UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE «Santé, Sciences, Technologies»

INSERM U966 : « Morphogénèse et antigénicicté du VIH et des virus des hépatites »

THÈSE

présentée par :

Elodie BEAUMONT

soutenue le : **15 décembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie / virologie

Etude de l'émergence *in vivo* d'un variant du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 portant des glycoprotéines d'enveloppe naturellement tronquées dans leur domaine cytoplasmique

THÈSE dirigée par :

Mr Denys BRAND	Professeur des Universités, Université François Rabelais -Tours

RAPPORTEURS :

Mme Delphine MURIAUX	Chargée de recherche, INSERM - Lyon
Mr Serge BENICHOU	Directeur de recherche, INSERM - Paris

JURY :

Mr Yves GAUDIN	Directeur de recherche, CNRS - Gif sur Yvette
Mr Fabrizio MAMMANO	Directeur de recherche, INSERM - Paris
Mme Delphine MURIAUX	Chargée de recherche, INSERM - Lyon
Mr Serge BENICHOU	Directeur de recherche, INSERM – Paris
Mr Denys BRAND	Professeur des Universités, Université François Rabelais -Tours

REMERCIEMENTS

Comme il se doit, je voudrais remercier l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail et toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant toutes ces années.

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le Professeur Denys Brand, pour la confiance qu'il m'a accordée durant toutes ces années. Un grand merci pour votre sympathie, votre écoute, votre sens de l'humour, votre savoir-faire et votre disponibilité de tous les instants. Je vous remercie pour l'attention que vous avez porté à la direction de ce travail.

Un grand merci également au Docteur Fabrizio Mammano pour la collaboration fructueuse que nous avons établie et pour l'intérêt porté à mon travail. Merci pour ton soutien tout au long de ce projet et ta grande disponibilité. Tes précieux conseils et ta participation dans la rédaction de ma publication ont largement contribué à ma réussite. Je tiens aussi à te remercier pour avoir si gentiment accepté d'être examinateur de mon travail.
Par la même occasion, je tiens aussi à remercier Daniela Vendrame pour sa participation dans la réalisation de certaines manips de cette étude. Merci pour ton savoir-faire et pour la qualité de ton travail.

Un grand merci au Professeur Bernard Verrier et au Docteur François Biron qui nous ont mis a disposition tous le matériel sanguin nécessaire à la réalisation de cette étude, et pour nous avoir donné tous les renseignements cliniques et biologiques concernant ce fameux patient.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Delphine Muriaux, chargée de recherche INSERM à Lyon, et au Docteur Serge Benichou, directeur de recherche INSERM à Paris, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail de thèse en participant à mon jury en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Yves Gaudin, directeur de recherche CNRS à Gif sur Yvette, de me faire l'honneur de juger ce travail et de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l' U966 pour tous les bons moments que j'ai partagé en votre compagnie au cours de ces années de thèse :

A Philippe, notre responsable du laboratoire, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse au sein de ton équipe, pour ta disponibilité et ton attention de tous les instants. Un grand merci pour la confiance que tu m'accordes.

A Francis, Alain G. et Jean-christophe, pour leur soutien tout au long de cette thèse et pour leurs précieux conseils.

A Manu B. et Christophe, le duo de choc, pour votre disponibilité, votre aide au quotidien et votre sympathie.

A ma petite Manue R., ma voisine de paillasse, pour ton aide technique tout au long de ce projet. Merci mille fois pour ta disponibilité, ta bonne humeur quotidienne et ton écoute de tous les instants ! Ce fut un vrai plaisir que de travailler à tes cotés !

A Eric, mon sauveur, pour ta disponibilité et tes précieux conseils informatiques qui m'ont été d'une grande aide dans la rédaction de mon article et de ce manuscrit

A Alain, mon voisin de paillasse, pour ton aide technique et ton savoir-faire en séquençage. Nos petits moments de rire m'ont beaucoup manquée ces derniers mois, j'ai vraiment hâte de reprendre du service! (Attention n'oublies jamais qu'il n'y a que le mercredi que tout est permis !)

A Martine, pour ton aide tout au long de cette thèse et pour ton oreille attentive. Merci pour tes relectures.

A Nadine, pour ta joie de vivre, pour ton attention et ton écoute de tous les instants. Ma championne de l'orthographe, merci pour tes relectures.

Au clan des filles (Laura, Marion, Pauline, Suzie, Anne, Manue R. et Virginie (Les filles en force !)) pour votre soutien au quotidien et votre joie de vivre. Merci pour toutes les petites soirées organisées par vos soins qui m'ont permis de faire des "breaks" bien sympathiques au cours de ces derniers mois très intenses ! J'en avais bien besoin !

A Vincent, le roi du QPUC, pour ton dynamisme et ta sympathie.

A Catherine, pour ta sympathie et tes précieux conseils. Merci aussi pour tous ces bons moments passés à tes côtés lors de nos escapades parisiennes (En souvenir de notre petit moment détente enneigé à la tour Eiffel ! Trop bien !)

A christine, pour tes précieux conseils, ta gentillesse et ta bonne cuisine.

A Tanawan et Woottichai, mes deux compagnons thaïlandais du soir, pour votre joie de vivre et votre sympathie.

A Marie et Romu, pour votre savoir-faire et vos bons conseils

Sans oublier Valentina, Christiane et Loïc

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Cellulaire et de Microscopie Electronique pour son accueil chaleureux des derniers mois et surtout à Pierre-Yves pour sa formation en microscopie confocale.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire hospitalier de virologie pour leur accueil chaleureux, et plus particulièrement à Sylvie Brunet pour son aide technique et ses précieux conseils.

Merci bien évidemment au Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie ainsi qu'au Sidaction pour leurs financements qui m'ont permis de réaliser cette thèse.

Un grand merci aussi à tous mes amis qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse et qui m'ont surtout permis tous les week-ends d'oublier tous les soucis de la semaine et de m'évader un peu, le temps d'une soirée. Merci à Sophie, Valou, Matthieu, Juju, Aurélien, Sandrine, Jesse, Nini, Alex, Lolo, Mao, Tony, Pat, Domi et Charlène pour tous ces bons moments de rire et détente passés en votre compagnie, merci à Sylvie pour toutes ces "IBIZA nights" endiablées, pour ton sens de l'humour et ta joie de vivre (Ne changes rien !), et enfin merci à mon amie fidèle, Souheila, pour ton soutien et ton écoute de tous les instants.

Je dédie ce manuscrit à ma famille, et tout particulièrement à ma petite Maman et ma grande sœur, Lauréna, qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre soutien permanent, votre confiance et votre écoute. Vous avez toujours trouvé les bons mots pour me réconforter dans les moments difficiles et pour me relancer dans cette quête de réussite. Merci aussi à mon petit rayon de soleil, Dylan, qui a toujours été très attentionné envers sa tante (fleurs, chansonnettes, petits dessins…) et qui s'est toujours chargé de me divertir pendant ces années de thèse.

Merci aussi à Pat, mon père, et à tous mes oncle et tantes, Michel, Jeannine, Ginette, Jacques, Monique, Pierrot et mon parrain Henri, qui m'ont toujours soutenue dans cette poursuite d'étude et qui ont toujours été à mon écoute.

Enfin, j'aimerais prendre le temps de remercier mon petit homme qui a toujours été présent quelque-soient les épreuves traversées. Merci pour ton soutien dans les périodes sombres, tes encouragements permanent et ta grande patience. Merci de m'avoir soutenue, supportée et attendue tout ce temps.

RÉSUMÉ

Les glycoprotéines d'enveloppe (Env) du VIH-1 se caractérisent par leur long domaine cytoplasmique (DC) qui joue un rôle essentiel dans la morphogenèse et l'infectivité virales. La multiplication virale *in vitro* et *in vivo* dépend ainsi étroitement de l'intégrité de ce domaine.

Nous avons cependant identifié un patient infecté par un VIH-1 présentant des Env avec un DC tronqué de 20 acides aminés. Cette anomalie structurale aurait dû aboutir à la production de virions dont la capacité infectieuse était fortement diminuée. Mon travail de thèse a donc consisté à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une telle troncation et à explorer les mécanismes moléculaires permettant au virus présentant cette anomalie de se multiplier efficacement *in vivo*. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont abouti à l'identification de mécanismes de compensation des capacités de multiplication de ce virus portant des Env tronquées dans leur DC impliquant des mutations dans la protéine de matrice.

En conclusion, toutes ces données ont permis d'apporter des éléments de compréhension nouveaux quant à l'assemblage du VIH-1 et son fort potentiel d'évolution *in vivo.*

Mots clé : VIH-1, glycoprotéines d'enveloppe, matrice, compensation, évolution

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) typically encodes envelope glycoprotein transmembrane subunits with long cytoplasmic tails (CTs) involved in viral infectivity and morphogenesis. The integrity of the gp41 CT thus seems to be essential for viral replication *in vitro* and *in vivo.*

However, we report here the emergence and dominance *in vivo* of a primary HIV-1 variant carrying a natural 20-amino-acid truncation of the gp41 CT. Such a deletion would therefore be expected to impair viral replication. The aims of this study were thus to assess the functional consequences of the gp41 truncation and to identify the molecular mechanisms by which a primary HIV-1 harboring such a deletion in the gp41 CT maintained its ability to replicate efficiently *in vivo*. Our findings reveal that replication capacity of a primary HIV-1 carrying truncated CT could be rescued by compensatory mechanisms involving mutations in the matrix protein.

In conclusion, our findings provide new insignt into HIV-1 assembly and evolution potential *in vivo*.

Keywords : HIV-1, envelope glycoproteins, matrix, complementation, evolution

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

AcN	: Anticorps neutralisants
ADCC	: Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ATP	: Adénosine triphosphate
Alix	: ALG-2 Interacting factor X
ALT	: Asymptomatique à long terme
AP	: Complexes d'adaptine
APOBEC3G	: Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide like 3G
ARN	: Acide ribonucléique
ARNg	: Acide ribonucléique génomique
ARNm	: Acide ribonucléique messager
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
CAp24	: Protéine de capside virale
CD4	: Clustal of differentiation 4
CD4bs	: CD4 binding site
CDCC	: Complement-Dependant Cellular Cytotoxicity
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	: Cellule Présentatrice d'antigènes
CRFs	: Circulant Recombinant Forms
CTD	: C-terminal Domain
CTLs	: Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques
DCs	: Cellules dendritique
DC	: Domaine cytoplasmique de la TMgp41
DC-SIGN	: Dendritic cell–Intercellular adhesion molecule Grabbing Non-integrin
DRMs	: Detergent-Resistant Microdomains
env	: Le gène *env* ("*envelope*")
Env	: Les glycoprotéines d'enveloppe
ESCRTs	: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
gag	: Le gène *gag* ("*group-specific antigen*")
Glc	: Glucose
GTP	: Guanosine triphosphate

GPI : glycosylphosphatidylinositol
HLA : Human Lymphocyte Antigen
HTLV-1 : Human T-cell Lymphoma virus type 1
ICAM-I : Intercellular Adhesion Molecule -I
INp32 : Intégrase virale
LEDGF : Lens Epithelium-derived Growth Factor
LFA-I : Lymphocytes Function-associated Antigen-I
LLPs : Lentivirus Lytic Peptides
LT CD4+ : Lymphocytes T CD4+
LTR : Long Terminal Repeat
Man : Mannose
MAp17 : Protéine de matrice virale
MHR : Major Homology Region
MVB : Multivesicular Bodies
Myr(E) : Etat myristate exposé
Myr(S) : Etat myristate séquestré
NAc : N-acétyl glucosamine
NCp7/p9 : Nucléoprotéines virales
nef : Le gène *nef* ("*negative factor* ")
NK : Natural Killer Cells
PDI : Protéine disulfure isomérase
PIC : Pre-Integration Complex
PIP : Phosphatidyl-inositol phosphate
pol : Le gène *pol* ("*polymerase*")
$Pr55^{Gag}$: Le précurseur Gag de 55 kDa (Gag)
$Pr^{Gag-Pol}$: Le précurseur Gag/Pol de 160 kDa (Gag/Pol)
$Pr160^{Env}$: Le précurseur Env de 160 kDa
PRp11 : Protéase virale
RE : Réticulum Endoplasmique
rev : Le gène *rev* ("*regulator of viral gene expression*")
Rnase H : Ribonucléase H
RTp66/51 : Reverse transcriptase ou transcriptase inverse virale
RTC : Reverse Transcription Complex
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV : Simian Immunodeficiency Virus

SIVcpzPtt : SIV infectant le chimpanzé "*Pan troglodytes troglodytes*"
SIVgor : SIV infectant le gorille
SLN : Signaux de localisation nucléaire
SNC : Système nerveux central
SRP : Signal Recognition Particle
SV : Synapse virologique
SUgp120 : Sous-unité de surface des glycoprotéines d'enveloppe
TAR : Trans-Activating Region
TCR : CTLs Receptor
Tsg101 : Tumor susceptibility gene 101
tat : Le gène *tat* ("*transcription transactivator*")
TGN : Trans-Golgi Network
TMgp41 : Sous-unité transmembranaire des glycoprotéines d'enveloppe
vif : Le gène *vif* ("*viral infectivity factor* ")
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type I
vpr : Le gène *vpr* ("*viral protein R*")
vpu : Le gène *vpu* ("*viral protein U* ")

ABRÉVIATIONS RELATIVES AUX ACIDES AMINÉS

Acides aminés quelconques :	X
Acide aspartique :	D, Asp
Acide glutamique :	E, Glu
Alanine :	A, Ala
Arginine :	R, Arg
Asparagine :	N, Asn
Cystéine :	C, Cys
Glutamine :	Q, Gln
Glycine :	G, Gly
Histidine :	H, His
Isoleucine :	I, Ile
Leucine :	L, Leu
Lysine :	K, Lys
Méthionine :	M, Met
Phénylalanine :	F, Phe
Proline :	P, Pro
Sérine :	S, Ser
Thréonine :	T, Thr
Tryptophane :	W, Trp
Tyrosine :	Y, Tyr
Valine :	V, Val

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2007 6

Figure 2. Représentation de la distribution mondiale des différents sous-types de VIH-1 de groupe M 11

Figure 3. Représentation des associations phylogénétiques existant entre les différents groupes M, N, O et P de VIH-1 et les souches de SIV de chimpanzés (SIVcpz) et de gorilles (SIVgor) 13

Figure 4. Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type I 14

Figure 5. Organisation génomique du VIH-1 et présentation des différentes protéines virales 17

Figure 6. Cycle de multiplication du VIH-1 20

Figure 7. Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible par fusion des membranes virale et cellulaire 22

Figure 8. Mécanisme de transcription inverse du génome du VIH-1..... 25

Figure 9. Représentation schématique de l'activité catalytique de l'intégrase du VIH-1 *in vivo* : processus d'intégration de l'ADN viral du VIH-1 dans l'ADN génomique de la cellule cible 27

Figure 10. Profils d'épissage non exhaustif de l'ARN génomique du VIH-1 30

Figure 11. Représentation schématique de la structure du précurseur $Pr55^{Gag}$ 32

Figure 12. Modèle de recrutement séquentiel des complexes ESCRTs impliqués dans le bourgeonnement vésiculaire observé dans les corps multivésiculaires (MVB) des compartiments endosomaux tardifs 36

Figure 13. Modèle supposé de relargage du VIH-1 de la cellule infectée 38

Figure 14. Maturation protéolytique séquentielle du précurseur $Pr55^{Gag}$ du VIH-1 43

Figure 15. Dissémination du VIH-1 par transfert direct de cellule à cellule selon un mécanisme dit de "synapse virologique" 45

Figure 16. Différents aspects complexes des jonctions adhésives intercellulaire impliqué dans la dissémination du VIH-1 par transfert direct 49

Figure 17. Représentation schématique du précurseur $Pr160^{Env}$ 52

Figure 18. Translocation du précurseur $Pr160^{Env}$ dans la lumière du réticulum endoplasmique 54

Figure 19. Le cycle calnexine-calréticuline de contrôle de la qualité du repliement des protéines néosynthétisées au niveau du réticulum endoplasmique 55

