wt and CD4 KRcyto was first assessed in cells expressing a provirus encoding either wt Vpu (HxBH10-vpu<sup>+</sup>) or Vpu S52,56/D (HxBH10-vpu S52,56/D) as described above in Fig. 2C. Results of Fig. 3A clearly show that both CD4 wt and CD4 KRcyto were unstable in Vpu expressing cells as observed by the decreased recovery of CD4 molecules over the chase period (lanes 9-12 and lanes 13-16). Quantification of CD4 turnover over several experiments indicated an attenuation of the degradation kinetic of CD4 KRcyto as compared to CD4 wt but the protein was clearly susceptible to Vpu-induced degradation (Fig. 3B). In contrast, both CD4 wt and CD4 KRcyto remained stable over the entire 7 h chase period in cells expressing the phosphorylation mutant Vpu S52,56/D (Fig. 3A, lanes 1-4 and lanes 5-8 and Fig. 3B).

Given that previous studies had shown that Vpu-mediated CD4 degradation strictly relied on cytosolic lysine residues in mammalian cells and yeast [24, 34], we analyzed the

steady-state levels of CD4 wt or CD4 KRcyto in HEK 293T expressing Vpu<sup>+</sup> or Vpu<sup>-</sup> provirus by western-blot. Similar to what we found in pulse-chase experiments, we repeatedly observed a difference in sensitivity to Vpu-mediated degradation between CD4 wt and CD4 KRcyto (Fig. 3C, compare lanes 14 and 16 with lanes 10 and 12 and Fig. 3D, right panel) but clearly, the absence of cytosolic Ub acceptor lysine residues was not entirely preventing the effect of Vpu on CD4 degradation. Similar results were also obtained when steady-state levels of CD4 wt and CD4 KRcyto were analyzed in BFA-treated HEK 293T cells expressing Vpu<sup>+</sup> or Vpu<sup>-</sup> provirus lacking Env (Fig. 3C, compare lanes 2 and 4 with lanes 6 and 8, and Fig. 3D, left panel).

Given that Vpu was reported to interact with the cytoplasmic tail of CD4 in a region (EKKT, residues 416-419 of CD4) that encompasses some of the lysine residues mutated in the CD4 KRcyto mutant (K417, K418), we further tested whether this difference in susceptibility to Vpu-mediated CD4 degradation could be explained by a diminished ability of CD4 KRcyto to associate with Vpu. Binding experiments were performed as described in materials and methods using the Vpu S52,56/N mutant, which binds CD4 as efficiently as Vpu wt but is unable to mediate CD4 degradation [21]. Results from these experiments reveal that CD4 KRcyto associates with Vpu at least as efficiently as CD4 wt, thus ruling-out that the decreased sensitivity of CD4 KRcyto to Vpu-mediated degradation results from reduced Vpu binding efficiency (Supplemental Fig. 1). These results were also confirmed by immunoprecipitation of CD4 followed by western-blot with anti-Vpu antibodies (data not shown).

Given that CD4 KRcyto was still susceptible to Vpu-mediated degradation, we next evaluated whether CD4 KRcyto could undergo ubiquitination in presence of Vpu. To optimize the recovery of CD4-Ub conjugates, Vpu/CD4 or Vpu/CD4 KRcyto HEK 293T transfectants were made to co-express the TDN Ub K48/R mutant. Analysis of CD4-Ub and CD4 KRcyto-Ub conjugates levels in presence or absence of Vpu was performed as described above for Fig. 2B. Fig. 4A reveals that even though CD4 KRcyto is less susceptible to Vpu-mediated degradation as compared to CD4 wt (compare lanes 1 and 3 with lanes 5 and 7, middle panel), it still undergoes enhanced ubiquitination in presence of Vpu (compare lane 6 and lane 8). However, it is important to note that the relative level of recovered CD4 KRcyto-Ub conjugates was decreased as compared to CD4-Ub conjugates. In fact, quantitative analysis of ubiquitinated CD4 conjugate levels reveals that Vpu enhanced ubiquitination of CD4 KR by approximately 3-fold while it increased

ubiquitination of wt CD4 by 8-fold. Altogether, these results suggest that lysine residues in the cytosolic domain of CD4 are not absolutely essential for ubiquitination and degradation of the viral receptor in presence of Vpu. Even-though optimal Vpu-mediated CD4 ubiquitination most probably involves cytosolic lysine residues there must be other sites that are also targeted during Vpu-induced ubiquitination.

**Vpu-mediated CD4 degradation involves the dislocation of ubiquitinated CD4 conjugates across the ER membrane.**

To examine whether CD4 undergoes a process of dislocation across the ER membrane during Vpu-mediated degradation, we conducted subcellular fractionation studies. To optimize recovery and detection of dislocated forms of CD4 targeted for degradation by the cytosolic proteasome, we performed these cell fractionation experiments in conditions where CD4 degradation was inhibited by over-expression of the TDN Ub K48/R mutant. BFA-treated HEK 293T cells expressing CD4/Ub K48/R and Vpu or CD4/Ub K48/R alone were fractionated by mechanical lysis into membrane and cytosolic fractions and each resulting fraction was directly analyzed for the presence of CD4, Vpu and membrane or cytosolic markers, such as calnexin and actin respectively, by western-blot as described in materials and methods. Furthermore, the presence of poly-ubiquitinated forms of CD4 in membrane or cytosolic fractions was determined by immunoprecipitation/western-blot analysis. In contrast to Fig. 2 and 4 and because of technical reasons, ubiquitinated CD4 molecules were detected in these experiments by performing immunoprecipitation using anti-Myc antibodies followed by western-blot using anti-CD4 antibodies. As expected, Vpu and calnexin were detected exclusively in association with membrane fractions (Fig. 5A, lane 5 for Vpu and lanes 1, 3, 5 and 7 for calnexin) whereas actin (lanes 2, 4, 6, 8) or Ub (lanes 4, 6, 8) were recovered in a very large proportion in the cytosolic fractions, thus demonstrating that the fractionation procedure was almost free of membrane or cytosolic contaminations. CD4 molecules were found in the membrane fraction in presence or absence of Vpu (lanes 3 and 5). We could repeatedly recover and detect CD4-Ub conjugates, represented as a smear signal, predominantly in the membrane fraction but also in the cytosolic fraction in absence and in presence of Vpu (Fig. 5A); in some instances, depending on the experiments, we also detected discrete high molecular bands in addition to the smear signal (lane 5 of Supplemental Fig. 2A and lane 6 of Supplemental Fig. 2B). Interestingly, the absolute signal associated with membrane and

cytosolic fractions was always more intense in presence than in absence of Vpu (Fig. 5A, compare lanes 3, 5 and 7 as well as lanes 4, 6 and 8, upper panel). The specific levels of CD4-Ub conjugates associated with membrane and cytosolic fractions in absence and in presence of Vpu were calculated relative to the amount of CD4 detected directly by western-blot. As shown in Fig. 5B, quantitative analysis revealed that in presence of Vpu there was approximately a six-fold increase in membrane-associated CD4-Ub conjugate levels relative to the negative control without Vpu (Vpu<sup>-</sup>); in the cytosolic fractions, the levels of CD4-Ub conjugates detected in presence of Vpu were approximately two-fold higher relative to the Vpu<sup>-</sup> control (Fig. 5B).

To determine whether membrane-associated CD4-Ub conjugates represent CD4 molecules that are still embedded in the membrane while undergoing dislocation or if some of these conjugates are fully dislocated but stay tethered to the cytosolic face of the membrane, we treated membrane fractions with 100 mM sodium carbonate at basic pH (pH 11) (Fig. 5C) and analyzed the treated membrane and resulting supernatant for the presence of CD4-Ub conjugates as described in Fig. 5A. Salt-wash at basic pH (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) but not at neutral pH (NaCl) was previously shown to remove peripheral proteins that are associated with membranes [38]. In this experiment, Vpu (Fig. 5C, lane 5) and calnexin (lanes 1, 3, 5 and 7) were exclusively recovered in the membrane fractions after Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> treatment, thus confirming that the integrity of microsomes was maintained during the procedure. Surprisingly, we repeatedly detected small amounts of CD4 in the salt-wash supernatant (lanes 4 and 6, WB anti-CD4 panel) that perhaps represent population of CD4 molecules that are dislocated prior to ubiquitination. Quantitative analysis of the relative CD4-Ub conjugates signal associated with membrane and supernatant fractions revealed that approximately 50% of the membrane-associated signal could be salt washed at basic pH (Fig. 5C, compare lane 3 to lane 4 and lane 5 to lane 6), thus indicating that part of the membrane-associated CD4-Ub signal represents dislocated ubiquitinated forms of CD4 that are associated with the cytosolic face of the membrane. Importantly, in presence of Vpu we detected a 2-3-fold increase in the relative levels of CD4-Ub conjugates associated with the treated membrane fraction and salt-washed supernatant (Fig. 5D). As expected, control experiments where membranes were washed with sodium chloride at neutral pH (pH 7) did not lead to any recovery of CD4-Ub in the supernatant (Additional file 2A). Conversely, treatment of membranes with RIPA-DOC lysis buffer solubilized CD4-Ub conjugates,



which were detected almost completely in the supernatant (Additional file 2B). As expected, in both conditions the absolute levels of detected CD4-Ub conjugates was more elevated in presence than in absence of Vpu. Overall, these results suggest that Vpu targets CD4 for cytosolic proteasomal degradation by enhancing dislocation of receptor molecules across the ER membrane.

### **Expression of a transdominant negative mutant of p97 inhibits Vpu-mediated CD4 degradation.**

To further confirm that Vpu-mediated CD4 degradation involves a dislocation step, we examined the implication of the Cdc48/p97 ATPase in this process. Mammalian p97 plays an important role in dislocation of ERAD substrates presumably by binding poly-ubiquitinated substrates in conjunction with its cofactors, including Ufd1 and Npl4 [39], and mediating a process of extraction that is energy-dependent [40]. The p97 protein has two ATPase domains and mutants affected in their ability to bind or hydrolyze ATP are no longer able to perform their function in retro-translocation [41]. We took advantage of a well-described p97 TDN ATP binding mutant (p97 AA) [41] and tested its effect on Vpu-mediated CD4 degradation. HEK 293T cells were co-transfected with expression plasmids encoding CD4, Vpu and FLAG-tagged p97 wt or FLAG-tagged p97 TDN mutant and the levels of CD4 were analyzed at steady-state by western-blot. As shown in Fig. 6, expression of the p97 TDN mutant strongly inhibited Vpu-mediated CD4 degradation while wt p97 had no significant inhibitory effect on Vpu ability to degrade CD4 (compare lanes 3 and 5 with lanes 2 and 4). These results were also confirmed by pulse-chase labeling experiments where CD4 turnover was evaluated in presence of Vpu and the p97 TDN mutant or wt p97 (data not shown). Since p97 is directly involved in the dislocation of several ERAD substrates, these results provide additional evidence suggesting that Vpu targets the CD4 receptor for cytosolic proteasomal degradation by a process that involves a dislocation step across the ER membrane.

## **DISCUSSION**

In the present study, we have conducted a detailed analysis of processes involved in the ER-associated degradation of CD4 receptor molecules induced by the HIV-1 Vpu accessory protein in human cells. Using a TDN mutant of Ub, Ub K48/R, which acts as a

poly-Ub chain terminator, we have confirmed previous findings [24] suggesting that poly-ubiquitination of CD4 is required for Vpu-mediated CD4 degradation (Fig. 1). Based on these observations, we attempted to directly detect ubiquitinated forms of CD4, which are expected to accumulate under conditions where Ub K48/R is over-expressed. A similar approach was successfully used to facilitate the isolation and detection of substrates of the Ub pathway such as APOBEC3G in presence of HIV-1 Vif [42]. Under these conditions, we could demonstrate an increased accumulation of high molecular weight CD4-Ub conjugates, typical of poly-ubiquitinated protein targets, in presence of Vpu (Fig. 2). Direct detection of ubiquitinated forms of CD4 in presence of Vpu was achieved both in conditions where CD4 retention in the ER was produced through short treatment of cells with BFA or through formation of Env/CD4 complexes, thus demonstrating that both systems could be used to analyze Vpu-mediated CD4 degradation. Some high molecular weight ubiquitinated CD4 conjugates could be detected in absence or presence of a non functional Vpu mutant unable to recruit the SCF<sup>β-TrCP</sup> E3 ligase complex, except that their levels were significantly lower than those found in presence of Vpu. It is likely that ubiquitinated CD4 conjugates detected at steady-state in absence of Vpu or in presence of inactive Vpu represent intermediates resulting from the relatively low but normal degradation of misfolded CD4 molecules that occurs through the ERAD pathway in condition of transient ectopic over-expression. Together, these findings provide direct evidence that Vpu promotes *trans*-ubiquitination of CD4 through recruitment of the SCF<sup>β-TrCP</sup> complex in human cells.

CD4, as a type 1 integral membrane protein, consists of a 38-amino acid cytosolic domain that contains four lysine residues (amino acid positions: K411, KK417-418, and K428) that could serve as acceptor sites for ubiquitination. Ubiquitin conjugation of lysine residues accessible from the cytosol through recruitment of the specific SCF<sup>β-TrCP</sup> E3 ligase complex by Vpu may represent a very early step in the process of CD4 degradation and precede the transport of the viral receptor through the ER membrane for proteolytic degradation by the cytosolic proteasome. To investigate the role of cytosolic lysine residues in Vpu-mediated CD4 degradation, we used a CD4 mutant in which all four lysines were replaced by arginine residues. In contrast to earlier observations made in HeLa cells [24], replacement of lysine residues in the CD4 cytoplasmic tail did not strictly prevent CD4 degradation by Vpu in HEK 293T cells. In our conditions, even though we detected a

significant difference in the protein turnover (Fig. 3A-B) as well as in the steady-state levels (Fig. 3C-D) of CD4 KRcyto and CD4 wt in presence of Vpu, our data also revealed that CD4 KRcyto was still susceptible to Vpu-mediated CD4 degradation. These results suggest that ubiquitination of the cytosolic tail at lysine acceptor sites by the SCF<sup>β-TrCP</sup> E3 ligase is not strictly required for Vpu-mediated CD4 degradation and, therefore, does not appear to constitute an essential early signal that triggers CD4 targeting to the cytosolic proteasome. Given that poly-ubiquitination of CD4 appears to be required for Vpu-mediated CD4 degradation (Fig. 1), our findings raise the possibility that ubiquitination may occur at sites other than cytosolic lysines. Consistent with this possibility, CD4 molecules lacking cytosolic lysine Ub acceptor sites (CD4 KRcyto) are still capable of undergoing ubiquitination in presence of Vpu, albeit to levels that are lower than wt CD4 (Fig. 4). One possible explanation for Vpu-mediated ubiquitination of cytosolic lysine-less CD4 is that a partial dislocation of the receptor N-termini to the cytosolic side may be required, so that lysine residues in the luminal domain of CD4 may be accessible for ubiquitination by the cytosolic ubiquitination machinery recruited by Vpu. In that regard, in the specific case of HCMV US2-induced ERAD of MHC-I HC, the replacement of cytosolic tail lysine residues did not affect MHC-I HC dislocation and degradation while internal lysine residues were found to be required for these processes. These results have raised the possibility that US2 could induce a partial dislocation of part of the heavy chain into the cytosol, resulting in cytosolic deposition of luminal lysine residues [43]. Although, this possibility cannot be completely excluded at this point for Vpu-mediated CD4 degradation, we believe that this scenario is unlikely since replacement of cytosolic lysine residues led to an attenuation of CD4 degradation and to a substantial decrease of CD4 ubiquitination by the SCF<sup>β-TrCP</sup> E3 ligase (Fig.4); these observations suggests that Vpu-mediated CD4 degradation involves most probably ubiquitination of the receptor cytosolic tail.

An alternative explanation for the ubiquitination and degradation of cytosolic tail lysine-less CD4 molecules by Vpu is that ubiquitination may occur via non-lysine residues. Interestingly, recent evidence indicate that the mouse gamma herpesvirus ( $\gamma$ -HSV) mK3 E3 Ub ligase, which targets nascent MHC-I HC for degradation by ERAD, mediates ubiquitination via serine, threonine or lysine on the HC tail, each of which was found to be sufficient to induce rapid degradation of HC [44]. The  $\gamma$ -HSV mK3 E3 Ub ligase was found

to have the ability to mediate the formation of ester bonds that covalently linked Ub to serine or threonine in the tail of the HC substrate. Unlike MIR 1 (also called kK3), an E3 ligase of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus that requires cysteine residues to ubiquitinate MHC-I [45], a cysteine residue in the HC tail was not required for HC to be a substrate for mK3-induced ubiquitination and degradation. Interestingly, the CD4 cytoplasmic tail contains three serine, three threonine and four cysteine residues in addition to four lysines that could potentially serve as ubiquitin acceptor sites. Vpu-mediated ubiquitination of CD4 cytosolic tail at serine, threonine, cysteine or lysine ubiquitin acceptor sites would obviate the need for a partial dislocation of CD4 before ubiquitination and would suggest a vectorial exit of CD4 from the ER in presence of Vpu. On the basis of these novel findings, a systematic analysis of the role of cytosolic serine, threonine, cysteine and lysine residues in Vpu-mediated CD4 ubiquitination and degradation is warranted.

Our cell fractionation studies reveal that Vpu promoted dislocation of CD4 across the ER membrane since levels of poly-ubiquitinated CD4 molecules found associated with membrane and cytosolic fractions were found to be significantly increased in presence of Vpu (Fig. 5A-B). Furthermore, larger amounts of membrane-associated CD4-Ub conjugates, which likely represent exported ubiquitinated CD4 intermediates still attached to the cytosolic surface of the membrane, were recovered following salt wash treatment in presence of Vpu (Fig. 5D). These cytosolic- and membrane-associated poly-ubiquitinated CD4 molecules represent very likely substrates for the cytosolic 26S proteasome. Importantly, the process underlying Vpu-mediated CD4 degradation appears to depend on the AAA ATPase Cdc48/p97 since over-expression of a TDN mutant of p97 inhibits efficiently the degradation of the receptor (Fig. 6). Although we cannot rule-out that the effect of the p97 TDN mutant might be indirect, we believe that this result combined with the subcellular fractionation studies provide evidence consistent with a model whereby Vpu targets CD4 for cytosolic proteasomal degradation by a process involving dislocation of the receptor across the ER membrane.

Our findings contrast in part with observations made by Meusser and Sommer in *S. cerevisiae* where they have reconstituted the process of Vpu-mediated CD4 degradation by expressing human CD4 together with Vpu and human  $\beta$ -TrCP [34]. They found that Vpu-mediated proteolysis of CD4 involved dislocation of ubiquitinated intermediates in the cytosol as we found in the present study. However, in their reconstituted biological system

this process relied strictly on prior ubiquitination of CD4 at cytosolic lysine residues. Their findings based on data obtained in yeast display one basic difference compared to our results, which indeed suggest that the process of CD4 degradation mediated by Vpu involves a dislocation of CD4 across the ER membrane that is not entirely dependent on prior ubiquitination of CD4 at cytosolic lysine Ub acceptor sites. Even though cytosolic lysine-less CD4 molecules displayed a substantial reduction of Vpu-mediated ubiquitination, they were still substrate susceptible to Vpu-mediated degradation. This apparent discrepancy may reflect differences between human cells and yeast where indeed the CD4 receptor is not normally expressed. Indeed, human CD4, which is a stable protein when expressed in mammalian cells, was found to be rapidly degraded in yeast in the absence of Vpu. On the other hand, we cannot rule-out that Vpu-mediated degradation and ubiquitination of cytosolic lysine-less CD4 may indeed represent a forced pathway used by substrate having no available lysine residues in the cytoplasmic tail. Nevertheless, both studies provide evidence suggesting that Vpu-mediated ubiquitination of the CD4 cytosolic tail represents an early signal triggering dislocation of receptor molecules across the ER membrane for proteolysis by the cytosolic proteasome.

The recruitment of an E3 ubiquitin ligase complex by Vpu that is distinct from those used in classical ERAD raises the possibility that Vpu might target CD4 to a distinct ERAD pathway. Interestingly, three major pathways of ERAD are now emerging, including ERAD-C, ERAD-L and more recently ERAD-M [46-48]. These pathways, which were mostly characterized in *S. cerevisiae*, are involved in the degradation of substrates that display misfolded cytosolic, luminal or transmembrane domains, respectively. Even though these pathways have been found to involve ER-associated dislocation and ubiquitination machineries of different protein composition, they all appear to rely on the presence of the Cdc48/p97 ATPase complex [49]. It is believed that the ERAD-M and ERAD-C pathways involve dislocation of substrate membrane-anchored portion to the cytosol before the luminal domain whereas in the ERAD-L pathway the luminal domain of the misfolded substrate is dislocated first through a channel before the membrane-anchored portion is released in the cytosol. The situation is thought to be similar in mammalian cells but less is known about the different protein complexes involved in the different ERAD pathways. Interestingly, the well-characterized degradation of MHC-I HC by the HCMV proteins US11 and US2 involve different protein complexes and distinct requirements for cytoplasmic lysine residues for dislocation, ubiquitination and degradation. Indeed, MHC-I

HC degradation by HCMV US11 involves the recruitment of Derlin-1 [26, 27] whereas US2 does not need this interaction to mediate degradation of MHC-I HC [26]. The specific ERAD pathway recruited by Vpu to target the CD4 receptor for degradation by the proteasome remains to be identified. More studies in this area will not only shed light on the molecular mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation but will also enhance our understanding of ER-associated protein quality control pathway in mammalian cells.

## CONCLUSIONS

Our data provide evidence supporting a model whereby HIV-1 Vpu targets CD4 to the ubiquitin-proteasome degradative machinery by a process involving most likely poly-ubiquitination of the CD4 cytosolic tail by the SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 ligase prior to dislocation of CD4 through the ER membrane. Given that lysine residues in the cytosolic domain of CD4 are not absolutely essential for ubiquitination and degradation of the viral receptor in presence of Vpu, there might be sites, other than lysines, that are also targeted during Vpu-induced CD4 ubiquitination.

## MATERIALS AND METHODS

### DNA constructions

SVCMV CD4 was constructed by inserting a XbaI-XbaI cDNA fragment encoding CD4 into the corresponding sites of the expression vector SVCMV expa as described previously [51]. Plasmid pHIV CD4 KRcyto has already been described [24] and is a kind gift from Dr. Klaus Strebel (NIAID, NIH, Bethesda). The four cytoplasmic lysine residues of CD4 were replaced by arginines in pHIV CD4 KRcyto. pHIV CD4 was constructed by inserting a NheI-BamHI fragment from the CD4 cDNA derived from the pT4B expression plasmid [52] into the corresponding sites of pHIV CD4 KRcyto plasmid, thus creating the wild-type (wt) counterpart of pHIV CD4 KRcyto. The plasmid SVCMV CD4 KRcyto was constructed by subcloning a PCR-generated fragment from pHIV CD4 KRcyto into SVCMV CD4.

The Vpu expression plasmid, SVCMV Vpu has been described previously [53]. SVCMV Vpu S52,56/N expressing the corresponding Vpu substitution mutant was generated by PCR-based site-directed mutagenesis as described previously [54].

HxBH10-vpu<sup>+</sup> (LTR-gag<sup>+</sup>, pol<sup>+</sup>, vif<sup>+</sup>, vpr<sup>-</sup>, tat<sup>+</sup>, rev<sup>+</sup>, vpu<sup>+</sup>, env<sup>+</sup>, nef<sup>-</sup>-LTR) and HxBH10-vpu<sup>-</sup> (LTR-gag<sup>+</sup>, pol<sup>+</sup>, vif<sup>+</sup>, vpr<sup>-</sup>, tat<sup>+</sup>, rev<sup>+</sup>, vpu<sup>-</sup>, env<sup>+</sup>, nef<sup>-</sup>-LTR) are two isogenic infectious molecular clones of HIV-1 that differ only in their ability to express Vpu [16]. The phosphorylation mutant of Vpu, HxBH10-vpu S52,56/D, was created from HxBH10-vpu<sup>+</sup> using PCR-based mutagenesis. HxBc2-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>-</sup>, env<sup>-</sup> was obtained by replacing the Sall-BamHI fragment of HxBc2-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>-</sup> [55] with the corresponding fragment from HxBc2-vpu<sup>-</sup>, env<sup>-</sup>fs [55]. HxBH10-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>+</sup>, env<sup>-</sup> was obtained by replacing the Sall-BamHI fragment of HxBH10-pr<sup>-</sup>,vpu<sup>+</sup> with the corresponding fragment from HxBH10-vpu<sup>+</sup>, env<sup>-</sup>fs [56].

The expression plasmids pCW7 and pCW8 encoding wt Ub and the Ub K48/R transdominant negative (TDN) mutant respectively, have been described previously [57] and were kindly provided by Dr. Ron Kopito (Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford). They both encode N-terminal his(6)/c-myc tagged forms of yeast Ub, which is almost identical to the mammalian counterpart. The plasmids encoding the FLAG-tagged versions of p97 wt and the TDN mutant p97AA were kindly provided by Dr. Martin Latterich (Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal). The TDN p97AA mutant was described previously [40]. The nucleotide sequence of all plasmids was confirmed by automatic DNA sequencing.

### **Cell lines and transfections**

SV40-transformed human embryonic kidney fibroblasts (HEK 293T) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Wisent Inc., Saint-Bruno, QC) supplemented with 5% of fetal bovine serum (FBS) (Wisent Inc.) (DMEM+5%). For transfections, 100-mm petri dishes were seeded with 1 or 2 million cells and cultured overnight in DMEM+5%. Cells were then co-transfected with a mixture of the indicated DNA plasmids by the calcium-phosphate method.

### **Antibodies and chemical compounds**

The anti-CD4 (OKT4) and anti-myc (9E10) monoclonal antibodies were derived from ascitic fluids of Balb/c mice that were injected with the OKT4 or 9E10 hybridoma respectively. The OKT4 and 9E10 hybridomas were obtained from the ATCC. Rabbit polyclonal anti-CD4 (CD4 H-370) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Rabbit anti-Vpu serum was raised by immunization of rabbits with a synthetic peptide corresponding to amino acids 73-81 of the HIV-1 BH10 Vpu protein [9]. Rabbit polyclonal anti-actin, anti-calnexin and anti-FLAG (M2) antibodies as well as BFA were obtained from Sigma Chemical Co (Saint-Louis, MO). BFA was stored as a stock solution of 10 mM in ethanol at -20°C. MG-132 was purchased from Peptide International (Louisville, KY) and was stored as a 10 mM stock solution in DMSO at -20°C.

### **Metabolic labeling and radio-immunoprecipitation**

Pulse-chase analysis of CD4 degradation experiments were all performed 48 hours post-transfection. Transfected cells were starved in methionine-free DMEM+5% in the presence of 10  $\mu$ M BFA for 30 min before labeling. Cells were then pulse-labeled for 30 min with 800  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine ([<sup>35</sup>S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer, Waltham, MA) and chased in complete DMEM+5% supplemented with 10  $\mu$ M BFA. At the indicated time periods, radio-labeled cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA-DOC) buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Nonidet-P40, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1.2 mM deoxycholate (DOC), pH 7.2) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Laval, QC). For CD4 degradation experiments where Vpu was expressed from HxBH10 provirus, no BFA was added since CD4 ER retention was achieved through HIV-1 Env glycoproteins.

CD4-Vpu binding experiments were performed 48 hours post-transfection. Transfected cells expressing CD4 and a phosphorylation mutant of Vpu (Vpu S52,56/N) were first starved in methionine-free DMEM+5% for 30 min. Cells were then labeled for 2.5 h with 400  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and lysed in CHAPS buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% CHAPS, pH 7.2) supplemented with a cocktail of protease inhibitors.



Following lysis, labeled protein lysates were sequentially immunoprecipitated with anti-CD4 OKT4 monoclonal antibodies only (for binding experiments) or a mixture of OKT4 and CD4 H-370 antibodies (for CD4 degradation experiments) and subsequently with a rabbit anti-Vpu serum as described previously [58]. When indicated, anti-myc antibodies (9E10) were mixed with anti-Vpu antibodies in order to detect his(6)/c-myc Ub fusion proteins. Immunoprecipitates were resolved on a 12.5% SDS-poly-acrylamide tricine gel and analyzed by autoradiography. Scanning of the autoradiograms was performed on an AGFA Duoscan T1200 scanner. Densitometric analysis of autoradiograms was performed with Image Quant 5.0 from Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA).

### **Protein analysis by immunoprecipitation and western-blot**

All experiments were performed 48 h post-transfections. For experiments using SVCMV expressor plasmids to express CD4 and Vpu proteins or experiments using protease and envelope deficient proviruses (HxBH10 pr<sup>-</sup>, env<sup>-</sup>), cells were pre-treated with 10  $\mu$ M BFA for 2 h when indicated prior to lysis with 0.5%-1% Nonidet-P40 (10 mM Tris, 250 mM glucose, 1 mM EDTA, 0.5-1% Nonidet-P40, pH 7.6) for 30 min on ice. When HxBH10 was used to express Vpu, no BFA was added to the cells. Cell lysates were obtained after centrifugation at 10,000g in a microcentrifuge for 30 min at 4°C. A sample of each lysate was run directly on 12.5% SDS-poly-acrylamide tricine gel. For detection of ubiquitinated CD4 conjugates, the remaining portion was immunoprecipitated with anti-CD4 polyclonal antibodies (CD4 H-370) and analyzed on an 8% SDS-poly-acrylamide tricine gel. Proteins were then electro-blotted over-night in a Bio-Rad Trans Blot Cell on a 0.45  $\mu$ m pore size nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) and specific proteins were revealed by western-blotting using anti-CD4 polyclonal antibodies (1:1,000 dilution), anti-Vpu polyclonal antibodies (1:1,000 dilution), anti-actin polyclonal antibodies (1:1,200 dilution), anti-myc monoclonal antibodies (1:1,500 dilution) or anti-FLAG antibodies (1:2,000 dilution) diluted in PBS containing 0.02% sodium azide (NaN<sub>3</sub>). Ubiquitinated forms of CD4 were revealed by western-blotting the membrane containing the anti-CD4 immunoprecipitates with anti-myc monoclonal antibodies. Bound antibodies were then probed with horse-radish peroxidase-linked anti-rabbit (1:7,000 dilution) or anti-mouse (1:6,000 dilution) antibodies, washed extensively and revealed using a standard enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

### **Cell fractionation and salt wash experiment**

Forty-eight hours post-transfection, HEK 293T cells were treated with 10  $\mu$ M BFA for 2 h, washed in cold PBS, resuspended in 500  $\mu$ l of hypotonic buffer (10 mM Tris, 250 mM glucose, 1 mM EDTA) and incubated on ice for 30 min. Cells were then lysed mechanically with a type B Dounce homogenizer on ice (70 strokes). Cell lysates were centrifuged twice at 250g in a microcentrifuge at 4°C for 15 min to eliminate unlysed cells and then centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C to isolate the membrane fraction. The supernatant (cytosolic fraction) was ultra-centrifuged at 100,000g at 4°C for 1.5 h to eliminate remaining membrane contaminants and then adjusted with lysis buffer (10 mM Tris, 250 mM glucose, 1 mM EDTA, 4% Nonidet-P40, pH 7.6) to a final concentration of 1% Nonidet-P40. The pellet (membrane fraction) of the 10,000g centrifugation was washed with the hypotonic buffer 4 times prior to lysis in 1% Nonidet-P40 lysis buffer. After lysis, a sample of each fraction was run directly on 12.5% SDS-poly-acrylamide tricine gel while the remaining portion was immunoprecipitated first with anti-myc 9E10 monoclonal antibodies before analysis on an 8% SDS-poly-acrylamide tricine gel. Analysis of proteins in lysates was performed as described above while detection of ubiquitinated CD4 conjugates was performed by western-blotting using anti-CD4 polyclonal antibodies. Polyclonal anti-calnexin antibodies were diluted 1:7,000.

For the salt wash experiment, the cytosolic fraction was discarded and the membrane fraction was either treated with 100  $\mu$ l of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mM, pH 11), NaCl (100mM) or with RIPA-DOC lysis buffer during 10 min on ice. After treatment, samples were centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C to isolate the membrane fraction (M) and the supernatant (S) was recovered and adjusted to a final volume of 1 ml with 1% Nonidet-P40 lysis buffer. The remaining membrane fraction was lysed with 1 ml of 1% Nonidet-P40 lysis buffer. Each fraction was then analyzed as described above.

## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no competing interests.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

JB designed and performed all the experiments and contributed to the writing of the manuscript. MD provided reagents, participated in the design of some experiments and in the revision of the manuscript. JM participated in the execution of several experiments. EAC conceived the study, participated to data analysis and contributed to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We want to thank Klaus Strelbel for kindly providing the pHIV CD4 KRcyto plasmid, and Ron Kopito for the kind gift of pCW7 and pCW8 ubiquitin expressors.

This work was performed by JB in partial fulfillment of her doctoral thesis and was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-14228) and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to EAC. JB is the recipient of a studentship from the FRSQ and EAC holds the Canada Research Chair in Human Retrovirology.

## REFERENCES

1. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, and Montagnier L: **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** *Nature* 1984, **312**:767-768.
2. Levesque K, Finzi A, Binette J, and Cohen EA: **Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection.** *Curr HIV Res* 2004, **2**:51-59.
3. Levesque K, Zhao YS, and Cohen EA: **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* 2003, **278**:28346-28353.
4. Wildum S, Schindler M, Munch J, and Kirchhoff F: **Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection.** *J Virol* 2006, **80**:8047-8059.
5. Schwartz O, Dautry-Varsat A, Goud B, Marechal V, Subtil A, Heard JM, and Danos O: **Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes.** *J Virol* 1995, **69**:528-533.
6. Willey RL, Bonifacino JS, Potts BJ, Martin MA, and Klausner RD: **Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:9580-9584.
7. Crise B, Buonocore L, and Rose JK: **CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor.** *J Virol* 1990, **64**:5585-5593.
8. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, and Strebel K: **Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes.** *J Virol* 1992, **66**:226-234.
9. Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, and Haseltine WA: **Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1.** *Nature* 1988, **334**:532-534.
10. Strebel K, Klimkait T, and Martin MA: **A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product.** *Science* 1988, **241**:1221-1223.
11. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, and Wain-Hobson S: **Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1.** *Nature* 1990, **345**:356-359.

12. Binette J and Cohen EA: **Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions.** *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004, **4**:297-307.
13. Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, and Strebel K: **Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein.** *J Virol* 1993, **67**:5056-5061.
14. Schubert U, Schneider T, Henklein P, Hoffmann K, Berthold E, Hauser H, Pauli G, and Porstmann T: **Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II.** *Eur J Biochem* 1992, **204**:875-883.
15. Friborg J, Ladha A, Gottlinger H, Haseltine WA, and Cohen EA: **Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995, **8**:10-22.
16. Terwilliger EF, Cohen EA, Lu YC, Sodroski JG, and Haseltine WA: **Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:5163-5167.
17. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, and Orenstein JM: **The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release.** *J Virol* 1990, **64**:621-629.
18. Varthakavi V, Smith RM, Bour SP, Strebel K, and Spearman P: **Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:15154-15159.
19. Schubert U, Clouse KA, and Strebel K: **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* 1995, **69**:7699-7711.
20. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, and Strebel K: **Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4.** *J Virol* 1992, **66**:7193-7200.
21. Bour S, Schubert U, and Strebel K: **The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation.** *J Virol* 1995, **69**:1510-1520.
22. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, and Benarous R: **A novel human WD protein, h-beta TrCp, that**

- interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1998, **1**:565-574.
23. Fuchs SY, Spiegelman VS, and Kumar KG: **The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:2028-2036.
  24. Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orłowski M, Strelbel K, and Yewdell JW: **CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway.** *J Virol* 1998, **72**:2280-2288.
  25. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, and Sommer T: **ERAD: the long road to destruction.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:766-772.
  26. Lilley BN and Ploegh HL: **A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER.** *Nature* 2004, **429**:834-840.
  27. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, and Rapoport TA: **A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol.** *Nature* 2004, **429**:841-847.
  28. Gauss R, Sommer T, and Jarosch E: **The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment.** *EMBO J* 2006, **25**:1827-1835.
  29. Wiertz EJHJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, and Ploegh HL: **Sec61-mediated transfer of membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction.** *Nature* 1996, **384**:432-438.
  30. Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, and Ploegh HL: **The Human Cytomegalovirus US11 Gene Product Dislocates MHC Class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol.** *Cell* 1996, **84**:769-779.
  31. Yang M, Omura S, Bonifacino JS, and Weissman AM: **Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes.** *J Exp Med* 1998, **187**:835-846.

32. Furman MH, Loureiro J, Ploegh HL, and Tortorella D: **Ubiquitinylation of the cytosolic domain of a type I membrane protein is not required to initiate its dislocation from the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 2003, **278**:34804-34811.
33. Shamu CE, Flierman D, Ploegh HL, Rapoport TA, and Chau V: **Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:2546-2555.
34. Meusser B and Sommer T: **Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation.** *Mol Cell* 2004, **14**:247-258.
35. Fujita K, Omura S, and Silver J: **Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors.** *J Gen Virol* 1997, **78 ( Pt 3)**:619-625.
36. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, and Varshavsky A: **A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein.** *Science* 1989, **243**:1576-1583.
37. Ellison MJ and Hochstrasser M: **Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function.** *J Biol Chem* 1991, **266**:21150-21157.
38. Doolman R, Leichner GS, Avner R and Roitelman J: **Ubiquitin is conjugated by membrane ubiquitin ligase to three sites, including the N terminus, in transmembrane region of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *J Biol Chem* 2004, **279**:38184-38193.
39. Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, and Warren G: **A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways.** *EMBO J* 2000, **19**:2181-2192.
40. Ye Y, Meyer HH, and Rapoport TA: **The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol.** *Nature* 2001, **414**:652-656.
41. Ye Y, Meyer HH, and Rapoport TA: **Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains.** *J Cell Biol* 2003, **162**:71-84.