Figure 20. N-glycosylation du précurseur $Pr160^{Env}$ du VIH-1..... 57

Figure 21. Représentation schématique du trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1..... 62

Figure 22. Représentation schématique du trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1..... 67

Figure 23. Profil d'évolution des paramètres virologiques et immunologiques sériques au cours de l'infection par le VIH-1 71

Figure 24. Tropisme du VIH-1..... 73

Figure 25. Différents mécanismes d'action des anticorps intervenant dans le contrôle de l'infection par le VIH-1..... 83

Figure 26. Mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse humorale neutralisante 85

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES 1
AVANT-PROPOS 4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 8
Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine de type I 9
I. Classification, diversification génétique et origines du VIH-1 9
A. Classification et diversification génétique du VIH-1 9
B- Origines du VIH-1 10
II. Caractéristiques générales du VIH-1 12
A. Structure du VIH-1 12
B. Organisation génomique du VIH-1 15
a. Les séquences LTR 16
b. Les régions codantes 16
III. Le cycle de multiplication du VIH-1 19
A. La phase précoce du cycle de multiplication 19
a. Pénétration du VIH-1 au sein de la cellule cible 19
a.1. Processus de reconnaissance de la cellule hôte par le VIH-1 21
a.2. Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte 23
b. Transcription inverse du génome viral 23
c. Intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte 24
B. La phase tardive du cycle de multiplication 28
a. Transcription de l'ADN proviral et expression régulée des protéines virales 28
b. Assemblage et bourgeonnement du VIH-1 29
b.1. Le rôle pilote du précurseur $Pr55^{Gag}$ 31
b.1.1. Le domaine M ou domaine de liaison aux membranes 31
b.1.2. Les domaines I ou domaines d'interaction 33
b.1.3. Les domaines L ou domaines tardifs 34
b.2. Implication de la machinerie ESCRTs dans le bourgeonnement viral 35
b.2.1. Fonctionnement des complexes ESCRTs 35
b.2.2. Exploitation de la machinerie ESCRTs par le VIH-1 37
b.3. Le site d'assemblage et de bourgeonnement viral 39
c. Processus de maturation virale 42
Chapitre 2 : Dissémination du VIH-1 par transfert direct de cellule à cellule 44
I. Processus d'établissement de la "synapse virologique" 44
A. Processus d'adhésion intercellulaire 46

B. Site de formation de la "synapse virologique" 47
II. Mécanisme de transfert direct du VIH-1 au niveau de la "synapse virologique" 48
III. Contribution du transfert direct de cellule à cellule dans l'établissement de l'infection à VIH-1 50
Chapitre 3 : Les complexes glycoprotéiques d'enveloppe du VIH-1 51
I. Biosynthèse et maturation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 51
A. Biosynthèse des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 51
B. Maturation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 51
a. Maturation dans le réticulum endoplasmique 51
b. Maturation dans l'appareil de Golgi 58
II. Fonctions des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 59
A. Structure de la glycoprotéine transmembranaire (TMgp41) du VIH-1 59
B. Fonctions de la glycoprotéine transmembranaire (TMgp41) du VIH-1 60
a. Les motifs LLPs 63
a.1. Implication des LLPs dans le processus de fusion 63
a.2. Implication des LLPs dans l'incorporation des Env 64
b. Les motifs de trafic 65
b.1. Implication dans la distribution intracellulaire des Env 65
b.2. Implication des Env dans la formation et le bourgeonnement de la particule virale 66
Chapitre 4 : Tropisme du VIH-1, réponse immune de l'hôte et échappement viral 69
I. Cinétique générale d'évolution de l'infection par le VIH-1 70
II. Le tropisme viral 72
A. Notion générale sur le tropisme du VIH-1 72
B. Les cellules cibles du VIH-1 74
a. Les cellules dendritiques 74
b. Les lymphocytes T CD4+ 75
c. Les macrophages 76
d. Les monocytes 77
e. Les autres types cellulaires ciblés par le VIH-1 77
III. Réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire 78
IV. Réponse immunitaire adaptative à médiation humorale 81
TRAVAIL EXPÉRIMENTAL 87
I. Objectifs de l'étude 88
II. Résumé des résultats obtenus (les figures auxquelles il sera fait référence sont celles du manuscrit) 88

III. Article 91

IV. Discussion 107

A. Conséquences fonctionnelles de la troncation du DC de la TMgp41 108

B. Compensation fonctionnelle de la troncation du DC de la TMgp41 par des mutations apparues dans la protéine de matrice 110

C. Compensation du défaut d'incorporation des Env présentant un DC de TMgp41 tronqué par les mutations apparues dans la protéine de matrice 112

D. Emergence séquentielle des mutations dans les Env et la protéine de matrice *in vivo* 114

E. Transfert viral de cellule à cellule 115

BIBLIOGRAPHIE 117

AVANT-PROPOS

Les premiers cas de patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ont été rapportés en 1981 aux Etats-Unis suite à l'observation d'une recrudescence d'infections opportunistes survenant habituellement chez des individus fortement immunodéprimés (Gottlieb et al., 1981; Hymes et al., 1981). Le SIDA se caractérise en effet par une défaillance du système immunitaire favorisant l'émergence d'infections opportunistes. Ce fléau, qui se transmet principalement par voie sexuelle ou sanguine, s'est rapidement propagé jusqu'aux régions les plus éloignées du globe en entraînant un nombre croissant de contaminations et de décès.

Depuis la découverte en 1983 par l'équipe de Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (Institut Pasteur, Paris, tous les deux Prix Nobel de médecine 2008) du virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1), l'agent étiologique du SIDA (Barre-Sinoussi et al., 1983), la communauté scientifique s'est mobilisée pour mettre en place un nombre important de programmes de recherche pour lutter contre cette maladie. Malgré des progrès scientifiques considérables tels que l'élaboration de tests de diagnostic, le séquençage du génome viral et le développement de traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART, " *Highly Active AntiRetroviral Therapy* "), le VIH-1 a continué à se propager et l'épidémie a pris des proportions mondiales. En 2007, elle a causé près de 2 millions de décès. Parallèlement, environ 2,7 millions de personnes ont contracté le VIH cette même année, ce qui porte à plus de 33 millions le nombre total d'individus infectés par le VIH dans le monde (Rapport annuel 2008 de l'ONUSIDA). A ce jour, l'Afrique Subsaharienne supporte toujours la plus grande partie du fardeau de l'épidémie mondiale, l'épicentre de cette épidémie étant situé en Afrique australe **(Figure 1)**.

Le développement des multithérapies combinant plusieurs antirétroviraux et la meilleure prise en charge thérapeutique ont permis d'améliorer de manière notable les conditions de vie des patients, et surtout d'augmenter leur espérance de vie. Cependant l'efficacité des multithérapies peut être contrecarrée, à plus ou moins brève échéance, par l'apparition chez les patients traités de virus résistants à différents antirétroviraux. Ces mutations générées par la polymérase virale émergent sous la pression de sélection imposée par la thérapeutique et par le système immunitaire.

En raison du grand potentiel d'évolution *in vivo* du VIH-1, lui permettant un échappement à la réponse immunitaire de l'hôte infecté et à diverses molécules thérapeutiques, un contrôle effectif de la pandémie de SIDA reste difficile.

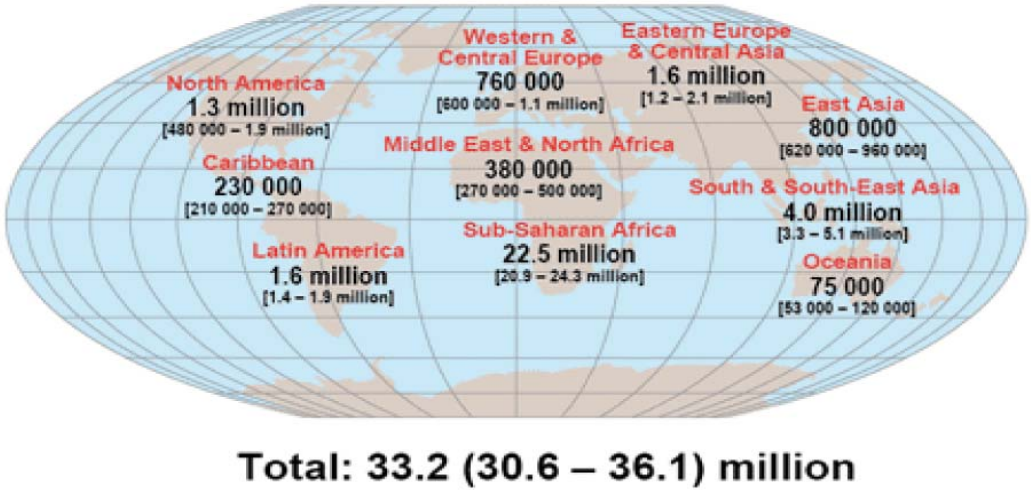


Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2007. Depuis les premiers cas de SIDA rapportés aux Etats-Unis, le VIH n'a cessé de se propager jusqu'aux régions les plus éloignées du globe. Dans les années 1970-80, l'épidémie s'est initialement propagée en Afrique sub-saharienne et dans les pays industrialisés (Europe, Amérique du Nord, Australie, Japon). Ensuite, une diffusion explosive du virus a été observée en Asie du Sud et du Sud-Est (Inde, Thaïlande), puis plus tardivement en Ukraine, Russie et actuellement en Chine. A ce jour, l'Afrique Subsaharienne supporte de loin la plus grande partie de l'épidémie mondiale (67% du total des personnes vivant avec le VIH et 72% des décès dus au SIDA en 2007).
[source: UNAIDS, 2007]

Il est donc indispensable de continuer à étudier le déroulement mécanistique du cycle de multiplication du VIH-1 afin d'obtenir des éléments de compréhension sur les moyens adoptés *in vivo* par ce virus pour s'assurer d'une propagation optimale de l'infection.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine de type I

I. Classification, diversification génétique et origines du VIH-1

A. Classification et diversification génétique du VIH-1

Le VIH-1 est un virus qui appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus* (Ratner et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985). Les rétrovirus présentent la particularité d'avoir un génome à ARN monocaténaire diploïde de polarité positive qu'ils rétrotranscrivent en ADN bicaténaire pour infecter leurs cellules cibles. Cette opération est réalisée par une enzyme qui leur est spécifique : la transcriptase inverse ou réverse transcriptase (RT).

Classiquement, l'infection à VIH-1 se caractérise *in vivo* par l'émergence continuelle de variants viraux très proches génétiquement qui forment des "quasi-espèces". Ce phénomène est associé à l'évolution rapide du virus en réponse aux pressions sélectives exercées par le système immunitaire et/ou aux thérapeutiques antirétrovirales. Cette variabilité du patrimoine génétique viral résulte notamment du manque de fidélité de la RT qui est dépourvue d'activité correctrice (3'-5' exonucléasique). Cette enzyme est responsable d'un taux très élevé d'erreurs d'incorporation de nucléotides, (Bebenek et al., 1993; O'Neil et al., 2002) de l'ordre de $5.4x10^{-5}$ par paire de bases et par cycle réplicatif (Gao et al., 2004), lors de la synthèse de l'ADN bicaténaire. La longueur du génome du VIH-1 étant d'environ 10^4 paires de bases et le taux de production viral étant d'approximativement 10^{10} virions/jour (Ho et al., 1995), des millions de variants viraux émergent au sein d'un même individu infecté chaque jour. Il est cependant important de noter que beaucoup de ces variants émergeants sont défectifs et, que seuls quelques-uns présentent un avantage sélectif. La diversité génétique du VIH-1 peut s'observer sur la totalité du génome viral mais les séquences codant pour des régions très immunogènes comme les glycoprotéines d'enveloppe (notamment les régions hypervariables V1 à V5 de la SUgp120) sont cependant plus concernées par ce phénomène (Starcich et al., 1986; Willey et al., 1986).

La classification des multiples isolats du VIH-1 en groupes, sous-types et formes recombinantes circulantes (CRFs, "*Circulant Recombinant Forms*") reflète la réalité du processus d'évolution dynamique du patrimoine génétique viral (Robertson et al., 2000). Les CRFs résultent de phénomènes de recombinaisons survenant au moment de la transcription inverse entre les génomes de virus distincts coinfectant une même cellule. Ces formes recombinantes deviennent de plus en plus fréquentes et complexes (McCutchan, 2006).

Après analyse phylogénétique, les différents variants du VIH-1 sont actuellement rassemblés en 4 groupes : le groupe M ("*Main*") comprenant 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et diverses CRFs (43 CRFs sont identifiées pour le moment) (Taylor et al., 2008), le groupe O ("*Outlier*"), le groupe N ("*New*" ou non-M, non-O) (Ayouba et al., 2000; Simon et al., 1998) et le groupe P récemment mis en évidence (Plantier et al., 2009). Cette classification a été établie en grande partie selon la diversité génétique observée au sein du gène *env* codant les glycoprotéines d'enveloppe. Les séquences nucléotidiques des gènes *env* diffèrent d'au moins 20% entre les différents sous-types et, à l'intérieur d'un même sous-type, l'ensemble des souches présentent des séquences de gène *env* ayant plus de 80% d'homologie génétique entre elles.

Les isolats du VIH-1 de groupe M, qui sont à l'origine de plus de 95% des infections, sont responsables de la pandémie actuelle. La distribution mondiale des différents sous-types et CRFs du VIH-1 reste encore hétérogène même si les mouvements internationaux tendent à permettre leur diffusion (Buonaguro et al., 2007; Hemelaar et al., 2006) **(Figure 2)**. Ainsi, les virus de sous-type A sont surtout présents en Afrique de l'Est et de l'Ouest, ainsi qu'en Europe orientale. Les virus de sous-type B prédominent en Europe occidentale, en Amérique, en Australie et dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est. Les virus de sous-type C sont majoritairement retrouvés en Afrique de l'Est et du Sud et en Inde. Enfin, les virus de sous-type D sont présents en Afrique de l'Est et de l'Ouest. Les formes recombinantes circulantes CRF01_AE et CRF02_AG, responsables du plus grand nombre d'infections, sont prédominantes respectivement en Asie du Sud-Est (Piyasirisilp et al., 2000) et en Afrique de l'Ouest (Montavon et al., 2000).

B- Origines du VIH-1

L'existence de lentivirus proches du VIH-1 chez de nombreuses espèces de primates non-humains (Daniel et al., 1985; Kanki et al., 1985) a suggéré qu'une transmission à l'homme de certains de ces virus puisse être à l'origine du VIH-1. Des analyses phylogénétiques menées sur les séquences du génome du VIH-1 et des virus associés de primates non-humains laissaient supposer une transmission inter-espèces de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) de singes infectés à l'homme (Gao et al., 1999).

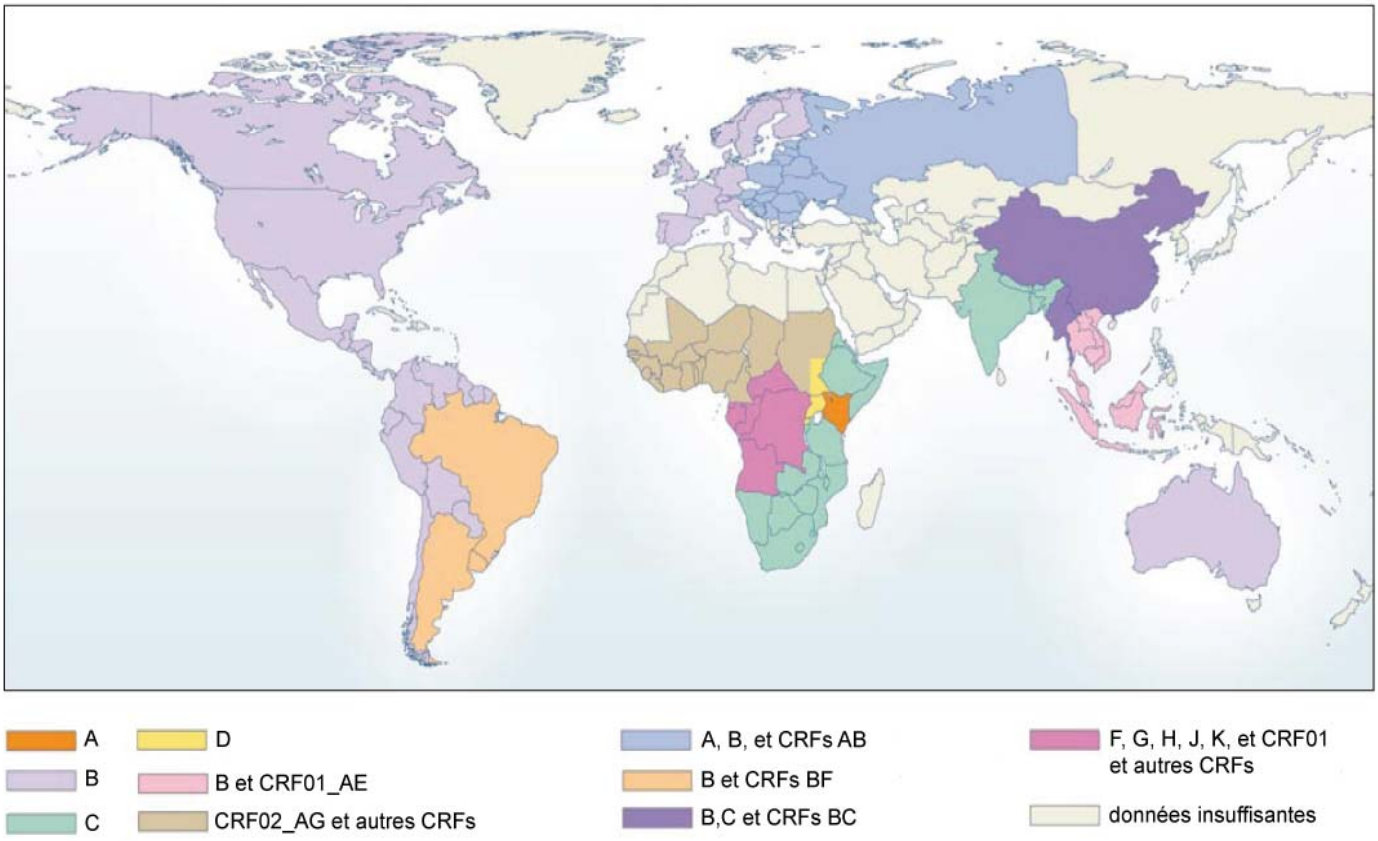


Figure 2. Représentation de la distribution mondiale des différents sous-types de VIH-1 de groupe M. Seuls les sous-types dominants et les formes recombinantes circulantes majoritaires de ce groupe sont indiqués.
[D'après Taylor *et al*., 2008]

Des analyses complémentaires ont permis de préciser que le VIH-1 provenait de la transmission à l'homme du SIVcpzPtt, un virus infectant naturellement plusieurs communautés géographiquement isolées au Cameroun de chimpanzés "*Pan troglodytes troglodytes*" (Gao et al., 1999; Korber et al., 2000). L'hypothèse d'une transmission sanguine de ce virus du chimpanzé aux chasseurs humains par exposition directe des hommes au sang des animaux contaminés lors de la chasse de primates ou de la consommation de viande de singe contaminée crue a été évoquée, d'autant plus que ces pratiques sont courantes en Afrique.

Des travaux récents ont permis de montrer que trois événements de transmission indépendants paraissaient être à l'origine des VIH-1 des groupes M, N et O (Keele et al., 2006). Ces travaux ont établi un lien phylogénétique entre les VIH-1 du groupe M et N et des virus infectant des groupes de chimpanzés localisés géographiquement au Cameroun **(Figure 3)**. Par contre, les VIH-1 du groupe O semblent plutôt provenir d'un groupe de gorilles également localisé au Cameroun, infecté par une souche de SIV proche du SIVcpzPtt (Van Heuverswyn et al., 2006). Enfin, le VIH-1 de groupe P récemment identifié infectait une patiente d'origine camerounaise (Plantier et al., 2009). Cette nouvelle forme virale semblerait être génétiquement extrêmement proche d'une souche de SIV identifiée parmi des populations de gorilles d'Afrique centrale (SIVgor).

II. Caractéristiques générales du VIH-1

A. Structure du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé arborant un génome à ARN qui se présente sous forme de particules sphériques infectieuses dont le diamètre varie de 90 à 120 nm (Gelderblom et al., 1987) **(Figure 4A)**.

La particule virale mature est constituée au centre d'une capside de forme conique dense aux électrons résultant de l'assemblage de protéines de capside (CAp24) **(Figure 4B)**. Cette capside renferme le génome viral composé de deux molécules d'ARN monocaténaires de polarité positive auxquelles sont associées les nucléoprotéines (NCp7/p9), la protéine p6, mais aussi des molécules de chacune des enzymes virales indispensables à la multiplication virale : la transcriptase inverse (RTp66/51) et l'intégrase (INp32).

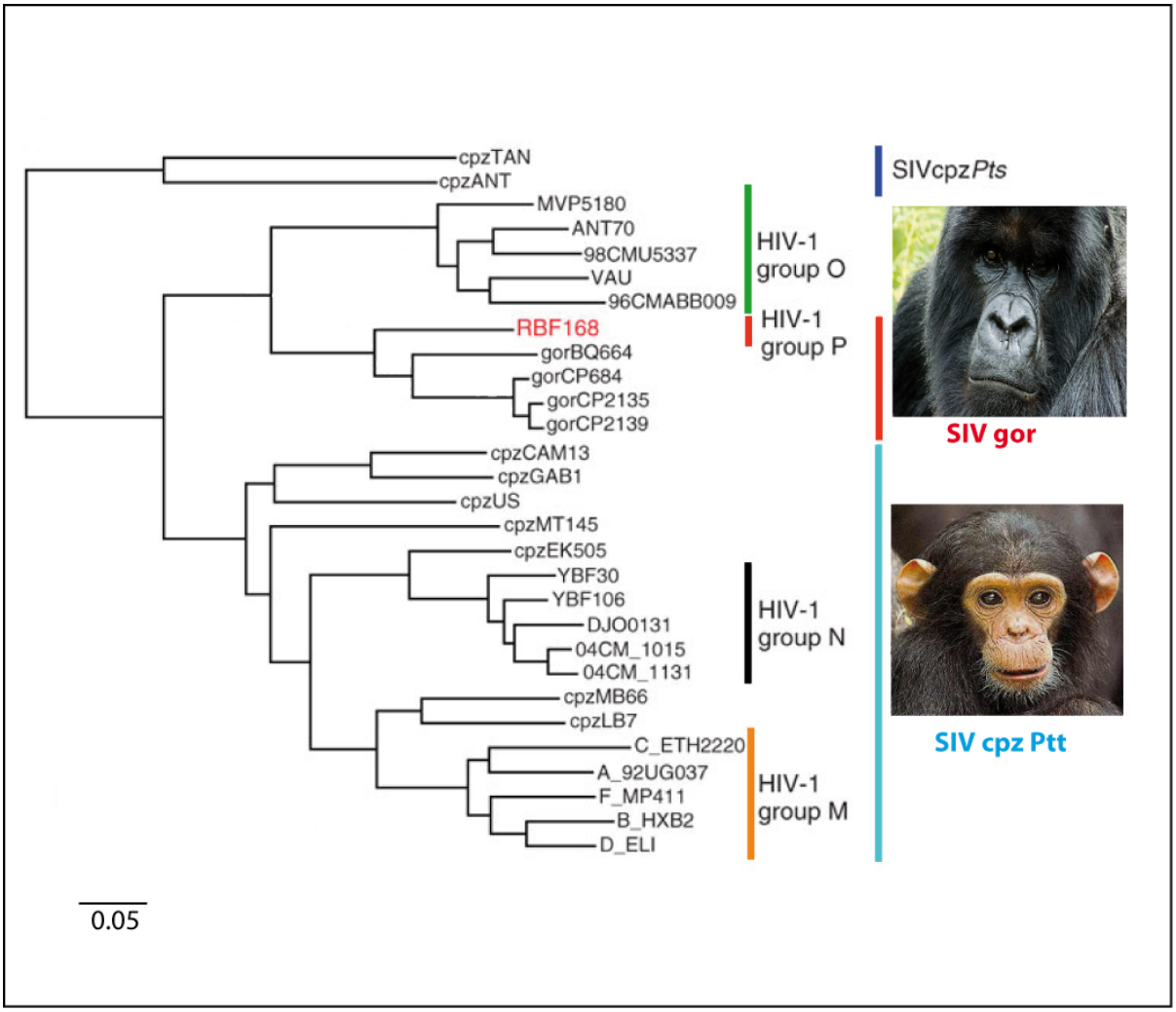
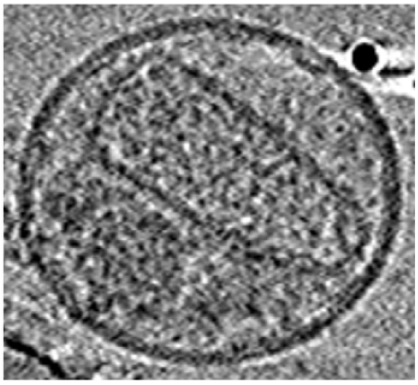


Figure 3. Représentation des associations phylogénétiques existant entre les différents groupes M, N, O et P de VIH-1 et les souches de SIV de chimpanzés (SIVcpz) et de gorilles (SIVgor).
[d'après Plantier et al., 2009]

A



B

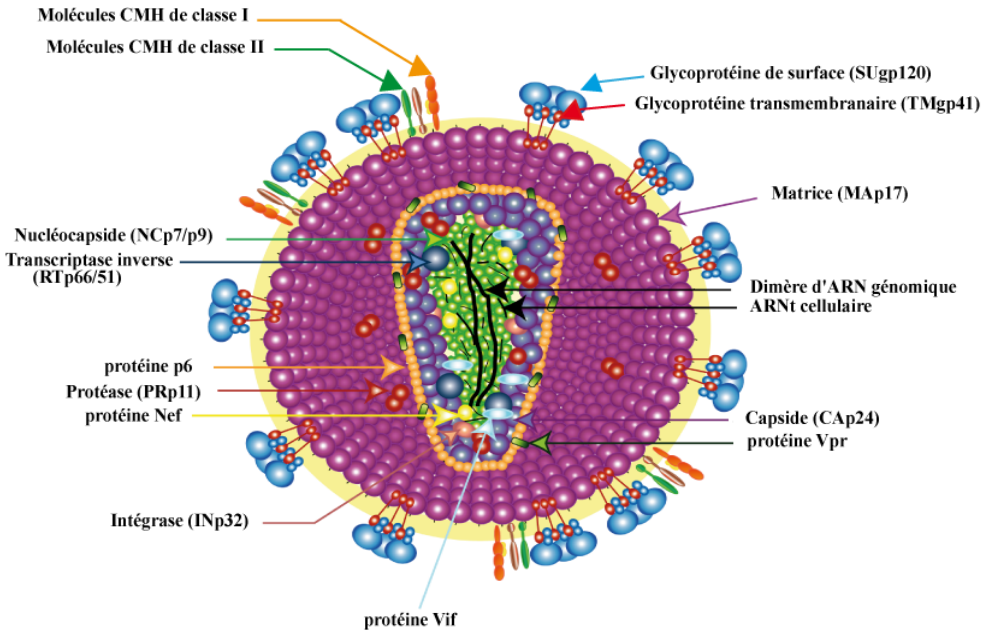


Figure 4. Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type I. (A) Particule virale mature observée en cryotomographie électronique. (B) Représentation schématique d'une particule virale infectieuse. Le VIH-1 est un virus enveloppé à ARN mesurant de 80 à 120 nm de diamètre. Il est constitué d'une capside conique qui renferme deux molécules d'ARN identiques associées aux nucléoprotéines et les enzymes virales, à savoir l'intégrase et la transcriptase inverse. Cette capside est entourée non seulement par une matrice, mais aussi par une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines d'enveloppe SUgp120 et TMgp41. Les protéines cellulaires normalement encapsidées ne sont pas indiquées sur ce schéma.
[source: Ganser-Pornillos *et al.*, 2008]

L'enveloppe externe du virus est constituée d'une bicouche phospholipidique riche en cholestérol et sphingolipides empruntée à la cellule hôte infectée, dans laquelle sont enchâssées des protéines d'origine cellulaire telles que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Henderson et al., 1987; Schols et al., 1992) et des complexes glycoprotéiques viraux **(Figure 4B)**. Ces spicules glycoprotéiques d'enveloppe (Env) sont formées par l'association non covalente sous forme de trimères d'hétérodimères de deux glycoprotéines : la glycoprotéine de surface (SUgp120) de 120 kDa et la glycoprotéine transmembranaire (TMgp41) de 41 kDa (Doms et al., 1991).

La matrice formée par l'assemblage et l'oligomérisation des protéines de matrice (MAp17) entoure la capside conique virale, renferme la protéase virale (PRp11), mais aussi tapisse la face interne de l'enveloppe **(Figure 4B)**. Diverses analyses structurales ont montré que la protéine de matrice est constituée de cinq hélices α et de trois feuillets β (Hill et al., 1996; Massiah et al., 1994; Verli et al., 2007). Les hélices α 1-4 forment un domaine globulaire compact tandis que l'hélice α 5 C-terminale est projetée vers l'intérieur de la particule virale et sert de connecteur entre la matrice et la capside. D'autre part, cette protéine structurale de 132 acides aminés est myristillée post-traductionellement à son extrémité N-terminale pour un ciblage à la membrane cellulaire. Les premières études cristallographiques menées avaient montré que cette protéine de matrice s'oligomérisait sous forme trimérique (Morikawa et al., 1998; Rao et al., 1995). Cette donnée a été récemment revue par Alfadhli et ses collaborateurs qui ont mis en évidence l'organisation de la protéine de matrice à la membrane plasmique sous forme d'hexamères de trimères de protéines (Alfadhli et al., 2009).

Les particules virales contiennent également des protéines virales auxiliaires (Nef, Vif et Vpr), des protéines cellulaires comme l'actine et la cyclophiline A, et des ARN de transfert (ARNt) cellulaires.

B. Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 est diploïde. Il est composé de deux molécules identiques d'ARN monocaténaires de polarité positive de 9.2 kb liées de façon non covalente, à proximité de leur extrémité 5', dans une région appelée DLS ("*Dimer Linkage Structure*"). Les ARN génomiques (ARNg) viraux ont une structure d'ARN messager (ARNm) puisqu'ils possèdent une coiffe en 5' et sont polyadénylés en 3'. Ces ARN disposent également à chaque extrémité de régions R identiques, indispensables à la transcription inverse. Ainsi, rapidement après l'infection d'une cellule cible, ces deux molécules d'ARNg sont converties par la RT en un

ADN bicaténaire linéaire qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte : on parle alors d'ADN proviral.

a. Les séquences LTR

L'ADN proviral est flanqué à ses extrémités par des séquences inversées répétées non codantes nommées LTR ("*Long Terminal Repeat*") qui se subdivisent en trois régions : U3, R et U5 **(Figure 5)**. Ce sont des régions stratégiques qui présentent des séquences d'amorçage de la réplication, des signaux essentiels de régulation de la transcription et de la traduction et des signaux nécessaires à l'intégration et l'encapsidation.

La région U3 du LTR-5' (-454 à -1) comporte l'ensemble des signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN proviral. Elle contient notamment un promoteur (-78 à -1) de structure eucaryote régulant l'expression des transcrits viraux dépendant de l'ARN polymérase II cellulaire et de ses cofacteurs, un domaine activateur (-104 à -79) et un domaine modulateur (-454 à -105) qui fixent des facteurs transcriptionnels cellulaires stimulant la transcription. Les régions U3 du LTR-5' et U5 du LTR-3' contiennent des sites de reconnaissance de l'intégrase virale qui assure la fonction d'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire. La région U5 du LTR-5' contient des signaux nécessaires au recrutement et à l'empaquetage de l'ARNg dans la capside virale. Enfin, la région U5 du LTR-3' contient les signaux de terminaison de la transcription et de polyadénylation.

b. Les régions codantes

L'ADN proviral du VIH-1 comporte 3 gènes principaux, *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus, qui codent des précurseurs polyprotéiques **(Figure 5)**. Le clivage de ces précurseurs par la protéase virale ou une protéase cellulaire libère les protéines structurales et enzymatiques du virus.