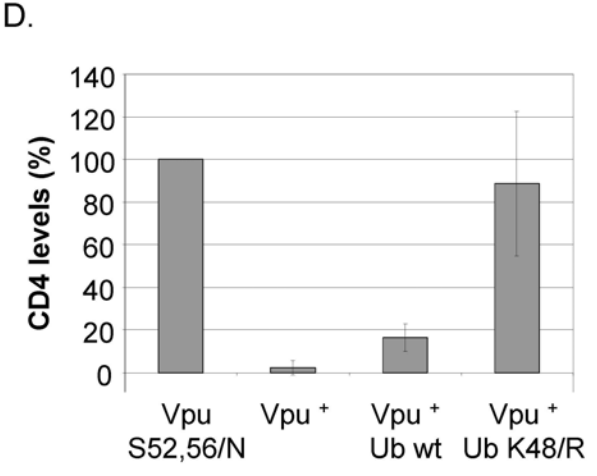
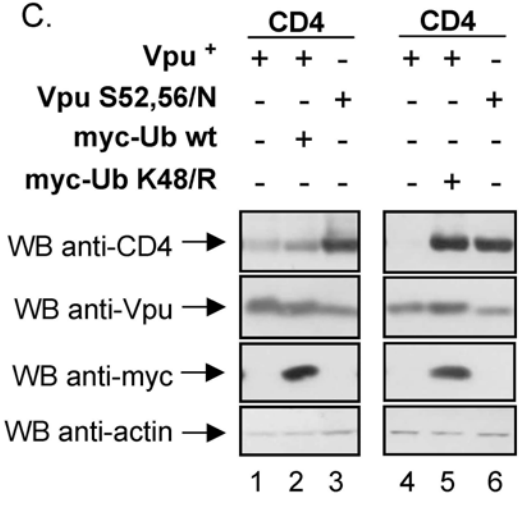
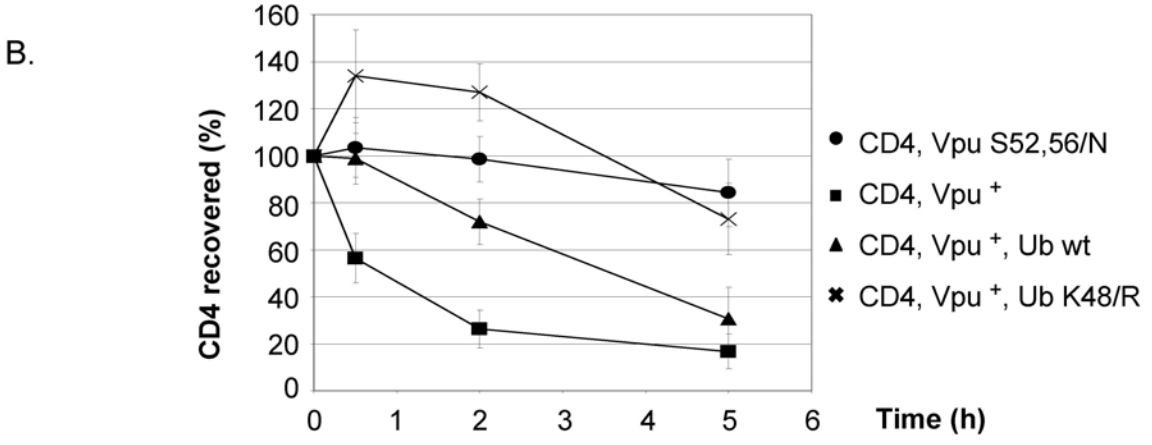
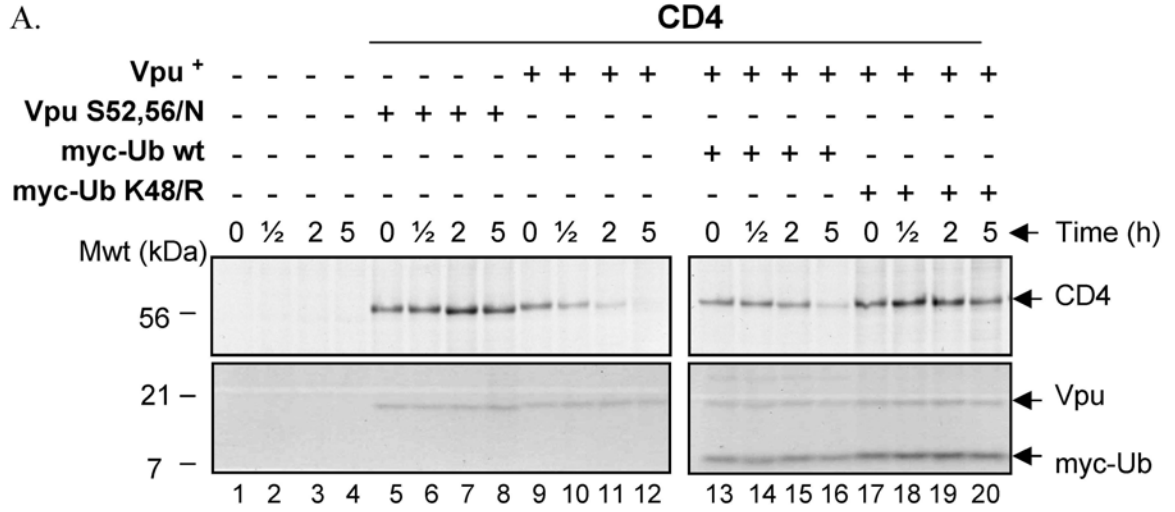
42. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, and Gabuzda D: **Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway.** *J Biol Chem* 2004, **279**:7792-7798.
43. Hassink GC, Barel MT, Van Voorden SB, Kikkert M, and Wiertz EJ: **Ubiquitination of MHC class I heavy chains is essential for dislocation by human cytomegalovirus-encoded US2 but not US11.** *J Biol Chem* 2006, **281**:30063-30071.
44. Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJ, and Hansen TH: **Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3.** *J Cell Biol* 2007, **177**:613-624.
45. Cadwell K and Coscoy L: **Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase.** *Science* 2005, **309**:127-130.
46. Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, Kreft SG, Hochstrasser M, Brodsky JL, and Michaelis S: **Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein.** *J Biol Chem* 2004, **279**:38369-38378.
47. Vashist S and Ng DT: **Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control.** *J Cell Biol* 2004, **165**:41-52.
48. Carvalho P, Goder V, and Rapoport TA: **Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins.** *Cell* 2006, **126**:361-373.
49. Ismail N and Ng DT: **Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble!** *Cell* 2006, **126**:237-239.
50. Wang X, Ye Y, Lencer W, and Hansen TH: **The viral E3 ubiquitin ligase mK3 uses the Derlin/p97 endoplasmic reticulum-associated degradation pathway to mediate down-regulation of major histocompatibility complex class I proteins.** *J Biol Chem* 2006, **281**:8636-8644.
51. Yao XJ, Friberg J, Checroune F, Gratton S, Boisvert F, Sekaly RP, and Cohen EA: **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* 1995, **209**:615-623.



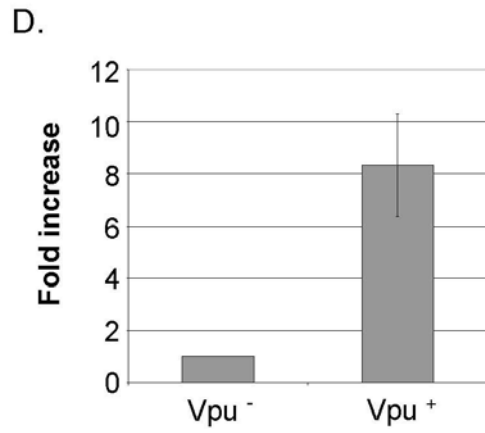
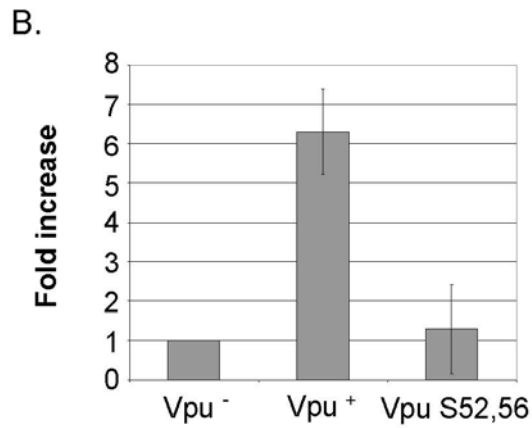
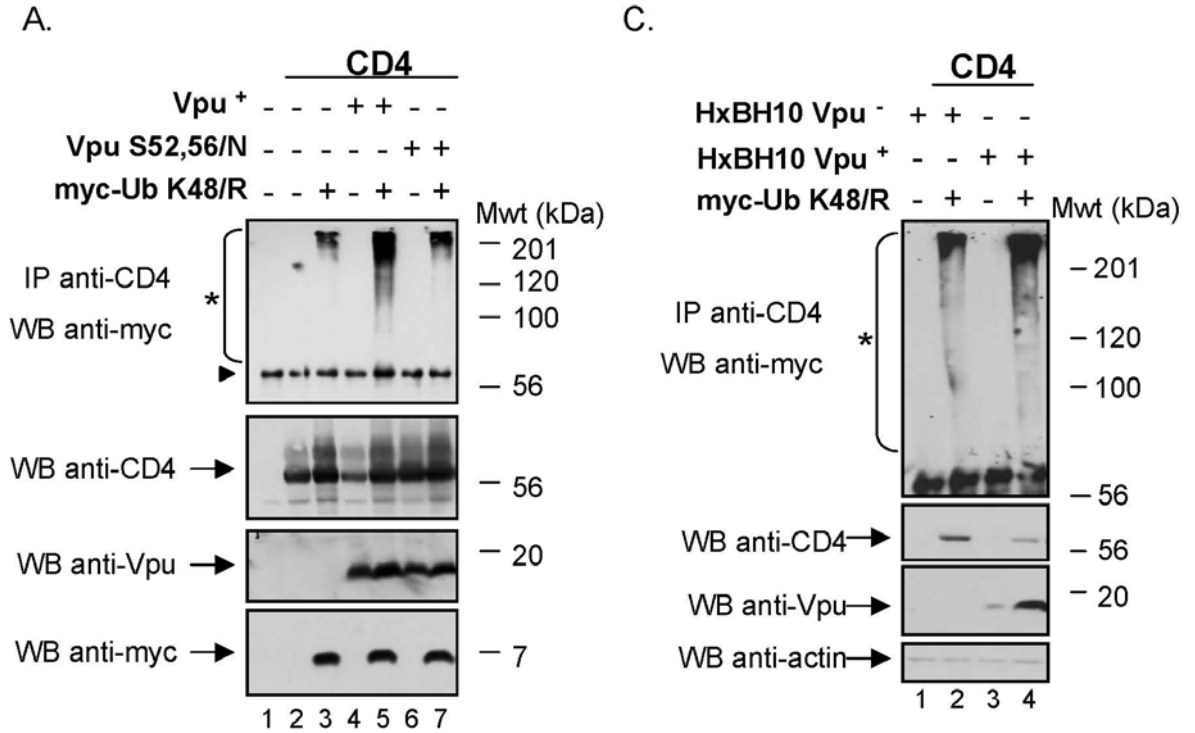
52. Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, and Axel R: **The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family.** *Cell* 1985, **42**:93-104.
53. Yao XJ, Gottlinger H, Haseltine WA, and Cohen EA: **Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export.** *J Virol* 1992, **66**:5119-5126.
54. Tiganos E, Friborg J, Allain B, Daniel NG, Yao XJ, and Cohen EA: **Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein.** *Virology* 1998, **251**:96-107.
55. Gottlinger HG, Dorfman T, Cohen EA, and Haseltine WA: **Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:7381-7385.
56. Lavalley C, Yao XJ, Ladha A, Gottlinger H, Haseltine WA, and Cohen EA: **Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles.** *J Virol* 1994, **68**:1926-1934.
57. Ward CL, Omura S, and Kopito RR: **Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway.** *Cell* 1995, **83**:121-127.
58. Tiganos E, Yao XJ, Friborg J, Daniel N, and Cohen EA: **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* 1997, **71**:4452-4460.

**Figure 1. Poly-ubiquitination of CD4 is required for Vpu-mediated CD4 degradation.**

A. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1.5  $\mu$ g of SVCMV CD4 wt and 8  $\mu$ g of SVCMV Vpu<sup>+</sup> (Vpu<sup>+</sup>) or the phosphorylation-defective Vpu mutant SVCMV Vpu S52,56/N (Vpu S52,56/N). In parallel, CD4/Vpu transfectants were co-transfected with 8  $\mu$ g of plasmids encoding his(6)/c-myc-Ub wt (myc-Ub wt) or the TDN mutant of ubiquitin his(6)/c-myc-Ub K48/R (myc-Ub K48/R). Transfected cells were treated with BFA, pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and chased with complete media for the indicated time intervals. Cells were then lysed and immunoprecipitated sequentially with anti-CD4 monoclonal and polyclonal antibodies first and then with anti-Vpu and anti-myc antibodies. B. Using quantitative scanning of CD4 bands from three independent experiments, the percentage of CD4 remaining over time as compared to time 0 is plotted for each transfection. C. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected as described in A. Cell transfectants were treated for two hours with BFA prior to lysis. Steady state levels of CD4, actin and tagged ubiquitin were analysed by western-blot. D. Quantitative analysis from three independent experiments showing the level of CD4 relative to CD4 expressed with Vpu S52,56/N (arbitrarily set at 100%) for each transfectant.

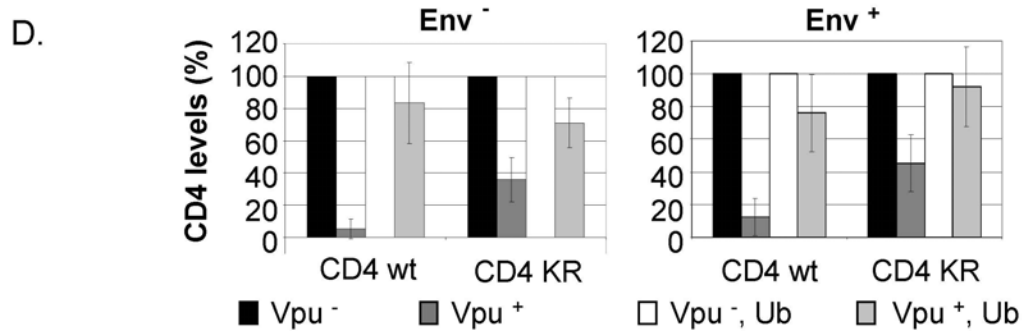
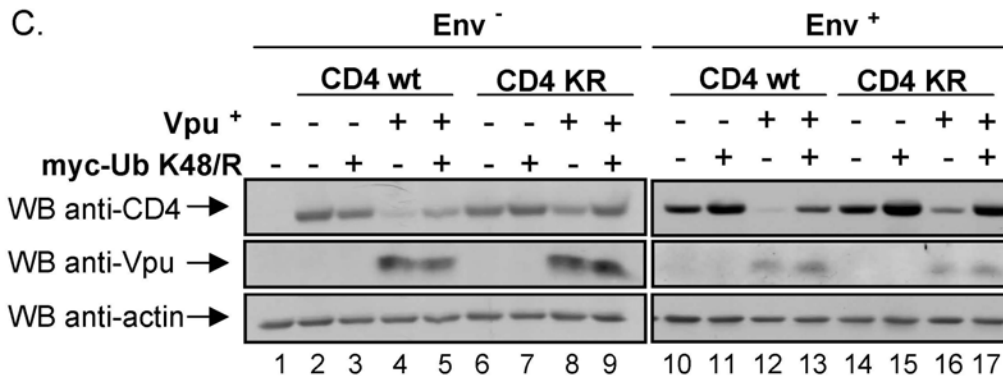
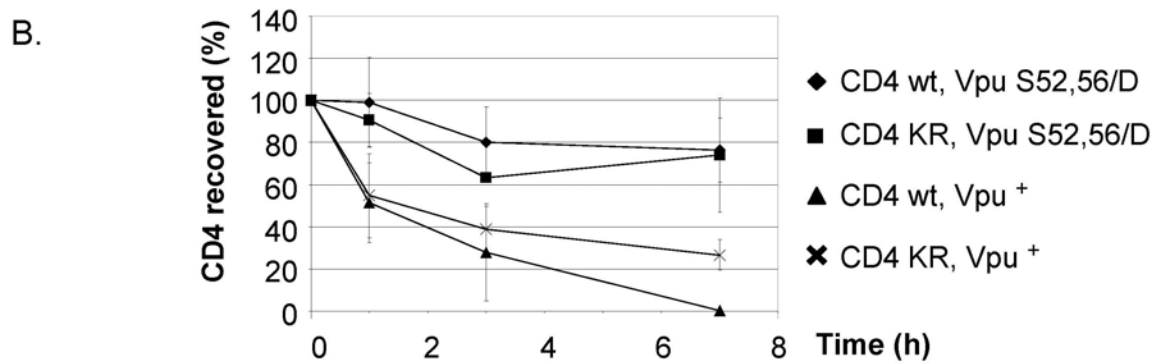
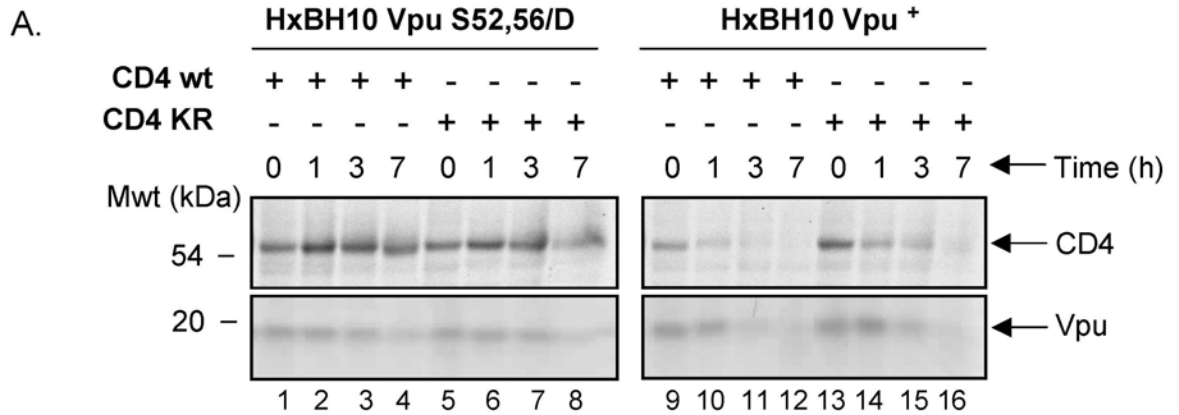


**Figure 2. Effect of Vpu on CD4 ubiquitination.** A. Vpu-mediated ubiquitination of CD4 wt when CD4 is retained in the ER through treatment with BFA. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu\text{g}$  of SVCMV CD4 wt, 8  $\mu\text{g}$  of SVCMV Vpu<sup>+</sup> or the phosphorylation-defective Vpu mutant SVCMV Vpu S52,56/N and 8  $\mu\text{g}$  of the TDN mutant his(6)/c-myc-Ub K48/R. Samples were then treated as described in the materials and methods section. CD4 molecules were immunoprecipitated with anti-CD4 polyclonal antibodies prior to western-blot analysis with anti-myc monoclonal antibodies. (►) indicates the position of the heavy chains of anti-CD4 antibodies. B. Quantitative analysis of ubiquitinated CD4 conjugates. (\*) represents the area of the autoradiogram that was used for quantitation of CD4-Ub conjugates. The histogram shows the relative levels of ubiquitinated CD4 conjugates in presence or absence of a functional Vpu. Relative CD4-Ub conjugates levels were evaluated by quantitation of the signal detected in the area delineated on the autoradiogram relative to total CD4 as determined by quantitation of the band detected with the anti-CD4 antibodies on whole cell lysate. The relative level of ubiquitinated CD4 detected in absence of Vpu was arbitrarily set at 1. The data represent results from seven experiments. C. Vpu-mediated ubiquitination of CD4 wt in condition where CD4 is retained in the ER through binding with HIV-1 Env. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu\text{g}$  of pHIV CD4 wt, 10  $\mu\text{g}$  of provirus encoding Vpu<sup>-</sup> (HxBH10-vpu<sup>-</sup>) or Vpu<sup>+</sup> (HxBH10-vpu<sup>+</sup>) and 20  $\mu\text{g}$  of his(6)/c-myc-Ub K48/R. Samples were then treated as in A but in absence of BFA. D. Quantitative analysis showing the relative levels of ubiquitinated CD4 detected in two independent experiments. Relative levels of ubiquitinated CD4 conjugates were determined as described in B.



**Figure 3. Effect of Vpu on CD4 molecules lacking lysine residues in the cytoplasmic tail.**

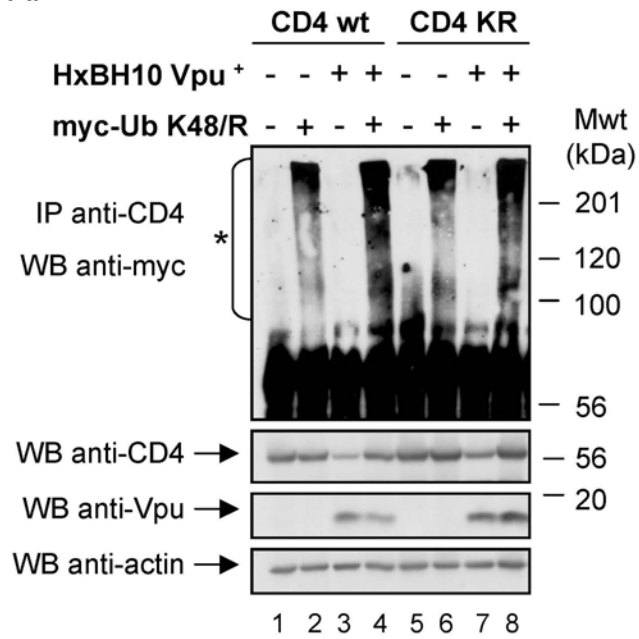
A. Analysis of CD4 wt and CD4 KRcyto turnover in presence or absence of functional Vpu by pulse-chase labeling and immunoprecipitation. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 2  $\mu\text{g}$  of pHIV CD4 wt or pHIV CD4 KRcyto and 20  $\mu\text{g}$  of provirus encoding Vpu<sup>+</sup> (HxBH10-vpu<sup>+</sup>) or phosphorylation-defective Vpu mutant (HxBH10-vpu S52,56/D). Cells were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and chased in complete medium for the indicated time intervals. Cells were then lysed and immunoprecipitated sequentially with anti-CD4 antibodies first (polyclonal and monoclonal) and then with anti-Vpu antibodies. B. Using quantitative scanning of CD4 bands from two independent experiments, the percentage of CD4 remaining over time as compared to time 0 is plotted for each transfection. C. Effect of Vpu on steady-state CD4 wt and CD4 KRcyto levels. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu\text{g}$  of pHIV CD4 wt or pHIV CD4 KRcyto and 10  $\mu\text{g}$  of proviruses encoding Vpu<sup>-</sup> or Vpu<sup>+</sup> in addition to 25  $\mu\text{g}$  of the his(6)/c-myc-Ub K48/R expressor. In the left panel (Env<sup>-</sup>), a similar experiment was performed except that HEK 293T cells were co-transfected with 10  $\mu\text{g}$  of envelope-defective provirus (HxBc2-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>-</sup>, env<sup>-</sup> or HxBH10-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>+</sup>, env<sup>-</sup>) and treated with BFA for 2 h prior to lysis. Cell lysates were then treated as described in the materials and methods section. D. Quantitative analysis of steady-state CD4 levels. CD4 levels in presence or absence of his(6)/c-myc-Ub K48/R were arbitrarily set at 100%. The levels of CD4 in presence of Vpu are shown relative to the corresponding controls. These results are representative of the data obtained in three independent experiments for Env<sup>-</sup> and five independent experiments for Env<sup>+</sup>.



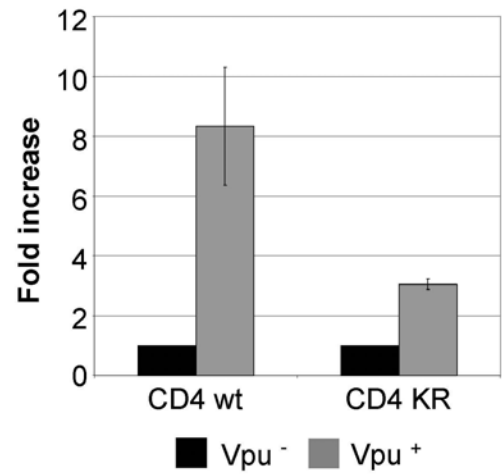
**Figure 4. Effect of Vpu on CD4 KRcyto poly-ubiquitination.** A. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu\text{g}$  of pHIV CD4 wt or pHIV CD4 KRcyto, 10  $\mu\text{g}$  of provirus encoding Vpu<sup>-</sup> (HxBH10-vpu<sup>-</sup>) or Vpu<sup>+</sup> (HxBH10-vpu<sup>+</sup>) and 25  $\mu\text{g}$  of the TDN mutant of Ub his(6)/c-myc-Ub K48/R. Transfected cells were not treated with BFA prior to lysis. Samples were then treated as described in the materials and methods. B. Quantitative analysis of the relative levels of ubiquitinated CD4 conjugates for CD4 wt and CD4 KRcyto in two independent experiments. (\*) represents the area of the autoradiogram that was used for the quantitation of CD4-Ub conjugates. Relative levels of ubiquitinated CD4 conjugates were determined as described in Fig. 2B.



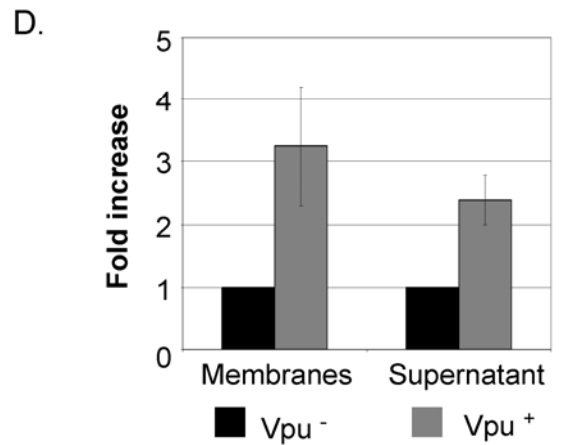
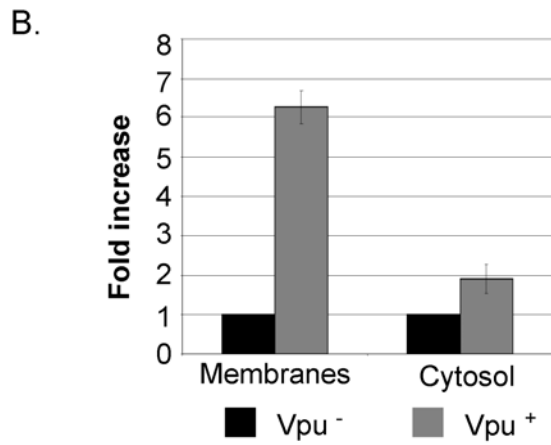
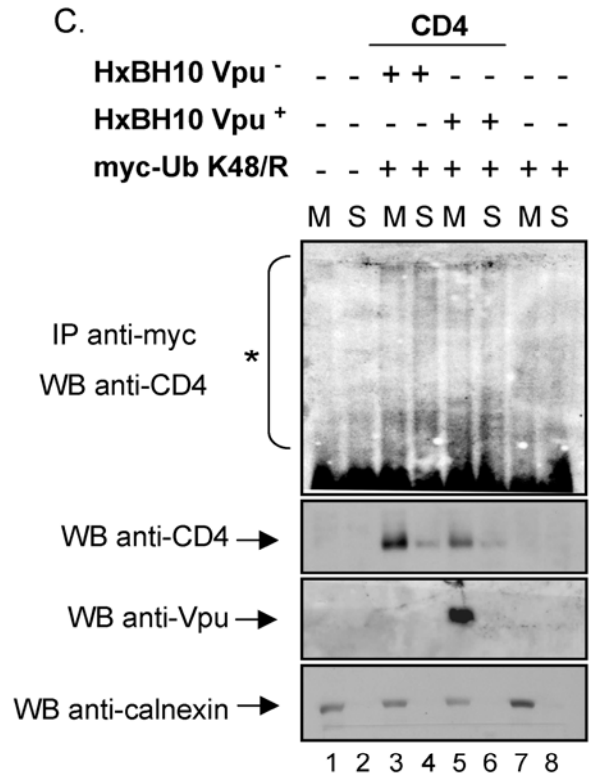
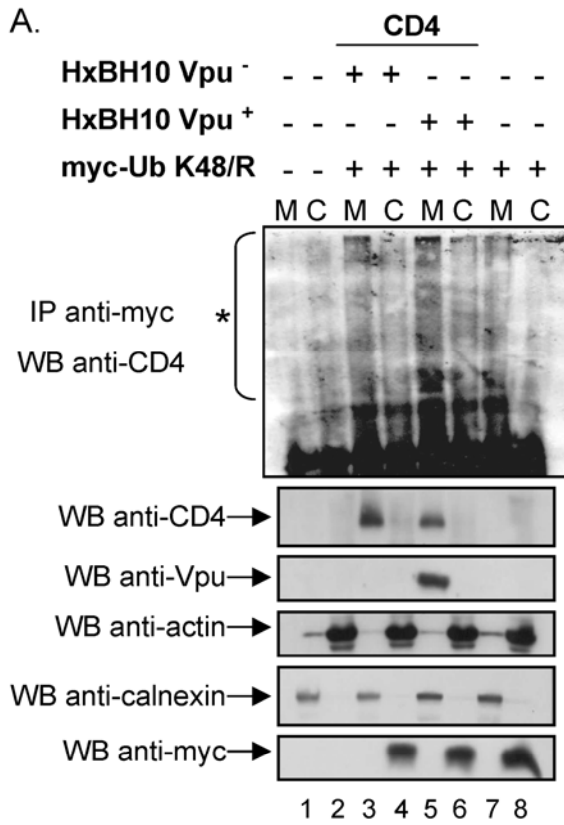
A.



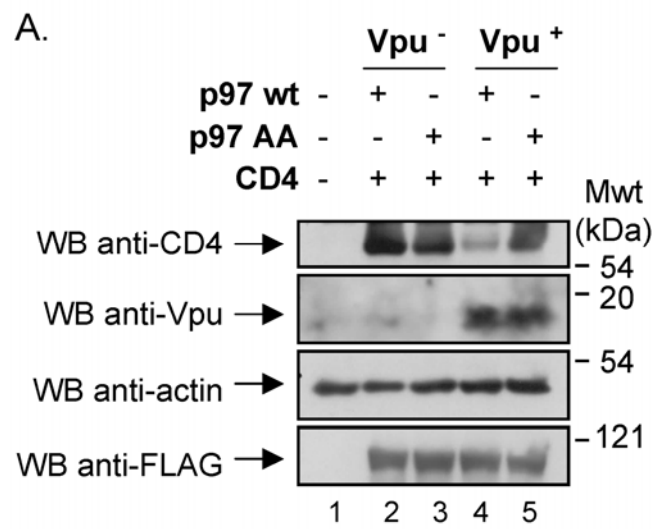
B.

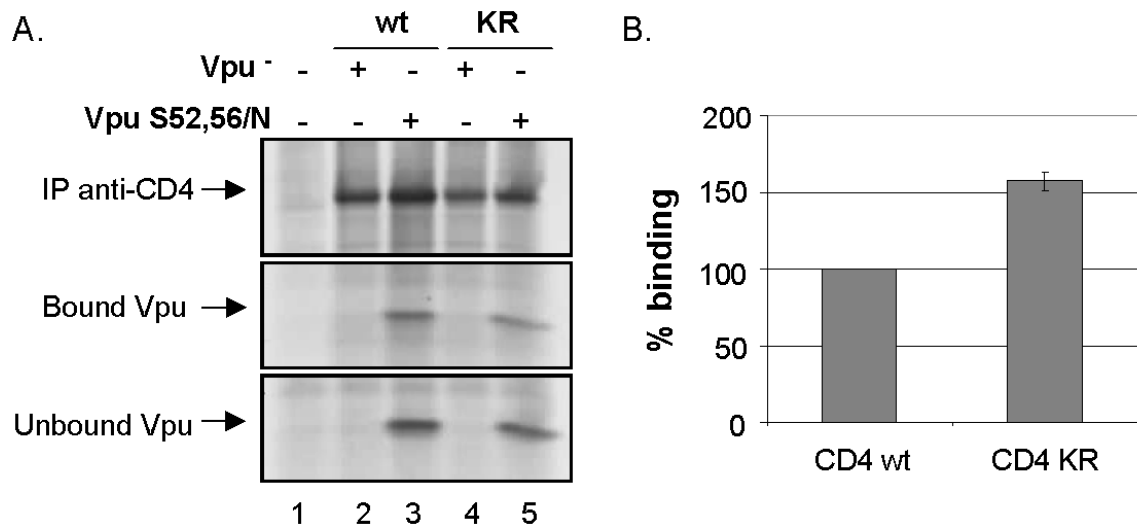


**Figure 5. Vpu-mediated CD4 degradation involves dislocation of ubiquitinated CD4 conjugates from the ER membrane to the cytosol.** HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu$ g of pHIV CD4 wt, 10 $\mu$ g of envelope-defective provirus (HxBc2-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>-</sup>, env<sup>-</sup> or HxBH10-pr<sup>-</sup>, vpu<sup>+</sup>, env<sup>-</sup>) and 15  $\mu$ g of his(6)/c-myc-Ub K48/R expression plasmid where indicated. Cells were treated with BFA for 2 h before mechanical lysis. CD4-Ub conjugates were immunoprecipitated with anti-myc monoclonal antibodies prior to western-blot analysis with anti-CD4 polyclonal antibodies while control proteins in each fraction were revealed by western-blot. Actin and calnexin were used as cytosolic and membrane controls, respectively. A. Membrane (M) and cytosolic (C) fractions were separated and treated as described in the materials and methods section. B. Quantitative analysis of the relative amounts of ubiquitinated CD4 molecules present in each fraction relative to the amounts measured in absence of Vpu (arbitrarily set at 1). (\*) represents the area of the autoradiogram that was used for the quantitation of CD4-Ub conjugates. Non-specific background signal detected in lanes 7 and 8 was subtracted. Relative levels of ubiquitinated CD4 conjugates were determined as described in the legend of Fig. 2B. Error bars reflect standard deviations from duplicate independent experiments. C. Membrane (M) fractions were treated with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11) as described in materials and methods. Treated membrane and supernatant (S) were subsequently recovered by centrifugation. Fractions were analyzed as described above in A. D. Quantitative analysis of the relative amounts of ubiquitinated CD4 molecules (as described in the legend of Fig. 2B) present in each fraction relative to the amounts measured in absence of Vpu (arbitrarily set at 1). (\*) represents the area that was used for the quantitation of CD4-Ub conjugates. Non-specific background signal detected in lanes 7 and 8 was subtracted. Error bars reflect standard deviations from duplicate independent experiments.

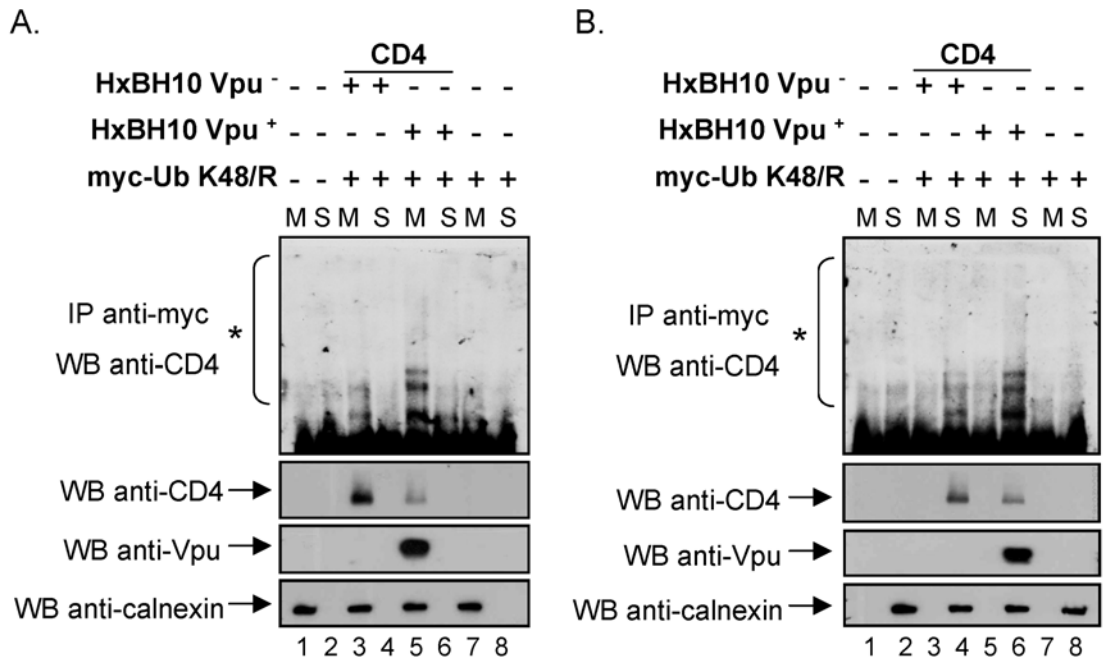


**Figure 6. Effect of a TDN mutant of p97 on Vpu-mediated CD4 degradation.** HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1.5  $\mu\text{g}$  of SVCMV CD4 wt, 12  $\mu\text{g}$  of SVCMV Vpu<sup>-</sup> or Vpu<sup>+</sup> and 1  $\mu\text{g}$  of an expression plasmid encoding a FLAG-tagged version of p97 wt or the TDN mutant p97 AA. Cells were treated with BFA for 2 h prior to lysis. Cell lysates were then analyzed by western-blot as described in materials and methods. These results are representative of the data obtained in two independent experiments.





**Additional file 1.** HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1.5  $\mu\text{g}$  of SVCMV CD4 wt or SVCMV CD4 KRcyto and 12  $\mu\text{g}$  of a plasmid encoding a phosphorylation-defective Vpu mutant (SVCMV Vpu S52,56/N). Cells were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine, lysed and sequentially immunoprecipitated with anti-CD4 OKT4 monoclonal antibodies first to observe bound Vpu and then with anti-Vpu antibodies to recover the unbound Vpu proteins. B. Quantitative analysis of the bands in A showing the percentage of binding of CD4 KRcyto to Vpu S52,56/N relative to CD4 wt (arbitrary set at 100%). Error bars reflect standard deviations from duplicate independent experiments.



**Additional file 2.** HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with 1  $\mu$ g of pHIV CD4 wt, 10  $\mu$ g of envelope-defective provirus (HxBc2-pr, vpu<sup>-</sup>, env<sup>-</sup> or HxBH10-pr, vpu<sup>+</sup>, env<sup>-</sup>) and 15  $\mu$ g of his(6)/c-myc-Ub K48/R expression plasmid where indicated. Cells were treated with BFA for 2 h prior to mechanical lysis. Membrane (M) were treated with either NaCl (pH 7.0) (panel A.) or RIPA-DOC (panel B.) as described in materials and methods. The treated membranes (M) and supernatants (S) were subsequently isolated by centrifugation. CD4-Ub conjugates were immunoprecipitated with anti-myc monoclonal antibodies prior to western-blot using anti-CD4 polyclonal antibodies whereas control proteins in each fraction were directly revealed by western-blot. Calnexin was used as a membrane-associated protein control. (asterisk) represents the area of the autoradiogram that we considered as poly-ubiquitinated CD4 molecules.

### CHAPITRE 3 : ARTICLE 4 EN PRÉPARATION

Les données présentées au chapitre 2 ont montré que la mutation de toutes les lysines cytoplasmiques de CD4 diminue la sensibilité de CD4 à Vpu sans toutefois empêcher totalement sa dégradation en présence de Vpu dans les cellules HEK 293T. Ces données suggèrent que l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 pouvait être une étape importante dans le processus de dégradation de CD4. Même si l'attachement de l'ubiquitine a normalement lieu sur les lysines de la protéine qui doit être dégradée, l'ubiquitination sur des résidus non-lysine (S, T et C) a aussi été caractérisée.

Le deuxième objectif de cette thèse était donc de déterminer si le processus de dégradation de CD4 induit par Vpu nécessite l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4. Comme l'absence de lysines cytoplasmiques de CD4 n'abolit pas sa dégradation par Vpu, nous voulions vérifier plus spécifiquement si Vpu peut induire la formation de chaînes de poly-ubiquitines sur des résidus non-lysines. Les résultats obtenus par cette étude pourraient nous permettre de déterminer si la E3 ligase recrutée par Vpu ubiquitine certains résidus de la queue cytoplasmique de façon spécifique ou si Vpu positionne le complexe SCF<sup>β-TrCP</sup> près de la queue cytoplasmique de CD4 de façon telle que la E2 présente dans le complexe puisse ubiquitiner les résidus disponibles à sa proximité (lysine ou autre).

Pour réaliser cette étude, nous avons généré plusieurs mutants de CD4 ne contenant aucune lysine cytoplasmique, mais dont les résidus non-lysines susceptibles d'être ubiquitinés ont aussi été mutés. Nous avons ensuite vérifié la sensibilité à Vpu de chacun de ces mutants de CD4. Les résultats obtenus concernant cet objectif de recherche sont présentés dans ce chapitre sous forme de manuscrit en préparation.