Le gène *gag* ("*group-specific antigen*") code un précurseur de 55 kDa ($Pr55^{Gag}$) qui, après clivages protéolytiques, donne naissance aux protéines structurales de matrice (MAp17), de nucléocapside (NCp7/p9), de capside (CAp24), à la protéine p6 et aux deux peptides p1 et p2. Cette polyprotéine joue un rôle essentiel dans l'assemblage des particules virales.

Le gène *pol* ("*polymerase*") code une polyprotéine qui, après clivages, génère les trois protéines enzymatiques virales indispensables à la multiplication virale: la protéase (PRp11), l'intégrase (INp32) et la transcriptase inverse (RTp66/p51).

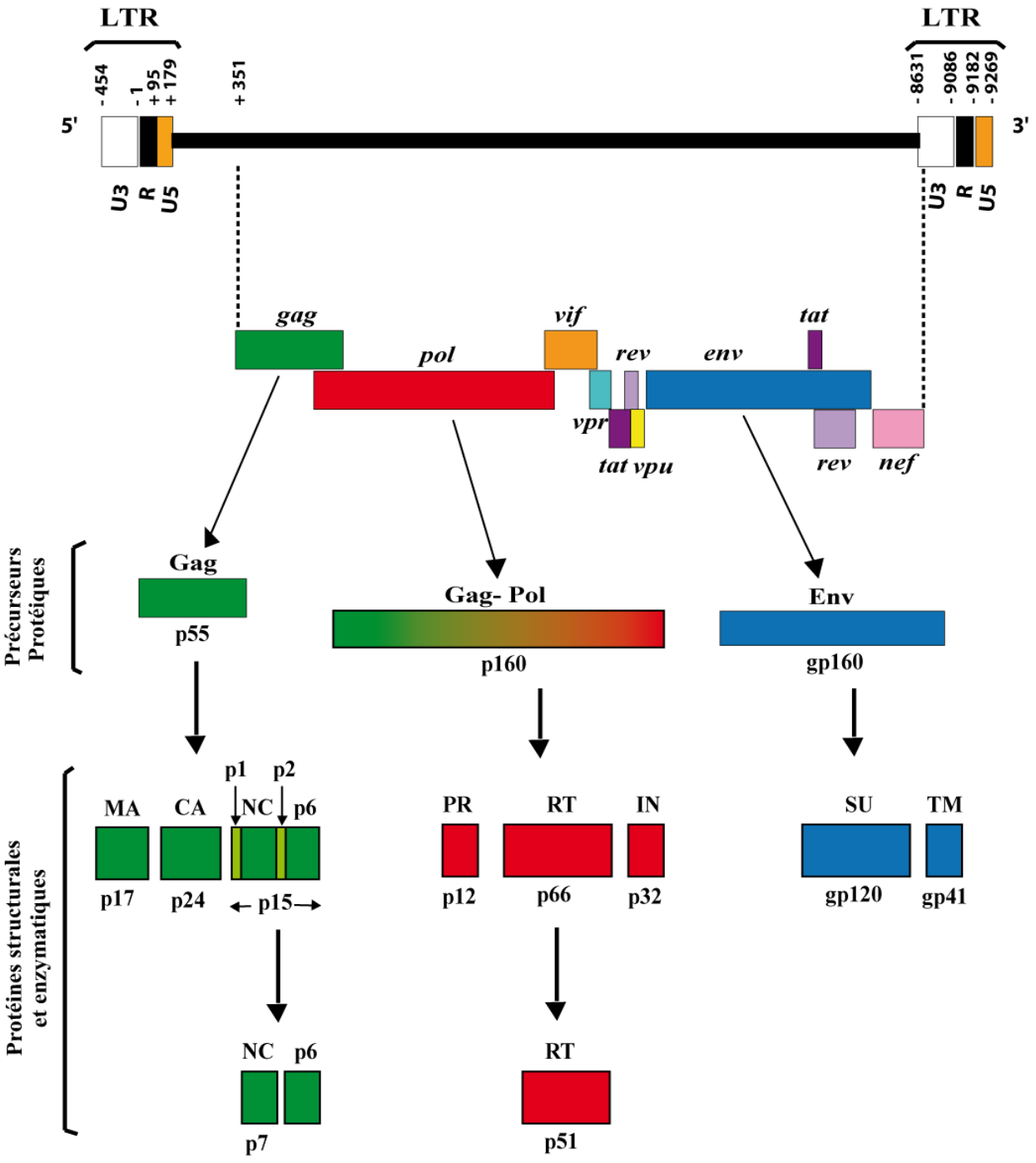


Figure 5. Organisation génomique du VIH-1 et présentation des différentes protéines virales. Le génome du VIH-1 comporte une région codante représentée non seulement par les trois gènes principaux *gag*, *pol* et *env*, codant respectivement les protéines de matrice, capside, nucléocapside et p6, les enzymes virales (protéase, transcriptase inverse et intégrase) et les glycoprotéines d'enveloppe, mais aussi par six autres gènes codant pour des protéines auxiliaires intervenant notamment dans la régulation du cycle de multiplication virale ou dans l'infectivité virale. Ce génome est également encadré à ses extrémités par des séquences inversées répétées (LTR, "*Long Terminal Repeat*") impliquées dans la transcription virale.

La protéase nécessite initialement d'être libérée par un mécanisme d'autocatalyse pour pouvoir ensuite assurer le clivage protéolytique de la polyprotéine et libérer l'intégrase et la transcriptase inverse. Ce gène *pol* n'est cependant pas toujours exprimé de manière indépendante. Il peut en effet se former des polyprotéines de fusion Gag-Pol. Cet événement, résultant d'un décalage du cadre de lecture en fin de synthèse de Gag, se produit pour environ 5% des ARN viraux traduits (Namy et al., 2006).

Le gène *env* ("*envelope*") code un précurseur de 160 kDa ($Pr160^{Env}$) qui, après clivage par une protéase cellulaire au cours de son transport à travers la voie sécrétoire, donne naissance aux deux glycoprotéines d'enveloppe: la SUgp120 et la TMgp41.

En plus de ces trois gènes communs à tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 possède six autres gènes dits "auxiliaires" présentant des cadres de lecture chevauchants **(Figure 5)**. Ces différents gènes, localisés entre le gène *pol* et le gène *env*, ainsi que dans la région 3' du gène *env*, codent de petites protéines régulatrices et auxiliaires intervenant dans la multiplication virale (Ratner et al., 1985).

Les gènes *tat* et *rev* codent des protéines qui assurent des fonctions régulatrices indispensables à la multiplication du virus. La protéine Tat ("*Transcription transactivator*") est un activateur transcriptionnel qui se fixe au niveau du domaine TAR de l'ARN pour accroître le taux de transcription des ARN viraux et, par conséquent, le niveau de synthèse des protéines virales au cours de l'infection (Gatignol, 2007). La protéine Rev ("*Regulator of viral gene expression*") est une protéine qui régule l'expression des protéines virales en participant à l'export nucléaire et l'accumulation cytoplasmique des ARNm viraux (Askjaer et al., 1998; Hofmann et al., 2001).

Les gènes *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* codent des protéines auxiliaires qui contribuent au pouvoir pathogène viral. La protéine Nef ("*Negative factor* ") semble ainsi jouer un rôle dans la pathogenèse *in vivo* en diminuant l'expression membranaire du CD4 et des molécules du CMH de classe I dans les cellules infectées, permettant ainsi l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire (Roeth and Collins, 2006). La protéine Vif ("*Viral infectivity factor* ") permet au virus d'échapper à des facteurs de restriction, membres de la famille des APOBEC, comme l'APOBEC3G, qui inhibent les phases précoces de l'infection en induisant l'hypermutation et la dégradation de l'ADN viral néosynthétisé (Goila-Gaur and Strebel, 2008). Il semblerait également que la protéine Vif soit capable de réguler certaines étapes de la transcription inverse *in vitro*, grâce à son activité chaperonne (Henriet et al., 2007). La protéine Vpr ("*Viral protein R*") provoque notamment l'activation de la réplication virale en induisant l'arrêt des cellules infectées en phase G2/M du cycle cellulaire (Andersen et al.,

2008; Muthumani et al., 2005). Enfin, la protéine Vpu ("*Viral protein U*") favorise le relargage du VIH-1 en dégradant le récepteur CD4 exprimé à la surface cellulaire, mais aussi en contrecarrant une restriction exercée par certains facteurs cellulaires dont un a été récemment identifié : la tétherine (Bst-2/CD317/HM1.24) (Bieniasz, 2009; Mitchell et al., 2009; Neil et al., 2008 ; Van Damme et al., 2008). La tétherine est une protéine transmembranaire cellulaire dont l'expression est induite par l'interféron. Elle présente la capacité de séquestrer les particules virales néoformées au niveau de la membrane plasmique pour restreindre leur libération dans le milieu extracellulaire. La protéine Vpu, qui est capable d'interagir avec cette tétherine, régulerait son expression à la surface cellulaire et constituerait ainsi un antagoniste de la restriction exercée par cette protéine. La protéine Vpu induirait d'ailleurs une relocalisation de la tétherine de la membrane plasmique vers les endosomes tardifs et sa dégradation par les lysosomes (Douglas et al., 2009).

III. Le cycle de multiplication du VIH-1

Le cycle de multiplication du VIH-1 ressemble à celui des autres rétrovirus. Il comprend une phase précoce durant laquelle le virus pénètre au sein de la cellule hôte suite à un processus de reconnaissance virus/cellule cible. Ce virus rétrotranscrit ensuite son ARNg en un ADN bicaténaire qui est transporté au noyau afin d'être intégré dans le génome de la cellule infectée **(Figure 6)**. Ce cycle comprend également une phase tardive durant laquelle ont lieu la transcription et l'expression régulée du génome proviral permettant alors la production des protéines et des ARN viraux nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement de nouvelles particules matures (Freed, 2001).

A. La phase précoce du cycle de multiplication

a. Pénétration du VIH-1 au sein de la cellule cible

En tant que parasite intracellulaire obligatoire, le VIH-1 ne peut se multiplier qu'au sein d'une cellule disposant de toute la machinerie nécessaire à l'établissement d'une infection productive. Le VIH-1 infecte de manière privilégiée les cellules du système immunitaire de l'hôte qui expriment le récepteur CD4 à leur surface, comme les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les monocytes. Ainsi, l'étape initiale du cycle de multiplication du VIH-1 consiste en l'entrée du virus dans la cellule cible suite à un processus de reconnaissance et d'attachement de la particule virale à la surface cellulaire (Clapham and McKnight, 2002).

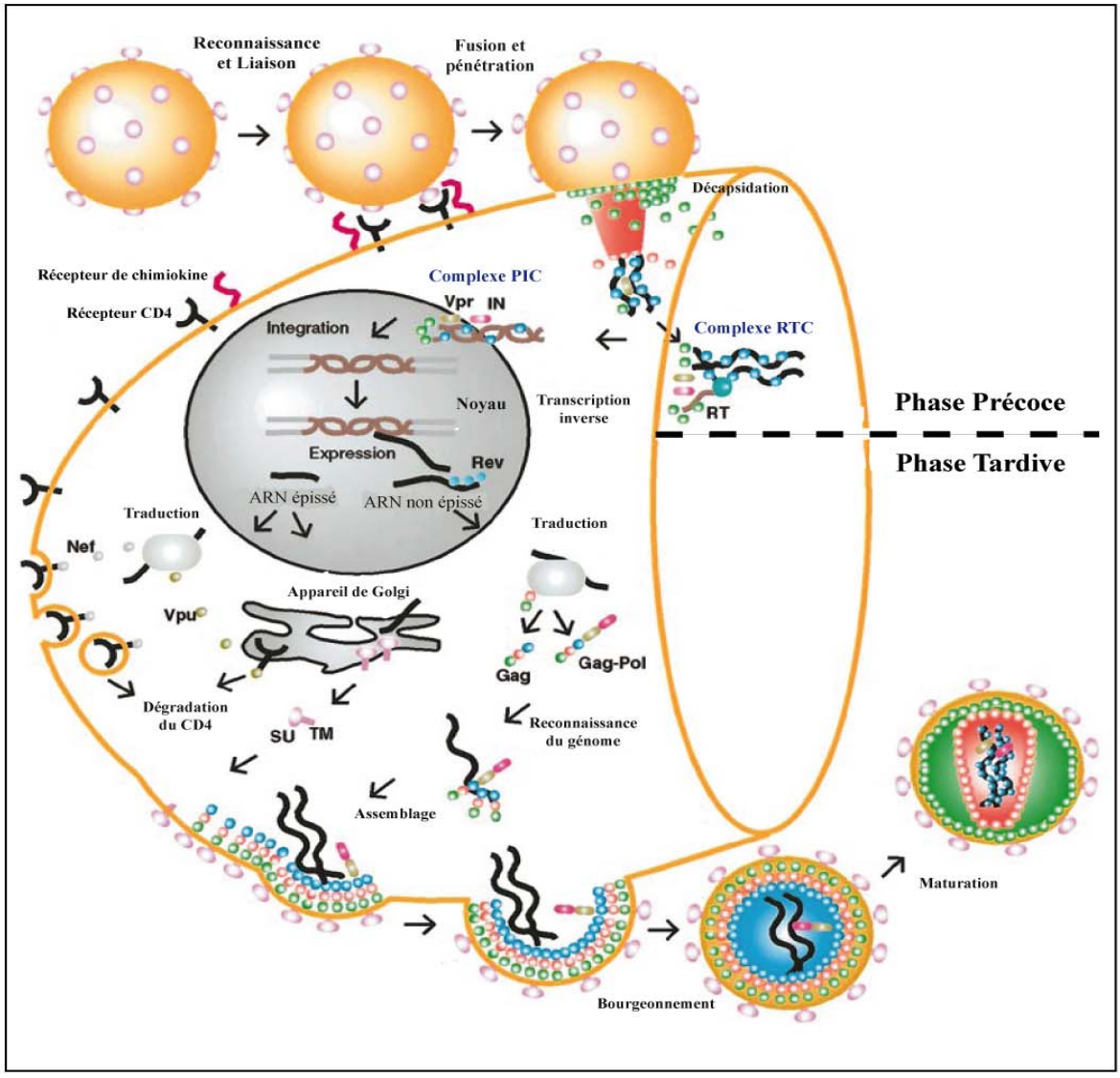


Figure 6. Cycle de multiplication du VIH-1. Après l'adsorption du virus sur la cellule cible par l'établissement d'une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe virales et les récepteurs (CD4) et co-récepteurs cellulaires (CCR5 et CXCR4), le virus pénètre dans la cellule par fusion des membranes virale et cellulaire. Suite à la libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule infectée, l'ARN génomique est rétrotranscrit en un ADN proviral qui est importé au noyau et intégré dans le génome de la cellule hôte. Après la transcription et l'expression des protéines de structure et enzymatiques, l'assemblage du génome et des divers éléments viraux a lieu au niveau des membranes cellulaires. Pour finir, les particules virales néoformées bourgeonnent et poursuivent leur maturation pour devenir infectieuses.
[D'après Turner & Summers, 1999]

a.1. Processus de reconnaissance de la cellule hôte par le VIH-1

Le processus d'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte requiert initialement des interactions de haute affinité entre l'enveloppe virale et des récepteurs de la surface cellulaire **(Figure 7)**. Cette reconnaissance spécifique est l'œuvre d'un nombre limité de résidus conservés des trimères de SUgp120 et de la région N-terminale du récepteur CD4 (Bour et al., 1995; Kwong et al., 1998; Prabakaran et al., 2007) exprimé à la surface des cellules permissives au VIH-1. Cet attachement peut aussi être stabilisé par d'autres interactions non spécifiques entre des molécules de surface des membranes virale et cellulaire. En effet, différentes études ont montré que diverses interactions pouvaient s'établir avec des molécules comme le récepteur du mannose présent sur les macrophages (Larkin et al., 1989), la molécule d'adhésion DC-SIGN ("*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin*") présente sur les cellules dendritiques (Curtis et al., 1992; Hong et al., 2002), les héparanes sulfates présents sur de nombreux types cellulaires (Bobardt et al., 2003; Mondor et al., 1998), et le galactosylcéramide et ses dérivés présents à la surface des macrophages et des cellules neuronales, gliales et épithéliales (Alfsen and Bomsel, 2002; Fantini et al., 1993; Harouse et al., 1991; Seddiki et al., 1994). L'attachement du virus à la cellule cible peut également s'effectuer grâce à d'autres interactions virus/cellule s'établissant entre des molécules de l'hôte incorporées dans l'enveloppe du VIH-1 et leurs ligands naturels présents à la surface des cellules cibles. Brièvement, des interactions entre la cyclophiline et les héparanes sulfates (Saphire et al., 2000) ou entre les deux molécules d'adhésion intracellulaires, ICAM-1 ("*InterCellular Adhesion Molecule-I*") et LFA-1 ("*Lymphocytes Function-associated Antigen-1*"), ont déjà été observées (Fortin et al., 1997; Rizzuto and Sodroski, 1997; Tardif and Tremblay, 2003).

L'interaction entre les trimères de SUgp120 et le récepteur CD4 induit chez la glycoprotéine une série de changements conformationnels qui aboutissent à la formation et/ou l'exposition du site de liaison à un corécepteur de la SUgp120 **(Figure 7)**. Les récepteurs de chimiokines CXCR4 ou CCR5 sont les deux principaux corécepteurs identifiés (Deng et al., 1996; Rizzuto et al., 1998). D'autres corécepteurs peuvent aussi être mis en oeuvre *in vitro*, cependant leur rôle *in vivo* reste à démontrer (Lusso, 2006).

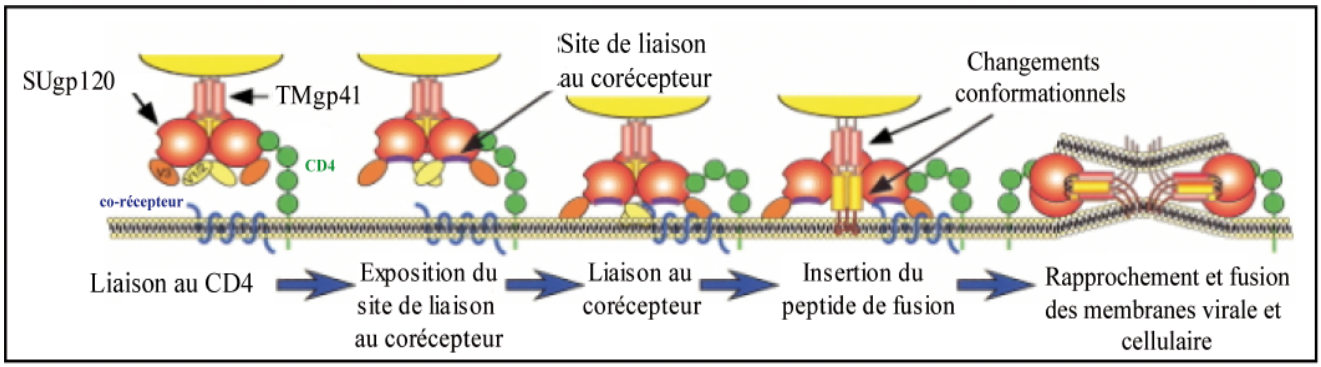


Figure 7. Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible par fusion des membranes virale et cellulaire. Suite à sa liaison au récepteur CD4, la glycoprotéine d'enveloppe SUgp120 expose le site de liaison au corécepteur. La liaison avec le corécepteur déclenche alors des remaniements conformationnnels de la TMgp41 qui projette le peptide de fusion à l'intérieur de la membrane plasmique de la cellule cible. De nouvelles modifications conformationnelles de l'ectodomaine de la TMgp41 permettent ensuite le rapprochement des bicouches phospholipidiques virale et cellulaire puis leur fusion.
[D'après Doms et al., 2000]

a.2. Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte

Suite à son attachement à la surface de la cellule cible, le VIH-1 va pénétrer au sein de cette cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Ce mécanisme de fusion, que nous allons voir en détail, a longtemps été considéré comme la voie d'entrée classique du virus dans les lymphocytes T $CD4^+$ (Prabakaran et al., 2007; Stein et al., 1987). Des études très récentes suggèrent cependant l'existence d'une voie d'entrée par endocytose (Miyauchi et al., 2009; Uchil and Mothes, 2009). Cette possibilité a d'ailleurs été corroborée par la mise en évidence récente d'une capacité du VIH-1 à se transmettre efficacement de cellule à cellule *via* un mécanisme dit de "synapse virologique" faisant appel à la voie d'endocytose (Hubner et al., 2009; Jolly et al., 2004). Ce mode de dissémination très particulier du VIH-1 par transfert direct sera exposé en détails dans le prochain chapitre.

Dans le cas d'une entrée virale par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, l'ultime interaction de la SUgp120 avec un de ses corécepteurs (CCR5 ou CXCR4) induit un changement de conformation radical des trimères de TMgp41 qui projettent alors leurs peptides de fusion très hydrophobes pour amarrer la bicouche lipidique de la cellule cible (Jones et al., 1998; Weissenhorn et al., 1997) **(Figure 7)**. Un second changement conformationnel des trimères de TMgp41 permet ensuite le rapprochement des membranes virale et cellulaire et leur fusion pour une libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule infectée (Lusso, 2006; Markosyan et al., 2003; Melikyan et al., 2000; Weissenhorn et al., 1997).

b. Transcription inverse du génome viral

Après sa libération dans le cytoplasme, la nucléocapside virale est soumise à un phénomène de désassemblage partiel et progressif (Auewarakul et al., 2005; Narayan and Young, 2004) **(Figure 6)**. Un complexe viral nucléoprotéique de transcription inverse (RTC, "*Reverse Transcription Complex*") est ainsi formé dans le cytoplasme de la cellule (Bukrinskaya et al., 1998; Fassati and Goff, 2001). La transcription inverse, initiée parallèlement à ce désassemblage, est un processus caractéristique des rétrovirus qui permet la conversion de l'ARNg en un ADN bicaténaire. Cette réaction est catalysée par la RT qui présente des activités ADN polymérase ARN-dépendante et ribonucléase H (RNase H).

La transcription inverse débute par la synthèse d'un premier brin d'ADN complémentaire de l'ARNg à partir d'une amorce ARNt cellulaire ($ARNt^{Lys3}$), selon un mécanisme dit de

"transfert de brin" faisant intervenir différents éléments cis-régulateurs répartis sur l'ARNg **(Figure 8)**. Parallèlement à cette synthèse, les amorces ARNt cellulaires et la majeure partie de l'ARNg sont dégradées par l'activité RNase H de la RT. La synthèse du second brin d'ADN à partir des portions d'ARNg résistantes à l'activité RNase H de la RT aboutit alors à la synthèse d'un ADN viral bicaténaire (Bampi et al., 2004; Basu et al., 2008; Katz and Skalka, 1994).

Au cours de nombreuses études, la protéine de matrice mature a été clairement montrée comme entrant dans la composition du RTC et jouant un rôle potentiel dans la régulation de cette synthèse d'ADN viral (Bukrinskaya et al., 2006; Bukrinsky et al., 1993b; Fassati and Goff, 2001). Cette fraction de protéine de matrice résulterait d'un processus précoce de maturation du $Pr55^{Gag}$ ayant eu lieu au cours du précédent cycle de multiplication virale dans le cytoplasme de la cellule infectée. Une mutation du résidu 20 de la protéine de matrice a d'ailleurs été montrée comme affectant significativement la synthèse d'ADN et, de ce fait, la réplication virale (Kiernan et al., 1998).

D'autres protéines virales et cellulaires seraient également impliquées dans la régulation de ce processus, notamment les protéines de nucléocapside (Iwatani et al., 2003; Li et al., 1996), l'intégrase (Ao et al., 2005; Wu et al., 1999; Zhu et al., 2004), les protéines Nef (Aiken and Trono, 1995), Vif, Tat (Harrich et al., 1997; Ulich et al., 1999), et Vpr (Stark and Hay, 1998), la cyclophiline A (Thali et al., 1994) et la topoisomérase I (Takahashi et al., 1995; Takahashi et al., 2002).

Suite à la conversion du génome viral en ADN, on assiste alors à l'établissement d'un complexe de préintégration (PIC, "*Pre-Integration Complex*") protégeant l'ADN viral de la dégradation et facilitant son intégration dans un chromosome de la cellule hôte (Miller et al., 1997).

c. Intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte

Le PIC migre alors rapidement au noyau pour que l'ADN viral soit intégré dans l'ADNg de la cellule hôte, sous l'action de l'intégrase (Depienne et al., 2001).

Ce processus d'intégration se déroule en deux étapes spatialement et temporellement distinctes (Ciuffi and Bushman, 2006; Lewinski and Bushman, 2005).

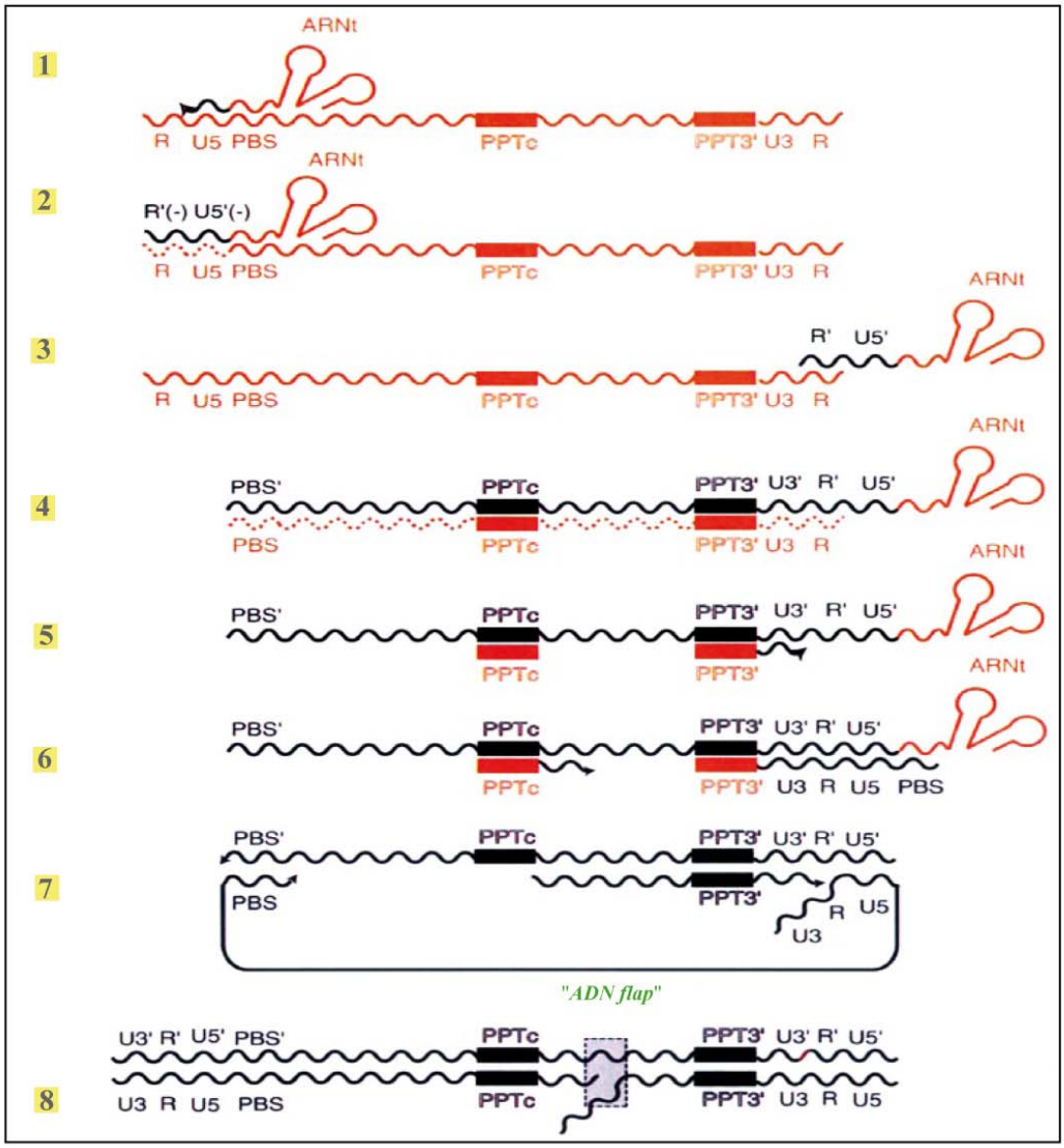


Figure 8. Mécanisme de transcription inverse du génome du VIH-1. La transcription inverse débute par l'appariement de l'ARNt^{Lys3} à une région (PBS) de l'ARN génomique (en rouge) (1) et l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) (en noir) (2). Après un premier transfert de brins (3), l'élongation du brin d'ADN (-) se poursuit parallèlement à une dégradation de l'ARN viral, à l'exception de séquence résistantes à l'activité RNAse H de la RT (PPTc et PPT3') (4). Ces séquences servent par la suite d'amorce à l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) (en noir) (5 et 6). Après un second transfert de brins, l'élongation du brin d'ADN (+) se poursuit (7) et permet l'obtention d'une conformation originale de l'ADN viral appelée "*ADN flap*" qui joue un rôle notamment dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (8).
[D'après Basu *et al.*, 2008]

Dans un premier temps, l'intégrase virale associée aux LTRs catalyse une étape de maturation cytoplasmique de l'ADN viral, aussi appelée "*3'processing*", qui consiste en un clivage endonucléotidique des deux extrémités 3'-OH de l'ADN bicaténaire après un dinucléotide CA très conservé chez les rétrovirus **(Figure 9)**.

Le VIH-1 présente la caractéristique de cibler des cellules différenciées et en arrêt de division comme les cellules dendritiques, les macrophages et bien d'autres cellules arrêtées à différents stades du cycle cellulaire (Lewis et al., 1992; Lewis and Emerman, 1994; Weinberg et al., 1991; Yamashita and Emerman, 2004). La membrane nucléaire ne se dissociant que durant la mitose cellulaire, la seconde étape d'intégration nécessite alors l'import actif du PIC à travers une enveloppe nucléaire intacte (Bukrinsky et al., 1992) grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (SLN) dans le PIC.

La protéine de matrice pourrait être impliquée dans ce phénomène d'import nucléaire actif du PIC (Bukrinskaya et al., 1996; Gallay et al., 1995), notamment *via* la présence de deux SLN (motif ^{26}KKKYKLK^{32} et motif ^{110}KSKKKAQ^{116}) chargés positivement (Bukrinsky et al., 1993a; Haffar et al., 2000; von Schwedler et al., 1994). Le ciblage du PIC au noyau par la protéine de matrice se ferait notamment par trafic le long des microtubules du cytosquelette de la cellule hôte (Arhel et al., 2006; McDonald et al., 2002), suite à une interaction avec des importines cellulaires (Ao et al., 2007; Bukrinsky, 2004). Ces divers mécanismes restent cependant aujourd'hui sujets à de nombreuses controverses (Hearps et al., 2008; Reil et al., 1998).

La nature multifactorielle de l'import nucléaire du PIC pourrait notamment expliquer les controverses concernant le rôle de la protéine de matrice dans ce processus. En effet, d'autres acteurs moléculaires du PIC, tels que l'intégrase (Gallay et al., 1997) et la protéine Vpr (Heinzinger et al., 1994; Nie et al., 1998), ont également été identifiés comme ayant un rôle dans son adressage nucléaire. L'ADN viral, en adoptant une conformation en triplex ("*ADN flap*") favorable à sa translocation à travers les pores nucléaires, participerait lui aussi à ce processus (Iordanskiy et al., 2006; Zennou et al., 2000) **(Figure 8)**. Enfin, un autre facteur cellulaire, le LEDGF ("*Lens Epithelium-derived Growth Factor*")/p75, a été récemment impliqué dans l'étape d'intégration de l'ADN du VIH-1 dans le génome cellulaire (Llano et al., 2006a).