## **Ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 could represent an early step necessary for HIV-1 Vpu-mediated CD4 degradation**

**Julie Binette and Éric A. Cohen\***

Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal and Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Abstract word count: 266

\*Corresponding author: Éric A. Cohen, Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7.

## ABSTRACT

Besides its role in HIV-1 entry into target cells, CD4 is rapidly degraded by the viral protein Vpu by a process reminiscent of endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). During this process, Vpu is targeting CD4 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway through its capacity to recruit  $\beta$ -TrCP, a component of the ubiquitin (Ub) ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>. We previously demonstrated that the replacement of all cytosolic Ub acceptor lysine residues of CD4 reduced but did not prevent Vpu-mediated CD4 degradation and ubiquitination, suggesting that CD4 degradation might involve ubiquitination of other sites in CD4.

Previous reports demonstrated that non-lysine residues (S, T and C) could serve as potential ubiquitination sites. To examine whether Ub conjugation occurs on the cytosolic tail of CD4, we generated a CD4 mutant lacking all cytosolic potential Ub acceptor residues (K, C, S, T). Replacement of these residues inhibited Vpu-mediated CD4 degradation. In addition, a CD4 mutant containing only cysteines as cytosolic Ub acceptor sites is partially sensitive to Vpu, suggesting that these cysteines could be involved in Vpu-mediated CD4 degradation process.

These results suggest that HIV-1 Vpu targets CD4 for degradation by an ERAD-like process involving poly-ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 by the E3 ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> as a necessary step. In order to explain our results, we propose a model where rather to recognize a specific amino acids sequence in the cytoplasmic tail of CD4, the Ub conjugating enzyme (E2) that is present in the SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> complex could be brought by Vpu in proximity of non specific cytosolic potential ubiquitination sites in the cytosolic tail of CD4 (either lysine or cysteine).

## BACKGROUND

CD4 is a type I integral membrane glycoprotein of 55-kDa that is known to be the primary co-receptor for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry into cells (Klatzmann et al. 1984). It is expressed primarily at the cell surface of a subset of T lymphocytes that recognizes class II major histocompatibility complex (MHC-II)-associated peptides. CD4 is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and then traffics through the Golgi in order to be expressed at the cell surface.

CD4 consists of a large N-terminal extracellular/lumenal domain, a membrane-spanning region and a 38-residues cytoplasmic tail that contains two cysteine residues (C420 et C422) responsible for its association with the Src family protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> (Maddon et al. 1985; Shaw et al. 1989). Despite the cysteines responsible for p56<sup>lck</sup> interaction, the cytosolic tail of CD4 contains other functional motifs. Indeed, T cell activation induces the endocytosis of CD4 following S408 and/or S415 phosphorylation (Pelchen-Matthews et al. 1993; Pitcher et al. 1999). This phosphorylation results in the dissociation of p56<sup>lck</sup> and the activation of an endocytosis signal consisting of a dileucine motif (L413-L414) (Pitcher et al. 1999). In addition, two other cysteines (C394 and C397) represent palmitoylation sites (Crise and Rose 1992b) but the functional consequence of CD4 palmitoylation is still not clear (Bijlmakers 2009).

Despite the essential role played by CD4 in viral entry, HIV-1 induces a potent down-regulation of CD4 molecules expressed at the cell surface during infection (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). This process is known to promote release of fully infectious viral particles and to prevent superinfection (Lama et al. 1999; Levesque et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Wildum et al. 2006).

In HIV-1 infected cells, three viral proteins act by distinct mechanisms in order to induce CD4 down-regulation, these proteins are Nef, Env and Vpu. In the early steps of the infection, Nef induces a rapid internalization and subsequent degradation in lysosomes of cell surface CD4 molecules (Aiken et al. 1994; Rhee and Marsh 1994). At later stages of the infection, the newly synthesized viral envelope glycoprotein precursor (Env gp160) binds to newly synthesized CD4 at the level of the ER. Through its high binding affinity to CD4 and its inefficient vesicular transport, gp160 sequesters CD4 in CD4-Env complexes in the ER and then prevents its transport to the cell surface and maturation (Crise et al.

1990). Finally, the sequestration of CD4 in the ER by gp160 allows the viral accessory protein Vpu to induce a rapid degradation of the newly synthesized CD4 (Willey et al. 1992b). The role of gp160 in Vpu-mediated CD4 degradation appears to be solely to retain CD4 in the ER given that efficient CD4 degradation can be observed in absence of Env as long as CD4 is retained in the ER by an ER retention signal or treatment of cells with Brefeldin A (BFA), a fungal metabolite known to block protein sorting from the ER to the Golgi apparatus (Willey et al. 1992a).

Vpu is an 81 amino acid class I integral membrane protein. The protein consists of an N-terminal transmembrane alpha helix and of a C-terminal hydrophilic cytoplasmic domain (Maldarelli et al. 1993). The cytoplasmic domain is composed of two alpha helices separated by a well conserved dodecapeptide encompassing amino acids 47-58 in which two serine residues (S52 and S56) are phosphorylated by casein kinase II (Schubert et al. 1992; Friberg et al. 1995). Besides the induction of CD4 degradation, Vpu promotes efficient viral release (Strebel et al. 1988; Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990; Schubert et al. 1995; Varthakavi et al. 2003) through its capacity to counteract a host cell protein named BST2 (B cell stromal factor 2) or “tetherin” that otherwise retains viruses at the surface of the infected cells (Neil et al. 2008; Van Damme et al. 2008).

CD4 degradation by Vpu is a multi-step process that is initiated by the interaction of CD4 with Vpu at the level of the ER (Bour et al. 1995b). Many studies have tried to delineate the minimal requirements in CD4 that are necessary to retain sensitivity to Vpu. It is clear that the cytosolic tail of CD4 is required since deletion of the cytosolic tail or destruction of the putative alpha-helical structure within cytosolic domain rendered CD4 insensitive to Vpu (Chen et al. 1993; Vincent et al. 1993; Willey et al. 1994; Tiganos et al. 1997). Putting all these mutational and deletion analyses together, a Vpu-responsive sequence in the cytosolic tail of CD4 encompassing residues 416-419 (EKKT) can be delineated (Chen et al. 1993; Lenburg and Landau 1993; Vincent et al. 1993; Tiganos et al. 1997). Finally, results from our laboratory have demonstrated that residues between 411 and 419, including the EKKT motif, and a predicted  $\alpha$ -helical structure in the proximal region of the cytoplasmic tail of CD4 were important for Vpu interaction (Yao et al. 1995; Tiganos et al. 1997).

The direct interaction between CD4 and Vpu is necessary for Vpu-mediated CD4 degradation but not sufficient since this process necessitates also the interaction of Vpu with a host cellular co-factor,  $\beta$ -TrCP (Margottin et al. 1998). Human  $\beta$ -TrCP contains a

WD-40 domain repeat region which recognizes Vpu when S52 and S56 are phosphorylated and an F-box domain, which recruits Skp1, a component of the ubiquitin ligase (E3) SCF<sup>β-TrCP</sup> complex. Therefore, β-TrCP acts as a substrate recognition receptor for SCF<sup>β-TrCP</sup> (reviewed in reference (Fuchs et al. 2004)). The involvement of the E3 complex SCF<sup>β-TrCP</sup> and the direct observation of ubiquitination and dislocation of CD4 from the ER membrane during Vpu-mediated proteolysis (Schubert et al. 1998; Binette et al. 2007) are supporting previous evidence that Vpu induces an ERAD-like process involving the ubiquitin-proteasome system in order to degrade CD4 (Schubert et al. 1998; Binette et al. 2007).

The use of non-lysine ubiquitination sites has been reported, for example, for viral encoded E3 ligases. Indeed, two E3 ligases of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), MIR1 and MIR2 (modulator of immune recognition, also called kK3 and kK5 respectively), have the capacity to induce ubiquitination on either lysine or cysteine residues in the MHC-I heavy chain (HC) cytosolic tail in order to induce its internalization from the cell surface and its subsequent degradation via lysosomes (Cadwell and Coscoy 2005; Cadwell and Coscoy 2008). In addition, it was shown that the mouse gamma herpesvirus 68 (γ-HV68) mk3 (murine γ-herpesvirus 68 k3 protein) E3 ligase, which targets nascent MHC-I HC for degradation by ERAD, is able to ubiquitinate HC cytosolic tail on either lysine, serine or threonine, each of which was found to be sufficient to induce degradation of HC (Wang et al. 2007b). In all of these cases, the choice of ubiquitination sites in the cytosolic tail of HCs does not appear to involve the recognition of specific sequences since replacement of cytosolic amino acid with a random GA stretch or by glycines only where Ub acceptor residues are placed at different sites among the cytosolic tail did not abolish ubiquitination of HC. Rather, it has been proposed that the ubiquitination site was chosen by spatial constraints when the viral E3 ligase is bringing a cellular E2 in proximity of the substrate (Cadwell and Coscoy 2005; Wang et al. 2007b; Cadwell and Coscoy 2008; Herr et al. 2009).

In a recent study, we provided evidence that the ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 can represent an early signal triggering dislocation of CD4 since mutation of all CD4 cytosolic lysine residues rendered this CD4 mutant less susceptible to Vpu (Binette et al. 2007). However, the fact that we did not observe a complete abolition of CD4 degradation when cytosolic lysines are mutated and that some non-lysine residues (S, T and C) have been demonstrated to be used as Ub acceptor sites (Cadwell and Coscoy 2005;

Carvalho et al. 2007; Platta et al. 2007; Tait et al. 2007; Cadwell and Coscoy 2008) prompted us to emit the hypothesis that ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 could involve non-lysine residues.

The goal of this paper was first to confirm that the ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 represent an early necessary step during Vpu-mediated CD4 degradation process. We next wanted to determine if Ub could be attached on non-lysine residues in the cytosolic tail of CD4 in presence of Vpu and to identify these residues.

We thus investigated in more details the necessity of the ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 as an essential step during the process of Vpu-mediated CD4 degradation. As such, we tested the involvement of non-lysine residues of CD4 cytosolic tail in this process. The data presented here show that a CD4 mutant lacking all potential ubiquitination sites (K, C, S and T) in its cytosolic tail (CD4 KCST) is absolutely insensitive to Vpu-mediated proteolysis. Cytosolic serine or threonine re-insertion was not sufficient to render CD4 KCST sensitive to Vpu. We found however that cytosolic cysteine residues were sufficient to render this CD4 mutant partially sensitive to Vpu.

## RESULTS

### *Mutation of all potential ubiquitin acceptor sites in the cytosolic tail of CD4 renders CD4 insensitive to Vpu*

In order to evaluate whether ubiquitination of the CD4 cytosolic tail is necessary for Vpu-mediated CD4 degradation, we generated a CD4 mutant lacking all cytosolic potential Ub acceptor residues (K, C, S and T). In this mutant, lysine, cysteine, serine and threonine were each substituted with amino acids with similar structure and/or charge (Fig. 1A) as was done for the studies on MHC-1 HC down-regulation from cell surface or degradation induced by viral E3 ligases (Cadwell and Coscoy 2005; Wang et al. 2007b). This was done in order to conserve the tri-dimensional structure of CD4 cytosolic tail, the interaction with Vpu and putative interactions with cellular proteins.

In a previous work, we described the CD4 KR mutant in which all cytosolic lysines were replaced with arginines. This mutant was less sensitive to Vpu than CD4 wt in a system where CD4 was expressed under an HIV-1 LTR promoter in cells transfected with HIV-1 proviruses (Binette et al. 2007). In the study presented here, we expressed CD4 and

Vpu from expressors with CMV promoters in SV40-transformed human embryonic kidney fibroblasts (HEK 293T) cells treated with BFA in order to retain CD4 in the ER. We took advantage that in this system where no viral gene is expressed, CD4 KR is degraded by Vpu with the same kinetic than CD4 wt.

This discrepancy with our previous results (Binette et al. 2007) is probably due to differences between the two experimental systems used. It is possible that CD4 KR is more expressed from CMV promoters than when its expression is driven by HIV-1 LTR. Therefore, the overexpression of CD4 when it is expressed from CMV promoters could decrease the half life of CD4 in HEK 293T cells, resulting in an apparent acceleration of its degradation in presence of Vpu. In both systems, however, CD4 KR is sensitive to Vpu, demonstrating that cytosolic lysines are dispensable for Vpu-mediated CD4 degradation in HEK 293T cells. We therefore think that the experimental system in which CD4 and Vpu are expressed from CMV promoters in HEK 293T cells is reliable and we chose this system here in order to be sure that no potential bystander effect of other viral proteins would interfere with our results.

CD4 and Vpu expressing cells were pulsed with  $^{35}\text{S}$  and the amount of radio-labeled CD4 was measured at different time by immunoprecipitation. Besides the CD4 KR mutant, we tested the sensitivity to Vpu of the CD4 KCST mutant (Fig. 1A) in which all cytosolic potential ubiquitination sites (K, C, S and T) were mutated. We also verified the sensitivity to Vpu of the CD4 N mutant that contains no cytosolic lysines and is mutated in all other potential ubiquitination sites that are usually upstream of the EKKT motif of CD4 wt, except for S415 (Fig. 1A). The potential ubiquitination sites (serines, threonines and cysteines) that are present downstream (in C-terminal) of the EKKT motif of the cytosolic domain of CD4 N were conserved (Fig. 1A).

First of all, we can observe a rapid degradation of CD4 wt on a 3 h chase period in presence of Vpu (Fig. 1B, lanes 5-6 compared to lanes 3-4 of the upper panel and graph). As was previously described (Binette et al. 2007), CD4 KR is also sensitive to Vpu (Fig. 1B, compare lanes 9-10 to lanes 7-8 of the upper panel and graph). However, the mutation of all potential ubiquitination sites in the cytosolic tail of CD4 (CD4 KCST) renders CD4 completely resistant to Vpu (Fig. 1B, compare lanes 13-14 to lanes 11-12 of the upper panel and graph). Interestingly, when only the N-terminal portion of the cytosolic tail is mutated (CD4 N), this CD4 is still degraded in presence of Vpu but with less efficiency (Fig. 1B, compare lanes 17-18 to lanes 15-16 of the upper panel and graph).

We also verified the capacity of these CD4 mutants to bind to a phosphorylation mutant of Vpu (Vpu S52,56/D) in order to make sure that the resistance of CD4 KCST was not due to a lack of binding to Vpu (Fig. 1C). HEK 293T cells were transfected as in Fig. 1B and labeled with  $^{35}\text{S}$ . After lysis, the CD4-Vpu conjugates were immunoprecipitated with monoclonal anti-CD4 antibodies. The signals corresponding to the Vpu proteins that were pulled-down with the anti-CD4 (bound Vpu) were measured relative to the total amount of Vpu (bound + unbound Vpu) and to the amount of CD4 that was recovered by immunoprecipitation. Each measure was compared to the binding of Vpu to CD4 wt in order to obtain a relative percentage of binding value.

Results of Fig. 1C show that CD4 KCST and CD4 N mutants have a decreased Vpu binding capacity compared to CD4 wt or CD4 KR, but they still retain a significant capacity to bind to Vpu (see graph of Fig. 1C). Then, the fact that CD4 KCST is not sensitive to Vpu can probably not be explained by a lack of binding to Vpu since its relative binding capacity is almost the same as CD4 N which is degraded in presence of Vpu (Fig. 1B). These results suggest that ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 is necessary to induce Vpu-mediated CD4 degradation and that this ubiquitination could involve, in addition to lysine residues, non-lysine residues.

***Re-insertion in CD4 KCST of C-terminal serine or threonine residues is not sufficient to render CD4 KCST sensitive to Vpu***

Because we observed that CD4 N was partially sensitive to Vpu, we hypothesized that some non-lysine residues downstream of the EKKT motif of the cytosolic tail of CD4 are still available for ubiquitination. The most studied example of the use of non-lysine residues for ubiquitination in order to induce degradation by the Ub-proteasome system is the degradation of MHC-I HC induced by the viral Ub ligase mk3 of  $\gamma$ -HV68 (Wang et al. 2007b). In that system, mk3 is able to induce ubiquitination on serine and threonine residues but not on cysteines. We thus decided to test the possibility that cytosolic serine or threonine could serve as potential ubiquitination sites in CD4's cytosolic tail.

For this purpose, we re-inserted one serine near the C-terminal end of the cytosolic tail of CD4 (CD4 KCST(S)) or the two threonines that were present in this region of CD4 (CD4 KCST(2T)) in the background of CD4 KCST (Fig. 2A). We did not specifically verify the importance for Vpu-mediated CD4 degradation of the serines (S408 and S415) that are present upstream of the EKKT motif. However, they were absent in CD4 N and



still this mutant was partially sensitive to Vpu, suggesting that they are not required for CD4 degradation. In addition, it has previously been shown that replacement of S408 or S415 by alanine did not prevent CD4 degradation (Lenburg and Landau 1993).

We next evaluated by pulse-chase radio-labeling, as in Fig. 1B, the sensitivity to Vpu of these two CD4 mutants compared to CD4 KCST. Neither the re-insertion of serine (Fig. 2B, compare lanes 17-18 to lanes 15-16 of the upper panel and graph), nor the re-insertion of threonines (Fig. 2B, compare lanes 21-22 to lanes 19-20 of the upper panel and graph) in the CD4 KCST background rendered CD4 sensitive to Vpu.

The CD4 signal for the CD4 KCST(2T) mutant is increasing in time both in absence (Fig. 2B lanes 19-20) and in presence (Fig. 2B lanes 21-22) of Vpu but this mutant was indeed resistant to Vpu (compare CD4 signal at 3 h in presence (lane 22) and in absence of Vpu (lane 20)). Finally, the resistance to Vpu of these two CD4 mutants (KCST(S) and KCST(2T)) is probably not due to a defect in Vpu interaction since these mutants still interact with Vpu, although CD4 KCST(S) binds Vpu with less efficiency than wt CD4 (Fig. 2C). These results suggest that neither serine nor threonine residues in the C-terminal part of the cytosolic tail of CD4 are sufficient to render CD4 KCST sensitive to Vpu.

***Cysteine residues in the cytosolic tail of CD4 are sufficient to render CD4 partially sensitive to Vpu***

Other reports involving the ubiquitination of non-lysine residues are the induction of the internalization and subsequent degradation in lysosomes of MHC-I HC following mono-ubiquitination on lysine or cysteine by the KSHV proteins MIR1 and MIR2 (Cadwell and Coscoy 2005; Cadwell and Coscoy 2008). Interestingly, in addition to this viral-induced phenomenon, it was shown that apoptosis induction requires the degradation by the proteasome of the N-terminal fragment of Bid (tBid-N) following its ubiquitination on either serine, threonine or cysteine residues (Tait et al. 2007). It is important to note that tBid-N has no lysine residues in its sequence and is unlikely to be ubiquitinated on its N-terminal residue (Tait et al. 2007). The ubiquitination of tBid-N was the first example of naturally occurring unconventional ubiquitination on non-lysine residues (including cysteines) in mammalian cells that serves as signal for subsequent degradation by the proteasome.

We thus decided to investigate if cysteine residues can be used as ubiquitination sites in the process of Vpu-mediated CD4 degradation. For this purpose, we created a CD4

mutant (CD4 KCST(3C)) in which three cysteines were re-inserted near the C-terminal end of the cytosolic tail of CD4 KCST mutant (Fig. 3A). We next tested the sensitivity to Vpu of this mutant by pulse-chase radio-labeling as in Fig. 1B.

Interestingly, CD4 KCST(3C) was partially sensitive to Vpu at approximately the same level as CD4 N (Fig. 3B, compare lanes 17-18 to lane 15-16 of upper panel and graph). Finally, CD4 KCST(3C) was interacting with Vpu at the same level as CD4 KCST (Fig. 3C). Thus, the presence of three cysteines downstream of the EKKT motif of the cytosolic tail of CD4 (CD4 KCST(3C)) was sufficient to render this mutant partially sensitive to Vpu to the same extent than CD4 N (where non-lysine potential Ub acceptor residues are only present downstream of the EKKT motif) (Fig. 3B).

## DISCUSSION

We previously showed that a CD4 mutant in which all cytosolic lysines were mutated (CD4 KR) was still sensitive to Vpu-mediated degradation but less than wild-type CD4 (Binette et al. 2007). Based on these results and on the fact that CD4 is ubiquitinated in presence of Vpu, we hypothesized that the cytosolic tail of CD4 could be ubiquitinated on non-lysine residues (serine, threonine or cysteine), in addition to lysine, in order to be degraded (Binette et al. 2007).

In the present study, we examined in more details the requirements in the cytosolic tail of CD4 for Vpu-mediated CD4 degradation. For this purpose, we first verified the sensitivity to Vpu of the CD4 KR (where all cytosolic lysines are replaced by arginines), CD4 KCST (where all cytosolic potential Ub acceptor residues are mutated) and CD4 N (where non-lysine potential Ub acceptor residues are only present in the C-terminal portion of the cytosolic tail). According to our results, mutation of all potential cytosolic ubiquitination sites (CD4 KCST) renders CD4 completely resistant to Vpu-mediated degradation. In addition, mutation of the potential cytosolic Ub acceptor residues upstream of the EKKT motif (CD4 N) reduced the sensitivity to Vpu but did not completely abolish Vpu-mediated CD4 degradation. This result suggested that some residues in the C-terminal portion of the cytosolic tail of CD4 N seem to be involved in Vpu-mediated degradation.

The resistance of CD4 KCST to Vpu was probably not completely due to a lack of interaction between CD4 KCST and Vpu. As shown in Fig. 1C, Vpu was still interacting with CD4 KCST, although less than with CD4 wt. However, the presence of potential ubiquitination sites downstream of the Vpu-binding EKKT motif in CD4 cytosolic tail (CD4 N and CD4 KCST(3C)) rendered these mutants partially sensitive to Vpu and their capacity of interaction with Vpu was not different from CD4 KCST who was resistant to Vpu. Up to now, we can not rule out that CD4 could be ubiquitinated on luminal lysines following binding of Vpu to its cytosolic tail. It is still possible that the degradation of CD4 KCST is blocked at an undefined step of the process induced by Vpu that would necessitate the cytosolic cysteines that were re-introduced in CD4 KCST(3C).

We next tested the contribution of cytosolic serine and threonines as potential ubiquitination sites in CD4. We verified the sensitivity to Vpu of CD4 KCST(S) and CD4 KCST(2T). The cytosolic tail of these mutants contains only one serine (S431 for CD4 KCST(S)) or two threonines (T419 and T429 for CD4 KCST(2T)) as potential ubiquitination sites. As shown in Fig. 2B, these residues (S and T) do not seem to be responsible for the residual degradation of the CD4 N mutant as these CD4 mutants remain resistant to Vpu. It is important to note that S415 was not re-inserted in the CD4 KCST(S) mutant. Therefore, we can not rule out that this serine could be used as a potential ubiquitination site. However, re-insertion of three cysteines downstream of the EKKT motif in the absence of S415 rendered CD4 partially sensitive to Vpu, meaning that S415 is not absolutely required for Vpu-mediated CD4 degradation. Indeed, a previous mutational study reported that this serine is not required for Vpu-mediated CD4 degradation (Lenburg and Landau 1993)

The CD4 KCST(2T) mutant was not degraded in presence of Vpu, but the CD4 signal for this mutant was reproducibly increasing in time (Fig. 2B). We hypothesized that the mutations introduced in CD4 KCST(2T) slow down its folding process. For this reason, this mutant could not be fully recognized at the beginning of the chase by the conformational antibody (OKT4) that was used to immunoprecipitate CD4. The amount of fully folded radio-labeled CD4 at time 0 was probably less than at 3h of chase time and that would explain the increase of signal we observed over time. CD4 KCST(2T) slow folding kinetic could also alter its recognition by the E3 ligase, thus explaining its resistance to Vpu. However, there is a substantial amount of fully folded CD4 KCST(2T) at 3 hrs of chase that could theoretically be recognized by the E3. Still, Vpu did not affect CD4

KCST(2T) levels after a 3 hrs chase period (Fig. 2B, compare lane 22 with lane 20). In addition, this mutant seems to interact more efficiently with Vpu than the other mutants suggesting that this mutant can eventually reach a conformation that is functional at least for Vpu interaction.

The portion of the cytosolic tail of CD4 downstream of the EKKT motif contains three cysteine residues (C420, C422 and C430). Our hypothesis was that one or more of these cysteines could be used as Ub acceptor sites by the E3 ligase SCF<sup>β-TrCP</sup> in presence of Vpu, at least when cytosolic lysines are mutated. We verified if these cysteines were responsible for the residual degradation of CD4 N in presence of Vpu. The Fig. 3B shows that these three cysteines, as the only potential Ub acceptor residues in the cytosolic tail, are sufficient to render CD4 at least partially sensitive to Vpu.

Interestingly, although we presented here results suggesting that the cytosolic cysteines in C-terminal of CD4 seem to be important for Vpu-mediated CD4 degradation, previous deletion studies have demonstrated that the C-terminal portion of the cytosolic tail of CD4 (encompassing C420, C422 and C430) was dispensable for this process (Chen et al. 1993; Vincent et al. 1993). In addition, it has been shown that mutation of C422 did not prevent Vpu-mediated CD4 degradation (Lenburg and Landau 1993).

We propose here a proximity-driven ubiquitination model that could reconcile the fact that in these studies, the N-terminal portion of the cytosolic tail is sufficient to render CD4 sensitive to Vpu while in our hands, C-terminal cysteines seem to allow some level of CD4 degradation in an otherwise KCST-less background. A similar model has been proposed recently for the down-regulation of MHC-I HC by MIR1 and MIR2 proteins of KSHV (Cadwell and Coscoy 2008) in which the choice of Ub acceptor residues in the cytosolic tail of HC is flexible in term of position and kind of residue chosen (lysine or cysteine). In a similar proximity model, the binding of Vpu to CD4 and β-TrCP could bring the E2 present in the SCF<sup>β-TrCP</sup> complex in proximity of potential ubiquitination sites in the cytosolic tail of CD4, whether they are in N or in C-terminal. The efficiency of the ubiquitination process would vary with the distance of the cytosolic residue from the membrane of the ER. Indeed, during MIR1- and MIR2-induced HC downregulation, cysteines or lysines positionned all over HC cytosolic tail (up to 25-30 amino acids apart from each other) could be either used as Ub acceptor residues with different efficiency (Cadwell and Coscoy 2008).

During Vpu-mediated CD4 degradation, the primary Ub acceptor residues would probably be cytosolic lysines because, in addition to our previous results with CD4 KR (Binette et al. 2007), data obtained in yeast cells (Meusser and Sommer 2004) and in HeLa cells (Schubert et al. 1998) have shown that mutation of cytosolic lysines of CD4 abolished CD4 degradation. In the previously mentioned CD4 deletion studies, the cytosolic tail of CD4 was truncated at different length from the C-terminal end. According to the proximity-driven ubiquitination model, the contribution of potential ubiquitination sites in C-terminal of cytosolic tail of CD4 would have been masked following truncation. The ubiquitination sites that remained in the N-terminal portion of the cytosolic tail would then be sufficient to induce CD4 degradation. However, based on our results, it is possible that cysteines could be used as secondary ubiquitination sites in a context where no lysine is available. This would explain why the CD4 KCST(3C) and CD4 N are not as sensitive to Vpu than CD4 wt. Whether ubiquitination of cysteines in CD4 would be physiologically relevant or not remains to be determined. However, this model implies some plasticity of the E3 ligase complex SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> in the choice of residues that can be ubiquitinated in the cytosolic tail of CD4 in presence of Vpu.

To confirm this model, it would be interesting in the future to verify the sensitivity to Vpu of a CD4 mutant containing potential ubiquitination sites only upstream of the EKKT motif. In addition the contribution of cysteines as potential ubiquitination sites can be tested by treatment of poly-ubiquitinated CD4 conjugates with  $\beta$ -mercaptoethanol at pH 11 in order to break potential thiolester bonds (cysteine-Ub bond) without affecting lysine-Ub bond (Cadwell and Coscoy 2005). The potential role of cytosolic tail ubiquitination as an early signal triggering dislocation of CD4 from the ER membrane could be evaluated using CD4 KCST as control. If this hypothesis was true, appearance of poly-ubiquitinated forms of CD4 in the cytosol should be abolished by the cytosolic KCST mutations.

Although the studies presented here involved CD4 mutants lacking cytosolic lysine residues, there is evidence that ubiquitination on non-lysine residues is indeed physiologically significant in mammalian cells. In addition to the degradation by the proteasome of tBid-N following its ubiquitination on either serine, threonine or cysteine residues (Tait et al. 2007), it has been shown that the mammalian peroxisomal import receptor Pex5p is ubiquitinated on a cysteine residue in order to induce its recycling (Carvalho et al. 2007; Platta et al. 2007; Williams et al. 2008). It is noteworthy that the

formation of thiolester bound between Ub and cysteine seems to involve a particular family of Ub conjugating enzymes (E2) named UBCH5/UBE2D (Grou et al. 2008). In addition, the UBE2D family of E2s is ubiquitously expressed in human cells, among those are kidney cells, Jurkat cells, HeLa cells and peripheral blood lymphocytes (Jensen et al. 1995; Okamoto et al. 2003). Finally, Grou and colleagues suggested that cysteine ubiquitination could be a common phenomenon in mammalian cells because these E2s are active with a variety of E3s (Brzovic and Klevit 2006), they mediate a large fraction of the total ubiquitination activity (at least in rat liver cells) (Rajapurohitam et al. 2002) and they can ubiquitinate proteins on cysteine residues.

Interestingly, it has been shown that SCF<sup>β-TrCP</sup> can work with three different human E2s (UBC3, UBC4/UBCH5B/UBE2D2 and UBCH5C/UBE2D3) in order to induce poly-ubiquitination of IκBα (Gonen et al. 1999; Strack et al. 2000)), thus suggesting some flexibility of the SCF<sup>β-TrCP</sup> complex in the recruitment of E2s. There is also evidence that Ub is donated to the substrate directly by the E2 present in the SCF<sup>β-TrCP</sup> complex, demonstrating the critical role of the E2 in ubiquitination process while the E3 positions the selected substrate in proximity of the E2 (Strack et al. 2000). Interestingly, two of the E2s involved in IκBα poly-ubiquitination (UBE2D2 and UBE2D3) have the capacity to attach Ub on cysteine (Grou et al. 2008). In addition, the same E2s are involved in ubiquitination of MHC-I HC by the MIR1 protein of KSHV (Duncan et al. 2006) and MIR1 can induce mono-ubiquitination on either lysine or cysteine residues in HC cytosolic tail (Cadwell and Coscoy 2005).

Based on these reports, it is conceivable that the E3 ligase SCF<sup>β-TrCP</sup> recruits in mammalian cells at least one E2 that is able to ubiquitinate on cysteine residues. This could explain the residual degradation of CD4 N and CD4 KCST(3C) that could be due to ubiquitination of CD4's cytosolic cysteines by SCF<sup>β-TrCP</sup>. To our knowledge, the identity of the E2 involved in CD4 ubiquitination in presence of Vpu is still unknown.

It is important to note that two of the three cysteines present in the CD4 KCST(3C) (C420 and C422) are normally involved in the interaction of CD4 with the p56<sup>lck</sup> kinase at the cell surface of T cells (Rudd et al. 1988; Veillette et al. 1988; Shaw et al. 1989; Shaw et al. 1990; Turner et al. 1990). In addition, it has been shown that p56<sup>lck</sup>, CD4 and gp160 are found in the same complex in the ER (Crise and Rose 1992a). Association of p56<sup>lck</sup> with CD4 in p56<sup>lck</sup>-expressing cells, such as naturally HIV-1 infected cells, would then mask

C420 and C422 to the E3 ligase, and as such, would prevent potential ubiquitination on these residues.

However, it has been shown that, in contrast to CD4<sup>+</sup> T cells, CD4 is not interacting with p56<sup>lck</sup> in primary monocytes, monocytic cell lines and macrophages (Pelchen-Matthews et al. 1991; Vinante et al. 1992; Sorio et al. 1993) suggesting that in a subset of HIV-1 target cells, cytosolic cysteines of CD4 would be accessible for poly-ubiquitination. It would still be interesting to verify if Vpu is able to induce the degradation of CD4 molecules containing only these three cysteine residues as cytosolic ubiquitination sites (CD4 KCST(3C)) in cells in which CD4 is interacting with p56<sup>lck</sup>, like Jurkat cells.

Finally, the results presented here suggest that the ubiquitination of the cytosolic tail of CD4 could represent an early step necessary for Vpu-mediated CD4 degradation. Our results also suggest that Vpu-mediated CD4 degradation seem to involve variable CD4 cytosolic determinants as C-terminal cytosolic cysteines rendered an otherwise KCST-less CD4 partially sensitive to Vpu when they seem to be dispensable in a CD4 wt context. To explain these results, we propose a proximity model in which the choice of ubiquitination sites in the cytosolic tail of CD4 by the E3 ligase is flexible. In conclusion, these results shed more light on the mechanism underlying Vpu-mediated CD4 degradation and could potentially give insights on the function of a cellular E3 ligase.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **DNA constructions**

SVCMV CD4 and SVCMV CD4 KRcyto were described previously (Binette et al. 2007). SVCMV CD4 KCST in which all lysine, cysteine, serine and threonine residues of the cytosolic tail of CD4 were mutated (see Fig. 1 for the details of the substitutions) was constructed by site-directed mutagenesis by PCR from SCVMV CD4 KRcyto. The final PCR product created from CD4 KRcyto and containing the additional mutations started at the natural SacI site in the middle of CD4 sequence and contained an additional non-natural SacI site in the non coding region of CD4. This PCR product was digested with SacI and inserted into SVCMV CD4 (in which the CD4 sequence was originally embedded between two XbaI sites), thus making CD4 cloned XbaI-SacI in the new plasmids. The XbaI site in 3' region of CD4 in the original plasmid is abolished. SVCMV CD4 KCST N, (S), (2T) and (3C) were generated by PCR-based site-directed mutagenesis from SVCMV CD4 KCST and cloned the same way in SVCMV CD4.

The Vpu expression plasmid, SVCMV Vpu has been described previously (Yao et al. 1992). The SVCMV Vpu S52,56/D was created by site-directed mutagenesis as previously described (Tiganos et al. 1998).

### **Cell lines and transfections**

SV40-transformed human embryonic kidney fibroblasts (HEK 293T) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Wisent Inc., Saint-Bruno, Québec) supplemented with 5% of fetal bovine serum (FBS) (Wisent Inc.) (DMEM+5%). For transfections, 100-mm petri dishes were seeded with 1,3 million cells and cultured overnight in DMEM+5%. Cells were then co-transfected with a mixture of the indicated DNA plasmids by the calcium-phosphate method.

### **Antibodies and chemical compounds**

The anti-CD4 (OKT4) monoclonal antibody was derived from ascitic fluids of Balb/c mice that were injected with the OKT4 hybridoma. The OKT4 hybridoma was obtained from the ATCC. Rabbit anti-Vpu serum was raised by immunization of rabbits with a synthetic peptide corresponding to amino acids 73-81 of the HIV-1 BH10 Vpu



protein (Cohen et al. 1988). BFA was obtained from Sigma Chemical Co (Saint-Louis, Missouri). BFA was stored as a stock solution of 10 mM in ethanol at -20°C.

### **Metabolic labeling and radio-immunoprecipitation**

Pulse-chase analyses of CD4 degradation experiments were all performed 48 h post-transfection. Transfected cells were starved in methionine-free DMEM+5% in the presence of 10  $\mu$ M BFA for 30 min before labeling. Cells were then pulse-labeled for 30 min with 800  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine ([<sup>35</sup>S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts) and chased in complete DMEM+5% supplemented with 10  $\mu$ M BFA. At the indicated time periods, radio-labeled cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA-DOC) buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Nonidet-P40, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1.2 mM deoxycholate (DOC), pH 7.2) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Laval, Québec).

CD4-Vpu binding experiments were performed 48 h post-transfection. Transfected cells expressing CD4 and a phosphorylation mutant of Vpu (Vpu S52,56/D) were first starved in methionine-free DMEM+5% for 30 min. Cells were then labeled for 2 h with 400  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and lysed in CHAPS buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% CHAPS, pH 7.2) supplemented with a cocktail of protease inhibitors.

Following lysis, labeled protein lysates were sequentially immunoprecipitated with anti-CD4 OKT4 monoclonal antibodies and subsequently with a rabbit anti-Vpu serum as described previously (Tiganos et al. 1997).

Immunoprecipitates were resolved on a 12.5% SDS-poly-acrylamide tricine gel and analyzed by autoradiography. Scanning of the autoradiograms was performed on an AGFA Duoscan T1200 scanner. Densitometric analysis of autoradiograms was performed with Image Quant 5.0 from Molecular Dynamics (Sunnyvale, California).

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

JB designed, performed all the experiments and participated to data analysis. She also wrote the manuscript. EAC conceived the study and participated to data analysis.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was performed by JB in partial fulfillment of her doctoral thesis and was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-14228) and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to EAC. EAC holds the Canada Research Chair in Human Retrovirology.

## REFERENCES

- Aiken, C., J. Konner, et al. (1994). "Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain." Cell **76**(5): 853-64.
- Bijlmakers, M. J. (2009). "Protein acylation and localization in T cell signaling (Review)." Mol Membr Biol **26**(1): 93-103.
- Binette, J., M. Dube, et al. (2007). "Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum." Retrovirology **4**: 75.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (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**(3): 1510-20.
- Brzovic, P. S. and R. E. Klevit (2006). "Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous?" Cell Cycle **5**(24): 2867-73.
- Cadwell, K. and L. Coscoy (2005). "Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase." Science **309**(5731): 127-30.
- Cadwell, K. and L. Coscoy (2008). "The specificities of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded E3 ubiquitin ligases are determined by the positions of lysine or cysteine residues within the intracytoplasmic domains of their targets." J Virol **82**(8): 4184-9.
- Carvalho, A. F., M. P. Pinto, et al. (2007). "Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **282**(43): 31267-72.
- Chen, M. Y., F. Maldarelli, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity." J Virol **67**(7): 3877-84.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, et al. (1988). "Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1." Nature **334**(6182): 532-4.
- Crise, B., L. Buonocore, et al. (1990). "CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor." J Virol **64**(11): 5585-93.

- Crise, B. and J. K. Rose (1992a). "Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor retains a CD4-p56lck complex in the endoplasmic reticulum." J Virol **66**(4): 2296-301.
- Crise, B. and J. K. Rose (1992b). "Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor." J Biol Chem **267**(19): 13593-7.
- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Duncan, L. M., S. Piper, et al. (2006). "Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules." Embo J **25**(8): 1635-45.
- Friborg, J., A. Ladha, et al. (1995). "Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **8**(1): 10-22.
- Fuchs, S. Y., V. S. Spiegelman, et al. (2004). "The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer." Oncogene **23**(11): 2028-36.
- Gonen, H., B. Bercovich, et al. (1999). "Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ ." J Biol Chem **274**(21): 14823-30.
- Grou, C. P., A. F. Carvalho, et al. (2008). "Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **283**(21): 14190-7.
- Herr, R. A., J. Harris, et al. (2009). "Role of the RING-CH Domain of Viral Ligase mK3 in Ubiquitination of Non-Lysine and Lysine MHC I Residues." Traffic.
- Jensen, J. P., P. W. Bates, et al. (1995). "Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes." J Biol Chem **270**(51): 30408-14.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.
- Klimkait, T., K. Strebel, et al. (1990). "The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release." J Virol **64**(2): 621-9.
- Lama, J., A. Mangasarian, et al. (1999). "Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner." Curr Biol **9**(12): 622-31.