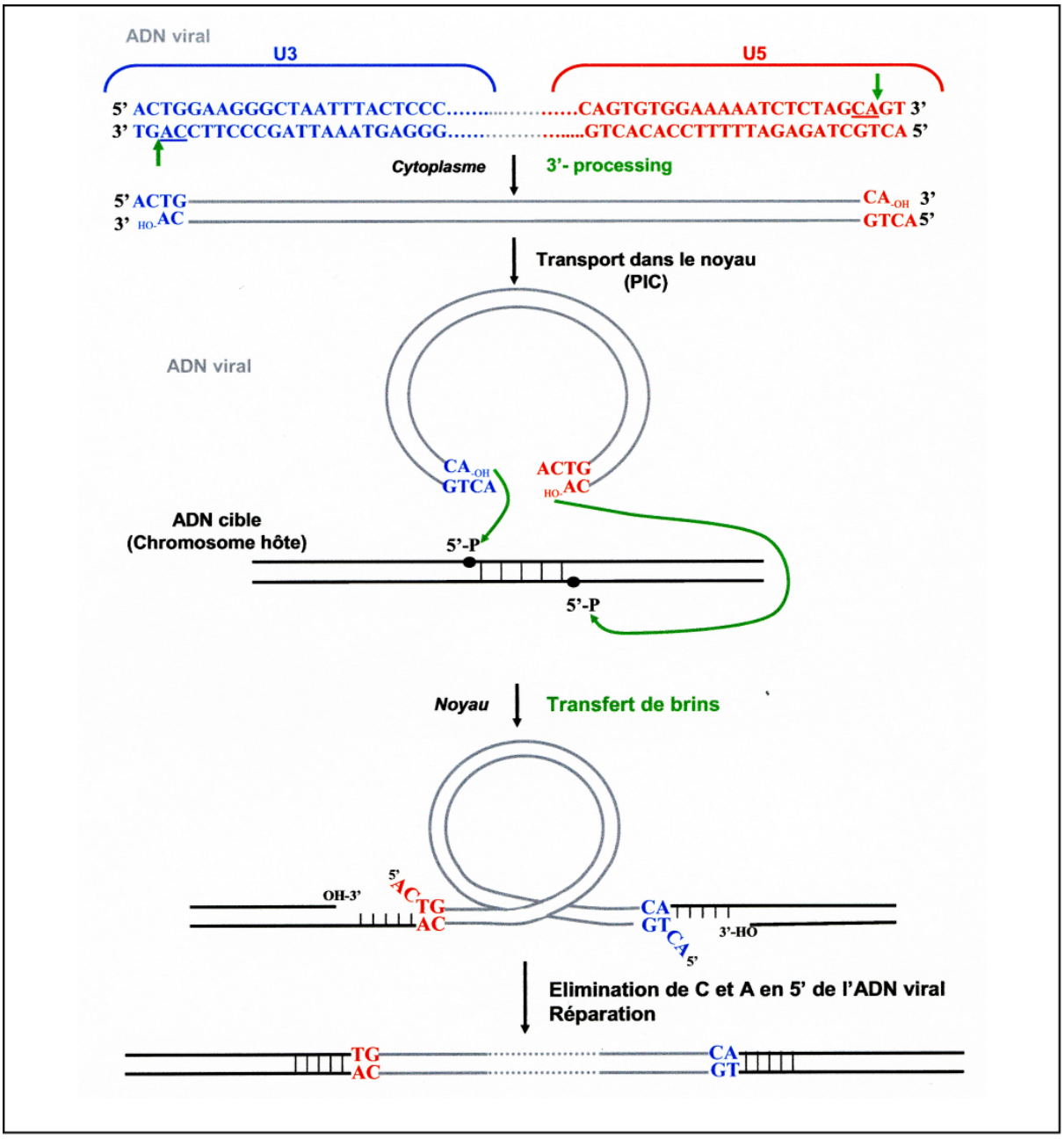


Figure 9. Représentation schématique de l'activité catalytique de l'intégrase du VIH-1 *in vivo*: processus d'intégration de l'ADN viral du VIH-1 dans l'ADN génomique de la cellule cible. La réaction d'intégration comprend trois étapes: le clivage des deux extrémités 3'-OH de l'ADN bicaténaire viral au niveau d'une séquence consensus CAGT, le transfert de brins et la jonction concertée de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire, et la réparation des régions d'ADN simple brin probablement par des enzymes cellulaires.
[D'après Ciuffi & Bushman, 2006]

Ce facteur, qui est capable d'interagir avec l'intégrase virale présente dans le PIC (Cherepanov et al., 2004), mais aussi avec la chromatine cellulaire (Llano et al., 2006b; Turlure et al., 2006), favoriserait le ciblage du PIC au noyau (Ciuffi et al., 2005; Marshall et al., 2007; Shun et al., 2007) et stimulerait l'activité de l'intégrase virale (Botbol et al., 2008).

Le noyau atteint, l'intégrase catalyse alors de façon concertée la jonction des deux extrémités 3'-OH de l'ADN viral aux deux extrémités 5'-phosphate de l'ADN hôte générées **(Figure 9)**. Pour finir, suite à un transfert de brins, l'espace compris entre le 5'-phosphate de l'ADN viral et le 3'-OH de l'ADN cible est réparé vraisemblablement par les enzymes de réparation du génome de la cellule (Daniel et al., 2004).

Il existe peu de spécificité quant à la séquence du site d'intégration au niveau de l'ADN cible (Ciuffi, 2008; Lewinski et al., 2006). Néanmoins, l'intégration semble se faire préférentiellement au niveau de gènes transcrits par l'ARN polymérase II et très peu au niveau des régions transcriptionellement inactives comme les télomères et les centromères (Carteau et al., 1998; Schroder et al., 2002).

B. La phase tardive du cycle de multiplication

a. Transcription de l'ADN proviral et expression régulée des protéines virales

L'ADN viral intégré dans le génome de la cellule hôte constitue alors une unité de transcription indépendante avec son propre promoteur. Selon l'état d'activation de la cellule hôte et l'influence de nombreux facteurs cellulaires et viraux, cet ADN proviral peut alors se présenter soit sous une forme latente et silencieuse ou sous une forme transcriptionnellement active (Nekhai and Jeang, 2006).

Lorsque la cellule infectée est activée, l'ADN proviral est transcrit par une enzyme cellulaire, l'ARN polymérase II, en un ARN précurseur commun à tous les ARNm nécessaires à la synthèse de nouvelles particules virales. Le LTR-5' du VIH-1 sert de site d'initiation de la transcription *via* la présence d'une "*TATA box*". Les LTRs contiennent également les éléments cis-régulateurs nécessaires à la synthèse de ces ARNm (Freed, 2001). Par la suite, des phénomènes d'épissage cellulaires différentiels conduisent à l'apparition de trois catégories d'ARNm : des ARNm multi-épissés codant les protéines Tat, Rev et Nef ; des ARNm mono-épissés codant le $Pr160^{Env}$ et les protéines Vif, Vpr et Vpu ; et des ARNm non-épissés codant le $Pr55^{Gag}$ et le $Pr^{Gag\text{-}Pol}$ **(Figure 10)**. Les ARNm alors obtenus subissent une exportation nucléaire pour être traduits en protéines par la machinerie cellulaire cytoplasmique.

De nombreuses études ont souligné le rôle de la protéine Rev dans la régulation des phénomènes d'épissage, et plus particulièrement dans la synthèse des ARNm mono- et non-épissés, mais aussi dans les mécanismes d'export des ARNm vers le cytosol (Malim et al., 1989; Strebel, 2003). Les ARNm multi-épissés codant les protéines Tat, Rev et Nef sont les premiers à être synthétisés, exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines. La protéine Rev, impliquée dans la synthèse et l'export des ARNm mono- et non-épissés (Wu and Marsh, 2003), et la protéine Tat, impliquée dans l'activation de la transcription (Gatignol, 2007), sont ensuite nécessairement réimportées au noyau. Les ARNm viraux mono et non-épissés sont alors tardivement synthétisés et traduits en précurseurs protéiques à l'origine des protéines structurales et enzymatiques nécessaires à la formation de nouveaux virions. Après la transcription, certains ARN viraux vont être également capables d'échapper aux phénomènes d'épissage. Ces derniers vont alors être exportés vers le cytoplasme, puis acheminés vers les sites d'assemblage viraux pour servir de génome aux nouvelles particules virales en cours de formation.

b. Assemblage et bourgeonnement du VIH-1

Parallèlement à la synthèse des divers composants viraux, le processus d'assemblage de nouvelles particules virales débute. Cette étape d'assemblage a récemment fait l'objet d'un réexamen approfondi à la lumière des développements technologiques en biologie moléculaire et cellulaire, et particulièrement en imagerie cellulaire. L'assemblage du VIH-1 est un processus complexe qui se déroule en de multiples étapes séquentielles régulées par divers composants viraux et de nombreux facteurs cellulaires (Demirov and Freed, 2004; Ganser-Pornillos et al., 2008; Morita and Sundquist, 2004). Initialement, cette étape d'assemblage débute par la dimérisation et la multimérisation du $Pr55^{Gag}$ (et du $Pr^{Gag-Pol}$), puis se poursuit par une liaison des multimères de $Pr55^{Gag}$ à l'ARNg viral et, enfin, se termine par le transport des complexes $Pr55^{Gag}$/ARN et des complexes glycoprotéiques d'enveloppe au niveau de sites spécifiques des membranes plasmiques ou endosomales où vont bourgeonner des virions immatures **(Figure 6)**. Les étapes de bourgeonnement viral et de maturation protéolytique des précurseurs $Pr55^{Gag}$ et $Pr^{Gag/Pol}$ par la protéase virale se déroulent de façon concomitante à la phase d'assemblage.

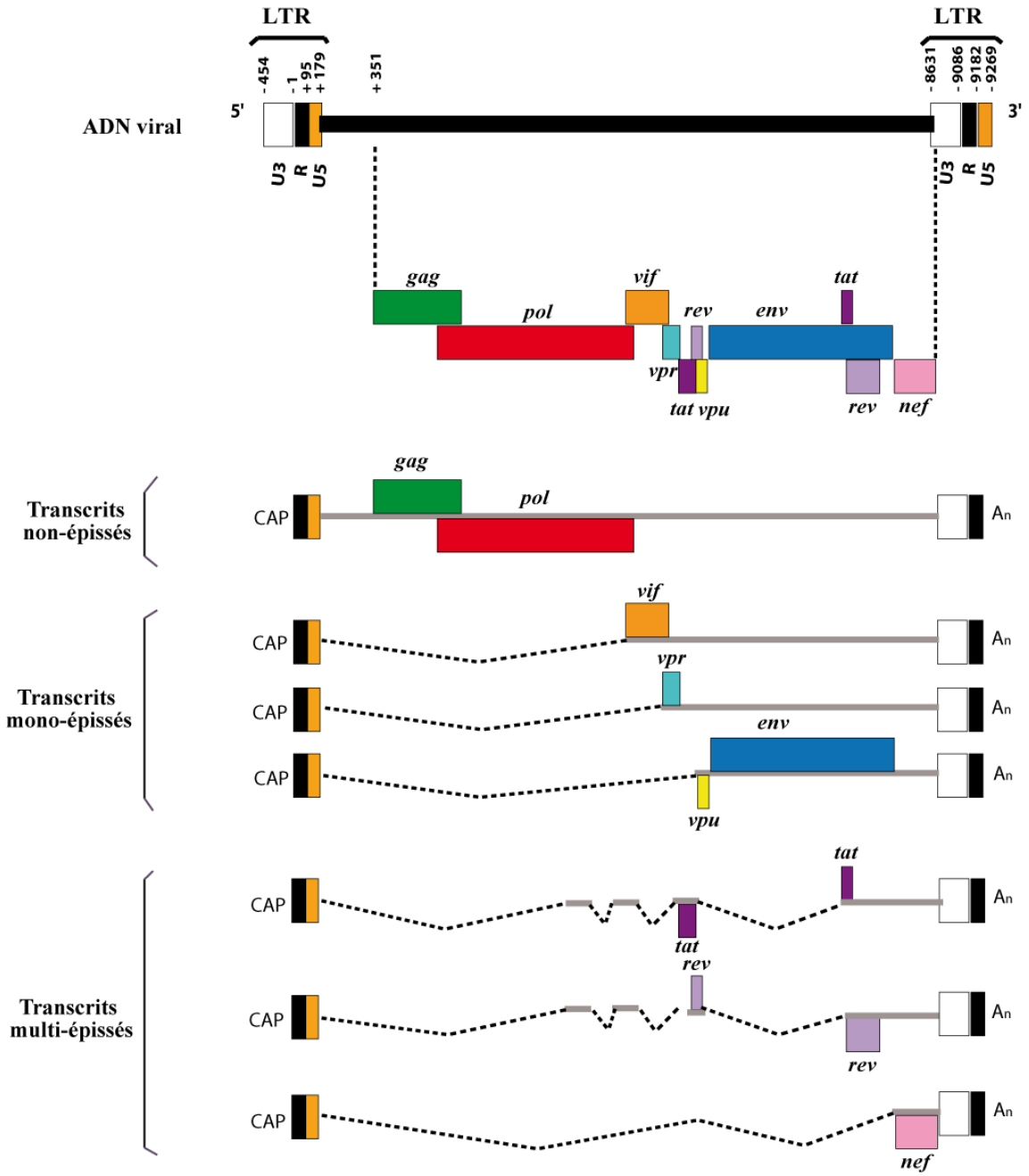


Figure 10. Profils d'épissage non exhaustif de l'ARN génomique du VIH-1. La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation de transcrits qui peuvent être regroupés en trois classes: les ARN viraux non-épissés qui codent les polyprotéines Gag et Gag-Pol et qui constituent l'ARN génomique viral, les ARN viraux mono-épissés qui codent les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env, et les ARN multi-épissés qui codent les protéines Tat, Rev et Nef.

Même si le $Pr55^{Gag}$ constitue l'élément essentiel à l'assemblage et au bourgeonnement, d'autres protéines virales semblent impliquées dans les étapes tardives du cycle de multiplication viral comme les Env (cf. chapitre ultérieur) et les protéines auxiliaires Rev (Brandt et al., 2007; Cochrane et al., 1990; Zapp and Green, 1989) ou Vpu (Gottlinger et al., 1993; Harila et al., 2006).

b.1. Le rôle pilote du précurseur $Pr55^{Gag}$

Le précurseur protéique $Pr55^{Gag}$ joue un rôle central dans l'assemblage et le bourgeonnement viral. D'ailleurs, sa seule expression dans la cellule est suffisante pour induire l'assemblage, la production et le relargage de pseudo-particules virales non infectieuses (Gheysen et al., 1989; Hoshikawa et al., 1991; Muriaux et al., 2001). L'assemblage viral est principalement piloté par le $Pr55^{Gag}$ qui est capable de se multimériser pour former le core viral, et de recruter les différents constituants viraux (notamment l'ARN) et les différents facteurs cellulaires impliqués dans ce mécanisme, aux niveaux des plate-formes d'assemblage membranaires. Le $Pr55^{Gag}$ contient trois domaines fonctionnels impliqués dans la biogenèse de la particule virale : le domaine M impliqué dans l'adressage du $Pr55^{Gag}$ à la membrane cellulaire, les domaines I nécessaires aux interactions Gag-Gag et au recrutement de l'ARNg, et enfin les domaines L impliqués dans le relargage de la particule virale (Freed, 1998) **(Figure 11)**.

b.1.1. Le domaine M ou domaine de liaison aux membranes

Le domaine M membranotropique est localisé à l'extrémité N-terminale (résidus 1-31) de la région du précurseur $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice. Ce domaine présente deux déterminants qui jouent un rôle majeur dans l'adressage et la liaison du $Pr55^{Gag}$ aux membranes cellulaires : un site de myristilation et une séquence riche en acides aminés basiques très conservée (résidus 17 à 31) (Zhou et al., 1994) **(Figure 11)**. La myristilation N-terminale permet notamment l'orientation et l'ancrage stable du $Pr55^{Gag}$ au niveau de structures membranaires hydrophobes particulières de la bicouche lipidique (Bryant and Ratner, 1990; Lindwasser and Resh, 2004). Cette liaison membranaire du $Pr55^{Gag}$ est d'ailleurs régulée par un mécanisme de contrôle de l'exposition du groupement myristate appelé « myristil switch » (Hermida-Matsumoto and Resh, 1999; Resh, 2004; Spearman et al., 1997; Tang et al., 2004).