- 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**(12): 7238-45.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (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**(30): 28346-53.
- Maddon, P. J., D. R. Littman, et al. (1985). "The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family." Cell **42**(1): 93-104.
- Maldarelli, F., M. Y. Chen, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein." J Virol **67**(8): 5056-61.
- Margottin, F., S. P. Bour, et al. (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**(4): 565-74.
- Meusser, B. and T. Sommer (2004). "Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation." Mol Cell **14**(2): 247-58.
- Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." Nature **451**(7177): 425-30.
- Okamoto, Y., T. Ozaki, et al. (2003). "UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme." Cancer Res **63**(14): 4167-73.
- Pelchen-Matthews, A., J. E. Armes, et al. (1991). "Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and nonlymphocytic cells." J Exp Med **173**(3): 575-87.
- Pelchen-Matthews, A., I. J. Parsons, et al. (1993). "Phorbol-ester-induced down-regulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting." J. Exp. Med. **178**: 1209-1222.
- Pitcher, C., S. Höning, et al. (1999). "CD4 endocytosis and adaptor complex binding require activation of CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation." Mol. Biol. Cell **10**: 677-691.
- Platta, H. W., F. El Magraoui, et al. (2007). "Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling." J Cell Biol **177**(2): 197-204.

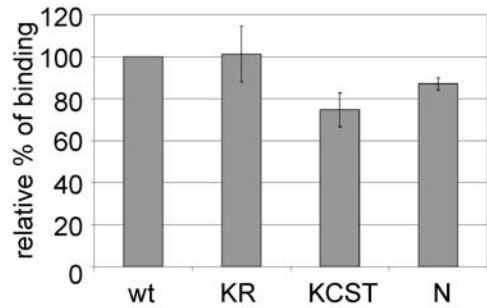
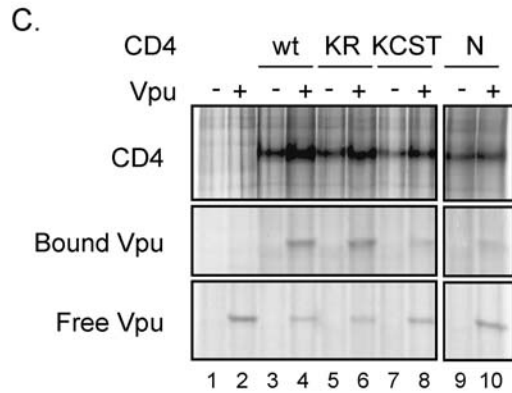
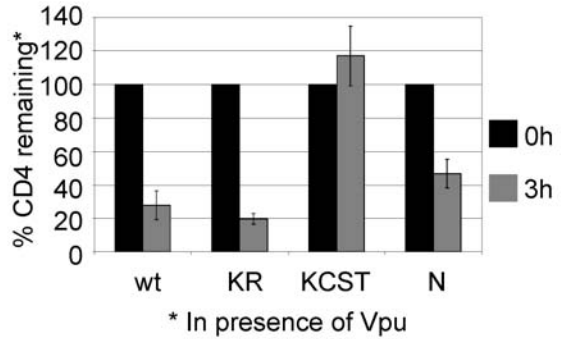
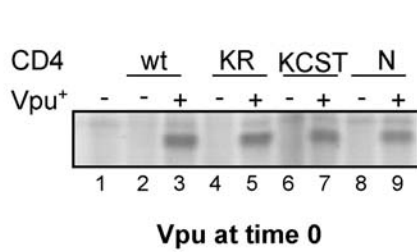
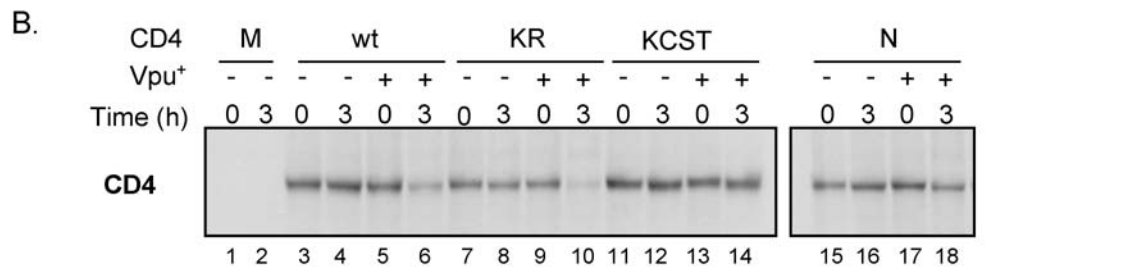
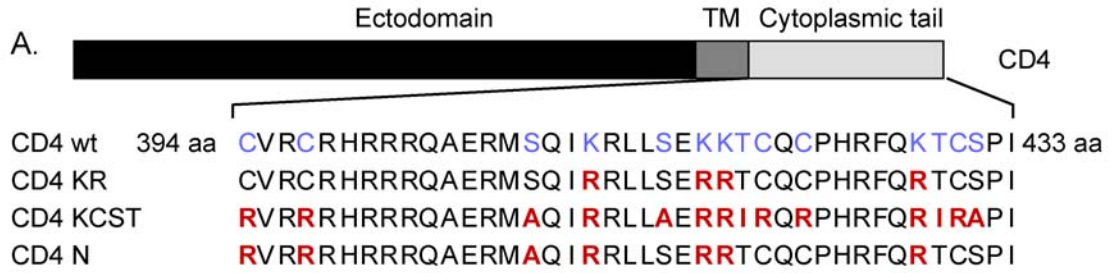
- Rajapurohitam, V., N. Bedard, et al. (2002). "Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(4): E739-45.
- Rhee, S. S. and J. W. Marsh (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4." J Virol **68**(8): 5156-63.
- Rudd, C. E., J. M. Trevillyan, et al. (1988). "The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5190-4.
- Schubert, U., L. C. Anton, et al. (1998). "CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway." J Virol **72**(3): 2280-8.
- Schubert, U., K. A. Clouse, et al. (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**(12): 7699-711.
- Schubert, U., T. Schneider, et al. (1992). "Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II." Eur J Biochem **204**(2): 875-83.
- Shaw, A. S., K. E. Amrein, et al. (1989). "The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain." Cell **59**(4): 627-36.
- Shaw, A. S., J. Chalupny, et al. (1990). "Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase." Mol Cell Biol **10**(5): 1853-62.
- Sorio, C., D. Saggiaro, et al. (1993). "The monosialoganglioside GM1 induces internalisation and degradation of the CD4 antigen in U937 cells: evidence for a novel mechanism of CD4 down-modulation in a p56lck-negative cell line, which is independent of protein kinase C activation." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 1105-10.
- Strack, P., M. Caligiuri, et al. (2000). "SCF(beta-TRCP) and phosphorylation dependent ubiquitination of I kappa B alpha catalyzed by Ubc3 and Ubc4." Oncogene **19**(31): 3529-36.
- Strebel, K., T. Klimkait, et al. (1988). "A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product." Science **241**(4870): 1221-3.

- Tait, S. W., E. de Vries, et al. (2007). "Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment." J Cell Biol **179**(7): 1453-66.
- Tanaka, M., T. Ueno, et al. (2003). "Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1." Virology **311**: 316-325.
- Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, et al. (1989). "Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5163-7.
- Tiganos, E., X. J. Yao, et al. (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**(6): 4452-60.
- Tiganos, E., J. Friberg, et al. (1998). "Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." Virology **251**(1): 96-107.
- Turner, J. M., M. H. Brodsky, et al. (1990). "Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs." Cell **60**(5): 755-65.
- Van Damme, N., D. Goff, et al. (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." Cell Host Microbe **3**(4): 245-52.
- Varthakavi, V., R. M. Smith, et al. (2003). "Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15154-9.
- Veillette, A., M. A. Bookman, et al. (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." Cell **55**(2): 301-8.
- Vinante, F., G. Pizzolo, et al. (1992). "The CD4 molecule belongs to the phenotypic repertoire of most cases of acute myeloid leukemia." Leukemia **6**(12): 1257-62.
- Vincent, M. J., N. U. Raja, et al. (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**(9): 5538-49.

- Wang, X., R. A. Herr, et al. (2007). "Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3." J Cell Biol **177**(4): 613-24.
- Wildum, S., M. Schindler, et al. (2006). "Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection." J Virol **80**(16): 8047-59.
- Willey, R. L., A. Buckler-White, et al. (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**(2): 1207-12.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992a). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4." J Virol **66**(12): 7193-200.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992b). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." J Virol **66**(1): 226-34.
- Williams, C., M. van den Berg, et al. (2008). "Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p." Biochem Biophys Res Commun **374**(4): 620-4.
- Yao, X. J., J. Friborg, et al. (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**(2): 615-23.
- Yao, X. J., H. Gottlinger, et al. (1992). "Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export." J Virol **66**(8): 5119-26.



**Figure 1: Mutation of all potential ubiquitin acceptor sites in the cytosolic tail of CD4 renders CD4 insensitive to Vpu.** A. Schematic presentation of CD4 showing the amino acid composition of the cytosolic tail of CD4 wt, CD4 KR, CD4 KCST and CD4 N. The amino acids that were substituted are shown in red for each mutant. B. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu<sup>-</sup> or Vpu<sup>+</sup>. Transfected cells were treated with BFA, pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and chased with complete media with BFA for 3 h. Cells were then lysed and immunoprecipitated sequentially with anti-CD4 (OKT4) first (upper panel) and then with anti-Vpu antibodies (lower panel, Vpu was immunoprecipitated from lysates at time 0 only). Using quantitative scanning of CD4 bands from two independent experiments, the percentage of CD4 remaining over time as compared to time 0 is plotted for each transfection (in presence of Vpu only) and is shown in the graph. C. HEK 293T cells were mock transfected, transfected with SVCMV Vpu S52,56/D or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu S52,56/D. Transfected cells were treated with BFA and labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine for 2 h. Cells were then lysed in CHAPS buffer and the amount of Vpu bound to CD4 was measured following immunoprecipitation of CD4 with anti-CD4 (OKT4) antibodies. The Vpu remaining in the lysate was then immunoprecipitated with anti-Vpu antibodies. The graph shows the relative % of binding compared to CD4 wt from two independent experiments.

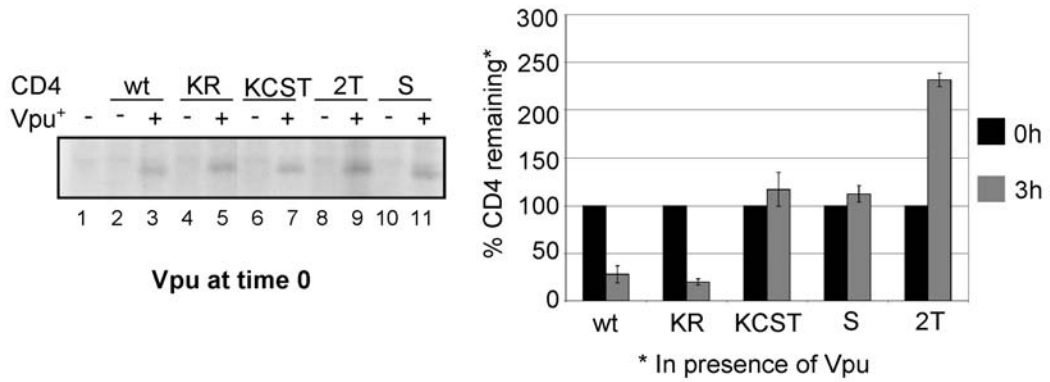
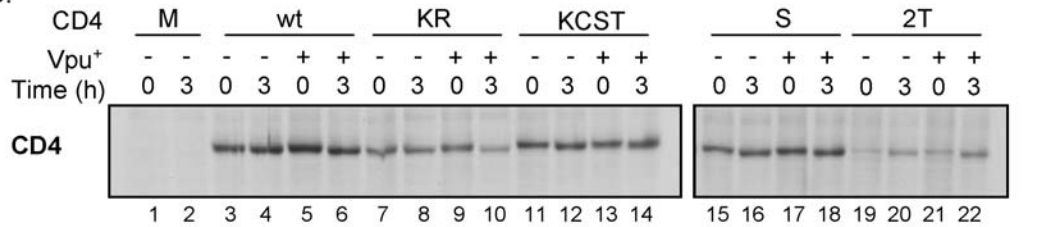


**Figure 2: Re-insertion in CD4 KCST of C-terminal serine or threonine residues is not sufficient to render CD4 KCST sensitive to Vpu.** A. Amino acid composition of the cytosolic tail of CD4 wt, CD4 KCST, CD4 N, CD4 KCST(S) and CD4 KCST(2T). The amino acids that were substituted are shown in red for each mutant. The blue amino acids in CD4 KCST(S) and CD4 KCST(2T) represent residues that were mutated back to the wt sequence from a KCST background. B. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu<sup>-</sup> or Vpu<sup>+</sup>. Transfected cells were treated with BFA, pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and chased with complete media with BFA for 3 h. Cells were then lysed and immunoprecipitated sequentially with anti-CD4 (OKT4) first (upper panel) and then with anti-Vpu antibodies (lower panel, Vpu was immunoprecipitated from lysates at time 0 only). The asterisk (\*) represents a mock band. Using quantitative scanning of CD4 bands from two independent experiments, the percentage of CD4 remaining over time as compared to time 0 is plotted for each transfection (in presence of Vpu only) and is shown in the graph. C. HEK 293T cells were mock transfected, transfected with SVCMV Vpu S52,56/D or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu S52,56/D. Transfected cells were treated with BFA and labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine for 2 h. Cells were then lysed in CHAPS buffer and the amount of Vpu bound to CD4 was measured following immunoprecipitation of CD4 with anti-CD4 (OKT4) antibodies. The Vpu remaining in the lysate was then immunoprecipitated with anti-Vpu antibodies. The graph shows the relative % of binding compared with CD4 wt from two independent experiments. The signal measured for the mock band shown by the asterisk (\*) was subtracted from each Vpu signal before to perform the calculation of the relative % of binding.

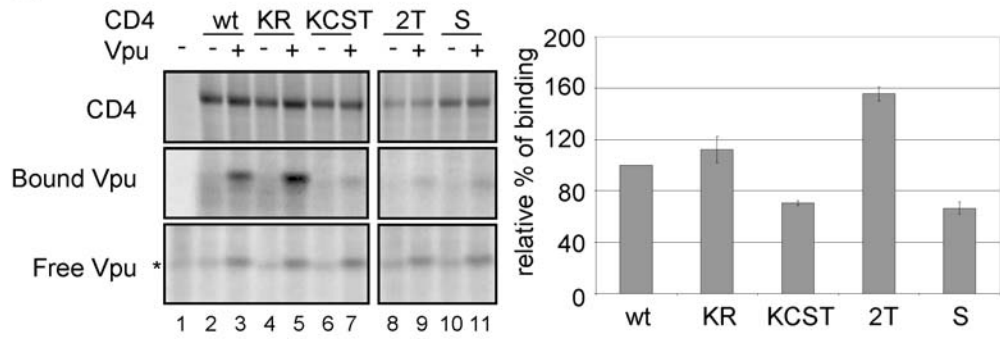
A.

CD4 wt 394 aa CVR**C**RHRRRQAERM**S**Q I **K**RLL**S**E**K**K**T**C**Q**C**P**H**R**F**Q****K**T**C**S**P**I 433 aa  
 CD4 KCST R**V**R**R**RHRRRQAER**M**A**Q** I **R**RLL**A**E**R**R I **R**Q**R**P**H**R**F**Q**R** I **R**A**P**I  
 CD4 N R**V**R**R**RHRRRQAER**M**A**Q** I **R**RLL**S**E**R**R**T**C**Q**C**P**H**R**F**Q****R**T**C**S**P**I  
 CD4 KCST(S) R**V**R**R**RHRRRQAER**M**A**Q** I **R**RLL**A**E**R**R I **R**Q**R**P**H**R**F**Q**R** I **R**S**P**I  
 CD4 KCST(2T) R**V**R**R**RHRRRQAER**M**A**Q** I **R**RLL**A**E**R**R**T**R**Q**R**P**H**R**F**Q****R****T**R**A**P**I**

B.



C.

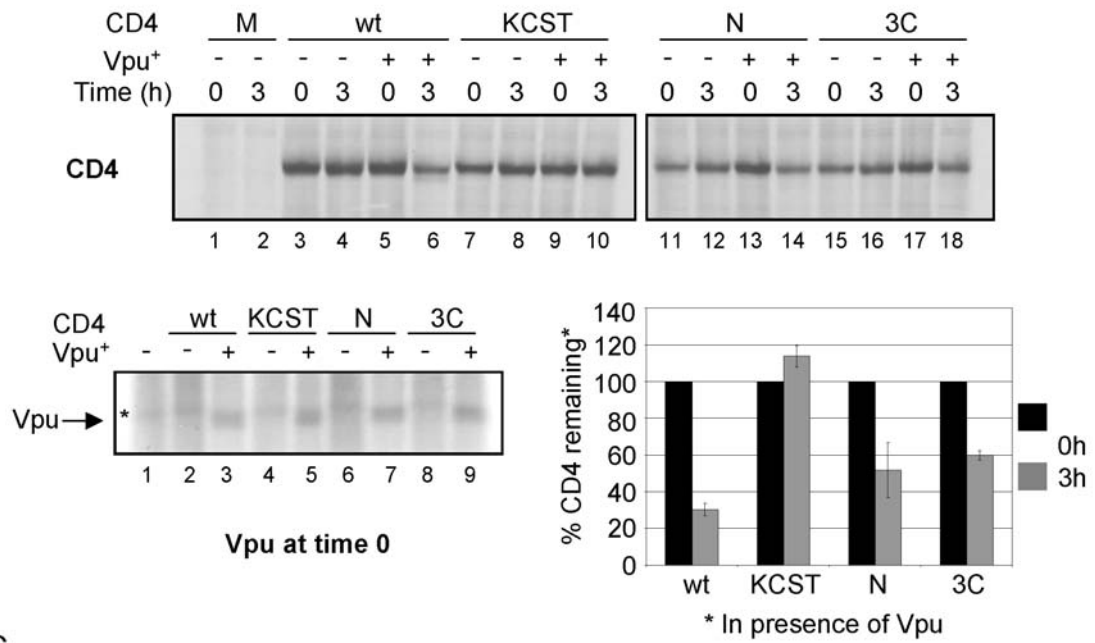


**Figure 3: Cysteine residues in the cytosolic tail of CD4 are sufficient to render CD4 partially sensitive to Vpu.** A. Amino acid composition of the cytosolic tail of CD4 wt, CD4 KCST, CD4 N, and CD4 KCST(3C). The amino acids that were substituted are shown in red for each mutant. The blue amino acids in CD4 KCST(3C) represent residues that were mutated back to the wt sequence from a KCST background. B. HEK 293T cells were mock-transfected or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu<sup>-</sup> or Vpu<sup>+</sup>. Transfected cells were treated with BFA, pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and chased with complete media with BFA for 3 h. Cells were then lysed and immunoprecipitated sequentially with anti-CD4 (OKT4) first (upper panel) and then with anti-Vpu antibodies (lower panel, Vpu was immunoprecipitated from lysates at time 0 only). The asterisk (\*) represents a mock band. Using quantitative scanning of CD4 bands from two independent experiments, the percentage of CD4 remaining over time as compared to time 0 is plotted for each transfection (in presence of Vpu only) and is shown in the graph. C. HEK 293T cells were mock transfected, transfected with SVCMV Vpu S52,56/D or co-transfected with SVCMV CD4 wt or mutant and SVCMV Vpu S52,56/D. Transfected cells were treated with BFA and labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine for 2 h. Cells were then lysed in CHAPS buffer and the amount of Vpu bound to CD4 was measured following immunoprecipitation of CD4 with anti-CD4 (OKT4) antibodies. The Vpu remaining in the lysate was then immunoprecipitated with anti-Vpu antibodies. The graph shows the relative % of binding compared with CD4 wt from two independent experiments. The signal measured for the mock band shown by the asterisk (\*) was subtracted from each Vpu signal before to perform the calculation of the relative % of binding.

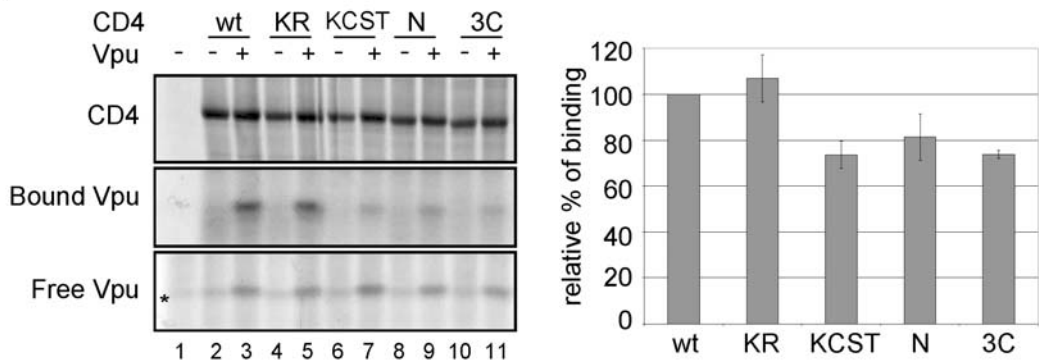
A.

CD4 wt 394 aa CVRCRHRRRQAERM**SQ** | KRLLSE**KKTC**QCPHRFQ**KTCSP** | 433 aa  
 CD4 KCST R**VRRR**HRRRQAERMA**Q** | RLLA**ERRI**RQ**R**PHRFQ**R** | R**A**P |  
 CD4 N R**VRRR**HRRRQAERMA**Q** | RLLSE**RR**TCQCPHRFQ**R**TCSP |  
 CD4 KCST(3C) R**VRRR**HRRRQAERMA**Q** | RLLA**ERRI****Q**CPHRFQ**R** | C**A**P |

B.



C.



**CHAPITRE 4 : ÉTUDE DES FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA  
DÉGRADATION DE CD4 INDUITE PAR VPU**

## 1. Introduction

Plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans la voie ERAD au niveau de la reconnaissance des substrats, de leur dislocation et de leur acheminement vers le protéasome. Les chaperonnes résidentes du RE telles que BiP, calnexine et calréticuline sont impliquées dans la reconnaissance des protéines mal-repliées qui s'accumulent dans le RE suite à un stress cellulaire ou à une mutation. D'autres protéines telles que Herp semblent impliquées dans la reconnaissance des substrats non-glycosylés exclusivement (Okuda-Shimizu and Hendershot 2007). Ces protéines, ainsi que les candidats potentiels pour les pores de dislocation comme Derlin-1 peuvent aussi être impliqués dans certains processus de dégradation ERAD induits par des protéines virales telles que US2 et US11 du HCMV (Lilley and Ploegh 2004; Oresic and Tortorella 2008).

Il est aussi connu que les facteurs cellulaires impliqués dans la dégradation ERAD varient selon le type de substrat qui doit être dégradé. Trois types d'ERAD (ERAD-M, L et C) ont été décrits chez la levure (voir section 9.1.3 du chapitre 1 et Figure 15). Les différentes protéines impliquées dans chacune de ces voies commencent à être mieux connues et certains homologues des protéines de levure ont été caractérisés chez les cellules de mammifères (Carvalho et al. 2006; Nakatsukasa and Brodsky 2008). Il semble toutefois évident maintenant que le processus ERAD présente un haut degré de complexité dans les cellules humaines. En ce sens, l'identification de partenaires cellulaires impliqués dans un processus ERAD connu et la caractérisation de leurs fonctions pourrait permettre d'élargir nos connaissances des processus sous-jacents au ERAD dans les cellules humaines.

Comme les processus ERAD nécessitent généralement plusieurs protéines cellulaires, il semble peu probable que seuls Vpu et le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> soient suffisants pour induire la dégradation de CD4. De plus, plusieurs questions restent encore en suspens concernant la dégradation de CD4 induite par Vpu. Par exemple, quelle est la protéine de conjugaison de l'ubiquitine (E2) impliquée dans ce processus ? Comment CD4 subit-il la dislocation en présence de Vpu ? Quelle est l'identité du pore de dislocation ? Est-ce que des chaperonnes luménales ou cytosoliques sont impliquées ? Est-ce que CD4 et/ou Vpu doit interagir avec des protéines cytosoliques pour que CD4 soit amené vers le protéasome ?

Le troisième objectif de mes recherches était donc de déterminer si Vpu interagit avec des facteurs cellulaires autres que  $\beta$ -TrCP dans le but d'induire la dégradation de



CD4. Certaines données pouvant suggérer en effet que l'interaction de Vpu avec CD4 et  $\beta$ -TrCP n'est pas suffisante pour induire la dégradation de CD4 seront présentées dans ce chapitre. Outre le fait que l'identification de facteurs impliqués dans la dégradation de CD4 pourrait nous donner une meilleure idée du mécanisme induit par Vpu, mais l'identification de protéines cellulaires impliquées dans ce processus pourrait mener à de nouvelles avenues de recherche concernant la caractérisation du ERAD dans les cellules humaines.

## 2. Matériel et méthodes

### Constructions d'ADN

SVCMV CD4 a été construit par l'insertion d'un fragment d'ADN XbaI-XbaI codant pour CD4 dans les sites correspondants du vecteur d'expression SVCMV expa comme il a été décrit précédemment (Yao et al. 1995). SVCMV CD4 KRcyto a été construit par le sous-clonage d'un fragment de PCR généré à partir du plasmide pHIV CD4 KRcyto (décrit dans (Schubert et al. 1998)) dans SVCMV CD4.

Le plasmide exprimant Vpu (SVCMV Vpu) a été décrit précédemment (Yao et al. 1992). Les plasmides codant pour les protéines Vpu mutées au niveau des deux sites de phosphorylation, SVCMV Vpu S52,56/D et SVCMV Vpu S52,56/N, ont été générés par mutagenèse dirigée par PCR tel que décrit précédemment (Tiganos et al. 1998). Les mutants de Vpu présentés à l'Annexe I ont tous été créés de la même façon que le Vpu S52,56/D.

Le plasmide exprimant la protéine  $\beta$ -TrCP humaine fusionnée à l'épitope « Myc-His » (pcDNA3.1  $\beta$ -TrCP-Myc-His) nous a été gracieusement donné par Richard Benarous (Institut Cochin, Paris). La protéine  $\beta$ -TrCP humaine a été clonée entre les sites BamHI et ApaI du plasmide pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen, CA).

### Lignée cellulaire et transfection

Les cellules humaines de fibroblastes embryonnaires de rein transformées par SV40 (cellules HEK293T pour « human embryonic kidney » 293T) ont été obtenues de l'« American Type Culture Collection » (ATCC, Rockville, MD) et ont été gardées en

culture dans du milieu « Dulbecco's modified eagle medium » (DMEM, Wisent Inc., Saint-Bruno, QC) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (FBS, Wisent Inc.) (DMEM + 5%). Pour les transfections, 1 million de cellules a été déposé dans des pétris de 100mm et elles ont été gardées en culture toute la nuit dans du DMEM + 5%. Les cellules ont ensuite été co-transfectées avec les ADN indiqués dans chaque légende de figure par la méthode calcium-phosphate.

### Anticorps et produits chimiques

L'anti-CD4 monoclonal (OKT4) et l'anti-myc monoclonal (9E10) ont été produits à partir des fluides ascitiques de souris Balb/c préalablement injectées avec l'hybridome OKT4 et 9E10 respectivement. Les hybridomes OKT4 et 9E10 ont été obtenus de l'ATCC. L'anticorps anti-CD4 polyclonal de lapin (CD4 H-370) a été acheté de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). L'anti-Vpu polyclonal de lapin a été produit par l'immunisation de lapins avec un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 73-81 de la protéine Vpu du provirus VIH-1 BH10 (Cohen et al. 1988). L'anti-TGN46 humain (« sheep anti-TGN46 ») a été obtenu de Serotec (Kidlington, Oxford, UK) et l'anti-IgG de chèvres (« donkey anti-goat ») Alexa Fluor 488 a été acheté de Molecular Probes (Burlington, ON). L'anticorps anti-actine polyclonal de lapin, la BFA (« brefeldin A ») et la chloroquine ont été obtenus de Sigma Chemical Co (Saint-Louis, MO) et la solution stock de BFA 10 mM a été gardée dans l'éthanol à -20°C. Le MG-132 a été obtenu de Peptide International (Louisville, KY) et la solution stock de 10mM a été gardée dans du DMSO à -20°C. Le cocktail d'inhibiteur de protéases (« Complete ») a été obtenu de Roche Diagnostics (Laval, QC).

### Marquage métabolique et radio-immunoprécipitation

Les analyses de marquage métabolique suivi d'une chasse ont été effectuées 48 h après la transfection. Les cellules transfectées sont resuspendues dans du milieu de carence DMEM sans méthionine avec 5% de sérum de veau fœtal dialysé en présence de 10 µM de BFA pendant 30 min avant le marquage. Les cellules sont ensuite marquées pendant 30 min avec 800 µCi/ml de [<sup>35</sup>S]méthionine et [<sup>35</sup>S]cystéine ([<sup>35</sup>S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer, Waltham, MA). Après plusieurs lavages dans du milieu complet DMEM + 5%, les cellules sont resuspendues dans le milieu complet contenant 10 µM de BFA. Aux temps

indiqués dans les figures, les cellules marquées sont lysées dans du tampon RIPA-DOC (« radio-immunoprecipitation assay-deoxycholate ») (140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Nonidet-P40, 0,5% sodium dodecyl sulfate, 1,2 mM deoxycholate, pH 7,2) auquel on a ajouté un cocktail d'inhibiteur de protéases.

Les expériences de marquage en présence de chloroquine ont été effectuées 48 h après la transfection. Les cellules transfectées exprimant CD4 et un mutant de Vpu qui n'est pas phosphorylé (Vpu S52,56/D) sont resuspendues dans du milieu de carence DMEM sans méthionine avec 5% de sérum de veau fœtal dialysé en présence de 10 µM de BFA et 50 µM de chloroquine pendant 30 min avant le marquage. Les cellules sont ensuite marquées pendant 12 h avec 200 µCi/ml de [<sup>35</sup>S]methionine et [<sup>35</sup>S]cysteine toujours en présence de BFA et de chloroquine et lysées ensuite dans du tampon RIPA-DOC. La BFA a aussi été rajoutée après 6 heures de marquage afin de s'assurer de son efficacité jusqu'à la fin du marquage.

Suite à la lyse, les lysats cellulaires marqués sont immunoprécipités séquentiellement avec l'anti-CD4 OKT4 et ensuite avec l'anti-Vpu comme décrit précédemment (Tiganos et al. 1997). Les protéines immunoprécipitées sont séparées sur gel tricine SDS-poly-acrylamide de 12,5% et analysées par autoradiographie. L'analyse des autoradiogrammes a été effectuée avec un « scanner » AGFA Duoscan T1200. L'analyse densitométrique des autoradiogrammes a été effectuée avec le programme Image Quant 5.0 de Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA).

#### Analyse des protéines par immunobuvardage (« western-blot » ou WB)

48 h après la transfection, les cellules sont traitées dans du DMEM + 5% avec 10 µM de BFA pendant 3 h avant la lyse dans du RIPA-DOC. Les niveaux de CD4 et de Vpu ont ensuite été révélés par immunobuvardage comme décrit ci-dessous.

Pour vérifier la liaison à CD4, 48 h après la transfection, les cellules sont resuspendues dans du DMEM + 5% avec 10 µM de BFA et de MG-132 pendant 2 h avant la lyse dans du tampon CHAPS (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% CHAPS, pH 7,2) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases. La quantité de Vpu dans le lysat a été évaluée directement par WB avec l'anti-Vpu polyclonal de lapin. Les protéines CD4 et Vpu liées à CD4 ont ensuite été immunoprécipitées avec l'anti-CD4 monoclonal OKT4.

Pour vérifier la liaison à  $\beta$ -TrCP, les cellules transfectées ont été traitées de la même façon que pour la liaison à CD4, mais sans MG-132. La quantité de Vpu dans le lysat a été évaluée directement par WB avec l'anti-Vpu polyclonal de lapin. Les protéines  $\beta$ -TrCP-Myc-His et Vpu liées à  $\beta$ -TrCP ont ensuite été immunoprécipitées avec l'anti-myc monoclonal 9E10.

Les protéines provenant d'une fraction de chaque lysat ou immunoprécipitées sont séparées sur gel tricine SDS-polyacrylamide de 12,5%. Les protéines sont ensuite transférées toute la nuit sur une membrane de nitrocellulose avec des pores de 0,45  $\mu$ m dans une cuve de transfert Bio-Rad Trans Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Les protéines CD4,  $\beta$ -TrCP-Myc-His, actine et Vpu sont ensuite révélées par WB avec l'anti-CD4 polyclonal (dilution 1 : 1000), l'anti-myc monoclonal (dilution 1 : 2000), l'anti-actine (dilution 1 : 2000) et l'anti-Vpu (dilution 1 : 1000) respectivement dilués dans du PBS contenant 0,02 % d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Les anticorps liés sur la membrane sont révélés avec des anticorps anti-IgG de lapins ou de souris liés à la peroxidase du raifort (HRP, « horse-radish peroxidase ») (dilution 1 : 7000) par la méthode ECL (« enhanced chemiluminescence ») standard.

### Immunofluorescence

Dans une plaque de culture cellulaire à 6 puits, 250 000 cellules HEK 293T sont déposées dans 3 ml pour la nuit. Le lendemain, chaque puits de cellule est traité à la BFA 10  $\mu$ M pour les temps indiqués. Ensuite, 40 000 cellules pour chaque condition de traitement sont resuspendues dans 100  $\mu$ l de PBS et centrifugées sur lame pendant 4 min à 1100 RPM (révolution par minute). Les cellules sont fixées dans la paraformaldéhyde 4% pendant 30 min. Les cellules sont ensuite marquées immunologiquement avec l'anti-TGN46 et les anticorps liés sont révélés avec un anti-IgG de chèvres Alexa Fluor 488. Les noyaux sont colorés au DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). La localisation de la protéine TGN46 a été évaluée ensuite par microscopie à épifluorescence avec un système « Zeiss Cell Observer » (Zeiss, Toronto, ON) équipé d'un microscope Axiovert 200 M et d'une caméra digitale monochrome à ultra-haute résolution Zeiss AxioCam.

### 3. Résultats

#### 3.1 Stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D

Dans le but de découvrir d'autres facteurs interagissant avec Vpu pour induire la dégradation de CD4, nous avons utilisé un mutant de Vpu qui n'est pas phosphorylé (Vpu S52,56/D ou Vpu S52,56/N) et qui ne peut donc pas interagir avec  $\beta$ -TrCP. Au chapitre 2, nous avons démontré que ce mutant était incapable d'induire la poly-ubiquitination de CD4. Puisqu'un mutant des sites de phosphorylation de Vpu a la même capacité de liaison à CD4 qu'une protéine Vpu sauvage (Bour et al. 1995b; Tiganos et al. 1997) et qu'il ne peut induire la dégradation de CD4, ce genre de mutant peut être utilisé afin d'identifier de potentiels partenaires cellulaires de Vpu.

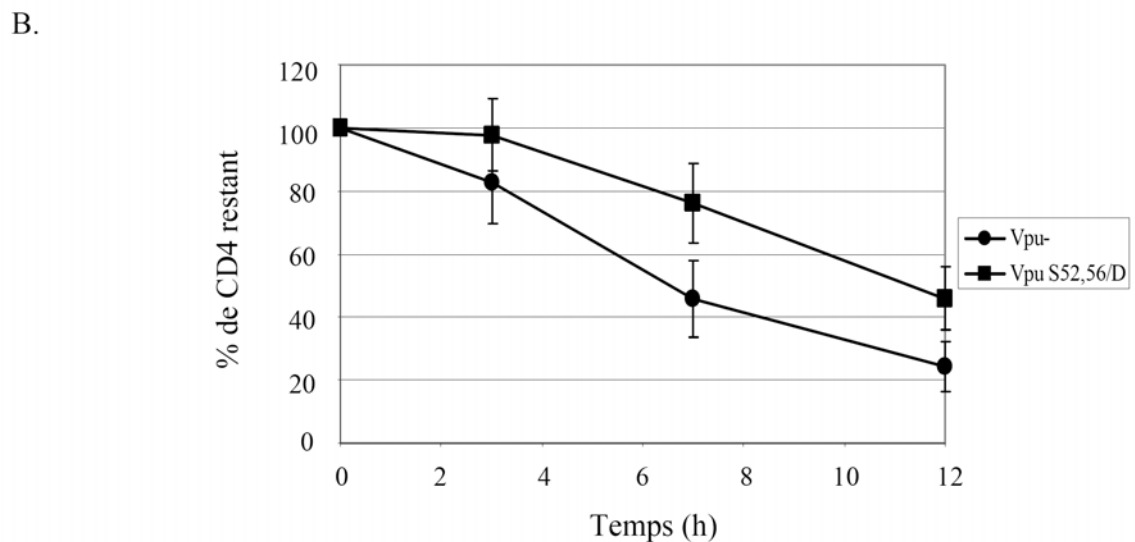
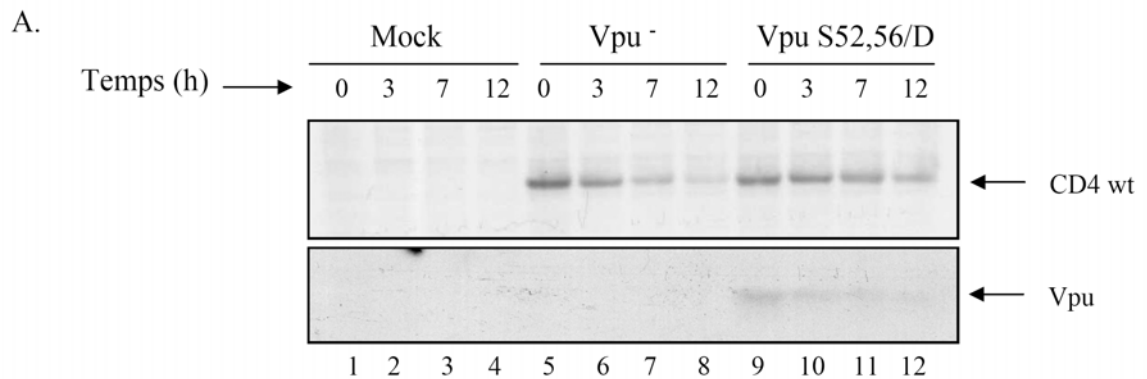
##### 3.1.1 La demi-vie de CD4 semble augmentée par l'expression de Vpu S52,56/D

Nous avons tout d'abord caractérisé le phénotype de ce mutant dans des cellules HEK 293T transfectées avec CD4 en absence et en présence de Vpu S52,56/D et traitées à la BFA afin de retenir CD4 dans le RE. Par des études de marquage métabolique suivi d'une chasse, nous avons observé que l'expression d'un mutant de phosphorylation de Vpu avait tendance à stabiliser la molécule CD4 (Figure 1). En effet, CD4 a une demi-vie d'environ 6,5 h lorsqu'il est exprimé seul (Figure 1A, pistes 5-8 et 1B). Toutefois, la co-expression de Vpu S52,56/D augmente la demi-vie de CD4 à 11,5 h (Figure 1A, pistes 9-12 et 1B). Ces données suggèrent que Vpu S52,56/D puisse protéger CD4 d'une dégradation basale.

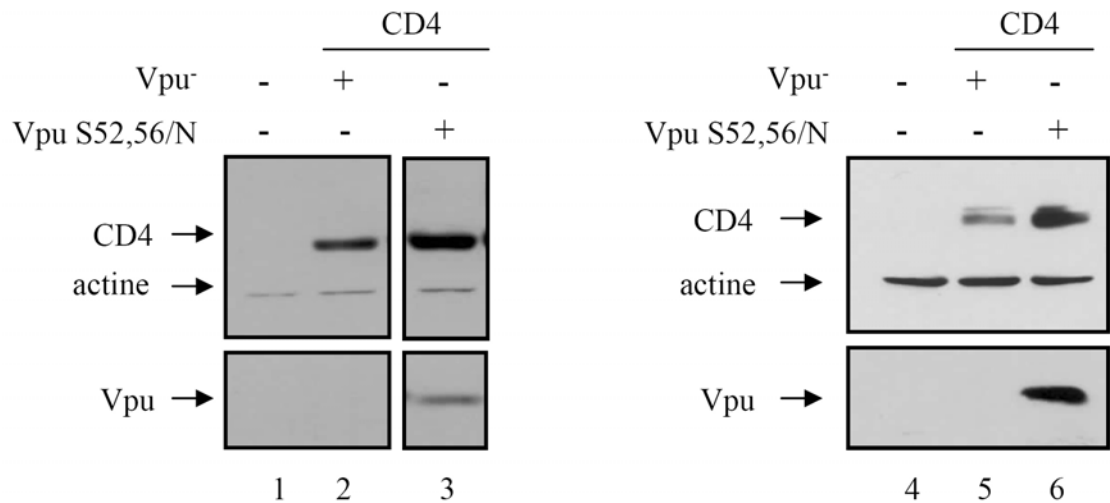
##### 3.1.2 À l'équilibre, on observe plus de CD4 en présence de Vpu S52,56/N

La quantité de CD4 retrouvée à l'équilibre dans les cellules HEK 293T transfectées avec CD4 en absence et en présence de Vpu S52,56/N a aussi été vérifiée. Suite à la transfection, les cellules ont été traitées avec la BFA pendant 3 h avant d'être lysées. L'expression de CD4 et de Vpu a été analysée par WB. À la Figure 2, on peut voir deux expériences indépendantes qui montrent que la quantité de CD4 est plus élevée en présence de Vpu S52,56/N. Cette augmentation de la quantité de CD4 à l'équilibre en présence de

**Figure 1 : Le mutant de Vpu S52,56/D augmente la demi-vie de CD4.** A. Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec SVCMV CD4 et SVCMV Vpu<sup>-</sup> ou SVCMV Vpu S52,56/D. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA et marquées avec du [<sup>35</sup>S]méthionine et [<sup>35</sup>S]cystéine pendant 30 min. Après plusieurs lavages dans du milieu DMEM complet contenant de la BFA, la quantité de CD4 marqué a été suivie par chasse métabolique pour les temps indiqués dans la figure. À chaque intervalle, les cellules ont été lysées et les protéines CD4 et Vpu ont été immunoprécipitées séquentiellement avec l'anti-CD4 monoclonal OKT4 en premier, suivi de l'anti-Vpu. B. Les bandes correspondant à CD4 ont été mesurées par densitométrie à partir de 5 expériences indépendantes et la moyenne du pourcentage de CD4 restant par rapport au temps 0 pour chaque transfection a été mise en graphique.



**Figure 2 : La co-expression du mutant de Vpu S52,56/N semble augmenter la quantité de CD4 observée à l'équilibre.** Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec SVCMV CD4 et SVCMV Vpu<sup>-</sup> ou SVCMV Vpu S52,56/N. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA pendant 3 h avant d'être lysées. La quantité de CD4, de l'actine et de Vpu à l'équilibre a été analysée par WB avec l'anti-CD4 polyclonal, l'anti-actine et l'anti-Vpu respectivement tel que décrit dans la section matériel et méthodes.



Vpu S52,56/N est observée de façon reproductible, mais le niveau d'augmentation est variable d'une expérience à une autre et c'est ce qui est démontré à la Figure 2 (comparer les pistes 2-3 avec les pistes 5-6).

### 3.1.3 La stabilisation par S52,56/D ne semble pas être due simplement à un phénomène de rétention du CD4 au RE

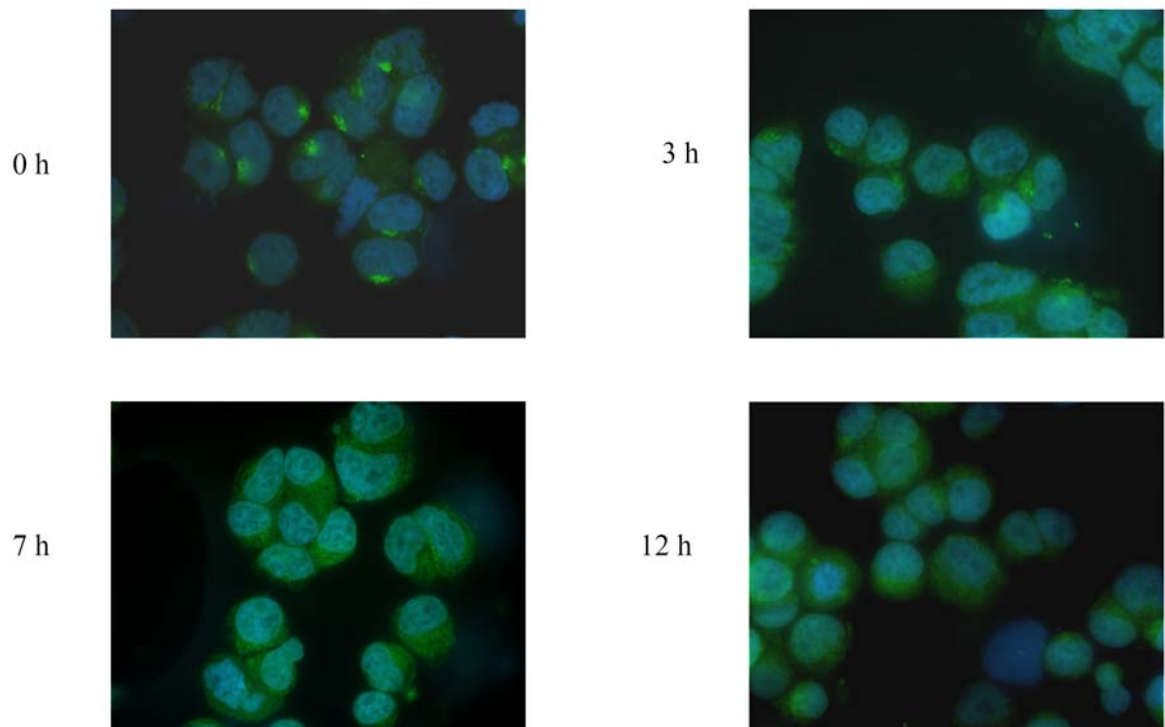
Dans l'expérience de marquage métabolique suivi d'une chasse présentée à la Figure 1, nous ne pouvons exclure que l'effet observé ne soit dû à l'inefficacité de la BFA après un certain temps. Si tel était le cas, la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D aurait pu s'expliquer simplement par un effet de rétention du CD4 au niveau du RE, l'empêchant ainsi d'être dégradé par les lysosomes. De plus, le même raisonnement peut s'appliquer pour les expériences présentées à la Figure 2 où les niveaux de CD4 à l'équilibre sont montrés par WB. En effet, les cellules sont traitées à la BFA pendant seulement 3 h alors que CD4 et Vpu sont exprimés pendant 48 heures avant l'ajout de la BFA. Il se pourrait donc que l'augmentation de CD4 observée soit due à la rétention de CD4 au niveau du RE par Vpu S52,56/D.

Afin de s'assurer de l'efficacité de la BFA pendant la chasse métabolique présentée à la Figure 1, elle a été ajoutée de nouveau aux cellules à 7h durant la chasse. Toutefois, nous avons évalué directement l'effet de la BFA pendant les temps de chasse indiqués à la Figure 1 par immunofluorescence dans les cellules HEK 293T par l'observation de la localisation intra-cellulaire de la protéine TGN46. En effet, il a été démontré que la BFA a pour effet de déstabiliser le TGN, entraînant ainsi un défaut au niveau du trafic des protéines vers la membrane plasmique. Cette déstabilisation du TGN peut s'observer par la délocalisation de la protéine TGN46 (marqueur du TGN) qui passe d'une localisation ponctuelle péri-nucléaire (localisation Golgi) à une localisation plus diffuse typique du RE puisque les composants du Golgi sont redistribués au RE suite au traitement à la BFA (Lippincott-Schwartz et al. 1989; Salcedo and Holden 2003).

La localisation de TGN46 a donc été observée par immunofluorescence dans des cellules HEK 293T non-transfectées traitées pendant 0, 3, 7 et 12 h avec de la BFA. Les résultats montrent que la protéine TGN46 est toujours délocalisée après 12 h de traitement des cellules avec la BFA (Figure 3).



**Figure 3 : La BFA semble active pendant 12 heures.** Les cellules HEK 293T non-transfectées ont été traitées à la BFA pour les temps indiqués. Ensuite, 40 000 cellules pour chaque condition de traitement ont été centrifugées sur lame et la localisation de la protéine TGN46 a été évaluée par microscopie à épifluorescence suivant le marquage immunologique des cellules avec un anti-TGN46. Les noyaux cellulaires sont en bleu (colorés au DAPI) et la protéine TGN46 en vert.



De plus, il a été montré qu'aussi tôt que 1 h après l'arrêt du traitement de cellules HeLa à la BFA, la localisation de TGN46 redevient péri-nucléaire (Salcedo and Holden 2003). Ces résultats suggèrent donc que la BFA soit active tout au long de la chasse de 12 h présentée à la Figure 1.

Afin de confirmer que la stabilisation de CD4 ne soit pas due seulement à la rétention de CD4 dans le RE empêchant ainsi sa dégradation subséquente dans les lysosomes, des cellules HEK 293T transfectées avec CD4 en absence et en présence de Vpu S52,56/D ont été marquées pendant 12 heures en présence de BFA et de chloroquine. La chloroquine est un agent lysosomotropique qui inhibe la dégradation lysosomale des protéines en neutralisant l'environnement acide des lysosomes (de Duve et al. 1974). La chloroquine ne devrait donc pas empêcher la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D. La Figure 4 montre que la quantité de CD4 observée dans les cellules traitées à la BFA et à la chloroquine après 12 h de marquage est plus élevée en présence de Vpu S52,56/D qu'en absence de Vpu. Ces données suggèrent que la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ait lieu au niveau du RE et pourrait donc impliquer des facteurs cellulaires encore inconnus.

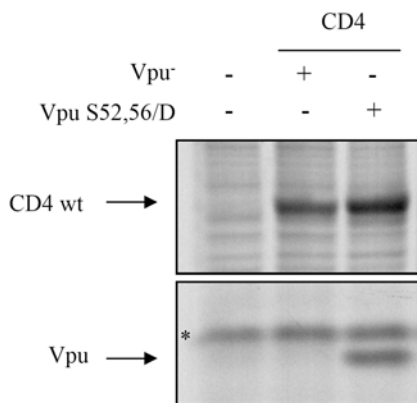
#### 3.1.4 La stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ne semble pas être due à un masquage de sites potentiels d'ubiquitination

Le mode de dégradation basale de CD4 au niveau du RE n'est pas connu, toutefois il se pourrait que la sur-expression de CD4 mène à sa dégradation par ERAD dans les cellules HEK 293T. Si tel est le cas, il est probable que l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 serait nécessaire pour cette dégradation basale observée en absence de Vpu. À cet effet, il est possible que Vpu S52,56/D bloque l'accès à certains sites d'ubiquitination cytosoliques de CD4 suite à sa liaison à CD4, ce qui pourrait alors expliquer la stabilisation de CD4 observée en présence de ce mutant de Vpu.

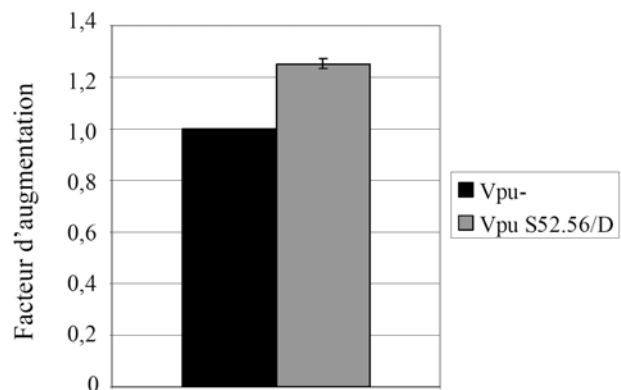
Dans les expériences de liaison de CD4 à Vpu présentées au chapitre 3 (Figures 1C, 2C et 3C), il semblait que la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D soit observable lors d'un marquage de 2,5 h des cellules HEK 293T transfectées avec différents mutants de la queue cytoplasmique de CD4. Afin de déterminer si la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D est due à un masquage des lysines ou d'autres sites potentiels d'ubiquitination présents dans la queue cytoplasmique de CD4, les signaux correspondant à CD4 wt, KR et

**Figure 4 : La stabilisation par S52,56/D ne semble pas être due seulement à un phénomène de rétention du CD4 au RE.** A. Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec SVCMV CD4 et SVCMV Vpu<sup>-</sup> ou SVCMV Vpu S52,56/D. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA et à la chloroquine et marquées avec du [<sup>35</sup>S]méthionine et [<sup>35</sup>S]cystéine pendant 12 h. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines CD4 et Vpu ont été immunoprécipitées séquentiellement avec l'anti-CD4 monoclonal OKT4 en premier, suivi de l'anti-Vpu. L'astérisque (\*) représente une bande mock. B. Les bandes correspondant à CD4 ont été mesurées par densitométrie à partir de 2 expériences indépendantes et la valeur correspondant au facteur d'augmentation de l'expression de CD4 en présence de Vpu S52,56/D a été mise en graphique par rapport à Vpu<sup>-</sup> (arbitrairement ajusté à 1).

A.



B.



KCST ont été mesurés dans ces expériences en absence et en présence de Vpu S52,56/D.

La Figure 5 montre le graphique ainsi obtenu. On peut observer que les niveaux de CD4 wt, KR et KCST semblent plus élevés lorsque Vpu S52,56/D est co-exprimé avec CD4, quoique le facteur d'augmentation en présence de Vpu S52,56/D soit faible. Le CD4 KCST ne contient aucun site potentiel d'ubiquitination dans sa queue cytoplasmique et semble tout de même stabilisé par Vpu S52,56/D. Ceci pourrait suggérer que cette stabilisation n'est pas le fait d'un masquage par Vpu de sites d'ubiquitination normalement nécessaires pour la dégradation basale de CD4. On pourrait donc penser que Vpu S52,56/D, en interagissant avec CD4, semble le séquestrer et ainsi le protéger d'un processus de dégradation basale se produisant au niveau du RE.

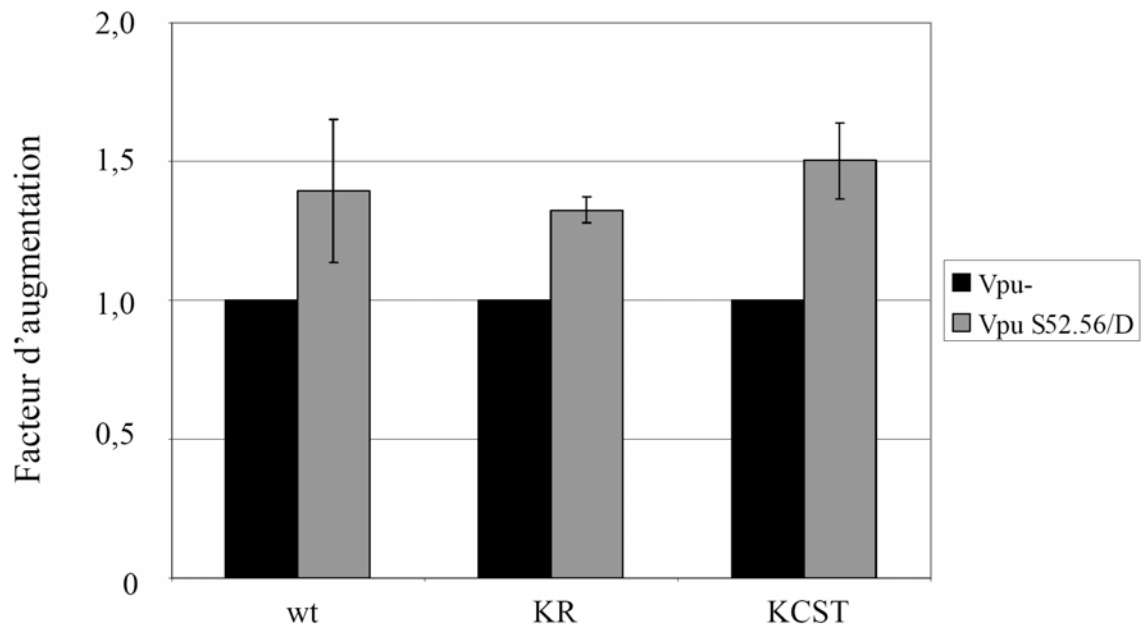
### 3.2 Analyse structure/fonction de Vpu (étude mutagénique)

Des mutants des hélices cytoplasmiques de Vpu ont été créés dans le but de vérifier le rôle de ces hélices dans le processus de dégradation de CD4 et pour déterminer si certaines régions pouvaient être impliquées dans l'interaction avec des partenaires cellulaires, soit directement, soit indirectement de par leur importance pour la conformation générale de la protéine. Le résultat de la caractérisation de ces mutants concernant leur capacité à dégrader CD4 dans les cellules HEK 293T et les cellules COS est présenté au Tableau I de l'Annexe I. Certains de ces mutants présentaient des phénotypes intéressants qui pourraient servir à l'identification de facteurs cellulaires pouvant être impliqués dans le processus de dégradation de CD4 par Vpu. En effet, plusieurs de ces mutants étaient capables d'interagir avec CD4 et  $\beta$ -TrCP tout en étant incapables d'induire la dégradation de CD4. Les données concernant ces mutants sélectionnés sont présentées dans les prochaines sections.

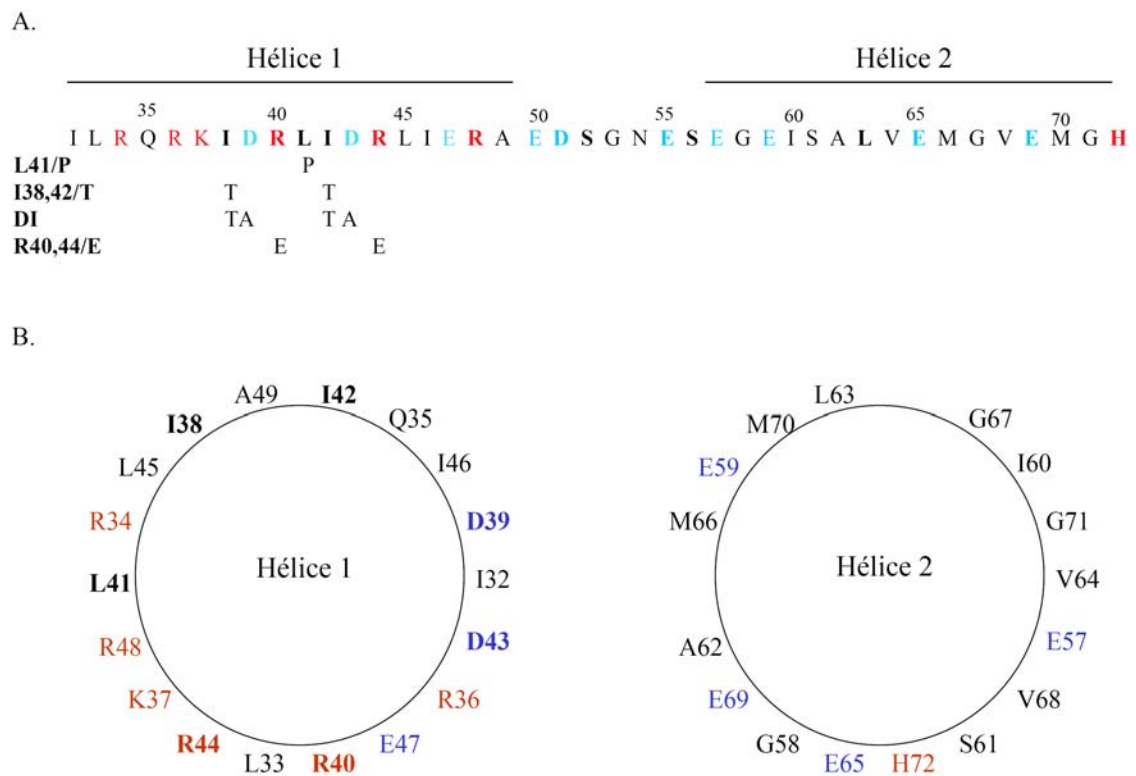
#### 3.2.1 Rationnel des mutations introduites dans Vpu

L'étude de la disposition des acides aminés tout au long des hélices cytoplasmiques de Vpu nous a permis de constater que les deux hélices sont amphipatiques (voir Figure 6). En fait, elles sont généralement chargées d'un côté et hydrophobes de l'autre. Nous

**Figure 5 : La stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ne semble pas être due à un masquage de sites potentiels d'ubiquitination.** Le signal correspondant à CD4 wt, CD4 KR et CD4 KCST dans les figures 1C, 2C et 3C du chapitre 3 a été mesuré par densitométrie en absence (Vpu<sup>-</sup>) et en présence de Vpu S52,56/D. Le facteur d'augmentation de l'expression de CD4 en présence de Vpu S52,56/D a été mis en graphique par rapport à Vpu<sup>-</sup> (arbitrairement ajusté à 1) pour chaque mutant de CD4.



**Figure 6 : Représentation du domaine cytoplasmique de Vpu et des mutations effectuées.** A. Séquence en acides aminés des deux hélices qui font partie du domaine cytoplasmique de Vpu. Les acides aminés qui ont été mutés sont en gras. Les acides aminés qui ont une charge positive sont en rouge et ceux qui ont une charge négative sont en bleu. Les mutations introduites dans les différents mutants de Vpu sont montrées en dessous de la séquence. B. Les acides aminés formant les deux hélices sont montrés autour de l'axe de chaque hélice afin d'apprécier la distribution des charges le long des hélices *alpha* de Vpu.



voulions donc tester l'hypothèse que les deux hélices cytoplasmiques pourraient interagir l'une avec l'autre par des interactions hydrophobes ou hydrophiles et que cette interaction serait nécessaire pour le processus de la dégradation de CD4.

Une proline a tout d'abord été insérée à la place de l'acide aminé 41 au milieu de l'hélice 1 (L41/P) afin de déstabiliser cette hélice pour vérifier son rôle global dans le processus de dégradation de CD4. De plus, plusieurs isoleucines sont présentes sur le côté hydrophobe de la première hélice cytoplasmique. Les deux isoleucines en position 38 et 42 ont donc été mutées pour des thréonines (I38,42/T) qui sont hydrophiles afin de vérifier si ces acides aminés hydrophobes sont importants pour la dégradation de CD4. (Figure 6)

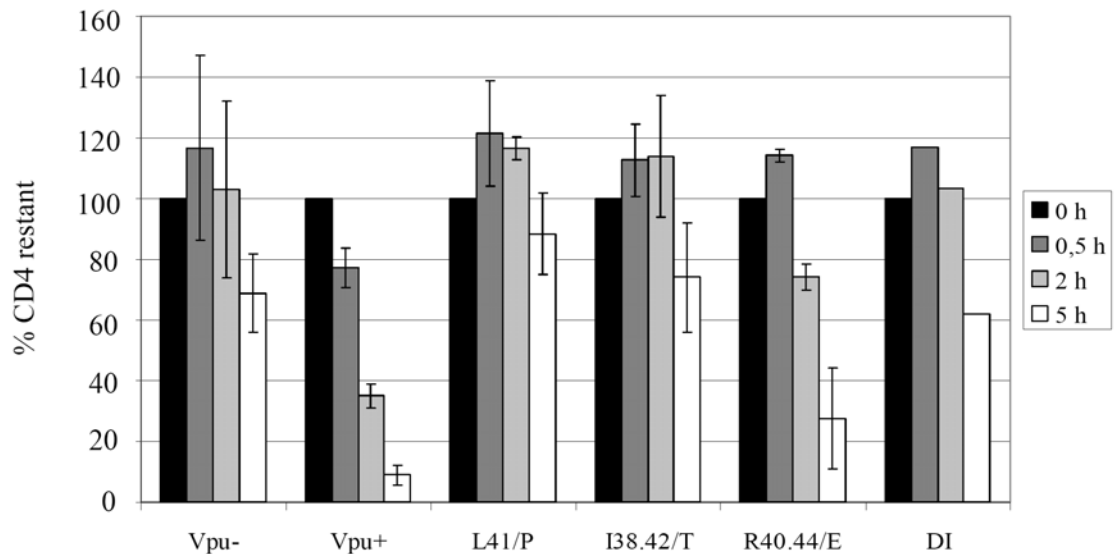
Les acides aminés chargés positivement (R40 et R44) présents de l'autre côté de l'hélice ont aussi été mutés pour un acide aminé chargé négativement (R40,44/E) afin de vérifier si la présence de charges positives à cet endroit est nécessaire pour la dégradation de CD4. Enfin, deux acides aminés chargés négativement (D39 et D43) sont présents d'un côté de l'hélice 1 et ils ont été mutés conjointement avec les isoleucines 38 et 42 pour créer le mutant DI (D39,43/A-I38,42/T). Les charges positives et négatives ont été mutées afin de vérifier leur implication potentielle dans l'interaction hydrophile entre la première et la deuxième hélice cytoplasmiques. (Figure 6)

Chacun de ces mutants est présenté à la Figure 6. Il est à noter qu'une proline avait déjà été insérée dans l'hélice 2 en position 63 (L63/P) (Tiganos et al. 1997) et il avait été montré que la déstabilisation de cette hélice inhibait complètement la dégradation de CD4 par Vpu, démontrant son importance dans le processus de dégradation.

### 3.2.2 Effet de ces mutations de Vpu sur la capacité d'induire la dégradation de CD4

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec CD4 en absence et en présence de Vpu sauvage ou des mutants de Vpu présentés à la Figure 6. La capacité de ces mutants de Vpu à induire la dégradation de CD4 a été évaluée par marquage métabolique des cellules HEK 293T transfectées avec CD4 et Vpu et traitées à la BFA suivi d'une chasse de 5 h. Les données compilées à partir de deux expériences (sauf pour le mutant DI) sont montrées à la Figure 7.

**Figure 7 : Effet des mutations de la première hélice cytoplasmique de Vpu sur la capacité de dégradation de CD4.** Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec SVCMV CD4 et SVCMV Vpu<sup>-</sup>, SVCMV Vpu<sup>+</sup> ou mutant. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA et marquées avec du [<sup>35</sup>S]méthionine et [<sup>35</sup>S]cystéine pendant 30 min. Après plusieurs lavages dans du milieu DMEM complet contenant de la BFA, la quantité de CD4 marqué a été suivie par chasse métabolique pour les temps indiqués. À chaque intervalle, les cellules ont été lysées et les protéines CD4 et Vpu ont été immunoprécipitées séquentiellement avec l’anti-CD4 monoclonal OKT4 en premier, suivi de l’anti-Vpu. Les bandes correspondant à CD4 ont été mesurées par densitométrie à partir de 2 expériences indépendantes (sauf pour le mutant DI) et la moyenne du pourcentage de CD4 restant par rapport au temps 0 pour chaque transfection a été mise en graphique.





Tout d'abord, on peut remarquer que la protéine Vpu sauvage (Vpu<sup>+</sup>) induit une dégradation rapide de CD4 comparativement au CD4 exprimé seul (Vpu<sup>-</sup>). Ensuite, on peut constater que les mutants L41/P, I38,42/T et DI semblent incapables d'induire la dégradation de CD4 puisque les niveaux de CD4 observés aux différents temps de chasse sont comparables à ceux observés en absence de Vpu. On peut toutefois remarquer que le mutant R40,44/E est capable d'induire une légère dégradation, surtout observable aux temps 2 h et 5 h (Figure 7, comparer les temps 2 h et 5 h pour R40,44/E comparativement aux mêmes temps de chasse avec Vpu<sup>-</sup>).

### 3.2.3 Liaison à CD4 et à $\beta$ -TrCP

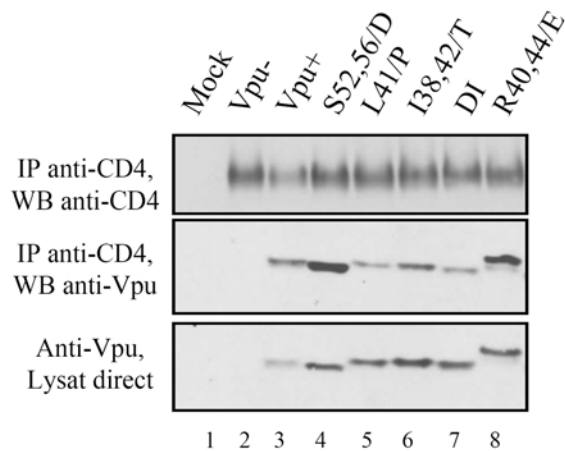
La raison la plus simple pouvant expliquer le défaut de dégradation de CD4 par les mutants de Vpu présentés à la Figure 7 est que leur interaction avec CD4 ou  $\beta$ -TrCP pourrait être affectée par les mutations introduites. Nous avons donc vérifié par immunobuvardage (WB) la capacité de chacun de ces mutants de Vpu d'interagir avec CD4 et  $\beta$ -TrCP dans les cellules HEK 293T transfectées avec CD4 en absence et en présence de Vpu.

La dégradation de CD4 a été bloquée en traitant les cellules avec du MG-132 (un inhibiteur du protéasome (Lee and Goldberg 1996)) afin de pouvoir observer la liaison du Vpu sauvage à CD4. La capacité d'interaction de ces Vpu avec  $\beta$ -TrCP-Myc-His a été mesurée de la même façon sans toutefois traiter les cellules au MG-132. Les cellules HEK 293T transfectées avec CD4 ou  $\beta$ -TrCP en absence et en présence de Vpu sauvage ou mutée ont été traitées avec de la BFA pendant 3 h avant d'être lysées. La liaison de Vpu à CD4 et à  $\beta$ -TrCP a été évaluée par WB suite à l'immunoprécipitation de chacune de ces protéines. La quantité totale de Vpu a été évaluée dans le lysat cellulaire par WB avant d'immunoprécipiter CD4 ou  $\beta$ -TrCP.

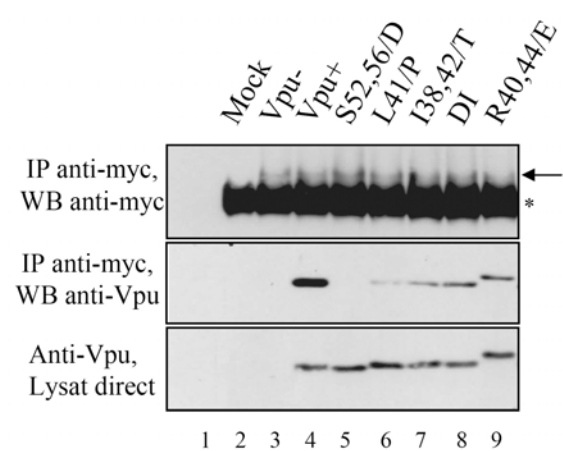
Les résultats présentés à la Figure 8A montrent que la destruction de la première hélice cytoplasmique de Vpu (L41/P) perturbe l'interaction de Vpu avec CD4 et que la mutation des charges positives (R40,44/E) a peu d'effet sur la capacité de Vpu d'interagir avec CD4 (Figure 8A, comparer piste 8 avec piste 3 pour R40,44/E et comparer piste 5 avec piste 3 pour L41/P). Les résultats de la Figure 8B confirment que le Vpu S52,56/D est

**Figure 8 : Liaison des mutants de Vpu à CD4 et à  $\beta$ -TrCP.** A. Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec SVCMV CD4 et SVCMV Vpu<sup>-</sup>, SVCMV Vpu<sup>+</sup> ou mutant. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA et au MG-132 pendant 2 h avant d'être lysées. La quantité de Vpu dans le lysat a été évaluée par WB avec l'anti-Vpu polyclonal de lapin (panneau du bas). Les protéines CD4 et Vpu liées à CD4 ont ensuite été immunoprécipitées avec l'anti-CD4 monoclonal OKT4. CD4 et les protéines Vpu co-immunoprécipitées avec CD4 ont été révélées par WB avec l'anti-CD4 polyclonal de lapin et l'anti-Vpu respectivement (panneaux du haut et du milieu). B. Les cellules HEK 293T ont été transfectées « mock » ou co-transfectées avec pcDNA3.1  $\beta$ -TrCP-Myc-His et SVCMV Vpu<sup>-</sup>, SVCMV Vpu<sup>+</sup> ou mutant. Les cellules transfectées ont été traitées à la BFA pendant 2 h avant d'être lysées. La quantité de Vpu dans le lysat a été évaluée par WB avec l'anti-Vpu polyclonal de lapin (panneau du bas). Les protéines  $\beta$ -TrCP-Myc-His et Vpu liées à  $\beta$ -TrCP ont ensuite été immunoprécipitées avec l'anti-myc monoclonal 9E10.  $\beta$ -TrCP-Myc-His et les protéines Vpu co-immunoprécipitées avec  $\beta$ -TrCP-Myc-His ont ensuite été révélées par WB avec l'anti-myc et l'anti-Vpu respectivement (panneaux du haut et du milieu). La flèche montre le signal correspondant à  $\beta$ -TrCP-Myc-His et l'astérisque (\*) représente le signal correspondant aux chaînes lourdes de l'anticorps anti-myc utilisé pour faire l'immunoprécipitation anti-myc.

A.



B.



incapable de recruter  $\beta$ -TrCP (Figure 8B, comparer piste 5 avec piste 4) et montrent que la déstabilisation de la première hélice cytoplasmique par l'introduction d'une proline (mutant L41/P) diminue drastiquement la capacité d'interaction de Vpu avec  $\beta$ -TrCP (Figure 8B, comparer piste 6 avec piste 4). La capacité de liaison à  $\beta$ -TrCP des mutant I38,42/T, DI et R40,44/E est aussi atténuée comparativement à la protéine Vpu sauvage, (Figure 8B, comparer pistes 7, 8 et 9 respectivement avec la piste 4).

#### 4. Discussion et perspectives

Nous avons tout d'abord montré que la co-expression avec CD4 d'un mutant de Vpu incapable de recruter  $\beta$ -TrCP avait pour effet de stabiliser CD4. Il semble que la dégradation lysosomale de CD4 ne puisse expliquer la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D. En effet, la BFA semble efficace tout au long de la chasse métabolique montrée à la Figure 1 puisque la protéine TGN46 est toujours délocalisée après 12 h de traitement à la BFA (Figure 3). De plus, si CD4 était dégradé via la voie lysosomale, le traitement des cellules à la chloroquine devrait stabiliser CD4 même en absence de Vpu S52,56/D. La stabilisation par ce mutant de Vpu ne devrait donc pas être observée en présence de chloroquine. Or, le traitement des cellules exprimant CD4 et Vpu S52,56/D à la chloroquine pendant le marquage, n'empêche pas la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D. Il est donc peu probable que la stabilisation de CD4 soit due au blocage par Vpu S52,56/D d'un phénomène de trafic résiduel de CD4 vers la membrane plasmique.

Pour continuer, la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D ne semble pas due à un masquage de sites potentiels d'ubiquitination présents dans la queue cytosolique de CD4. En effet, la mutation de tous les sites potentiels d'ubiquitination cytosoliques de CD4 (CD4 KCST) ne semble pas empêcher CD4 d'être stabilisé par Vpu S52,56/D. Ces résultats pourraient suggérer que la dégradation basale de CD4 ne nécessite pas l'ubiquitination de CD4 sur la queue cytosolique. Ces données rejoignent celles obtenues en exprimant CD4 chez *S. cerevisiae* (Meusser and Sommer 2004). En effet, dans ce système, CD4 est un substrat de ERAD en absence de Vpu et sa dégradation ne nécessite pas la présence de lysines cytosoliques (Meusser and Sommer 2004).

Toutefois, l'ubiquitination de la queue cytosolique de CD4 semble être nécessaire pour la dégradation de CD4 induite par Vpu (chapitres 2 et 3 et (Schubert et al. 1998;

Meusser and Sommer 2004)). Les données présentées dans ce chapitre nous permettent donc de proposer un modèle dans lequel le rôle de Vpu ne se résumerait pas à accélérer un processus de dégradation de CD4 déjà existant, mais où Vpu induirait plutôt un mécanisme de dégradation de CD4 qui lui est spécifique et différent du processus de dégradation basale cellulaire.

Dans le même ordre d'idées, il se pourrait que Vpu S52,56/D stabilise CD4 par son interaction avec des partenaires cellulaires différents de ceux impliqués dans la dégradation basale de CD4. Comme  $\beta$ -TrCP n'est pas recruté au site de dégradation de CD4 induit par Vpu, CD4 ne serait pas ubiquitiné, mais resterait attaché à Vpu S52,56/D et aux autres protéines impliquées. Cette interaction avec un « complexe de dégradation » recruté par Vpu S52,56/D mais non-fonctionnel pourrait résulter en la stabilisation de CD4 qui serait autrement dégradé lentement par ERAD en absence de Vpu.

Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait tout d'abord s'assurer que la stabilisation de CD4 par Vpu S52,56/D dépend de l'interaction directe entre CD4 et Vpu et n'est pas le reflet d'un effet indirect de Vpu sur le RE. Puisqu'aucun mutant de Vpu n'est connu comme étant complètement défectif pour son interaction avec CD4 dans les cellules HEK 293T, nous avons tenté de vérifier la stabilisation de mutants de CD4 qui avaient été caractérisés comme étant totalement incapables d'interagir avec Vpu. Ces mutants ont soit une délétion de 32 acides aminés de la queue cytoplasmique (CD4  $\Delta$ 32), soit des mutations ponctuelles dans la queue cytoplasmique (CD4 EMKL et CD4 MK407.11PP) (Yao et al. 1995; Tiganos et al. 1997). Nous avons constaté que la demi-vie de chacun de ces mutants de CD4 était tellement longue qu'il serait pratiquement impossible d'observer une quelconque stabilisation supplémentaire par Vpu S52,56/D (données non présentées). Il reste donc à déterminer si l'interaction directe entre Vpu et CD4 est nécessaire pour observer l'effet de stabilisation par Vpu S52,56/D.

Nous avons aussi présenté certains mutants de Vpu qui possèdent un site de phosphorylation intact, mais qui sont incapables d'induire la dégradation de CD4 (L41/P, I38,42/T et DI) ou qui dégradent très peu CD4 (R40,44/E). Le phénotype de ces mutants nous donne des indices en ce qui concerne les portions de Vpu responsables de l'interaction avec CD4 et  $\beta$ -TrCP. Tout d'abord, la déstabilisation de la première hélice cytoplasmique par l'insertion d'une proline au milieu de l'hélice (L41/P) inhibe presque complètement l'interaction avec  $\beta$ -TrCP en plus de diminuer l'interaction avec CD4, ce qui explique

probablement pourquoi Vpu L41/P n'induit pas la dégradation de CD4. Il semble donc que la première hélice cytoplasmique, tout comme la deuxième (Tiganos et al. 1997), est nécessaire au processus de dégradation de CD4 par Vpu et que la présence d'un dodécapeptide intact contenant les sérines en position 52 et 56 de Vpu n'est pas suffisante pour permettre l'interaction avec  $\beta$ -TrCP (Vpu L41/P, Figure 8).