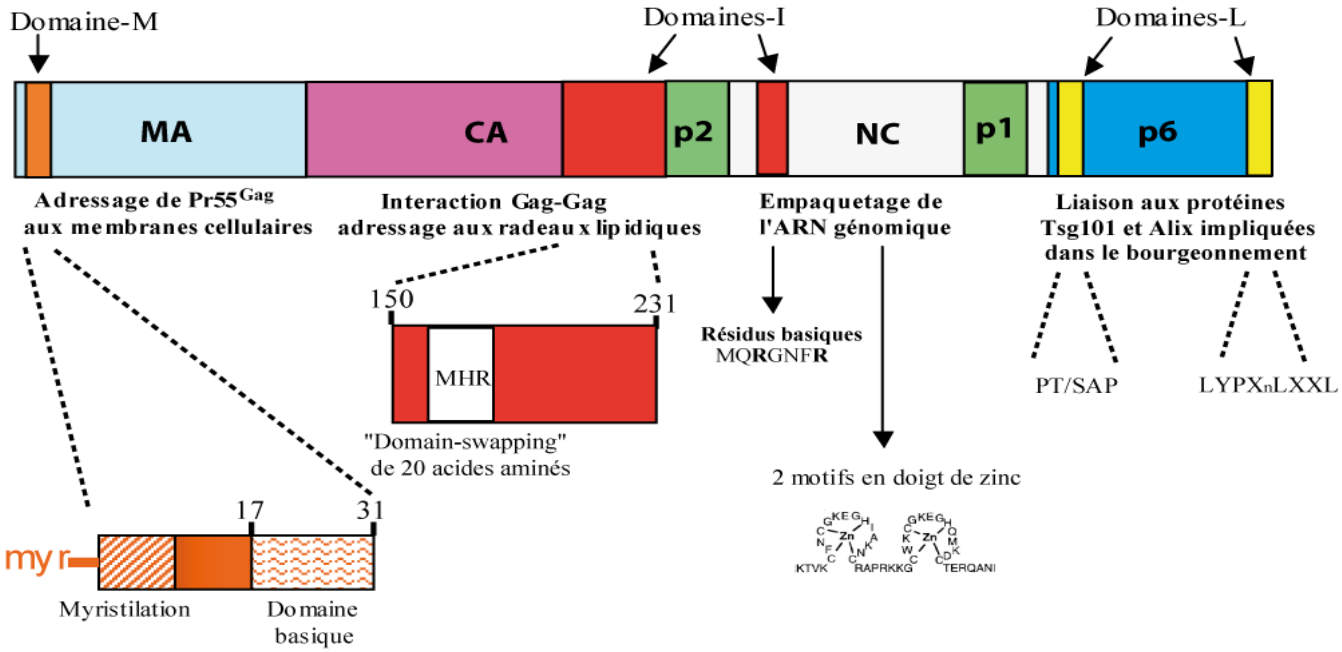


Figure 11. Représentation schématique de la structure du précurseur Pr55^{Gag}. Le précurseur Pr55^{Gag} contient trois types de domaines fonctionnels impliqués dans la morphogénèse virale: le domaine de liaison aux membranes cellulaires myristillé et riche en acides aminés basiques (M, en orange), les domaines d'interaction Gag-Gag et de liaison à l'ARN génomique présentant une région d'homologie MHR, des résidus basiques et deux motifs en doigt de zinc (I, en rouge), et enfin les domaines tardifs présentant deux motifs (PT/SAP et LYPXnLXXL) de liaison à des membres des complexes cellulaires ESCRTs, Tsg101 et Alix (L, en jaune).
[D'après Freed, 2001]

En effet, deux états de myristilation existent selon l'état d'oligomérisation et de maturation du précursseur $Pr55^{Gag}$: un état myristate exposé [myr(E)] et un état myristate séquestré [myr(S)]. Un $Pr55^{Gag}$ sous sa forme mature séquestre son groupement myristate dans une cavité préexistante hydrophobe située dans la tête globulaire, alors qu'un $Pr55^{Gag}$ sous sa forme oligomérisée expose son groupement myristate. Selon ce processus, l'exposition du groupement myristate serait ainsi déclenchée par l'oligomérisation du $Pr55^{Gag}$ lors de l'assemblage viral et inhibée par sa maturation protéolytique (Ono et al., 2000). Cette liaison membranaire du précurseur $Pr55^{Gag}$ est également régulée par des phénomènes de phosphorylation par des kinases cellulaires spécifiquement incorporées dans les virions des résidus sérine présents au niveau du site de myristilation et des autres domaines putatifs de liaison à la membrane de la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice (Bukrinskaya et al., 1996; Gallay et al., 1995).

Le domaine membranotropique arbore aussi en surface une série d'acide aminés basiques qui favorise l'établissement d'interactions électrostatiques avec les groupements phosphates chargés négativement des phospholipides membranaires (Ono and Freed, 1999), et notamment avec un phosphatidyl-inositol phosphate (PIP) présent au sein de la couche cytosolique de la membrane plasmique, le PI(4,5)P2 (Chukkapalli et al., 2008; Ono et al., 2004). Au même titre que l'oligomérisation du $Pr55^{Gag}$, l'interaction de la protéine de matrice avec ce facteur favoriserait l'exposition du groupement myristate (Saad et al., 2007).
La protéine de matrice interagit également avec d'autres partenaires cellulaires, comme les complexes d'adaptine AP-2 et AP-3, qui semblent être impliqués dans le trafic intracellulaire, l'assemblage des $Pr55^{Gag}$ et leur adressage aux diverses membranes cellulaires (Dong et al., 2005).

b.1.2. Les domaines I ou domaines d'interaction

Les domaines I sont localisés à l'extrémité C-terminale de la protéine de capside et à l'extrémité N-terminale de la nucléocapside **(Figure 11)**. Ces domaines sont impliqués dans de multiples fonctions comme la multimérisation du $Pr55^{Gag}$, la liaison du $Pr55^{Gag}$ à l'ARNg viral, la transcription inverse et la formation du complexe de pré-assemblage (Burniston et al., 1999; Cimarelli et al., 2000; Derdowski et al., 2004; Khorchid et al., 2002; Sandefur et al., 2000).

La multimérisation de Gag est un processus dont les étapes ne sont pas clairement établies. Cependant, la capside semble jouer un rôle majeur dans la cohésion mécanique des

virions et l'arrangement multimérique du $Pr55^{Gag}$. Son domaine C-terminal (CTD : résidus 150-231), qui contient une région d'homologie majeure de 20 acides aminés appelée MHR ("*Major Homology Region*" ou "*domain-swapping*"), permet la formation de dimères stables $Pr55^{Gag}$-$Pr55^{Gag}$ (Alfadhli et al., 2005; Ganser-Pornillos et al., 2008; Ivanov et al., 2007; Provitera et al., 2001). La nucléocapside qui contient dans sa partie N-terminale plusieurs acides aminés basiques chargés joue notamment un rôle dans l'interaction du $Pr55^{Gag}$ avec les molécules d'ARNg et leur incorporation dans les virions (Cimarelli et al., 2000). La nucléocapside présente également une structure globulaire centrale dite en "doigt de zinc", formée de deux boîtes cystéine-histidine (boîtes C-H), qui permet le recrutement et l'incorporation spécifique de l'ARNg dans les virions néoformés (Gorelick et al., 1990; Kanevsky et al., 2005; Lever, 2007; Levin et al., 2005; Ottmann et al., 1995). Dans certaines expériences où le gène *gag* a été délété de la région nucléocapside, un second domaine de liaison à l'ARN localisé au niveau de la protéine de matrice s'est révélé être utilisé pour la multimérisation de Gag (Ott et al., 2005). Ces observations suggèrent donc que les interactions des ARNg avec le $Pr55^{Gag}$ interviennent dans la multimérisation de ce dernier (Alfadhli et al., 2005; Cimarelli et al., 2000).

b.1.3. Les domaines L ou domaines tardifs

Les domaines L, localisés à l'extrémité C-terminale du $Pr55^{Gag}$ au niveau de la protéine p6, jouent un rôle important lors des phases tardives de bourgeonnement et de relargage des virions néoformés (Bieniasz, 2006) **(Figure 11)**. Le premier domaine L identifié chez le VIH-1 correspond à un motif conservé de type PT/SAP localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine p6 (Gottlinger et al., 1991). Ce motif, en interagissant avec un membre des complexes cellulaires ESCRTs ("*Endosomal Sorting Complexe Required for Transport*") impliqués dans la machinerie de sortie des protéines endosomales, la protéine Tsg101 ("*Tumor susceptibility gene 101*"), participe au relargage des particules virales (Garrus et al., 2001). Un second domaine L ($LYPX_nLXXL$ avec n = 1-3), localisé dans la partie C-terminale de la protéine p6, a été identifié comme capable d'interagir avec une autre protéine cellulaire associée à la machinerie ESCRTs, la protéine Alix (Dussupt et al., 2009; Fisher et al., 2007; Munshi et al., 2007; Strack et al., 2003).

b.2. Implication de la machinerie ESCRTs dans le bourgeonnement viral

De récents travaux ont mis en évidence l'existence de similitudes inattendues entre le bourgeonnement du VIH-1 et le bourgeonnement vésiculaire observé dans les corps multivésiculaires (MVB, "*Multivesicular Bodies*") retrouvés dans les compartiments endosomaux tardifs. En effet, dans les deux cas, le bourgeonnement est orienté du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers une vacuole intracellulaire, et il met en œuvre des dérivés de l'inositol ou des protéines spécifiques, telles que l'ubiquitine ou la protéine Tsg101, qui sont impliquées dans le tri des protéines membranaires à destination des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB (Bieniasz, 2009; Carlton and Martin-Serrano, 2009; Freed, 2003; Martin-Serrano et al., 2003).

Les complexes ESCRTs sont connus pour leur rôle dans la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB et surtout, pour leur fonction essentielle dans la voie de dégradation lysosomale des protéines membranaires ubiquitinylées adressées à ces vésicules (Gruenberg and Stenmark, 2004; Katzmann et al., 2002; Raiborg et al., 2003). La fusion des MVB avec la membrane plasmique peut cependant permettre le relargage de ces vésicules dans le milieu extracellulaire sous forme d'"exosomes" (Fevrier and Raposo, 2004).

b.2.1. Fonctionnement des complexes ESCRTs

Les complexes ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III sont des complexes multiprotéiques qui agissent séquentiellement dans la reconnaissance des protéines cargo ubiquitinylées et la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB (Haglund et al., 2003; Hicke and Dunn, 2003; Katzmann et al., 2002; Raiborg et al., 2003) **(Figure 12)**.

La première étape de reconnaissance de la protéine cargo au niveau de la membrane des endosomes dépend principalement de leur mono-ubiquitinylation et implique un complexe protéique cytosolique Hrs/TRAM composé de deux protéines capables de lier l'ubiquitine. Une interaction du complexe Hrs/TRAM avec le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) présent au niveau des endosomes facilite ensuite le recrutement des complexes ESCRTs à leur membrane (Bache et al., 2003a; Shih et al., 2002). Ainsi, le complexe ESCRT-I est recruté et activé à la membrane endosomale suite à une interaction du domaine PT/SXP de la protéine Hrs avec le domaine d'interaction de l'ubiquitine de la protéine Tsg101 (Bache et al., 2003b; Lu et al., 2003; Usami et al., 2009).

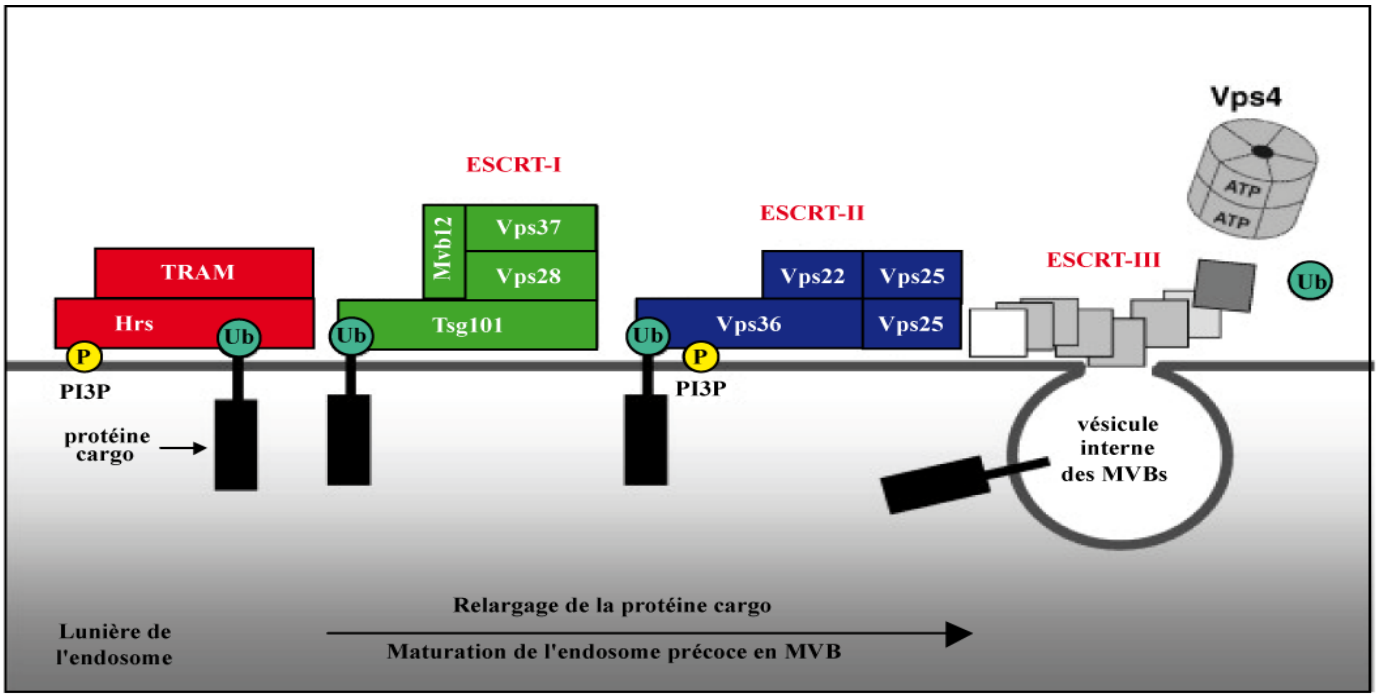


Figure 12. Modèle de recrutement séquentiel des complexes ESCRTs impliqués dans le bourgeonnement vésiculaire observé dans les corps multivésiculaires (MVB) des compartiments endosomaux tardifs. Le recrutement des complexes ESCRTs à la membrane endosomale est initié par une reconnaissance de la protéine cargo ubiquitinylée par un complexe Hrs/TRAM. Ensuite, un recrutement séquentiel des complexes ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III a lieu pour assurer l'adressage de la protéine cargo au niveau de microdomaines enrichis en clathrine. L'ESCRT-III, dès son arrivée à la membrane endosomale, s'assemble sous forme d'un complexe hétéromultimérique. Ce complexe participe alors à l'invagination des membranes endosomales nécessaire à la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVBs acccueillant les protéines cargo à relarguer. Enfin, l'ATPase Vps4 catalyse la dissociation ATP-dépendante du complexe ESCRT-III nécessaire au bourgeonnement des vésicules dans la lumière des endosomes.

Après liaison de la protéine cargo au complexe ESCRT-I, les complexe ESCRT-II, puis ESCRT-III, sont alors recrutés à la membrane endosomale (Gill et al., 2007). Lors de son arrivée à la membrane endosomale, l'ESCRT-III s'assemble sous forme d'un complexe hétéromultimérique de haut poids moléculaire et participe à l'invagination des membranes endosomales nécessaire à la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB qui vont accueillir les protéines cargo à relarguer (Babst et al., 2002). Pour finir, l'ATPase Vps4 catalyse la dissociation ATP-dépendante du complexe ESCRT-III qui est nécessaire au bourgeonnement (Hurley, 2008; Williams and Urbe, 2007).