La mutation des acides aminés hydrophobes de la première hélice de Vpu (voir Figure 6, Vpu I38,42/T et Vpu DI) inhibe complètement la dégradation de CD4. Toutefois, ces mutants conservent une certaine capacité d'interaction avec CD4 et  $\beta$ -TrCP qui est toutefois moindre que la protéine Vpu sauvage. Le niveau minimal d'interaction entre Vpu et CD4 ou  $\beta$ -TrCP requis pour que la dégradation de CD4 soit efficace n'est pas connu et pourrait varier d'un système expérimental à un autre. Il est toutefois peu probable que le niveau d'interaction de ces mutants de Vpu avec CD4 et  $\beta$ -TrCP explique complètement leur défaut au niveau de la dégradation de CD4. En effet, certains mutants de Vpu qui lient CD4 à environ 20% ou 40% (Vpu IVW et Vpu W22/V, présentés au Tableau II de l'annexe I) peuvent induire la dégradation de CD4. Il semble donc qu'une faible capacité d'interaction à CD4 dans un système expérimental ne soit pas garante de l'inhibition de la dégradation de CD4 par Vpu.

Comme la mutation des acides aminés hydrophobes n'empêche pas complètement la liaison de Vpu à CD4 et à  $\beta$ -TrCP, on se serait attendu à ce que les mutants I38,42/T et surtout DI (qui interagit plus fortement avec  $\beta$ -TrCP) induisent, même faiblement, la dégradation de CD4. Or, la dégradation de CD4 par ces deux mutants est complètement inhibée. Ceci pourrait suggérer que les acides aminés hydrophobes de la première hélice cytoplasmique de Vpu soient impliqués dans le recrutement de partenaires cellulaires essentiels à la dégradation de CD4 ou que la mutation de ces acides aminés entraîne un changement de conformation de la protéine qui la rend incapable d'interagir avec ces partenaires cellulaires.

La mutation des acides aminés de charge positive (R40,44/E) qui se trouvent du côté opposé des acides aminés hydrophobes dans la première hélice cytoplasmique (voir Figure 6) affecte peu la liaison à CD4 et à  $\beta$ -TrCP. Malgré tout, Vpu R40,44/E n'induit que faiblement la dégradation de CD4. Ces résultats suggèrent tout d'abord que les charges positives de la première hélice cytoplasmique de Vpu sont importantes pour sa fonction de dégradation de CD4. D'autre part, il est possible que la mutation des charges positives

diminue l'interaction avec des partenaires cellulaires normalement impliqués dans ce processus, ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la dégradation de CD4 induite par Vpu R40,44/E comparativement au Vpu sauvage.

Ces données de mutagenèse pourraient aussi suggérer que l'interaction éventuelle avec des facteurs cellulaires puisse nécessiter plusieurs domaines de la protéine Vpu. Ainsi, le côté hydrophobe et le côté hydrophile de la première hélice semblent tous deux importants pour la dégradation de CD4 induite par Vpu. De plus, le côté hydrophobe semble être plus important pour la liaison à CD4 que le côté hydrophile.

Il serait intéressant de déterminer si les acides aminés hydrophobes ou les charges positives de la première hélice cytoplasmique de Vpu sont impliqués directement dans l'interaction avec des partenaires cellulaires éventuels ou si la mutation de ces acides aminés entraîne un changement de conformation de Vpu qui nuit à la liaison de ces facteurs. À cet effet, il ne semble pas que l'interaction entre les deux hélices cytoplasmiques de Vpu par des interactions hydrophiles soit nécessaire pour la dégradation de CD4 puisque le remplacement des charges négatives de la deuxième hélice pour des charges positives (E65,69/K, voir le schéma de l'hélice 2 à la Figure 6) n'a aucun effet sur la dégradation de CD4 (voir Tableau I, Annexe I). Il se pourrait toutefois que les charges positives de la première hélice (R40 et R44) interagissent avec les phospholipides de la membrane qui possèdent des charges négatives et que cette interaction soit importante pour la conformation générale de Vpu.

À la lumière de ces résultats, il est donc possible de proposer un modèle dans lequel la première hélice cytoplasmique pourrait être alignée avec la membrane par l'interaction des charges positives avec le groupement polaire des phospholipides et que cette hélice pourrait soit interagir avec la deuxième hélice de Vpu par des interactions hydrophobes ou être directement impliquée dans l'interaction avec des partenaires cellulaires via ses acides aminés hydrophobes.

Une autre évidence tendant à suggérer que des protéines cellulaires autres que  $\beta$ -TrCP soient impliquées dans la dégradation de CD4 induite par Vpu est la différence de phénotype de certains mutants de Vpu qui est observée entre deux lignées cellulaires différentes (les cellules COS et les cellules HEK 293T). Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus par l'expression de CD4 et de Vpu dans les cellules HEK 293T qui sont des cellules embryonnaires de rein humain. Toutefois, certains mutants de Vpu avaient été caractérisés au préalable dans les cellules COS qui sont des cellules de rein de singe vert

africain adulte. La caractérisation selon le type cellulaire de certains mutants de Vpu est présentée au Tableau I de l'Annexe I.

On peut remarquer que les mutations individuelles des acides aminés hydrophobes de la première hélice de Vpu (I38/A et I42/A) inhibaient complètement la dégradation de CD4 dans les cellules COS alors qu'elles n'avaient aucun effet dans les cellules HEK 293T. De plus, la mutation des acides aminés de charge positive de la même hélice (R40,44/E) inhibait la dégradation de CD4 dans les cellules COS alors que ce mutant induit une légère dégradation de CD4 dans les cellules HEK 293T. Finalement, deux mutants du domaine transmembranaire de Vpu qui étaient déjà disponibles dans le laboratoire ont été testés dans les deux types cellulaires. Il s'agit des mutants IVW et W22/V dont la caractérisation est présentée au Tableau II de l'Annexe I. Ces mutants étaient totalement incapables d'induire la dégradation de CD4 dans les cellules COS alors qu'ils avaient un phénotype sauvage dans les cellules HEK 293T.

Il est intéressant de noter ici que la fonction d'augmentation de la relâche virale par Vpu présente aussi un phénotype différent selon le type de cellules humaines qui est utilisé. En effet, les cellules HEK 293T sont dites permissives puisqu'elles permettent une relâche virale efficace, même en absence de Vpu alors que les cellules HeLa sont dites restrictives puisque la relâche virale n'est efficace qu'en présence de Vpu (Varthakavi et al. 2003; Neil et al. 2008). Quoique ces deux types cellulaires soient d'origine humaine, l'effet de Vpu est observé seulement dans les cellules HeLa et il semble que ce phénomène soit dû à l'expression différentielle de la protéine BST2 qui n'est pas exprimée chez les cellules HEK 293T (voir section 7.4.2 du chapitre 1 pour l'effet de BST2 sur la relâche virale) (Neil et al. 2008). Ainsi, à l'instar de la fonction d'augmentation de la relâche virale par Vpu, certains facteurs importants pour l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu pourraient différer entre les cellules HEK 293T et les cellules COS, ce qui pourrait expliquer les différences de phénotype observés entre ces deux types cellulaires.

Ces différences pourraient donc s'expliquer par la nécessité de Vpu d'interagir avec des partenaires cellulaires. Comme le VIH-1 infecte normalement des cellules humaines, il se pourrait que la protéine Vpu du VIH-1 ait évolué pour interagir de façon plus efficace avec les protéines humaines comparativement aux homologues retrouvés chez le singe. Cela pourrait expliquer pourquoi les mutants de Vpu qui ont un phénotype différent entre les deux types cellulaires présentent tous un défaut de dégradation dans les cellules de singe et pas dans les cellules humaines et non l'inverse. Si l'interaction entre les protéines de

singe et Vpu est moins spécifique ou moins forte que celle entre les protéines humaines et Vpu, la moindre mutation introduite dans Vpu pourrait déstabiliser l'interaction avec les facteurs simiens, mais pas celle avec les facteurs humains. D'ailleurs, les mutations dans Vpu I38/A et I42/A sont assez conservatrices par rapport à la double mutation I38,42/T. Il est intéressant de remarquer que les mutants I38/A et I42/A n'induisent pas la dégradation de CD4 dans les cellules COS alors qu'ils dégradent CD4 dans les cellules 293T. De plus, la double mutation I38,42/T inhibe la dégradation de CD4 peu importe le type cellulaire (voir Tableau I, Annexe I).

En admettant, que la première hélice soit impliquée dans le recrutement de partenaires cellulaires encore inconnus dont la fonction serait essentielle à la dégradation de CD4 par Vpu, ces mutants (I38,42/T, DI et R40,44/E), en plus du mutant aux sites de phosphorylation de Vpu (Vpu S52,56/D) pourraient être utiles pour découvrir l'identité de ces partenaires potentiels. Vpu S52,56/D pourrait servir de contrôle positif en terme d'interaction avec un éventuel partenaire cellulaire puisqu'il interagit au même niveau que la protéine sauvage avec CD4 tout en étant incapable d'induire sa dégradation. En co-exprimant CD4 avec Vpu S52,56/D ou avec l'un des mutants de la première hélice de Vpu, il serait possible de trouver des protéines qui interagissent avec Vpu S52,56/D, mais pas avec l'un ou l'autre des autres mutants par des approches d'immunoprécipitation de Vpu suivi de l'identification des protéines éventuellement liées à Vpu S52,56/D par spectrométrie de masse.

Toutefois, comme les mutants de Vpu présentés dans ce chapitre lient moins CD4 que la protéine Vpu sauvage, les expériences de co-immunoprécipitation pourraient s'avérer difficiles. Il serait donc plus avantageux d'utiliser des mutants de Vpu qui interagissent avec CD4 et  $\beta$ -TrCP comme la protéine Vpu sauvage mais qui n'induisent pas la dégradation de CD4. Pour palier à cette difficulté, il serait possible d'utiliser les mutants I38/A et I42/A, dont il a été question plus haut, dans les cellules COS. Ces mutants lient CD4 et  $\beta$ -TrCP presque autant que la protéine sauvage (résultats non publiés) et pourtant, ils n'induisent pas du tout la dégradation de CD4 dans les cellules COS (voir Tableau I, Annexe I). Il faudrait toutefois être prudent avec les résultats ainsi obtenus puisqu'il se pourrait que les facteurs cellulaires impliqués dans la dégradation de CD4 induite par Vpu diffèrent entre les cellules humaines et simiennes (voir discussion plus haut).



Une autre façon de découvrir des partenaires cellulaires de Vpu qui pourraient être impliqués dans le processus de dégradation de CD4 est de vérifier l'implication dans la dégradation de CD4 de protéines cellulaires dont la fonction dans un processus ERAD est déjà connue, telles que la protéine Herp par exemple (dont il a été question dans la section 9.1.1 du chapitre 1). Il serait entre autres intéressant de vérifier l'implication des différents candidats comme pore de dislocation (Sec61, Derlin-1 ou des ubiquitine ligases retrouvées dans la membrane du RE) dans la dégradation de CD4 par Vpu. L'importance pour le mécanisme de dégradation de CD4 par Vpu de chacune de ces protéines cellulaires pourrait être étudiée en inhibant l'expression de la protéine par des petits ARN d'interférence (siRNAs) ou en exprimant des mutants transdominants négatifs des protéines avec CD4 et Vpu lorsqu'ils sont disponibles.

En conclusion, il a été montré qu'une protéine Vpu incapable de recruter  $\beta$ -TrCP (Vpu S52,56/D) semblait empêcher CD4 d'être dégradé au niveau du RE par une voie de dégradation cellulaire. Il a été proposé que cette stabilisation soit due au recrutement de CD4 dans un « complexe de dégradation » induit par Vpu où CD4 n'est pas dégradé puisqu'il ne peut être ubiquitiné par l'ubiquitine ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> en présence de Vpu S52,56/D. Cette séquestration de CD4 dans un « complexe de dégradation » non-fonctionnel aurait pour effet d'empêcher CD4 d'être dégradé par une autre voie cellulaire.

La mutation des acides aminés hydrophobes et hydrophiles de la première hélice cytoplasmique de Vpu inhibe ou ralentit la dégradation de CD4 induite par Vpu tout en conservant un certain niveau d'interaction avec CD4 et  $\beta$ -TrCP. Nous avons émis l'hypothèse que les mutations de la première hélice de Vpu puissent empêcher le recrutement de partenaires cellulaires qui seraient essentiels au processus de dégradation de CD4. Les mutants de Vpu qui ont été décrits dans ce chapitre pourraient éventuellement être utiles à l'identification de partenaires cellulaires de Vpu impliqués dans la dégradation de CD4. Ultiment, les mutants de Vpu et les résultats qui ont été présentés dans ce chapitre pourraient permettre de mieux comprendre les processus sous-jacents à la dégradation de CD4 induite par Vpu et le processus ERAD dans des cellules humaines.

## REMERCIEMENTS

Nous voulons remercier Richard Benarous qui nous a donné le plasmide pcDNA3.1  $\beta$ -TrCP-Myc-His.

**CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **Problématique et objectifs de départ**

Jusqu'à maintenant, certaines étapes du mécanisme de la dégradation de CD4 induite par la protéine Vpu du VIH-1 étaient connues. Par exemple, il était accepté que, suite à son interaction directe avec CD4, Vpu recrute une ubiquitine ligase cellulaire, SCF<sup>β-TrCP</sup> afin d'induire la dégradation du CD4 nouvellement synthétisé au niveau du RE par le système ubiquitine-protéasome. Puisque Vpu induit la dégradation du CD4 qui est retenu au RE, il a été suggéré que le processus de dégradation induit par Vpu implique un mécanisme semblable à la voie de dégradation ERAD.

La dégradation ERAD nécessite généralement la dislocation des protéines du RE vers le cytoplasme avant qu'elles soient poly-ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Toutefois, l'ubiquitination est parfois requise pour initier ou compléter le processus de dislocation. Plusieurs évidences indirectes démontrant l'implication du système ubiquitine-protéasome avaient été obtenues par des études effectuées chez des cellules de mammifères (Schubert et al. 1998). Toutefois, les seules évidences directes de l'ubiquitination de CD4 et de sa dislocation en présence de Vpu ont été obtenues chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en co-exprimant la protéine β-TrCP humaine (Meusser and Sommer 2004).

Les travaux présentés dans cette thèse avaient trois objectifs principaux. Le premier était de déterminer si la poly-ubiquitination de CD4 est nécessaire pour la dégradation induite par Vpu et de déterminer comment CD4 vient en contact avec la machinerie de dégradation cytoplasmique. Le deuxième objectif consistait à déterminer si l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 représente une étape essentielle dans le processus de dégradation. Le troisième objectif était de déterminer si Vpu interagit avec des facteurs cellulaires autres que β-TrCP dans le but d'induire la dégradation de CD4.

## **Étude du mécanisme de la dégradation de CD4 induite par Vpu**

### **Système expérimental**

Nous avons utilisé pour toutes les études présentées dans cette thèse, un système de surexpression de CD4 et de Vpu dans les cellules humaines HEK 293T qui ne représente pas les conditions physiologiques d'infection par le VIH-1. Le système utilisé ne nous permet pas d'extrapoler directement nos observations au processus de dégradation de CD4 qui a lieu lors de l'infection naturelle des cellules du système immunitaire par le VIH-1. En

effet, les cellules cibles du VIH-1 expriment CD4 de façon physiologique et le niveau d'expression de CD4 dans ces cellules est moins élevé que celui obtenu par la transfection d'un vecteur exprimant CD4 dans les cellules HEK 293T. De plus, ces cellules expriment aussi la kinase p56<sup>lck</sup> qui interagit avec CD4 au niveau du RE et à la membrane plasmique via deux cystéines (C420 et C422) de la queue cytoplasmique de CD4 (Rudd et al. 1988; Veillette et al. 1988; Shaw et al. 1989; Shaw et al. 1990; Turner et al. 1990; Crise and Rose 1992a). L'interaction de CD4 avec p56<sup>lck</sup> dans certains types cellulaires infectés par le VIH-1 pourrait avoir des conséquences sur la dégradation de CD4 induite par Vpu (voir discussion chapitre 3).

Le système que nous avons utilisé a tout de même plusieurs avantages. Il nous permet de vérifier l'effet de Vpu sur CD4 en absence d'autres protéines virales qui pourraient rendre la caractérisation du processus plus complexe. Il nous permet aussi de vérifier la sensibilité à Vpu de différents mutants de CD4 sans avoir à inhiber l'expression du CD4 sauvage puisque les cellules HEK 293T n'expriment pas CD4. Ces cellules sont aussi facilement transfectables et permettent un niveau d'expression de CD4 et de Vpu tels que la détection de ces deux protéines en est grandement facilitée.

#### Dislocation et ubiquitination de CD4 en présence de Vpu : Discussion des résultats présentés et proposition d'un modèle de la dégradation de CD4 induite par Vpu

Au chapitre 2, nous avons montré chez des cellules humaines HEK 293T par l'utilisation d'un mutant transdominant négatif de l'ubiquitine (UbK48/R) que Vpu pouvait induire la poly-ubiquitination de CD4. De plus, la mutation des sites de phosphorylation de Vpu, qui inhibe l'interaction avec  $\beta$ -TrCP, empêche la poly-ubiquitination de CD4, suggérant fortement que la E3 ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> soit impliquée dans la poly-ubiquitination du CD4 qui est recruté par Vpu (Figure 2, p. 125).

Les expériences de fractionnement cellulaire que nous avons mis au point nous ont permis d'obtenir des résultats suggérant que le processus de dégradation de CD4 nécessite sa dislocation de la membrane du RE vers le cytosol (Figure 5, p. 131). L'inhibition de la dégradation de CD4 par la surexpression d'un mutant transdominant négatif de l'ATPase p97 (Figure 6, p. 133) semble confirmer la dislocation de CD4 induite par Vpu puisque

cette ATPase est normalement impliquée dans la dislocation de certains substrats du ERAD (Meyer et al. 2000; Ye et al. 2001).

Enfin, nous avons démontré que les lysines cytoplasmiques de CD4 semblaient jouer un rôle dans la dégradation de CD4 par Vpu puisque la mutation de toutes les lysines cytoplasmiques ralentissait la cinétique de dégradation de CD4 (Figure 3, p. 127). Ces résultats montrent tout de même que la présence de lysines dans la queue cytoplasmique de CD4 n'est pas absolument nécessaire pour sa dégradation dans les cellules HEK 293T, suggérant que ce processus pourrait impliquer l'ubiquitination à d'autres positions dans CD4.

Les données concernant l'importance des lysines cytosoliques de CD4 que nous avons obtenues dans les cellules HEK 293T diffèrent des résultats obtenus dans les cellules HeLa et chez *S. cerevisiae* (Schubert et al. 1998; Meusser and Sommer 2004). En effet, dans ces deux systèmes, le remplacement des lysines de la queue cytoplasmique de CD4 par des arginines rendait CD4 complètement insensible à Vpu. Ces résultats suggéraient fortement que l'ubiquitination de la queue cytosolique de CD4 représente une étape essentielle dans le processus de dégradation induit par Vpu. Nous avons donc émis l'hypothèse que dans les cellules HEK 293T, il se pourrait que d'autres acides aminés de la queue cytoplasmique de CD4 soient utilisés comme site d'attachement de l'ubiquitine.

Les résultats présentés au chapitre 3 suggèrent effectivement que la dégradation de CD4 par Vpu implique l'ubiquitination de la queue cytoplasmique. En effet, le remplacement par mutagenèse dirigée de tous les sites potentiels d'ubiquitination (K, C, S et T) cytosoliques de CD4 inhibe complètement la dégradation de CD4 (Figure 1, p. 162). De plus, la présence de cystéines en C-terminal de la queue cytoplasmique de CD4, en absence de tout autre site potentiel d'ubiquitination, est suffisante pour induire la dégradation de CD4 en présence de Vpu (Figure 3, p. 166).

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons suggéré un modèle d'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 où les sites potentiels d'attachement de l'Ub sont placés à proximité de la E2 qui se retrouve dans le complexe SCF<sup>β-TrCP</sup> recruté par Vpu. Dans ce modèle présenté au chapitre 3, nous suggérons que les sites d'ubiquitination dans la queue cytosolique de CD4 sont choisis de façon non-spécifique par SCF<sup>β-TrCP</sup>, autant en terme de position, qu'en terme de résidu (lysine ou cystéine). Nous avons aussi discuté de la

possibilité que le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> puisse recruter certains membres d'une famille d'enzymes de conjugaison de l'Ub (E2) capables d'attacher l'Ub sur des cystéines.

Ce modèle pourrait expliquer que la présence de cystéines en C-terminal de la queue cytosolique d'un CD4 n'ayant aucun autre site potentiel d'ubiquitination cytosolique soit suffisante pour le rendre sensible à Vpu alors que leur délétion dans le contexte d'un CD4 sauvage n'a aucun effet sur la dégradation de CD4 (voir discussion chapitre 3). Ce modèle pourrait aussi expliquer pourquoi le CD4 KRcyto, chez qui toutes les lysines cytoplasmiques ont été remplacées par des arginines, reste sensible à Vpu dans les cellules HEK 293T.

Comment expliquer toutefois que les lysines cytosoliques sont nécessaires pour observer une dégradation de CD4 dans les cellules HeLa et *S. cerevisiae*? Il est à noter en effet que la protéine  $\beta$ -TrCP humaine a été exprimée par un plasmide dans les levures afin de pouvoir observer la dégradation de CD4 dépendante de Vpu (Meusser and Sommer 2004). Comme les protéines  $\beta$ -TrCP qui sont impliquées dans la dégradation de CD4 dans chacun des systèmes (cellules HeLa, cellules HEK 293T et levure) sont d'origine humaine, il est possible que les différences observées dans chacun de ces systèmes concernant la nécessité des lysines cytoplasmiques de CD4 soient dues à d'autres co-facteurs cellulaires de SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> qui varient peut-être d'un type cellulaire à un autre.

Selon le modèle que nous avons proposé au chapitre 3, la capacité de Vpu de dégrader un CD4 dépourvu de lysines cytosoliques dans les cellules HEK 293T pourrait s'expliquer par la capacité de SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> de recruter une E2 capable d'attacher l'Ub sur des cystéines, alors qu'il en serait incapable dans les cellules HeLa et *S. cerevisiae*. Or, bien que les E2 de la famille E2D (capables d'attacher l'Ub sur les cystéines) soient exprimées dans les cellules HeLa, leur niveau d'expression semble beaucoup moindre que dans les cellules de reins (comme les HEK 293T par exemple) (Jensen et al. 1995). Il est donc concevable que leur recrutement par SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> dans les cellules HeLa soit moins efficace que dans les cellules HEK 293T.

Par ailleurs, même si la protéine  $\beta$ -TrCP humaine a été exprimée chez *S. cerevisiae* pour étudier le processus de dégradation de CD4 induit par Vpu, il n'en demeure pas moins que les autres sous-unités du complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> sont des protéines de levures. Bien que des homologues des E2 de la famille E2D existent chez la levure, il se pourrait qu'ils ne soient pas recrutés dans ce contexte particulier. En effet, ce n'est pas  $\beta$ -TrCP qui recrute la

E2, mais bien la protéine Rbx1 qui fait partie du complexe SCF (voir Figure 16 de l'introduction).

### Expériences futures

En résumé, les résultats montrés au chapitre 3 nous ont permis d'élaborer un modèle dans lequel les lysines cytosoliques de CD4 représenteraient les sites principaux d'attachement de l'Ub en présence de Vpu mais où les cystéines pourraient servir de sites d'ubiquitination secondaires, menant éventuellement à la dégradation de CD4. Ce modèle devrait toutefois être confirmé par une approche plus directe, soit en vérifiant la capacité de Vpu d'induire l'ubiquitination d'un CD4 qui contient seulement des cystéines comme sites accepteurs de l'ubiquitine dans la queue cytoplasmique et en s'assurant qu'un CD4 dépourvu de tout site potentiel d'ubiquitination cytosolique ne peut être ubiquitiné en présence de Vpu. Ces études confirmeraient du même coup que l'ubiquitination du domaine cytoplasmique de CD4 représente une étape précoce, essentielle au processus de dégradation induit par Vpu.

Quoique cette approche puisse confirmer les résultats qui ont été présentés au chapitre 3, il n'en reste pas moins que toutes ces études ont été effectuées à l'aide de mutants de CD4. La création de mutants de la molécule CD4 est une approche pratique et rapide qui nous permet de mieux disséquer les différentes étapes du mécanisme de la dégradation de CD4 par Vpu. Toutefois, dans un contexte physiologique, les lysines sont présentes dans la queue cytoplasmique de CD4. Donc, même si SCF<sup>β-TrCP</sup> peut recruter une E2 capable d'attacher l'Ub sur des cystéines, il nous est difficile d'évaluer si l'ubiquitination sur des cystéines de CD4 serait physiologique, c'est-à-dire qu'elle ait lieu même quand les lysines cytosoliques de CD4 sont disponibles.

Il serait donc intéressant de vérifier s'il y a attachement de l'ubiquitine sur les cystéines de la queue cytosolique de CD4 quand les lysines sont présentes. À cette fin, deux approches expérimentales qui seront discutées plus bas pourraient être utiles : le traitement des formes ubiquitinées de CD4 avec du β-mercaptoéthanol à pH 11 et la spectrométrie de masse. Ces deux techniques pourraient aussi être utilisées pour vérifier les sites d'ubiquitination de CD4 dans des lymphocytes T infectés par le VIH-1. Cela permettrait de valider nos résultats dans un contexte d'infection qui est plus physiologique.

La première technique a été utilisée avec succès afin de vérifier l'attachement de l'Ub sur les cystéines de la queue cytosolique de la chaîne lourde (CL) du CMH-I par la protéine MIR1 du KSHV (Cadwell and Coscoy 2005). En effet, le traitement des protéines ubiquitinées par du  $\beta$ -mercaptoéthanol à pH 11 a la capacité de briser les liens thiol-ester (Ub-cystéine) tout en laissant les liens peptidiques (Ub-lysine) intacts. Il serait donc intéressant de vérifier si le signal correspondant aux formes ubiquitinées d'un CD4 sauvage en présence de Vpu diminue suite à ce traitement réducteur.

La deuxième technique pouvant servir à vérifier l'attachement de l'Ub sur les cystéines en conditions physiologiques est un peu plus hypothétique. Il a été démontré que l'attachement de l'ubiquitine sur une protéine peut être détecté par spectrométrie de masse après digestion des protéines ubiquitinées avec la trypsine (Wang and Cotter 2005; Denis et al. 2007). L'ubiquitine laisse une « signature » sur le résidu auquel elle est attachée et il pourrait alors être possible de vérifier si l'ubiquitine a été attachée sur des cystéines. Cette approche a été jusqu'à maintenant validée avec des protéines qui étaient ubiquitinées sur des lysines. Comme l'ubiquitine n'est pas attachée via un lien peptidique sur les cystéines, il reste à déterminer si cette approche pouvait servir à identifier des peptides dont les cystéines sont ubiquitinées.

#### Indices suggérant l'implication de partenaires de Vpu autres que $\beta$ -TrCP dans le processus de dégradation de CD4

Même si l'ubiquitination sur les cystéines cytosoliques de CD4 en présence de Vpu s'avérait possible mais non physiologique, nos résultats permettraient tout de même de mieux comprendre le mécanisme d'attachement de l'ubiquitine sur la queue cytosolique de CD4 par le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>. En ce sens, il se pourrait que les sites d'ubiquitination ne soient pas choisis selon une séquence spécifique, mais que les résidus qui se retrouvent spatialement à proximité de la E2 présente dans le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> peuvent être ubiquitinés.

Ceci impliquerait que la structure CD4-Vpu-SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> ne soit pas rigide. Ainsi, le rôle de Vpu ne serait pas de placer le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> dans une position spécifique près de sites d'ubiquitination précis de la queue cytosolique de CD4. Vpu pourrait par contre amener SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> à proximité de la queue cytosolique de CD4 dans le but d'induire son



ubiquitination de façon non spécifique qui autrement, n'aurait pas lieu en absence de Vpu (voir discussion du chapitre 4). Dans ce modèle, c'est l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 par SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> qui serait le signal déclencheur de sa dégradation en présence de Vpu. Reste à savoir si le rôle de Vpu s'arrête là ou si Vpu pourrait avoir un rôle à jouer dans les étapes subséquentes de la dégradation de CD4.

En ce sens, les résultats présentés au chapitre 4 représentent un indice que Vpu pourrait devoir interagir avec d'autres partenaires cellulaires dans le but de compléter la dégradation de CD4. En effet, la co-expression avec CD4 d'un mutant de Vpu qui ne peut recruter  $\beta$ -TrCP (Vpu S52,56/D) a pour effet de stabiliser CD4. Ceci implique d'une part que CD4 soit dégradé par un processus cellulaire en absence de Vpu et d'autre part, que Vpu S52,56/D pourrait protéger CD4 de cette dégradation basale.

Nous avons proposé que la stabilisation de CD4 par ce mutant de Vpu pourrait être due au recrutement de CD4 dans un « complexe de dégradation » qui est normalement recruté par la protéine Vpu sauvage, mais que CD4 n'est pas ubiquitiné (et donc pas dégradé) puisque le Vpu S52,56/D ne peut recruter  $\beta$ -TrCP. La formation de ce « complexe de dégradation » par Vpu pourrait nécessiter le recrutement de protéines cellulaires par Vpu (telles qu'un pore de dislocation ou des chaperonnes par exemple) qui seraient nécessaires pour la dégradation de CD4. Vpu S52,56/D pourrait alors protéger CD4 de sa dégradation basale qui impliquerait des facteurs différents de ceux recrutés par Vpu.

Les résultats de la section 3.2 du chapitre 4 appuient aussi l'hypothèse du recrutement de facteurs cellulaires par Vpu afin d'induire la dégradation de CD4. Ces résultats montrent que certains mutants de Vpu qui sont capables d'interagir avec CD4 et  $\beta$ -TrCP sont toutefois incapables (ou très faiblement) d'induire la dégradation de CD4. Quoique ces mutants de Vpu interagissent plus faiblement que la protéine Vpu sauvage avec CD4 et  $\beta$ -TrCP, il est possible que leur défaut de dégradation de CD4 soit dû à un défaut de recrutement de certains partenaires cellulaires nécessaires pour la dégradation de CD4 (voir discussion du chapitre 4). De plus, certains mutants de Vpu sont capables de dégrader CD4 dans les cellules HEK 293T alors qu'ils n'induisent pas du tout la dégradation de CD4 dans les cellules COS (Tableaux I, p.262 et II, p. 263 de l'Annexe I). Ces résultats suggèrent que certains facteurs cellulaires puissent être différents entre les cellules humaines et les cellules simiennes.

Comme il a été mentionné plus haut, les données obtenues dans des cellules de rein humaines ou simiennes (HEK 293T ou COS) devraient être confirmées dans des cellules T CD4<sup>+</sup> par exemple qui sont normalement la cible du VIH-1. En effet, puisqu'il semble y avoir des différences entre les COS et les 293T, il est possible qu'il y en ait aussi entre les cellules 293T et les cellules T. Même si ces deux types cellulaires sont d'origine humaine, il se peut que le niveau d'expression des protéines diffère dans chacun d'eux. Il serait donc intéressant de confirmer les données de mutagenèse présentées au chapitre 4 et de vérifier l'interaction de Vpu avec des partenaires cellulaires potentiels dans un système plus physiologique en infectant des cellules T avec des virus dont le gène *vpu* a été muté.

### **Utilité des résultats présentés pour la compréhension du processus ERAD**

Comme la dégradation de type ERAD semble être très complexe dans les cellules de mammifères contrairement aux cellules de levures, l'étude de systèmes viraux impliquant un processus ERAD peut nous renseigner sur les différents acteurs impliqués dans les processus ERAD cellulaires. À cet effet, plusieurs protéines virales ayant la capacité d'induire la dégradation d'un substrat cellulaire en servant d'adaptateurs entre le substrat et la machinerie ERAD (Vpu, US2, et US11 par exemple) ou qui agissent elles-mêmes en tant qu'ubiquitine ligases (mk3, MIR1 et MIR2 par exemple) sont présentement à l'étude. Ces systèmes sont faciles à manipuler car ils nous permettent d'exprimer les protéines virales sauvages ou mutantes ainsi que leurs substrats afin de pouvoir disséquer les différentes étapes impliquées dans le processus étudié. Les niveaux d'expression ainsi atteints sont adéquats pour faire plusieurs études telles que des co-immunoprécipitations par exemple.

L'étude du mécanisme de la dégradation de CD4 induite par Vpu pourrait amener des renseignements très différents de ceux obtenus par l'étude de la dégradation de la chaîne lourde (CL) du CMHI par les protéines US2 et US11 du HCMV par exemple. Vpu, US2 et US11 agissent comme des adaptateurs entre le système ERAD cellulaire et leurs substrats respectifs. Leur topologie est toutefois très différente. En effet, la plus grande portion de Vpu se retrouve dans le cytoplasme alors que US2 et US11 sont principalement luménales. D'ailleurs, l'interaction entre CD4 et Vpu a lieu entre leurs domaines cytoplasmiques respectifs (Bour et al. 1995a) alors que US2 et US11 interagissent avec la CL via leurs domaines luménaux et transmembranaire pour US11 (Gewurz et al. 2001b; Lilley et al. 2003).

Une autre différence notoire qui existe entre les mécanismes induits par Vpu ou par US2 et US11 est le fait que la dislocation et la dégradation dans le cas du processus de dégradation de la CL semblent complètement dissociés alors que ce n'est pas le cas pour la dégradation de CD4. En effet, lorsque le protéasome est inhibé, les CL s'accumulent dans le cytoplasme en présence de US2 et de US11 (Wiertz et al. 1996a; Shamu et al. 1999) alors qu'il a été démontré que CD4 reste dans la voie sécrétoire lorsque le protéasome n'est pas fonctionnel (Schubert et al. 1998). Ces données démontrent que les mécanismes de dislocation de la CL et de CD4 sont probablement différents. Il se pourrait que le protéasome soit impliqué directement dans la dislocation de CD4 et que la dislocation et la dégradation soient couplées dans le cas de la dégradation de CD4 par Vpu. Par ailleurs, des formes ubiquitinées de CD4 n'ont jamais pu être observées dans les cellules de mammifères en bloquant le protéasome (Schubert et al. 1998). Nous avons été en mesure de les détecter seulement en bloquant la dégradation par la surexpression du mutant transdominant négatif de l'ubiquitine (UbK48/R) (chapitre 2).

Comme US2, US11 et Vpu ont des topologies différentes, la différence entre les mécanismes induits par ces protéines n'est pas sans rappeler les différentes voies de ERAD qui ont été caractérisées chez la levure (ERAD-M, ERAD-L et ERAD-C) (Carvalho et al. 2006) et qui impliquent des co-facteurs spécifiques selon le domaine du substrat qui est reconnu par la machinerie ERAD. Toutefois, même US2 et US11 présentent des différences au niveau du mécanisme qu'elles induisent afin de dégrader la CL (voir section 9.1.4.1 du chapitre 1), ce qui tend à confirmer que la dégradation par ERAD présente un degré de complexité très élevé dans les cellules de mammifères. Donc, même si la dégradation de la CL par les protéines US2 et US11 du HCMV est un des mécanismes de dégradation ERAD les plus étudiés, l'étude du mécanisme de la dégradation du CD4 induite par Vpu est importante afin d'amener des évidences nouvelles concernant les processus cellulaires et viraux de dégradation des protéines au niveau du RE.

### **Importance de Vpu et de la dégradation de CD4 par Vpu pour la pathogenèse virale**

En plus de pouvoir potentiellement nous donner des renseignements sur les mécanismes cellulaires ERAD, l'étude du mécanisme de la dégradation de CD4 induite par Vpu est importante afin de mieux comprendre la pathogenèse du VIH-1. En effet, s'il nous

était donné de disséquer finement ce processus, de nouvelles voies de traitement de l'infection au VIH-1 pourraient nous être ouvertes.

Des évidences directes de l'importance de Vpu dans la pathogenèse virale ont été principalement démontrées par l'infection de singes avec des virus recombinants entre un VIS et le VIH (SHIV). Dans ce modèle d'infection, la présence de Vpu a été associée avec une virémie plus élevée chez les singes infectés avec des virus codant pour la protéine Vpu sauvage (Li et al. 1995). De plus, la réversion du gène *vpu* vers la forme sauvage semblait être associée à une élimination des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une perte de l'immunocompétence chez les singes infectés (McCormick-Davis et al. 1998). Ces résultats ont ensuite été confirmés par d'autres études montrant que la perte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les singes infectés corrélait avec la présence d'un gène *vpu* intact (Stephens et al. 2002) et que la progression de la maladie chez des macaques infectés avec un SHIV n'exprimant pas Vpu dépendait de l'apparition de mutations compensatoires dans les gènes *env* et *nef* (McCormick-Davis et al. 2000; Singh et al. 2001).

L'importance de la fonction de la facilitation de la relâche par Vpu a été démontrée pour la première fois dans ce système d'infection de singes par des virus recombinants SHIV (Hout et al. 2005). Lorsque le domaine transmembranaire de Vpu dans ce virus a été modifié afin de changer l'ordre des acides aminés, le virus résultant était beaucoup moins cytopathique, causait moins de perte des cellules T CD4<sup>+</sup> et les singes infectés avaient une virémie plus faible que ceux infectés avec le SHIV parental (Hout et al. 2005). Toutefois, comme ce mutant de Vpu était incapable de diminuer les niveaux d'expression en surface de CD4, il n'était pas très clair si la diminution des effets pathologiques observés avec ce mutant étaient causés par un défaut d'augmentation de la relâche virale ou à un défaut de la dégradation de CD4 par Vpu.

Il a aussi été démontré que la présence d'un site de phosphorylation intact dans Vpu, nécessaire pour l'induction de la dégradation de CD4, corrélait avec la capacité d'un virus recombinant SHIV de causer la perte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez des macaques infectés (Singh et al. 2003). L'importance de la fonction de dégradation du récepteur CD4 par la protéine Vpu pour la pathogenèse virale a aussi été étudiée récemment (Hill et al. 2008). Dans cette étude, ce groupe a tout d'abord démontré que la protéine Vpu d'un sous-type C du VIH-1 était moins efficace pour diminuer les niveaux d'expression de CD4 à la surface de la cellule que la protéine Vpu d'un sous-type B. Il a ensuite été démontré que le remplacement du gène *vpu* du sous-type B par celui du sous-type C dans leur virus SHIV

modèle a pour effet de ralentir la disparition des cellules T CD4<sup>+</sup> (Hill et al. 2008). Toutefois, comme le Vpu du sous-type C est moins efficace en terme d'augmentation de la relâche virale (Ruiz et al. 2008), il n'est pas clair si l'effet observé est dû à un défaut de dégradation de CD4, à un défaut d'augmentation de relâche ou à une combinaison des deux fonctions de Vpu.

Comme ces résultats suggèrent que la fonction de dégradation de CD4 par Vpu semble être importante pour la pathogenèse virale, il est intéressant de penser que cette fonction de Vpu pourrait représenter une cible supplémentaire pour les traitements contre la réplication du VIH-1. Comme CD4 est dégradé via le protéasome en présence de Vpu, il serait possible de cibler directement la fonction du protéasome afin d'inhiber la dégradation de CD4. Toutefois, cette approche risque d'avoir des effets pléiotropiques puisque le protéasome est impliqué dans la régulation de plusieurs protéines cellulaires. Les données présentées au chapitre 4 suggèrent que d'autres facteurs cellulaires, à part  $\beta$ -TrCP, puissent être nécessaires à l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu. Si d'autres partenaires cellulaires de Vpu sont découverts, ils pourraient représenter autant de cibles additionnelles pour le traitement contre le VIH-1. En effet, le ciblage de l'interaction entre Vpu et une autre protéine cellulaire par un composé anti-viral potentiel a plus de chance d'être spécifique à l'effet de Vpu comparativement au traitement de l'hôte avec des inhibiteurs du protéasome.

### **Modèle de la dégradation de CD4 induite par Vpu**

Suite aux résultats présentés dans cette thèse, nous pouvons suggérer un modèle tentant d'expliquer le mécanisme de la dégradation de CD4 par Vpu. Vpu interagit avec CD4 au niveau du RE et recrute l'ubiquitine ligase cellulaire SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> en plus d'autres facteurs cellulaires dont la fonction dans la dégradation de CD4 reste à déterminer. Suite à l'interaction entre CD4 et Vpu, l'ubiquitine ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> est amenée à proximité de la queue cytoplasmique de CD4 par Vpu et induit le transfert de l'ubiquitine sur des lysines ou cystéines de CD4 qui sont présentes près du site actif de la E2 qui fait partie de ce complexe. Cette ubiquitination peut induire la dislocation de CD4 de la membrane du RE vers le cytoplasme par un processus nécessitant l'ATPase p97 qui peut lier le CD4

ubiquitiné et faciliter son extraction de la membrane. Le CD4 ubiquitiné qui se retrouve dans le cytosol ou encore associé aux membranes est alors acheminé au protéasome et dégradé.

Le pore qui est utilisé pour la dislocation de CD4 est encore inconnu. Les protéines cellulaires qui sont peut-être recrutées par la première hélice cytoplasmique de Vpu pourraient être impliquées dans plusieurs étapes du processus de dégradation telles que le ciblage de CD4 vers un site spécifique de la membrane du RE, la dislocation de CD4 ou son acheminement jusqu'au protéasome une fois qu'il se retrouve dans le cytosol. La E2 qui est présente dans le complexe SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> recruté par Vpu reste aussi à déterminer.

**CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET CONTRIBUTIONS MAJEURES**

## Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse ont donc permis de mieux définir le mécanisme de dégradation du CD4 par la protéine Vpu du VIH-1. En effet, ces études ont démontré directement dans des cellules humaines que la protéine Vpu semble induire la poly-ubiquitination de CD4 et probablement la dislocation de la protéine du RE vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant de l'ATPase p97.

De plus, les résultats ont montré que dans les cellules HEK 293T, les lysines cytoplasmiques de CD4 semblent importantes pour la dégradation de CD4, mais non nécessaires. Toutefois, les évidences amenées aux chapitres 2 et 3 suggèrent que l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 représente une étape précoce nécessaire au mécanisme de la dégradation de CD4 induite par Vpu. De plus, ces résultats nous ont permis de proposer un modèle dans lequel l'ubiquitine ligase cellulaire SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> serait amenée à proximité de CD4 par Vpu et pourrait induire l'attachement de l'ubiquitine sur des acides aminés cytosoliques de CD4 de façon non-spécifique. Le choix des sites d'ubiquitination ne serait pas rigide, mais les lysines seraient probablement les sites principaux d'attachement de l'ubiquitine alors que les cystéines pourraient représenter des sites d'ubiquitination secondaires.

Enfin, les résultats présentés au chapitre 4 ont amené des évidences suggérant que Vpu puisse recruter, mis à part  $\beta$ -TrCP, d'autres partenaires cellulaires qui seraient importants pour l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu.

Ces résultats pourront servir à l'élaboration de plusieurs autres pistes de recherche qui s'ouvrent maintenant aux chercheurs concernant la dégradation de CD4 par Vpu puisque plusieurs aspects du processus restent encore à être caractérisés. Ces données pourraient aussi être utiles pour la compréhension des voies ERAD cellulaires par l'identification de nouveaux partenaires de Vpu qui pourraient être impliqués dans la dégradation de CD4. Enfin, les données présentées ici ont contribué à l'avancement des connaissances concernant le mécanisme de la dégradation de CD4 induit par Vpu dans des cellules de mammifères.



### Contributions majeures

- Évidences directes dans des cellules humaines que CD4 est poly-ubiquitiné en présence de Vpu.
- Première évidence dans des cellules humaines que les formes ubiquitinées de CD4 sont disloquées de la membrane du RE vers le cytoplasme avant d'être dégradées en présence de Vpu.
- Première évidence que l'ATPase p97 est impliquée dans le processus de dégradation de CD4 par Vpu.
- Premiers indices suggérant que les cystéines cytosoliques de CD4 pourraient être utilisés comme sites d'ubiquitination secondaires après les lysines.
- Proposition d'un nouveau modèle d'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4 où tout site potentiel d'attachement de l'ubiquitine (lysine et possiblement cystéine) qui se retrouve spatialement à proximité du site actif de la E2 présente dans le complexe SCF<sup>β-TrCP</sup> peut être ubiquitiné sans reconnaissance d'une séquence spécifique de CD4.
- Étude mutagénique extensive de Vpu qui pourrait être utile pour la découverte de nouveaux partenaires cellulaires de Vpu.

**CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abeijon, C. and C. B. Hirschberg (1990). "Topography of initiation of N-glycosylation reactions." J Biol Chem **265**(24): 14691-5.
- Accola, M. A., A. A. Bukovsky, et al. (1999). "A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agm)." J Virol **73**(12): 9992-9.
- Accola, M. A., A. Ohagen, et al. (2000a). "Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag)." J Virol **74**(13): 6198-202.
- Accola, M. A., B. Strack, et al. (2000b). "Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain." J Virol **74**(12): 5395-402.
- Aiken, C., J. Konner, et al. (1994). "Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain." Cell **76**(5): 853-64.
- Akari, H., S. Bour, et al. (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**(9): 1299-311.
- Albrecht, D. and et.al. (2007). HIV medicine 2007, Flying publisher.
- Alce, 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**(33): 34083-6.
- Alfadhli, A., T. C. Dhenub, et al. (2005). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly." J Virol **79**(23): 14498-506.
- Alin, K. and S. P. Goff (1996). "Amino acid substitutions in the CA protein of Moloney murine leukemia virus that block early events in infection." Virology **222**(2): 339-51.
- Andersen, J. L., J. L. DeHart, et al. (2006). "HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT." PLoS Pathog **2**(12): e127.
- Aniento, F., F. Gu, et al. (1996). "An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes." J Cell Biol **133**(1): 29-41.
- Ao, Z., X. Yao, et al. (2004). "Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system." J Virol **78**(6): 3170-7.

- Ardley, H. C. and P. A. Robinson (2005). "E3 ubiquitin ligases." Essays Biochem **41**: 15-30.
- Arganaraz, E., M. Schindler, et al. (2003). "Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 *nef* alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication." J. Biol. Chem. **278**: 33912-33919.
- 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**(6): 356-63.
- Auewarakul, P., P. Wacharapornin, et al. (2005). "Uncoating of HIV-1 requires cellular activation." Virology **337**(1): 93-101.
- Bachand, F., X. J. Yao, et al. (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**(13): 9083-91.
- Badley, A. D., D. Dockrell, et al. (1997). "Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor." J Exp Med **185**(1): 55-64.
- Bagasra, O., K. Khalili, et al. (1992). "TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells." J Virol **66**(12): 7522-8.
- Bai, C., P. Sen, et al. (1996). "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box." Cell **86**(2): 263-74.
- Barat, C., O. Schatz, et al. (1993). "Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase." J Mol Biol **231**(2): 185-90.
- Barel, M. T., N. Pizzato, et al. (2003a). "Amino acid composition of alpha1/alpha2 domains and cytoplasmic tail of MHC class I molecules determine their susceptibility to human cytomegalovirus US11-mediated down-regulation." Eur J Immunol **33**(6): 1707-16.
- Barel, M. T., M. Rensing, et al. (2003b). "Human cytomegalovirus-encoded US2 differentially affects surface expression of MHC class I locus products and targets membrane-bound, but not soluble HLA-G1 for degradation." J Immunol **171**(12): 6757-65.
- Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6910-24.

- Barry, M. and K. Fruh (2006). "Viral modulators of cullin RING ubiquitin ligases: culling the host defense." Sci STKE **2006**(335): pe21.
- Bartee, E., A. McCormack, et al. (2006). "Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators." PLoS Pathog **2**(10): e107.
- Baur, A. S., E. T. Sawai, et al. (1994). "HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization." Immunity **1**(5): 373-84.
- Belzile, J. P., G. Duisit, et al. (2007). "HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase." PLoS Pathog **3**(7): e85.
- Benichou, S., M. Bomsel, et al. (1994). "Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic." J Biol Chem **269**(48): 30073-6.
- Benkirane, M., K. T. Jeang, et al. (1994). "The cytoplasmic domain of CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells." EMBO J. **13**: 5559-69.
- Benson, R. E., A. Sanfridson, et al. (1993). "Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection." J Exp Med **177**(6): 1561-6.
- Bergeron, L. and J. Sodroski (1992). "Dissociation of unintegrated viral DNA accumulation from single-cell lysis induced by human immunodeficiency virus type 1." J. Virol. **66**: 5777-87.
- Berkowitz, R., J. Fisher, et al. (1996). "RNA packaging." Curr Top Microbiol Immunol **214**: 177-218.
- Bernardi, K. M., M. L. Forster, et al. (2008). "Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin." Mol Biol Cell **19**(3): 877-84.
- Berthoux, L., S. Sebastian, et al. (2005). "Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14849-53.
- Besnard-Guerin, C., N. Belaidouni, et al. (2004). "HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates." J Biol Chem **279**(1): 788-95.
- Bhamidipati, A., V. Denic, et al. (2005). "Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen." Mol Cell **19**(6): 741-51.

- Bidou, L., G. Stahl, et al. (1997). "In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal." Rna **3**(10): 1153-8.
- Bieniasz, P. D. (2006). "Late budding domains and host proteins in enveloped virus release." Virology **344**(1): 55-63.
- Bijlmakers, M. J. (2009). "Protein acylation and localization in T cell signaling (Review)." Mol Membr Biol **26**(1): 93-103.
- Binette, J., M. Dube, et al. (2007). "Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum." Retrovirology **4**: 75.
- Blasius, A. L., E. Giurisato, et al. (2006). "Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation." J Immunol **177**(5): 3260-5.
- Bolton, D. L., R. A. Barnitz, et al. (2008). "14-3-3 theta binding to cell cycle regulatory factors is enhanced by HIV-1 Vpr." Biol Direct **3**: 17.
- Bolton, D. L. and M. J. Lenardo (2007). "Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ T cells." J Virol **81**(17): 8878-90.
- Boname, J. M. and P. G. Stevenson (2001). "MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein." Immunity **15**(4): 627-36.
- Bonifacino, J. and L. Traub (2003). "Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes." Ann. Rev. Biochem **72**: 395-447.
- Borsetti, A., A. Ohagen, et al. (1998). "The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly." J Virol **72**(11): 9313-7.
- Bour, S., H. Akari, et al. (2003). "Naturally occurring amino acid substitutions in the HIV-2 ROD envelope glycoprotein regulate its ability to augment viral particle release." Virology **309**(1): 85-98.
- Bour, S., F. Boulerice, et al. (1991). "Inhibition of gp160 and CD4 maturation in U937 cells after both defective and productive infections by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **65**(12): 6387-96.
- Bour, S., R. Geleziunas, et al. (1995a). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection." Microbiol Rev **59**(1): 63-93.

- Bour, S., C. Perrin, et al. (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**(19): 15920-8.
- Bour, S., C. Perrin, et al. (1999). "Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity." J Biol Chem **274**(47): 33800-6.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (1996). "The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?" J Virol **70**(2): 820-9.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (1995b). "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**(3): 1510-20.
- 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**(12): 8285-300.
- Bour, S. and K. Strebel (2003). "The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release." Microbes Infect **5**(11): 1029-39.
- Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, et al. (2001). "HIV-1 infection requires a functional integrase NLS." Mol Cell **7**(5): 1025-35.
- Brady, J. and F. Kashanchi (2005). "Tat gets the "green" light on transcription initiation." Retrovirology **2**: 69.
- Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, et al. (1998). "A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor." Curr Biol **8**(22): 1235-8.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.
- Brown, P. O., B. Bowerman, et al. (1989). "Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2525-9.
- Bryant, M. and L. Ratner (1990). "Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 523-7.
- Brzovic, P. S. and R. E. Klevit (2006). "Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous?" Cell Cycle **5**(24): 2867-73.

- Bukrinsky, M. I. and O. K. Haffar (1998). "HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr." Mol Med **4**(3): 138-43.
- Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." Nature **365**(6447): 666-9.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Buonocore, L. and J. K. Rose (1990). "Prevention of HIV-1 glycoprotein transport by soluble CD4 retained in the endoplasmic reticulum." Nature **345**(6276): 625-8.
- Buonocore, L., T. G. Turi, et al. (1994). "Stimulation of heterologous protein degradation by the Vpu protein of HIV-1 requires the transmembrane and cytoplasmic domains of CD4." Virology **204**(1): 482-6.
- Burleigh, L., P. Y. Lozach, et al. (2006). "Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells." J Virol **80**(6): 2949-57.
- Butticaz, C., O. Michielin, et al. (2007). "Silencing of both beta-TrCP1 and HOS (beta-TrCP2) is required to suppress human immunodeficiency virus type 1 Vpu-mediated CD4 down-modulation." J Virol **81**(3): 1502-5.
- Cadwell, K. and L. Coscoy (2005). "Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase." Science **309**(5731): 127-30.
- Cadwell, K. and L. Coscoy (2008). "The specificities of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded E3 ubiquitin ligases are determined by the positions of lysine or cysteine residues within the intracytoplasmic domains of their targets." J Virol **82**(8): 4184-9.
- Caffrey, M., M. Cai, et al. (1998). "Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41." Embo J **17**(16): 4572-84.
- Cairns, T. M. and R. C. Craven (2001). "Viral DNA synthesis defects in assembly-competent Rous sarcoma virus CA mutants." J Virol **75**(1): 242-50.
- Callahan, M. A., M. A. Handley, et al. (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**(10): 8461.



- Cammarota, G., A. Scheirle, et al. (1992). "Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules." Nature **356**(6372): 799-801.
- Campbell, E. M., O. Perez, et al. (2008). "Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha." J Cell Biol **180**(3): 549-61.
- Cancio, R., S. Spadari, et al. (2004). "Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass." Biochem J **383**(Pt. 3): 475-82.
- Caramelo, J. J. and A. J. Parodi (2007). "How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum." Semin Cell Dev Biol **18**(6): 732-42.
- Carl, S., T. C. Greenough, et al. (2001). "Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS." J Virol **75**(8): 3657-65.
- Carvalho, A. F., M. P. Pinto, et al. (2007). "Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **282**(43): 31267-72.
- Carvalho, P., V. Goder, et al. (2006). "Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins." Cell **126**(2): 361-73.
- Casella, C. R., E. L. Rapaport, et al. (1999). "Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing." J Virol **73**(1): 92-100.
- CDC. (1993). "Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adult."
- Cen, S., F. Guo, et al. (2004). "The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G." J Biol Chem **279**(32): 33177-84.
- Cenciarelli, C., D. S. Chiaur, et al. (1999). "Identification of a family of human F-box proteins." Curr Biol **9**(20): 1177-9.
- Center, R. J., R. D. Leapman, et al. (2002). "Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface." J Virol **76**(15): 7863-7.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." Cell **89**(2): 263-73.
- Chan, D. C. and P. S. Kim (1998). "HIV entry and its inhibition." Cell **93**(5): 681-4.
- Chaudhuri, R., O. W. Lindwasser, et al. (2007). "Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor." J Virol **81**(8): 3877-90.

- Chen, B. K., R. T. Gandhi, et al. (1996). "CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef." *J Virol* **70**(9): 6044-53.
- Chen, M. Y., F. Maldarelli, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity." *J Virol* **67**(7): 3877-84.
- Chen, R., E. Le Rouzic, et al. (2004). "Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages." *J Biol Chem* **279**(27): 28419-25.
- Ciechanover, A. and R. Ben-Saadon (2004). "N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in." *Trends Cell Biol* **14**(3): 103-6.
- Clark, S. J., M. S. Saag, et al. (1991). "High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection." *N Engl J Med* **324**(14): 954-60.
- Coadou, G., N. Evrard-Todeschi, et al. (2002). "HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) solution structure of the 41-62 hydrophilic region containing the phosphorylated sites Ser52 and Ser56." *Int J Biol Macromol* **30**(1): 23-40.
- Coady, M. J., N. G. Daniel, et al. (1998). "Effects of Vpu expression on *Xenopus* oocyte membrane conductance." *Virology* **244**(1): 39-49.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, et al. (1988). "Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1." *Nature* **334**(6182): 532-4.
- Cohen, G. B., R. T. Gandhi, et al. (1999). "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells." *Immunity* **10**(6): 661-71.
- Collins, K. L., B. K. Chen, et al. (1998). "HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes." *Nature* **391**(6665): 397-401.
- Collman, R., J. W. Balliet, et al. (1992). "An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **66**(12): 7517-21.
- Connor, R. I., B. K. Chen, et al. (1995). "Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes." *Virology* **206**(2): 935-44.
- Cooper, D. A., J. Gold, et al. (1985). "Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion." *Lancet* **1**(8428): 537-40.

- Cornelissen, M., C. Kuiken, et al. (1997). "Gross defects in the vpr and vpu genes of HIV type 1 cannot explain the differences in RNA copy number between long-term asymptomatics and progressors." *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(3): 247-52.
- Cortes, M. J., F. Wong-Staal, et al. (2002). "Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells." *J Biol Chem* **277**(3): 1770-9.
- Coscoy, L. and D. Ganem (2000). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8051-6.
- Coscoy, L., D. J. Sanchez, et al. (2001). "A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition." *J Cell Biol* **155**(7): 1265-73.
- Courgnaud, V., B. Abela, et al. (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**(23): 12523-34.
- Courgnaud, V., M. Salemi, et al. (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**(16): 8298-309.
- Coux, O. and M. Piechaczyk (2000). "Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines." *Médecine/sciences* **16**(5): 623-9.
- Craig, H. M., M. W. Pandori, et al. (1998). "Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11229-34.
- Craig, H. M., T. R. Reddy, et al. (2000). "Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif." *Virology* **271**(1): 9-17.
- Craven, R. C., A. E. Leure-duPree, et al. (1995). "Genetic analysis of the major homology region of the Rous sarcoma virus Gag protein." *J Virol* **69**(7): 4213-27.
- Crise, B., L. Buonocore, et al. (1990). "CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor." *J Virol* **64**(11): 5585-93.

- Crise, B. and J. K. Rose (1992a). "Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor retains a CD4-p56lck complex in the endoplasmic reticulum." J Virol **66**(4): 2296-301.
- Crise, B. and J. K. Rose (1992b). "Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor." J Biol Chem **267**(19): 13593-7.
- Daar, E. S., T. Moudgil, et al. (1991). "Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **324**(14): 961-4.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Darlix, J. L., M. Lapadat-Tapolsky, et al. (1995). "First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses." J Mol Biol **254**(4): 523-37.
- daSilva, L. L., R. Sougrat, et al. (2009). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway." J Virol **83**(13): 6578-90.
- Dazza, M. C., M. Ekwala, et al. (2005). "Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*)." J Virol **79**(13): 8560-71.
- de Duve, C., T. de Barse, et al. (1974). "Commentary. Lysosomotropic agents." Biochem Pharmacol **23**(18): 2495-531.
- de Rocquigny, H., A. Caneparo, et al. (2000). "Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus." Eur J Biochem **267**(12): 3654-60.
- Deacon, N. J., A. Tsykin, et al. (1995). "Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients." Science **270**(5238): 988-91.
- Deak, P. M. and D. H. Wolf (2001). "Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation." J Biol Chem **276**(14): 10663-9.
- Decroly, E., S. Benjannet, et al. (1997). "Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160." FEBS Lett **405**(1): 68-72.
- Decroly, E., M. Vandenbranden, et al. (1994). "The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM)." J Biol Chem **269**(16): 12240-7.

- Deeks, S. G., C. M. Kitchen, et al. (2004). "Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load." Blood **104**(4): 942-7.
- Dehart, J. L. and V. Planelles (2008). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation." J Virol **82**(3): 1066-72.
- DeHart, J. L., E. S. Zimmerman, et al. (2007). "HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system." Virol J **4**: 57.
- Demirov, D. G. and E. O. Freed (2004). "Retrovirus budding." Virus Res **106**(2): 87-102.
- Demirov, D. G., A. Ono, et al. (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**(2): 955-60.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Denic, V., E. M. Quan, et al. (2006). "A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation." Cell **126**(2): 349-59.
- Denis, N. J., J. Vasilescu, et al. (2007). "Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry." Proteomics **7**(6): 868-74.
- 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**(14): 6714-8.
- Deora, A., P. Spearman, et al. (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**(2): 305-12.
- Deshai, R. J. (1999). "SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 435-67.
- Dietrich, C., J. Scherwat, et al. (2002). "Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density." Biochem Biophys Res Commun **292**(1): 195-9.
- Dong, X., H. Li, et al. (2005). "AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly." Cell **120**(5): 663-74.
- Doranz, B. J., J. Rucker, et al. (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.

- Dorfman, T., A. Bukovsky, et al. (1994a). "Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **68**(12): 8180-7.
- Dorfman, T., F. Mammano, et al. (1994b). "Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein." J Virol **68**(3): 1689-96.
- Douaisi, M., S. Dussart, et al. (2004). "HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles." Biochem Biophys Res Commun **321**(3): 566-73.
- Douglas, J. L., K. Viswanathan, et al. (2009). "Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a  $\beta$ TrCP-dependent mechanism." J Virol **83**(16): 7931-47.
- Doyle, C. and J. L. Strominger (1987). "Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion." Nature **330**(6145): 256-9.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
- Dube, M., B. B. Roy, et al. (2009). "Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network." J Virol **83**(9): 4574-90.
- Duncan, L. M., S. Piper, et al. (2006). "Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules." Embo J **25**(8): 1635-45.
- Earl, P. L., B. Moss, et al. (1991). "Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." J Virol **65**(4): 2047-55.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.
- Elsasser, S. and D. Finley (2005). "Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines." Nat Cell Biol **7**(8): 742-9.
- Estrabaud, E., E. Le Rouzic, et al. (2007). "Regulated degradation of the HIV-1 Vpu protein through a  $\beta$ TrCP-independent pathway limits the release of viral particles." PLoS Pathog **3**(7): e104.
- Ewart, G. D., K. Mills, et al. (2002). "Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu." Eur Biophys J **31**(1): 26-35.

- Ewart, G. D., T. Sutherland, et al. (1996). "The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels." J Virol **70**(10): 7108-15.
- Fackler, O. T., N. Kienzle, et al. (1997). "Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization." Eur J Biochem **247**(3): 843-51.
- Fauci, A. S. (1988). "The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis." Science **239**(4840): 617-22.
- Federau, T., U. Schubert, et al. (1996). "Solution structure of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 encoded virus protein U (Vpu)." Int J Pept Protein Res **47**(4): 297-310.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Fields, B. N. and E. al. (1996). Fields Virology. Philadelphia, Lipincott-Raven Publishers.
- Finzi, A., A. Orthwein, et al. (2007). "Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane." J Virol **81**(14): 7476-90.
- Fischer, W. B. (2003). "Vpu from HIV-1 on an atomic scale: experiments and computer simulations." FEBS Lett **552**(1): 39-46.
- Fletcher, T. M., 3rd, B. Brichacek, et al. (1996). "Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM)." Embo J **15**(22): 6155-65.
- Flierman, D., Y. Ye, et al. (2003). "Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **278**(37): 34774-82.
- Foti, M., A. Mangasarian, et al. (1997). "Nef-mediated clathrin-coated pit formation." J Cell Biol **139**(1): 37-47.
- Fouchier, R. A., B. E. Meyer, et al. (1998). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex." J Virol **72**(7): 6004-13.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-62.
- Freed, E. O., D. J. Myers, et al. (1989). "Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160." J Virol **63**(11): 4670-5.

- Freed, E. O., D. J. Myers, et al. (1990). "Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4650-4.
- Friborg, J., A. Ladha, et al. (1995). "Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **8**(1): 10-22.
- Fu, W., R. J. Gorelick, et al. (1994). "Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions." J Virol **68**(8): 5013-8.
- Fuchs, S. Y., A. Chen, et al. (1999). "HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin." Oncogene **18**(12): 2039-46.
- Fuchs, S. Y., V. S. Spiegelman, et al. (2004). "The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer." Oncogene **23**(11): 2028-36.
- Fujimuro, M., S. D. Hayward, et al. (2007). "Molecular piracy: manipulation of the ubiquitin system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Rev Med Virol **17**(6): 405-22.
- Fujita, K., S. Omura, et al. (1997). "Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors." J Gen Virol **78 ( Pt 3)**: 619-25.
- Furman, M. H., J. Loureiro, et al. (2003). "Ubiquitinylation of the cytosolic domain of a type I membrane protein is not required to initiate its dislocation from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **278**(37): 34804-11.
- Furman, M. H. and H. L. Ploegh (2002). "Lessons from viral manipulation of protein disposal pathways." J Clin Invest **110**(7): 875-9.
- Furuta, R. A., C. T. Wild, et al. (1998). "Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41." Nat Struct Biol **5**(4): 276-9.
- Gabuzda, D., U. Olshevsky, et al. (1991). "Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor." J Acquir Immune Defic Syndr **4**(1): 34-40.
- Gaddis, N. C., A. M. Sheehy, et al. (2004). "Further investigation of simian immunodeficiency virus Vif function in human cells." J Virol **78**(21): 12041-6.



- Gallay, P., T. Hope, et al. (1997). "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9825-30.
- Gallay, P., V. Stitt, et al. (1996). "Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import." J Virol **70**(2): 1027-32.
- Gao, G. and H. Luo (2006). "The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections." Can J Physiol Pharmacol **84**(1): 5-14.
- Garcia, J. V. and A. D. Miller (1991). "Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef." Nature **350**(6318): 508-11.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, et al. (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." Cell **107**(1): 55-65.
- Gay, D., P. Maddon, et al. (1987). "Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen." Nature **328**(6131): 626-9.
- Geleziunas, R., W. Xu, et al. (2001). "HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell." Nature **410**(6830): 834-8.
- Geraghty, R. J. and A. T. Panganiban (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu has a CD4- and an envelope glycoprotein-independent function." J Virol **67**(7): 4190-4.
- Geraghty, R. J., K. J. Talbot, et al. (1994). "Cell type-dependence for Vpu function." J Med Primatol **23**(2-3): 146-50.
- Gewurz, B. E., R. Gaudet, et al. (2001a). "Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6794-9.
- Gewurz, B. E., E. W. Wang, et al. (2001b). "Human cytomegalovirus US2 endoplasmic reticulum-luminal domain dictates association with major histocompatibility complex class I in a locus-specific manner." J Virol **75**(11): 5197-204.
- Geyer, M., O. T. Fackler, et al. (2001). "Structure--function relationships in HIV-1 Nef." EMBO Rep **2**(7): 580-5.
- Geyer, M., H. Yu, et al. (2002). "Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery." J Biol Chem **277**(32): 28521-9.

- Gillece, P., J. M. Luz, et al. (1999). "Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase." J Cell Biol **147**(7): 1443-56.
- Giorgi, J. V., L. E. Hultin, et al. (1999). "Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage." J Infect Dis **179**(4): 859-70.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Glushakova, S., J. Munch, et al. (2001). "CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4(+) T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo." J Virol **75**(21): 10113-7.
- Goffinet, C., I. Allespach, et al. (2009). "HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor." Cell Host Microbe **5**(3): 285-97.
- Goh, W. C., M. E. Rogel, et al. (1998). "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo." Nat Med **4**(1): 65-71.
- Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, et al. (1995). "Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef." J Virol **69**(7): 4112-21.
- Gomez, L. M., E. Pacyniak, et al. (2005). "Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains." Virology **335**(1): 46-60.
- Gonen, H., B. Bercovich, et al. (1999). "Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ ." J Biol Chem **274**(21): 14823-30.
- Goto, T., S. J. Kennel, et al. (1994). "A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells." Blood **84**(6): 1922-30.
- Gotoh, B., T. Komatsu, et al. (2002). "Paramyxovirus strategies for evading the interferon response." Rev Med Virol **12**(6): 337-57.
- Gottlinger, H. G. (2001). "The HIV-1 assembly machine." Aids **15** Suppl 5: S13-20.

- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (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**(15): 7381-5.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (1991). "Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3195-9.
- Goujon, C., L. Riviere, et al. (2007). "SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells." Retrovirology **4**: 2.
- Granelli-Piperno, A., I. Shimeliovich, et al. (2006). "HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood." J Immunol **176**(2): 991-8.
- Greenberg, M., L. DeTulleo, et al. (1998). "A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4." Curr Biol **8**(22): 1239-42.
- Greenberg, M. E., S. Bronson, et al. (1997). "Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation." Embo J **16**(23): 6964-76.
- 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**(7): 673-80.
- Grigorov, B., F. Arcanger, et al. (2006). "Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines." J Mol Biol **359**(4): 848-62.
- Grou, C. P., A. F. Carvalho, et al. (2008). "Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **283**(21): 14190-7.
- Grzesiek, S., S. J. Stahl, et al. (1996). "The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR." Biochemistry **35**(32): 10256-61.
- Gummuluru, S., C. M. Kinsey, et al. (2000). "An in vitro rapid-turnover assay for human immunodeficiency virus type 1 replication selects for cell-to-cell spread of virus." J Virol **74**(23): 10882-91.
- Gupta, R. K., S. Hue, et al. (2009). "Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion." PLoS Pathog **5**(5): e1000443.

- Haffar, O. K., S. Popov, et al. (2000). "Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." J Mol Biol **299**(2): 359-68.
- Hallenberger, S., V. Bosch, et al. (1992). "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160." Nature **360**(6402): 358-61.
- Hampton, R. Y., R. G. Gardner, et al. (1996). "Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein." Mol Biol Cell **7**(12): 2029-44.
- Handley, M. A., S. Paddock, et al. (2001). "Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein." Virology **291**(2): 198-207.
- Hanna, Z., D. G. Kay, et al. (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." Cell **95**(2): 163-75.
- Harila, K., I. Prior, et al. (2006). "Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag." J Virol **80**(8): 3765-72.
- Harris, M. (1999). "HIV: a new role for Nef in the spread of HIV." Curr Biol **9**(12): R459-61.
- Harris, M. P. and J. C. Neil (1994). "Myristoylation-dependent binding of HIV-1 Nef to CD4." J Mol Biol **241**(2): 136-42.
- Harris, R. S., K. N. Bishop, et al. (2003). "DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection." Cell **113**(6): 803-9.
- Harris, R. S. and M. T. Liddament (2004). "Retroviral restriction by APOBEC proteins." Nat Rev Immunol **4**(11): 868-77.
- Hart, M., J. P. Concordet, et al. (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." Curr Biol **9**(4): 207-10.
- Hassink, G. C., M. T. Barel, et al. (2006). "Ubiquitination of MHC class I heavy chains is essential for dislocation by human cytomegalovirus-encoded US2 but not US11." J Biol Chem **281**(40): 30063-71.
- Hatakeyama, S. and K. I. Nakayama (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 635-45.

- Hatzioannou, T., D. Perez-Caballero, et al. (2005). "Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells." J Virol **79**(1): 176-83.
- Hazenberg, M. D., S. A. Otto, et al. (2003). "Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS." Aids **17**(13): 1881-8.
- Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." Physiol Rev **87**(4): 1377-408.
- Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, et al. (1994). "The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7311-5.
- Helseth, E., U. Olshevsky, et al. (1991). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein." J Virol **65**(4): 2119-23.
- Henklein, P., R. Kinder, et al. (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**(3): 220-4.
- Henklein, P., U. Schubert, et al. (1993). "Synthesis and characterization of the hydrophilic C-terminal domain of the human immunodeficiency virus type 1-encoded virus protein U (Vpu)." Pept Res **6**(2): 79-87.
- Henriet, S., D. Richer, et al. (2005). "Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA." J Mol Biol **354**(1): 55-72.
- Hermida-Matsumoto, L. and M. D. Resh (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55(gag) and p17MA." J Virol **73**(3): 1902-8.
- Herr, R. A., J. Harris, et al. (2009). "Role of the RING-CH Domain of Viral Ligase mK3 in Ubiquitination of Non-Lysine and Lysine MHC I Residues." Traffic.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hill, M. S., A. Ruiz, et al. (2008). "Modulation of the severe CD4(+) T-cell loss caused by a pathogenic simian-human immunodeficiency virus by replacement of the subtype B vpu with the vpu from a subtype C HIV-1 clinical isolate." Virology **371**(1): 86-97.

- Himathongkham, S. and P. A. Luciw (1996). "Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells." *Virology* **219**(2): 485-8.
- Hirsch, C., D. Blom, et al. (2003). "A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins." *Embo J* **22**(5): 1036-46.
- Ho, D. D., T. R. Rota, et al. (1985). "Antibody to lymphadenopathy-associated virus in AIDS." *N Engl J Med* **312**(10): 649-50.
- Hofmann, W., D. Schubert, et al. (1999). "Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection." *J Virol* **73**(12): 10020-8.
- Hoglund, S., A. Ohagen, et al. (1994). "Role of vif during packing of the core of HIV-1." *Virology* **201**(2): 349-55.
- Holmes, R. K., F. A. Koning, et al. (2007a). "APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G." *J Biol Chem* **282**(4): 2587-95.
- Holmes, R. K., M. H. Malim, et al. (2007b). "APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?" *Trends Biochem Sci* **32**(3): 118-28.
- Hosokawa, N., I. Wada, et al. (2001). "A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation." *EMBO Rep* **2**(5): 415-22.
- Hout, D. R., M. L. Gomez, et al. (2005). "Scrambling of the amino acids within the transmembrane domain of Vpu results in a simian-human immunodeficiency virus (SHIVTM) that is less pathogenic for pig-tailed macaques." *Virology* **339**(1): 56-69.
- Hoxie, J. A., B. S. Haggarty, et al. (1988). "Biological characterization of a simian immunodeficiency virus-like retrovirus (HTLV-IV): evidence for CD4-associated molecules required for infection." *J Virol* **62**(8): 2557-68.
- Hrecka, K., M. Gierszewska, et al. (2007). "Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11778-83.
- Hsu, K., J. Seharaseyon, et al. (2004). "Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel." *Mol Cell* **14**(2): 259-67.
- Huang, M., J. M. Orenstein, et al. (1995). "p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease." *J Virol* **69**(11): 6810-8.
- Huet, T., R. Cheynier, et al. (1990). "Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1." *Nature* **345**(6273): 356-9.

- Hurley, J. H. (2008). "ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 4-11.
- Hussain, A., S. R. Das, et al. (2007). "Oligomerization of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein--a genetic, biochemical and biophysical analysis." Virology **4**: 81.
- Hussain, A., C. Wesley, et al. (2008). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation." J Virol **82**(2): 893-902.
- Huthoff, H. and M. H. Malim (2005). "Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins." Virology **334**(2): 147-53.
- Huyer, G., W. F. Piluek, et al. (2004). "Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein." J Biol Chem **279**(37): 38369-78.
- Hwang, S. S., T. J. Boyle, et al. (1991). "Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1." Science **253**(5015): 71-4.
- Iafrate, A. J., S. Carl, et al. (2000). "Disrupting surfaces of nef required for downregulation of CD4 and for enhancement of virion infectivity attenuates simian immunodeficiency virus replication in vivo." J Virol **74**(21): 9836-44.
- Imai, Y., M. Soda, et al. (2001). "An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin." Cell **105**(7): 891-902.
- Ishido, S., C. Wang, et al. (2000). "Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins." J Virol **74**(11): 5300-9.
- Ishikawa, J., T. Kaisho, et al. (1995). "Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth." Genomics **26**(3): 527-34.
- Iwatani, Y., D. S. Chan, et al. (2007). "Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G." Nucleic Acids Res **35**(21): 7096-108.
- Jabbar, M. A. and D. P. Nayak (1990). "Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4

- blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane." *J Virol* **64**(12): 6297-304.
- Jacks, T., M. D. Power, et al. (1988). "Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression." *Nature* **331**(6153): 280-3.
- Janvier, K., H. Craig, et al. (2001). "Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP." *J Virol* **75**(8): 3971-6.
- Jarosch, E., C. Taxis, et al. (2002). "Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48." *Nat Cell Biol* **4**(2): 134-9.
- Jensen, J. P., P. W. Bates, et al. (1995). "Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes." *J Biol Chem* **270**(51): 30408-14.
- Jentsch, S. and S. Rumpf (2007). "Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway?" *Trends Biochem Sci* **32**(1): 6-11.
- Jia, B., R. Serra-Moreno, et al. (2009). "Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000429.
- Jiang, M., J. Mak, et al. (1993). "Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **67**(6): 3246-53.
- Johnson, A. E. and N. G. Haigh (2000). "The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic?" *Cell* **102**(6): 709-12.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, et al. (1998). "Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins." *J Cell Biol* **143**(7): 1883-98.
- Jouvenet, N., S. J. Neil, et al. (2006). "Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly." *PLoS Biol* **4**(12): e435.
- Julius, M., K. Newell, et al. (1991). "Functional consequences of CD4-TCR/CD3 interactions." *Semin Immunol* **3**(3): 161-6.
- Kalies, K. U., S. Allan, et al. (2005). "The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane." *Embo J* **24**(13): 2284-93.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, et al. (1987). "Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product." *Nature* **330**(6147): 489-93.
- Karin, M. (1999). "The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation." *J Biol Chem* **274**(39): 27339-42.
- Katiyar, S., S. Joshi, et al. (2005). "The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4584-94.



- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 893-905.
- Keckesova, Z., L. M. Ylinen, et al. (2006). "Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity." J Virol **80**(10): 4683-90.
- Kerkau, T., I. Bacik, et al. (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**(7): 1295-305.
- Kestler, H. W., 3rd, D. J. Ringler, et al. (1991). "Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS." Cell **65**(4): 651-62.
- Khan, M. A., H. Akari, et al. (2002). "Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease may be correlated with Vif function." J Virol **76**(18): 9112-23.
- Khorchid, A., R. Halwani, et al. (2002). "Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction." J Virol **76**(8): 4131-7.
- Kim, S. Y., R. Byrn, et al. (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression." J Virol **63**(9): 3708-13.
- Kim, T. Y., E. Kim, et al. (2008). "Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins." Biochem Biophys Res Commun **369**(2): 741-6.
- Kim, W., E. D. Spear, et al. (2005). "Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation." Mol Cell **19**(6): 753-64.
- Kimura, T., M. Nishikawa, et al. (1994). "Intracellular membrane traffic of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: vpu liberates Golgi-targeted gp160 from CD4-dependent retention in the endoplasmic reticulum." J Biochem (Tokyo) **115**(5): 1010-20.
- Kino, T., A. Gragerov, et al. (2005). "Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest." J Virol **79**(5): 2780-7.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.

- Klimkait, T., K. Strebel, et al. (1990). "The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release." *J Virol* **64**(2): 621-9.
- Klotman, M. E., S. Kim, et al. (1991). "Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 5011-5.
- Koegl, M., T. Hoppe, et al. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." *Cell* **96**(5): 635-44.
- Koike, J., N. Sagara, et al. (2000). "Molecular cloning and genomic structure of the betaTRCP2 gene on chromosome 5q35.1." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(1): 103-9.
- Komuro, A., D. Bamming, et al. (2008). "Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling." *Cytokine* **43**(3): 350-8.
- Konig, R., L. Y. Huang, et al. (1992). "MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8." *Nature* **356**(6372): 796-8.
- Korber, B., B. Gaschen, et al. (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." *Br Med Bull* **58**: 19-42.
- Kostova, Z., Y. C. Tsai, et al. (2007). "Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation." *Semin Cell Dev Biol* **18**(6): 770-9.
- Kostova, Z. and D. H. Wolf (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." *Embo J* **22**(10): 2309-17.
- Kota, J., C. F. Gilstring, et al. (2007). "Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD." *J Cell Biol* **176**(5): 617-28.
- Koup, R. A. and D. D. Ho (1994). "Shutting down HIV." *Nature* **370**(6489): 416.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." *J Virol* **68**(7): 4650-5.
- Krausslich, H. G., M. Facke, et al. (1995). "The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity." *J Virol* **69**(6): 3407-19.

- Kreft, S. G., L. Wang, et al. (2006). "Membrane topology of the yeast endoplasmic reticulum-localized ubiquitin ligase Doa10 and comparison with its human ortholog TEB4 (MARCH-VI)." *J Biol Chem* **281**(8): 4646-53.
- Kuiken, C., B. Foley, et al. (2000). *HIV sequence compendium*. Los Alamos, NM, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.
- Kupzig, S., V. Korolchuk, et al. (2003). "Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology." *Traffic* **4**(10): 694-709.
- Lai, M., E. S. Zimmerman, et al. (2005). "Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo." *J Virol* **79**(24): 15443-51.
- Lama, J. (2003). "The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection." *Curr HIV Res* **1**(2): 167-84.
- Lama, J., A. Mangasarian, et al. (1999). "Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner." *Curr Biol* **9**(12): 622-31.
- Lange, C. G., M. M. Lederman, et al. (2003). "Nadir CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection." *Aids* **17**(14): 2015-23.
- Lapadat-Tapolsky, M., H. De Rocquigny, et al. (1993). "Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle." *Nucleic Acids Res* **21**(4): 831-9.
- Le Gall, S., L. Erdtmann, et al. (1998). "Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules." *Immunity* **8**(4): 483-95.
- Le Rouzic, E., N. Belaidouni, et al. (2007). "HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase." *Cell Cycle* **6**(2): 182-8.
- Le Rouzic, E. and S. Benichou (2005). "The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle." *Retrovirology* **2**: 11.
- Le Rouzic, E., A. Mousnier, et al. (2002). "Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1." *J Biol Chem* **277**(47): 45091-8.

- Lecossier, D., F. Bouchonnet, et al. (2003). "Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein." Science **300**(5622): 1112.
- Lee, D. H. and A. L. Goldberg (1996). "Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **271**(44): 27280-4.
- Lee, R. J., C. W. Liu, et al. (2004). "Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein." Embo J **23**(11): 2206-15.
- Lemp, G. F., S. F. Payne, et al. (1990a). "Survival trends for patients with AIDS." Jama **263**(3): 402-6.
- Lemp, G. F., S. F. Payne, et al. (1990b). "Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco." Jama **263**(11): 1497-501.
- 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**(12): 7238-45.
- Leulier, F., C. Marchal, et al. (2003). "Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses." EMBO Rep **4**(10): 976-81.
- Levesque, K., A. Finzi, et al. (2004). "Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection." Curr HIV Res **2**(1): 51-9.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (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**(30): 28346-53.
- Levy, J. A. (1993). "Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection." Microbiol Rev **57**(1): 183-289.
- Li, J. T., M. Halloran, et al. (1995). "Persistent infection of macaques with simian-human immunodeficiency viruses." J Virol **69**(11): 7061-7.
- Lichterfeld, M., D. E. Kaufmann, et al. (2004). "Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells." J Exp Med **200**(6): 701-12.
- Lilley, B. N., J. M. Gilbert, et al. (2006). "Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection." J Virol **80**(17): 8739-44.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2004). "A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER." Nature **429**(6994): 834-40.

- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2005a). "Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14296-301.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2005b). "Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond." Immunol Rev **207**: 126-44.
- Lilley, B. N., D. Tortorella, et al. (2003). "Dislocation of a type I membrane protein requires interactions between membrane-spanning segments within the lipid bilayer." Mol Biol Cell **14**(9): 3690-8.
- 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**(17): 7913-24.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies." J Virol **78**(11): 6013-23.
- Lindwasser, O. W., W. J. Smith, et al. (2008). "A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2." J Virol **82**(3): 1166-74.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, et al. (1989). "Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER." Cell **56**(5): 801-13.
- Little, S. J., N. L. Riggs, et al. (1994). "Cell surface CD4 downregulation and resistance to superinfection induced by a defective provirus of HIV-1." Virology **205**(2): 578-82.
- Liu, B., P. T. Sarkis, et al. (2005). "Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase." J Virol **79**(15): 9579-87.
- Lock, M., M. E. Greenberg, et al. (1999). "Two elements target SIV Nef to the AP-2 clathrin adaptor complex, but only one is required for the induction of CD4 endocytosis." Embo J **18**(10): 2722-33.
- Lu, X., H. Yu, et al. (1998). "Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4." Immunity **8**(5): 647-56.
- Luban, J., K. L. Bossolt, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B." Cell **73**(6): 1067-78.

- Lum, J. J., O. J. Cohen, et al. (2003). "Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis." J Clin Invest **111**(10): 1547-54.
- Lundquist, C. A., M. Tobiume, et al. (2002). "Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes." J Virol **76**(9): 4625-33.
- Ma, C., F. M. Marassi, et al. (2002). "Expression, purification, and activities of full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1." Protein Sci **11**(3): 546-57.
- Maddon, P. J., D. R. Littman, et al. (1985). "The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family." Cell **42**(1): 93-104.
- Madrid, R., K. Janvier, et al. (2005). "Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity." J Biol Chem **280**(6): 5032-44.
- Mak, J., M. Jiang, et al. (1994). "Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles." J Virol **68**(4): 2065-72.
- Maldarelli, F., M. Y. Chen, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein." J Virol **67**(8): 5056-61.
- Malim, M. H. and B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency." Cell **65**(2): 241-8.
- Malim, M. H. and M. Emerman (2008). "HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment." Cell Host Microbe **3**(6): 388-98.
- Mancebo, H. S., G. Lee, et al. (1997). "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro." Genes Dev **11**(20): 2633-44.
- Mangasarian, A., M. Foti, et al. (1997). "The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane." Immunity **6**(1): 67-77.
- Mangeat, B., P. Turelli, et al. (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." Nature **424**(6944): 99-103.
- Mansky, L. M. (1996). "The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene." Virology **222**(2): 391-400.

- Mansky, L. M., S. Preveral, et al. (2000). "The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate." *J Virol* **74**(15): 7039-47.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." *J Virol* **69**(8): 5087-94.
- Marassi, F. M., C. Ma, et al. (1999). "Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14336-41.
- Margottin, F., S. P. Bour, et al. (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**(4): 565-74.
- Marin, M., K. M. Rose, et al. (2003). "HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation." *Nat Med* **9**(11): 1398-403.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2001). "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress." *Nat Med* **7**(12): 1313-9.
- Mbisa, J. L., R. Barr, et al. (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration." *J Virol* **81**(13): 7099-110.
- McCormick-Davis, C., S. B. Dalton, et al. (2000). "A molecular clone of simian-human immunodeficiency virus (DeltavpuSHIV(KU-1bMC33)) with a truncated, non-membrane-bound vpu results in rapid CD4(+) T cell loss and neuro-AIDS in pig-tailed macaques." *Virology* **272**(1): 112-26.
- McCormick-Davis, C., L. J. Zhao, et al. (1998). "Chronology of genetic changes in the vpu, env, and Nef genes of chimeric simian-human immunodeficiency virus (strain HXB2) during acquisition of virulence for pig-tailed macaques." *Virology* **248**(2): 275-83.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, et al. (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." *Cell* **53**(1): 55-67.
- McNatt, M. W., T. Zang, et al. (2009). "Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000300.

- Mehle, A., J. Goncalves, et al. (2004). "Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation." Genes Dev **18**(23): 2861-6.
- Meusser, B. and T. Sommer (2004). "Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation." Mol Cell **14**(2): 247-58.
- Meyer, H. H., J. G. Shorter, et al. (2000). "A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways." Embo J **19**(10): 2181-92.
- Meyer, H. H., Y. Wang, et al. (2002). "Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4." Embo J **21**(21): 5645-52.
- Miceli, M. C. and J. R. Parnes (1993). "Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation." Adv Immunol **53**: 59-122.
- Millan, J., J. Cerny, et al. (1999). "CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains." Tissue Antigens **53**(1): 33-40.
- Miller, M. D., M. B. Feinberg, et al. (1994a). "The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor." Trends Microbiol **2**(8): 294-8.
- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, et al. (1994b). "The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages." J Exp Med **179**(1): 101-13.
- Mitchell, R. S., C. Katsura, et al. (2009). "Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking." PLoS Pathog **5**(5): e1000450.
- Miyagi, E., A. J. Andrew, et al. (2009). "Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2868-73.
- Miyauchi, K., J. Komano, et al. (2005). "Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion." J Virol **79**(8): 4720-9.
- Molinari, M., V. Calanca, et al. (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science **299**(5611): 1397-400.



- Moore, J. P. (1990). "Simple methods for monitoring HIV-1 and HIV-2 gp120 binding to soluble CD4 by enzyme-linked immunosorbent assay: HIV-2 has a 25-fold lower affinity than HIV-1 for soluble CD4." Aids **4**(4): 297-305.
- Moore, J. P., Y. Cao, et al. (1994). "Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1." J Virol **68**(8): 5142-55.
- Moore, J. P., S. G. Kitchen, et al. (2004). "The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(1): 111-26.
- Moore, J. P., A. Trkola, et al. (1997). "Co-receptors for HIV-1 entry." Curr Opin Immunol **9**(4): 551-62.
- Morita, E. and W. I. Sundquist (2004). "Retrovirus budding." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 395-425.
- Munier, M. L. and A. D. Kelleher (2007). "Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection." Immunol Cell Biol **85**(1): 6-15.
- Muthumani, K., A. Y. Choo, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism." Cell Death Differ **12 Suppl 1**: 962-70.
- Nakai-Murakami, C., M. Shimura, et al. (2007). "HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination." Oncogene **26**(4): 477-86.
- Nakatsukasa, K. and J. L. Brodsky (2008). "The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum." Traffic **9**(6): 861-70.
- Nakatsukasa, K., G. Huyer, et al. (2008). "Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein." Cell **132**(1): 101-12.
- Narayan, S. V., S. Mukherjee, et al. (1999). "Characterization of a neutralization-escape variant of SHIVKU-1, a virus that causes acquired immune deficiency syndrome in pig-tailed macaques." Virology **256**(1): 54-63.
- Natarajan, K., N. Dimasi, et al. (2002). "Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination." Annu Rev Immunol **20**: 853-85.

- Neil, S. J., S. W. Eastman, et al. (2006). "HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane." PLoS Pathog **2**(5): e39.
- Neil, S. J., V. Sandrin, et al. (2007). "An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein." Cell Host Microbe **2**(3): 193-203.
- Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." Nature **451**(7177): 425-30.
- Nekhai, S. and K. T. Jeang (2006). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev." Future Microbiol **1**: 417-26.
- Newman, E. N., R. K. Holmes, et al. (2005). "Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity." Curr Biol **15**(2): 166-70.
- 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**(7): 3264-72.
- Nieva, J. L., S. Nir, et al. (1994). "Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage." Biochemistry **33**(11): 3201-9.
- Nikko, E., A. M. Marini, et al. (2003). "Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway." J Biol Chem **278**(50): 50732-43.
- Nishikawa, S. I., S. W. Fewell, et al. (2001). "Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation." J Cell Biol **153**(5): 1061-70.
- Novak, A. and S. Dedhar (1999). "Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf." Cell Mol Life Sci **56**(5-6): 523-37.
- Nydegger, S., M. Foti, et al. (2003). "HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes." Traffic **4**(12): 902-10.
- Oda, Y., N. Hosokawa, et al. (2003). "EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin." Science **299**(5611): 1394-7.

- Oda, Y., T. Okada, et al. (2006). "Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation." J Cell Biol **172**(3): 383-93.
- Odorizzi, G., D. J. Katzmann, et al. (2003). "Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1893-903.
- Ohagen, A. and D. Gabuzda (2000). "Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core." J Virol **74**(23): 11055-66.
- Okamoto, Y., T. Ozaki, et al. (2003). "UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme." Cancer Res **63**(14): 4167-73.
- Okuda-Shimizu, Y. and L. M. Hendershot (2007). "Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp." Mol Cell **28**(4): 544-54.
- 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**(5): 4136-44.
- 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**(24): 13925-30.
- 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**(3): 1552-63.
- ONUSIDA (2007) "Le point sur l'épidémie de SIDA, 2007." [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_fr.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_fr.pdf) Volume, DOI:
- Oresic, K. and D. Tortorella (2008). "Endoplasmic reticulum chaperones participate in human cytomegalovirus US2-mediated degradation of class I major histocompatibility complex molecules." J Gen Virol **89**(Pt 5): 1122-30.
- Otteken, A. and B. Moss (1996). "Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin." J Biol Chem **271**(1): 97-103.
- Owens, R. J., C. Burke, et al. (1994). "Mutations in the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein that affect fusion activity." J Virol **68**(1): 570-4.
- Oyadomari, S., C. Yun, et al. (2006). "Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload." Cell **126**(4): 727-39.

- Ozawa, M., H. Baribault, et al. (1989). "The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species." *Embo J* **8**(6): 1711-7.
- Pacyniak, E., M. L. Gomez, et al. (2005). "Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1." *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**(5): 379-94.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6853-66.
- Paillart, J. C. and H. G. Gottlinger (1999). "Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting." *J Virol* **73**(4): 2604-12.
- Palese, P., K. Tobita, et al. (1974). "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase." *Virology* **61**: 397-410.
- Pantaleo, G., J. F. Demarest, et al. (1994). "Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV." *Nature* **370**(6489): 463-7.
- 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**(1): 207-16.
- Paul, M., S. Mazumder, et al. (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**(2): 1270-9.
- Pauza, C. D., J. E. Galindo, et al. (1990). "Reinfection results in accumulation of unintegrated viral DNA in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells." *J. Exp. Med.* **172**: 1035-42.
- Paxton, W., R. I. Connor, et al. (1993). "Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis." *J Virol* **67**(12): 7229-37.
- Pelchen-Matthews, A., J. E. Armes, et al. (1991). "Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and nonlymphocytic cells." *J Exp Med* **173**(3): 575-87.

- Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, et al. (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." J Cell Biol **162**(3): 443-55.
- Pelchen-Matthews, A., I. J. Parsons, et al. (1993). "Phorbol-ester-induced down-regulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting." J. Exp. Med. **178**: 1209-1222.
- Pereira, L. A., K. Bentley, et al. (2000). "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." Nucleic Acids Res **28**(3): 663-8.
- Perlman, M. and M. D. Resh (2006). "Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag." Traffic **7**(6): 731-45.
- Piguet, V., Y. L. Chen, et al. (1998). "Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes." Embo J **17**(9): 2472-81.
- Piguet, V., F. Gu, et al. (1999). "Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes." Cell **97**(1): 63-73.
- Pilon, M., R. Schekman, et al. (1997). "Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation." Embo J **16**(15): 4540-8.
- Pitcher, C., S. Höning, et al. (1999). "CD4 endocytosis and adaptor complex binding require activation of CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation." Mol. Biol. Cell **10**: 677-691.
- Pizzato, M., A. Helander, et al. (2007). "Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6812-7.
- Platta, H. W., F. El Magraoui, et al. (2007). "Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling." J Cell Biol **177**(2): 197-204.
- Plempner, R. K., S. Bohmler, et al. (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." Nature **388**(6645): 891-5.
- Ploegh, H. L. (2007). "A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum." Nature **448**(7152): 435-8.
- Popov, S., M. Rexach, et al. (1998a). "Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex." J Biol Chem **273**(21): 13347-52.

- Popov, S., M. Rexach, et al. (1998b). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." Embo J **17**(4): 909-17.
- Preusser, A., L. Briese, et al. (2001). "Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain." J Virol **75**(8): 3960-4.
- Raasi, S. and D. H. Wolf (2007). "Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome." Semin Cell Dev Biol **18**(6): 780-91.
- Rabinovich, E., A. Kerem, et al. (2002). "AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Mol Cell Biol **22**(2): 626-34.
- Raja, N. U., M. J. Vincent, et al. (1994). "Vpu-mediated proteolysis of gp160/CD4 chimeric envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum: requirement of both the anchor and cytoplasmic domains of CD4." Virology **204**(1): 357-66.
- Rajapurohitam, V., N. Bedard, et al. (2002). "Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(4): E739-45.
- Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." Nature **450**(7170): 663-9.
- Rhee, S. S. and J. W. Marsh (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4." J Virol **68**(8): 5156-63.
- Ritter, G. D., Jr., G. Yamshchikov, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 2 glycoprotein enhancement of particle budding: role of the cytoplasmic domain." J Virol **70**(4): 2669-73.
- Robinson, H. L. and D. M. Zinkus (1992). "Accumulation of human immunodeficiency virus type 1 DNA in T cells: results of multiple infection events." J. Virol. **64**: 4836-41.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-29.
- Rong, L., J. Zhang, et al. (2009). "The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu." J Virol **83**(15): 7536-46.

- Rosen, C. A., E. Terwilliger, et al. (1988). "Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2071-5.
- Rosenberg, Z. F. and A. S. Fauci (1989). "The immunopathogenesis of HIV infection." Adv Immunol **47**: 377-431.
- Roshal, M., B. Kim, et al. (2003). "Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R." J Biol Chem **278**(28): 25879-86.
- Ross, T. M., A. E. Oran, et al. (1999). "Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein." Curr Biol **9**(12): 613-21.
- Rossi, F., A. Gallina, et al. (1996). "Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system." Virology **217**(1): 397-403.
- Rudd, C. E., J. M. Trevillyan, et al. (1988). "The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5190-4.
- Rudner, L., S. Nydegger, et al. (2005). "Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling." J Virol **79**(7): 4055-65.
- Ruiz, A., M. S. Hill, et al. (2008). "Requirements of the membrane proximal tyrosine and dileucine-based sorting signals for efficient transport of the subtype C Vpu protein to the plasma membrane and in virus release." Virology **378**(1): 58-68.
- Russo, J. J., R. A. Bohenzky, et al. (1996). "Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14862-7.
- Sakai, H., K. Tokunaga, et al. (1995). "Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types." J Gen Virol **76 ( Pt 11)**: 2717-22.
- Sakai, K., J. Dimas, et al. (2006). "The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3369-74.
- Salcedo, S. P. and D. W. Holden (2003). "SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network." Embo J **22**(19): 5003-14.
- Salim, A. and L. Ratner (2008). "Modulation of beta-catenin and E-cadherin interaction by Vpu increases human immunodeficiency virus type 1 particle release." J Virol **82**(8): 3932-8.

- Sandefur, S., R. M. Smith, et al. (2000). "Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag)." *J Virol* **74**(16): 7238-49.
- Sato, B. K. and R. Y. Hampton (2006). "Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis." *Yeast* **23**(14-15): 1053-64.
- Sato, B. K., D. Schulz, et al. (2009). "Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase." *Mol Cell* **34**(2): 212-22.
- Sattentau, Q. J., P. R. Clapham, et al. (1988). "The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule." *Aids* **2**(2): 101-5.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." *J Exp Med* **174**(2): 407-15.
- Sayah, D. M., E. Sokolskaja, et al. (2004). "Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1." *Nature* **430**(6999): 569-73.
- Schafer, A., H. P. Bogerd, et al. (2004). "Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor." *Virology* **328**(2): 163-8.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, et al. (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell* **75**(3): 495-505.
- Scheffner, M., U. Nuber, et al. (1995). "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." *Nature* **373**(6509): 81-3.
- Schmitz, A., H. Herrgen, et al. (2000). "Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex." *J Cell Biol* **148**(6): 1203-12.
- Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521-9.
- Schrofelbauer, B., Y. Hakata, et al. (2007). "HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4130-5.



- Schrofelbauer, B., Q. Yu, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases." J Virol **79**(17): 10978-87.
- Schubert, U., L. C. Anton, et al. (1998). "CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway." J Virol **72**(3): 2280-8.
- Schubert, U., S. Bour, et al. (1996a). "The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains." J Virol **70**(2): 809-19.
- Schubert, U., S. Bour, et al. (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**(2): 887-96.
- Schubert, U., K. A. Clouse, et al. (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**(12): 7699-711.
- Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, et al. (1996b). "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**(1): 12-8.
- Schubert, U., P. Henklein, et al. (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**(1): 16-25.
- Schubert, U., T. Schneider, et al. (1992). "Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II." Eur J Biochem **204**(2): 875-83.
- 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**(4): 2260-71.
- Schulze, A., S. Standera, et al. (2005). "The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway." J Mol Biol **354**(5): 1021-7.
- Schwartz, O., A. Dautry-Varsat, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes." J Virol **69**(1): 528-33.

- Schwartz, O., V. Marechal, et al. (1996). "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein." Nat Med **2**(3): 338-42.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1990). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs." J Virol **64**(11): 5448-56.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1992). "Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs." Mol Cell Biol **12**(1): 207-19.
- Selig, L., J. C. Pages, et al. (1999). "Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses." J Virol **73**(1): 592-600.
- Shackelford, J. and J. S. Pagano (2005). "Targeting of host-cell ubiquitin pathways by viruses." Essays Biochem **41**: 139-56.
- Shamu, C. E., C. M. Story, et al. (1999). "The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate." J Cell Biol **147**(1): 45-58.
- Sharova, N., Y. Wu, et al. (2008). "Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction." PLoS Pathog **4**(5): e1000057.
- Shaw, A. S., K. E. Amrein, et al. (1989). "The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain." Cell **59**(4): 627-36.
- Shaw, A. S., J. Chalupny, et al. (1990). "Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase." Mol Cell Biol **10**(5): 1853-62.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-50.
- Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." Traffic **4**(11): 785-801.
- Shioda, T., J. A. Levy, et al. (1991). "Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene." Nature **349**(6305): 167-9.

- Simon, J. H. and M. H. Malim (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes." J Virol **70**(8): 5297-305.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Singh, A. and R. G. Collman (2000). "Heterogeneous spectrum of coreceptor usage among variants within a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary-isolate quasispecies." J Virol **74**(21): 10229-35.
- Singh, D. K., D. Griffin, et al. (2003). "The presence of the casein kinase II phosphorylation sites of Vpu enhances the CD4+ T cell loss caused by simian-human immunodeficiency virus SHIV<sub>KU-1bMC33</sub> in pig-tailed macaques." Virology **313**: 435-451.
- Singh, D. K., C. McCormick, et al. (2001). "A simian human immunodeficiency virus with a nonfunctional Vpu (deltavpuSHIV(KU-1bMC33)) isolated from a macaque with neuroAIDS has selected for mutations in env and nef that contributed to its pathogenic phenotype." Virology **282**(1): 123-40.
- Skowronski, J., D. Parks, et al. (1993). "Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene." Embo J **12**(2): 703-13.
- Sleckman, B. P., A. Peterson, et al. (1987). "Expression and function of CD4 in a murine T-cell hybridoma." Nature **328**(6128): 351-3.
- Sleigh, R., M. Sharkey, et al. (1998). "Differential association of uracil DNA glycosylase with SIVSM Vpr and Vpx proteins." Virology **245**(2): 338-43.
- Sodroski, J., W. C. Goh, et al. (1986). "A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication." Nature **321**(6068): 412-7.
- Sokolskaja, E., D. M. Sayah, et al. (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **78**(23): 12800-8.
- Sol-Foulon, N., A. Moris, et al. (2002). "HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread." Immunity **16**(1): 145-55.
- Somasundaran, M., M. Sharkey, et al. (2002). "Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9503-8.
- Sorio, C., D. Saggiaro, et al. (1993). "The monosialoganglioside GM1 induces internalisation and degradation of the CD4 antigen in U937 cells: evidence for a

- novel mechanism of CD4 down-modulation in a p56lck-negative cell line, which is independent of protein kinase C activation." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 1105-10.
- Sousa, A. E., J. Carneiro, et al. (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." J Immunol **169**(6): 3400-6.
- South, T. L. and M. F. Summers (1993). "Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC." Protein Sci **2**(1): 3-19.
- Spencer, E., J. Jiang, et al. (1999). "Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP." Genes Dev **13**(3): 284-94.
- Srivastava, S., S. K. Swanson, et al. (2008). "Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection." PLoS Pathog **4**(5): e1000059.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, et al. (1986). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS." Cell **45**(5): 637-48.
- Stark, L. A. and R. T. Hay (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription." J Virol **72**(4): 3037-44.
- Steffens, C. M. and T. J. Hope (2001). "Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function." Aids **15 Suppl 5**: S21-6.
- Stephens, E. B., C. McCormick, et al. (2002). "Deletion of the vpu sequences prior to the env in a simian-human immunodeficiency virus results in enhanced Env precursor synthesis but is less pathogenic for pig-tailed macaques." Virology **293**(2): 252-61.
- Stevenson, M., C. Meier, et al. (1988). "Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS." Cell **53**(3): 483-96.
- Stevenson, P. G., S. Efstathiou, et al. (2000). "Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8455-60.

- Stoddart, C. A., R. Geleziunas, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis." *J Virol* **77**(3): 2124-33.
- Story, C. M., M. H. Furman, et al. (1999). "The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8516-21.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2003). "AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding." *Cell* **114**(6): 689-99.
- Strack, P., M. Caligiuri, et al. (2000). "SCF(beta-TRCP) and phosphorylation dependent ubiquitination of I kappa B alpha catalyzed by Ubc3 and Ubc4." *Oncogene* **19**(31): 3529-36.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." *Aids* **17 Suppl 4**: S25-34.
- Strebel, K., T. Klimkait, et al. (1989). "Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein." *J Virol* **63**(9): 3784-91.
- Strebel, K., T. Klimkait, et al. (1988). "A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product." *Science* **241**(4870): 1221-3.
- Stremlau, M., C. M. Owens, et al. (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." *Nature* **427**(6977): 848-53.
- Stremlau, M., B. Song, et al. (2006). "Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1." *Virology* **351**(1): 112-20.
- Subbramanian, R. A., X. J. Yao, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity." *J Mol Biol* **278**(1): 13-30.
- Suzuki, Y. and R. Craigie (2007). "The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses." *Nat Rev Microbiol* **5**(3): 187-96.
- Swingler, S., B. Brichacek, et al. (2003). "HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection." *Nature* **424**(6945): 213-9.
- Swingler, S., A. Mann, et al. (1999). "HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages." *Nat Med* **5**(9): 997-103.

- Szathmary, R., R. Biemann, et al. (2005). "Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD." Mol Cell **19**(6): 765-75.
- Tachiwana, H., M. Shimura, et al. (2006). "HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks." Cancer Res **66**(2): 627-31.
- Tait, S. W., E. de Vries, et al. (2007). "Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment." J Cell Biol **179**(7): 1453-66.
- Tan, K., J. Liu, et al. (1997). "Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12303-8.
- Tan, L., E. Ehrlich, et al. (2007). "DDB1 and Cul4A are required for human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced G2 arrest." J Virol **81**(19): 10822-30.
- Tanaka, M., T. Ueno, et al. (2003). "Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1." Virology **311**: 316-325.
- Tanchou, V., C. Gabus, et al. (1995). "Formation of stable and functional HIV-1 nucleoprotein complexes in vitro." J Mol Biol **252**(5): 563-71.
- Taube, R., K. Fujinaga, et al. (1999). "Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation." Virology **264**(2): 245-53.
- Taylor, J. P., M. Kundu, et al. (1993). "TAR-independent activation of HIV-1 requires the activation domain but not the RNA-binding domain of Tat." Virology **195**(2): 780-5.
- Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, et al. (1989). "Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5163-7.
- Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 363-5.
- Thomson, M. M. and R. Najera (2005). "Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update." AIDS Rev **7**(4): 210-24.
- Thoulouze, M. I., N. Sol-Foulon, et al. (2006). "Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse." Immunity **24**(5): 547-61.
- Tiganos, E., J. Friberg, et al. (1998). "Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein." Virology **251**(1): 96-107.

- Tiganos, E., X. J. Yao, et al. (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**(6): 4452-60.
- Tobiume, M., M. Takahoko, et al. (2002). "Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors." *J Virol* **76**(12): 5959-65.
- Towers, G. J. (2007). "The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A." *Retrovirology* **4**: 40.
- Towers, G. J., T. Hatzioannou, et al. (2003). "Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors." *Nat Med* **9**(9): 1138-43.
- Tremblay, M., S. Meloche, et al. (1994). "Association of p56lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression." *EMBO J.* **13**: 774-783.
- Tsai, B., Y. Ye, et al. (2002). "Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(4): 246-55.
- Turner, J. M., M. H. Brodsky, et al. (1990). "Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs." *Cell* **60**(5): 755-65.
- van Asten, L., F. Danisman, et al. (2004). "Pre-seroconversion immune status predicts the rate of CD4 T cell decline following HIV infection." *Aids* **18**(14): 1885-93.
- Van Damme, N., D. Goff, et al. (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." *Cell Host Microbe* **3**(4): 245-52.
- Varthakavi, V., R. M. Smith, et al. (2003). "Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15154-9.
- Varthakavi, V., R. M. Smith, et al. (2006). "The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release." *Traffic* **7**(3): 298-307.
- Vashist, S. and D. T. Ng (2004). "Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control." *J Cell Biol* **165**(1): 41-52.
- Veillette, A., M. A. Bookman, et al. (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." *Cell* **55**(2): 301-8.

- Vembar, S. S. and J. L. Brodsky (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 944-57.
- Verma, R., R. Oania, et al. (2004). "Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system." Cell **118**(1): 99-110.
- VerPlank, L., F. Bouamr, et al. (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**(14): 7724-9.
- Vidal-Laliena, M., X. Romero, et al. (2005). "Characterization of antibodies submitted to the B cell section of the 8th Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop by flow cytometry and immunohistochemistry." Cell Immunol **236**(1-2): 6-16.
- Vinante, F., G. Pizzolo, et al. (1992). "The CD4 molecule belongs to the phenotypic repertoire of most cases of acute myeloid leukemia." Leukemia **6**(12): 1257-62.
- Vincent, M. J. and M. Abdul Jabbar (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a potential regulator of proteolysis and protein transport in the mammalian secretory pathway." Virology **213**(2): 639-49.
- Vincent, M. J., N. U. Raja, et al. (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**(9): 5538-49.
- Virgin, H. W. t., P. Latreille, et al. (1997). "Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68." J Virol **71**(8): 5894-904.
- Vodicka, M. A., D. M. Koepp, et al. (1998). "HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection." Genes Dev **12**(2): 175-85.
- Volsky, D. J., M. Simm, et al. (1996). "Interference to human immunodeficiency virus type 1 infection in the absence of downmodulation of the principal virus receptor, CD4." J Virol **70**: 3823-33.
- von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, et al. (1994). "The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 6992-6.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, et al. (2003). "The protein network of HIV budding." Cell **114**(6): 701-13.



- Wahlman, J., G. N. DeMartino, et al. (2007). "Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system." Cell **129**(5): 943-55.
- Wang, D. and R. J. Cotter (2005). "Approach for determining protein ubiquitination sites by MALDI-TOF mass spectrometry." Anal Chem **77**(5): 1458-66.
- Wang, J., J. M. Shackelford, et al. (2007a). "The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells." Virology **359**(2): 243-52.
- Wang, J., J. M. Shackelford, et al. (2008). "The HIV-1 Vif protein mediates degradation of Vpr and reduces Vpr-induced cell cycle arrest." DNA Cell Biol **27**(5): 267-77.
- Wang, Q., L. Li, et al. (2006a). "Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3." J Cell Biol **174**(7): 963-71.
- Wang, X., R. A. Herr, et al. (2007b). "Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3." J Cell Biol **177**(4): 613-24.
- Wang, X., Y. Ye, et al. (2006b). "The viral E3 ubiquitin ligase mK3 uses the Derlin/p97 endoplasmic reticulum-associated degradation pathway to mediate down-regulation of major histocompatibility complex class I proteins." J Biol Chem **281**(13): 8636-44.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." Cell **92**(4): 451-62.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1997). "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." Nature **387**(6631): 426-30.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 169-78.
- Welker, R., H. Hohenberg, et al. (2000). "Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(3): 1168-77.
- Welman, M., G. Lemay, et al. (2007). "Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex." Virus Res **124**(1-2): 103-12.
- Wen, X., K. M. Duus, et al. (2007). "The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor." J Biol Chem **282**(37): 27046-57.

- Werner, E. D., J. L. Brodsky, et al. (1996). "Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13797-801.
- Wiertz, E. J. H. J., T. R. Jones, et al. (1996a). "The Human Cytomegalovirus US11 Gene Product Dislocates MHC Class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol." Cell **84**: 769-779.
- Wiertz, E. J. H. J., D. Tortorella, et al. (1996b). "Sec61-mediated transfer of membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature **384**: 432-438.
- Wildum, S., M. Schindler, et al. (2006). "Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection." J Virol **80**(16): 8047-59.
- Wilk, T., T. Pfeiffer, et al. (1996). "Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain." Virology **218**(1): 269-74.
- Willbold, D., S. Hoffmann, et al. (1997). "Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution." Eur J Biochem **245**(3): 581-8.
- Willer, M., G. M. Forte, et al. (2008). "Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY." J Biol Chem **283**(49): 33883-8.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 95-102.
- Willey, R. L., J. S. Bonifacino, et al. (1988). "Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9580-4.
- Willey, R. L., A. Buckler-White, et al. (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**(2): 1207-12.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992a). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4." J Virol **66**(12): 7193-200.

- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992b). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." J Virol **66**(1): 226-34.
- Williams, C., M. van den Berg, et al. (2008). "Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p." Biochem Biophys Res Commun **374**(4): 620-4.
- Williams, M., J. F. Roeth, et al. (2002). "Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking." J Virol **76**(23): 12173-84.
- Winston, J. T., D. M. Koepp, et al. (1999a). "A family of mammalian F-box proteins." Curr Biol **9**(20): 1180-2.
- Winston, J. T., P. Strack, et al. (1999b). "The SCF $\beta$ -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaB $\alpha$  and beta-catenin and stimulates IkappaB $\alpha$  ubiquitination in vitro." Genes Dev **13**(3): 270-83.
- Wolf, D., V. Witte, et al. (2001). "HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals." Nat Med **7**(11): 1217-24.
- Wray, V., T. Federau, et al. (1995). "Solution structure of the hydrophilic region of HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) by CD and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy." Int J Pept Protein Res **45**(1): 35-43.
- Wray, V., R. Kinder, et al. (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**(16): 5272-82.
- Wu, G., G. Xu, et al. (2003a). "Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase." Mol Cell **11**(6): 1445-56.
- Wu, X., J. L. Anderson, et al. (2006). "Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 $\alpha$  restriction of HIV-1 reverse transcription and infection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7465-70.
- Wu, X., Y. Li, et al. (2003b). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.

- Xu, X. N., B. Laffert, et al. (1999). "Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain." *J Exp Med* **189**(9): 1489-96.
- Yamashita, M. and M. Emerman (2005). "The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements." *PLoS Pathog* **1**(3): e18.
- Yao, X. J., J. Friberg, et al. (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**(2): 615-23.
- Yao, X. J., S. Garzon, et al. (1993). "The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation." *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**(2): 135-41.
- Yao, X. J., H. Gottlinger, et al. (1992). "Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export." *J Virol* **66**(8): 5119-26.
- Yaron, A., A. Hatzubai, et al. (1998). "Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase." *Nature* **396**(6711): 590-4.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." *Nature* **414**(6864): 652-6.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2003). "Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains." *J Cell Biol* **162**(1): 71-84.
- Ye, Y., Y. Shibata, et al. (2005). "Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14132-8.
- Ye, Y., Y. Shibata, et al. (2004). "A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol." *Nature* **429**(6994): 841-7.
- Yoshida, Y., E. Adachi, et al. (2005). "Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates." *EMBO Rep* **6**(3): 239-44.
- Yoshida, Y., F. Tokunaga, et al. (2003). "Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains." *J Biol Chem* **278**(44): 43877-84.
- Younger, J. M., L. Chen, et al. (2006). "Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Cell* **126**(3): 571-82.

- Yu, X., Y. Yu, et al. (2003). "Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex." Science **302**(5647): 1056-60.
- Yu, X., X. Yuan, et al. (1992). "The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions." J Virol **66**(8): 4966-71.
- Yu, X. F., Z. Matsuda, et al. (1995). "Role of the C terminus Gag protein in human immunodeficiency virus type 1 virion assembly and maturation." J Gen Virol **76** (Pt 12): 3171-9.
- Yu, Y., Z. Xiao, et al. (2004). "Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines." Genes Dev **18**(23): 2867-72.
- Yu, Y. Y., M. R. Harris, et al. (2002). "Physical association of the K3 protein of gamma-2 herpesvirus 68 with major histocompatibility complex class I molecules with impaired peptide and beta(2)-microglobulin assembly." J Virol **76**(6): 2796-803.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.
- Zhang, F., S. J. Wilson, et al. (2009). "Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists." Cell Host Microbe **6**(1): 54-67.
- Zhang, H., B. Yang, et al. (2003). "The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA." Nature **424**(6944): 94-8.
- Zhang, S., D. Pointer, et al. (1998). "Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1." Gene **212**(2): 157-66.
- Zheng, S., J. Strzalka, et al. (2003). "Comparative structural studies of vpu peptides in phospholipid monolayers by x-ray scattering." Biophys J **84**(4): 2393-415.
- Zheng, S., J. Strzalka, et al. (2001). "Structural studies of the HIV-1 accessory protein Vpu in langmuir monolayers: synchrotron X-ray reflectivity." Biophys J **80**(4): 1837-50.
- Zhong, X., Y. Shen, et al. (2004). "AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation." J Biol Chem **279**(44): 45676-84.
- Zimmerman, E. S., J. Chen, et al. (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation." Mol Cell Biol **24**(21): 9286-94.

## ANNEXE I

Tableau I : Tableau récapitulatif de certains mutants de Vpu effectués au cours des études présentées dans cette thèse et de leur capacité à dégrader CD4 selon le type cellulaire.

Mutations effectuées dans Vpu	Capacité à dégrader CD4 Cellules COS <sup>1</sup>	Capacité à dégrader CD4 Cellules 293T <sup>2</sup>
R30/A-K31/A	***	ND
R36/E	***	ND
I38/A	/	**
L41/P	/	/
I42/A	/	***
I38,42/T	/	/
D39,43/A	**	ND
D39,43/A- I38,42/T (DI)	/	/
R40,44/E	/	*
R48/E	/	/
R40,44,48/E	/	/
D51/A	/	/
E55/A	/	*1/2
ΔVEMG (délétion V68 à G71)	***	***
ΔVEMG-DTE (insertion DTE après G58 de Vpu ΔVEMG)	***	***
E65,69/K	***	ND
E65,69/K-R40,44,48/E (ER)	/	ND
W76/F	***	ND

<sup>1</sup> : Cellules COS : cellules de rein de singe vert africain adulte (CV-1) transformées avec SV40

<sup>2</sup> : Cellules 293T : cellules humaines de fibroblastes embryonnaires de rein transformées par SV40, HEK 293T

/ : incapable de dégrader CD4

\*\*\* : dégrade CD4 comme le Vpu sauvage

ND : non-déterminé

Tableau II : Caractérisation de certains mutants de Vpu qui étaient déjà disponibles dans le laboratoire en ce qui concerne leur capacité d'interagir avec CD4 et d'induire sa dégradation selon le type cellulaire.

Mutations effectuées dans Vpu	Cellules COS		Cellules 293T	
	Dégradation de CD4	Liaison à CD4	Dégradation de CD4	Liaison à CD4
IVW <sup>1</sup> (V21/I-W22/V-I24/W)	/	0%	***	20%
W22/V <sup>2</sup>	/	0%	***	40%

<sup>1</sup> : Mutant de Vpu créé par Angelo Tiganos

<sup>2</sup> : Mutant de Vpu créé par Karine Levesque

/ : incapable de dégrader CD4

\*\*\* : dégrade CD4 comme le Vpu sauvage