De plus, d'autres facteurs accessoires sembleraient impliqués dans la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB, l'adressage des protéines cargo à ces vésicules et, enfin, le relargage de ces vésicules dans la lumière des endosomes. Le complexe protéique cytosolique Alix capable d'interagir directement avec les complexes ESCRT-I, *via* un motif PT/SXP, et avec les complexes ESCRT-III (Odorizzi, 2006) participerait notamment à la formation des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB en stimulant l'invagination de la membrane endosomale (Hurley and Emr, 2006; Katzmann et al., 2002; Slagsvold et al., 2006). Alix permettrait également le recrutement de l'enzyme Doa4 impliquée dans la désubiquitinylation de la protéine cargo accumulée dans les vésicules internes des endosomes tardifs/MVB (Luhtala and Odorizzi, 2004).

b.2.2. Exploitation de la machinerie ESCRTs par le VIH-1

Le relargage du VIH-1 est dépendant des domaines L du $Pr55^{Gag}$ qui sont capables de recruter les complexes ESCRTs. Le VIH-1 est porteur d'un tetrapeptide de type PT/SAP qui est capable de mimer celui de la protéine Hrs et de recruter la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I à la membrane (Martin-Serrano et al., 2003; VerPlank et al., 2001; von Schwedler et al., 2003) **(Figure 13)**.

De plus, le facteur cellulaire Alix, via son interaction avec le motif YPX_nLXXL de la protéine p6 du $Pr55^{Gag}$, recruterait directement l'ESCRT-III, mais aussi l'ATPase Vps4 (Fisher et al., 2007) et jouerait un rôle dans l'assemblage du VIH-1 (Munshi et al., 2007; Strack et al., 2003). Ces deux domaines L pourraient agir en synergie optimisant ainsi le recrutement des complexes ESCRTs et de l'ATPase Vps4 qui sont essentiels au bourgeonnement du VIH-1 (Bowers et al., 2006; Garrus et al., 2001; Strack et al., 2003). Par contre, dans le cas du VIH-1, le complexe ESCRT-II ne semble pas indispensable pour ce processus (Bowers et al., 2006).

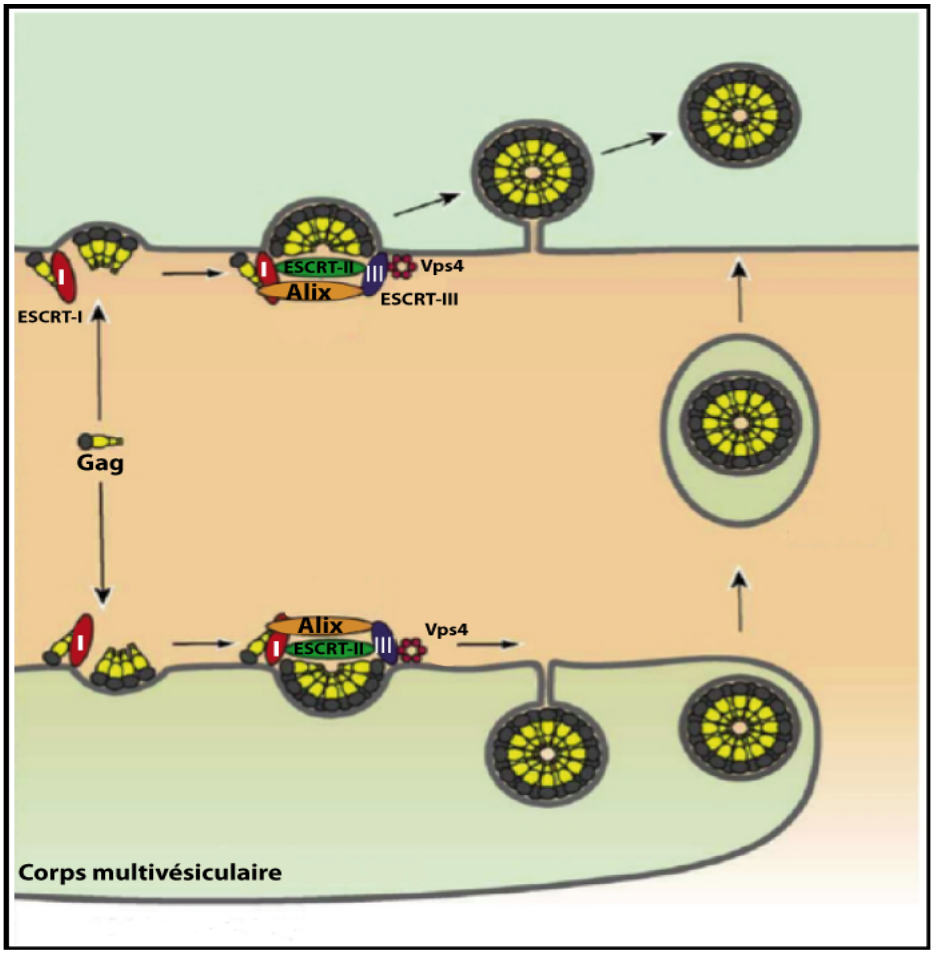


Figure 13. Modèle supposé de relargage du VIH-1 de la cellule infectée. Les polyprotéines virales Gag ubiquitinylées recruteraient les complexes ESRCTs *via* les domaines tardifs (L) présents dans leur domaine p6 et formeraient potentiellement un complexe ternaire par interaction avec le complexe ESCRT-I et la protéine Alix. Ce complexe ternaire permettrait alors le recrutement des complexes ESCRT-III et de l'ATPase Vps4 essentiels à l'invagination des membranes endosomales et à la séquestration dans les vésicules internes des protéines cargo. Ainsi, la fusion de ces vésicules internes à la membrane plasmique permettrait le relargage de la particule virale néoformée de la cellule infectée.
[D'après Demirov & Freed, 2004]

Au regard du rôle essentiel de l'ubiquitine dans l'adressage des protéines cargo aux vésicules internes des endosomes tardifs/MVB, beaucoup de travaux ont cherché à élucider le rôle de cette molécule dans le bourgeonnement viral. La liaison du $Pr55^{Gag}$ avec la protéine Tsg101 de l'ESCRT-I dépendrait donc également de son ubiquitinylation (Gottwein et al., 2006; Gottwein and Krausslich, 2005). En exploitant la machinerie ESCRTs, les particules virales accumulées dans les vésicules internes des endosomes tardifs/MVB pourraient ainsi être libérées dans le milieu extracellulaire.

b.3. Le site d'assemblage et de bourgeonnement viral

La localisation du site d'assemblage et de bourgeonnement viral a fait l'objet d'investigations importantes ces dernières années dans différents modèles cellulaires. Il était classiquement décrit que l'assemblage et le bourgeonnement du VIH-1 s'effectuait à la membrane plasmique, ce processus reposant sur la capacité du $Pr55^{Gag}$ myristillé à s'associer au feuillet interne de cette membrane et à s'y oligomériser pour induire le bourgeonnement de nouveaux virions vers l'extérieur de la cellule (Campbell et al., 2001; Jouvenet et al., 2006; Ono and Freed, 2001; Ono and Freed, 2004; Ono et al., 2007; Welsch et al., 2007). Différentes études ont d'ailleurs montré que cet assemblage et ce bourgeonnement viral étaient localisés spécifiquement au sein de microdomaines membranaires particuliers. Certaines de ces études ont suggéré qu'il s'agissait de microdomaines résistants au traitement par des détergents, appelés DRMs ("Detergent-Resistant Microdomains"). Ces DRMs constitueraient des zones où convergeraient les radeaux lipidiques riches en sphingolipides, cholestérol, protéines kinases de la famille SRC et en protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Bhattacharya et al., 2006; Graham et al., 2003; Hermida-Matsumoto and Resh, 2000; Laude and Prior, 2004). Ils serviraient de plate-formes de concentration et d'interaction au $Pr55^{Gag}$ myristillé (Nguyen and Hildreth, 2000) et aux complexes glycoprotéiques d'enveloppe palmitoylés au niveau de deux résidus cystéine du domaine cytoplasmique de la TMgp41 (Rousso et al., 2000) pour permettre la formation de virions complets (Ono et al., 2007). D'autres travaux ont également montré que les microdomaines où s'effectuait le bourgeonnement viral étaient riches en tétraspanines (Deneka et al., 2007; Grigorov et al., 2009; Jolly and Sattentau, 2007; Nydegger et al., 2006). La composition de l'enveloppe virale, qui contient de grandes quantités de cholestérol, de protéines ancrées au GPI et de tétraspanines, semble corroborer un tel bourgeonnement au sein de ces domaines (Brugger et al., 2006; Graham et al., 2003).

La mise en évidence de similitudes entre le bourgeonnement du VIH-1 et celui des vésicules internes des endosomes tardifs/MVB a également contribué au regain d'intérêt observé ces dernières années pour localiser le site d'assemblage et de bourgeonnement du VIH-1 (Martin-Serrano et al., 2003; von Schwedler et al., 2003). Les macrophages, chez lesquels un bourgeonnement et une accumulation de particules virales ont été observés de manière prédominante dans des compartiments vacuolaires intracytoplasmiques (Gendelman et al., 1988; Jouve et al., 2007; Orenstein et al., 1988), ont ainsi fait l'objet d'intenses investigations visant à identifier la nature de ces compartiments (Carter and Ehrlich, 2008 ; Chertova et al., 2006; Nermut et al., 2003; Ono and Freed, 2004). Les premières études réalisées ont suggéré qu'il s'agissait de vacuoles contenant des marqueurs (molécules du CMH de classe II, CD63) caractéristiques des compartiments endosomaux tardifs/MVB, et notamment des compartiments du CMH de classe II (Pelchen-Matthews et al., 2003; Perlman and Resh, 2006; Raposo et al., 2002). La composition de l'enveloppe des virions produits en macrophages, qui contient de grandes quantités de molécules CMH de classe II et de CD63, semblait corroborer un bourgeonnement au sein de ces compartiments. Cependant, l'accumulation de particules virales dans un compartiment intracellulaire pose le problème du mécanisme de relargage de virions libres dans l'environnement extracellulaire. L'existence d'un phénomène d'exocytose a été évoquée après avoir observé la fusion de compartiments contenant des particules virales avec la membrane plasmique (Gould et al., 2003; Nguyen et al., 2003).

Des éléments nouveaux concernant la biogenèse de la particule virale ont ensuite été mis en évidence dans des lignées cellulaires classiques. Ainsi, il a été montré dans les cellules HeLa et Jurkat (lignée lymphocytaire) que des mutations dans le domaine basique de la matrice virale pouvaient entraîner un ciblage du $Pr55^{Gag}$ vers les MVB au lieu de la membrane plasmique. Ces mutations sont sans effet sur le ciblage du $Pr55^{Gag}$ vers les MVB chez les macrophages. Par ailleurs, le ciblage de mutants Gag vers les MVB n'est pas modifié par une délétion du domaine tardif du $Pr55^{Gag}$ (Saad et al., 2007). Ces résultats tendent à confirmer l'existence de deux voies alternatives de ciblage du $Pr55^{Gag}$ mettant en œuvre des partenaires cellulaires différents dans les MVB et à la membrane plasmique. D'autres études menées notamment sur des cellules 293T laissent supposer que la voie endosomale pourrait jouer un rôle dans ces cellules pourtant initialement décrites comme étant le siège d'un bourgeonnement à la membrane plasmique. Ces études basées en partie sur des analyses en microscopie confocale ou électronique montrent que les polyprotéines Gag et les complexes glycoprotéiques d'enveloppe "colocalisent" préférentiellement dans les voies d'endocytose et,

en particulier, dans les endosomes tardifs/MVB comme cela a pu être observé chez les macrophages (Gousset et al., 2008; Sandrin et al., 2004; Sherer et al., 2003). Dans les lignées cellulaires classiques, la capacité du $Pr55^{Gag}$ à interagir avec les complexes d'adaptine AP-3 impliqués dans son transport du réseau trans-Golgien vers les endosomes tardifs suggèrerait notamment qu'une partie de l'assemblage virale puisse se produire dans les endosomes tardifs/MVBs (Dong et al., 2005; Lindwasser and Resh, 2004; Perlman and Resh, 2006; Sandrin et al., 2004; Sherer et al., 2003). De la même façon, les complexes d'adaptine AP-1, en intéragissant avec la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice seraient impliqués dans le transport du $Pr55^{Gag}$ aux sites de bourgeonnement viral et faciliteraient le recrutement des membres de la machinerie ESCRTs responsables du relargage viral (Camus et al., 2007). A l'inverse, une interaction du $Pr55^{Gag}$ avec les complexes d'adaptine AP-2 aurait été identifiée comme impliquée dans l'internalisation du VIH-1 de la membrane plasmique vers les compartiments endosomaux et dans une régulation négative du relargage des particules virales (Batonick et al., 2005). Les mécanismes en cause dans les différents modèles cellulaires restent donc à définir avec plus de précision.

Des travaux très récents viennent à nouveau de relancer la discussion sur le rôle de la voie endosomale dans le bourgeonnement viral pour revenir à la notion classique d'un assemblage et d'un bourgeonnement à la membrane plasmique dans différents types cellulaires incluant les macrophages (Jouvenet et al., 2006). Il a notamment été montré que le $Pr55^{Gag}$ était localisé préférentiellement à la membrane plasmique à un stade précoce de son expression et que l'inhibition des mouvements endosomaux n'affectait pas la libération des virions. Deux études portant exclusivement sur les macrophages semblent corroborer ces résultats (Deneka et al., 2007; Welsch et al., 2007).

A ce jour, il existe donc des avis divergents sur le site d'assemblage et de bourgeonnement viral. Il semble cependant que les deux voies d'assemblage et de bourgeonnement viral puissent coexister mais que l'utilisation préférentielle de l'une ou l'autre varie entre les cellules infectées de façon aiguë ou chronique. En effet, dans les cellules chroniquement infectées, l'assemblage du VIH-1 au niveau des compartiments intracellulaires semble d'ailleurs permettre l'établissement de réservoirs *in vivo* permettant un échappement au système immunitaire (Adamson and Freed, 2007; Corbin et al., 2008; Grigorov et al., 2006).

c. Processus de maturation virale

Initialement, les particules virales sont relarguées de la cellule infectée sous une forme immature. Il se produit donc un processus de maturation protéolytique du $Pr55^{Gag}$ qui s'effectue au niveau de particules virales bourgeonnantes ou relarguées dans le milieu extracellulaire (Gross et al., 2000; Shehu-Xhilaga et al., 2001; Wiegers et al., 1998). Cette étape est essentielle à l'acquisition du pouvoir infectieux de la particule virale (Chen et al., 2004; Pettit et al., 2005).

Cette étape de maturation virale consiste en un clivage protéolytique des divers précurseurs $Pr55^{Gag}$ et $Pr^{Gag-Pol}$ permettant la génération des diverses protéines structurales et enzymatiques virales. Ce processus dépend de la protéase virale qui est active sous sa forme homodimèrique. Ainsi, le dimère de $Pr^{Gag-Pol}$, formé durant l'assemblage, doit dans un premier temps s'autocliver pour libérer une protéase dimérique mature (Chen et al., 2004; Pettit et al., 2004). La protéase a la capacité de reconnaître sur un même $Pr55^{Gag}$ plusieurs sites de clivage avec une efficacité différente, ce qui va permettre une maturation protéolytique séquentielle du $Pr55^{Gag}$ dans un ordre bien précis (Gross et al., 2000; Krausslich et al., 1995; Mirambeau et al., 2007; Shehu-Xhilaga et al., 2001; Wiegers et al., 1998) **(Figure 14)**. Après le clivage intramoléculaire initial de la polyprotéine Gag par la protéase localisée en *cis* (Pettit et al., 1994), la protéase libère la nucléocapside, qui va former avec l'ARN viral, le complexe nucléoprotéique central du virion. La protéase sépare ensuite la matrice de la capside qui vont alors, pour la première, tapisser l'intérieur de la bicouche lipidique et, pour la seconde, former la capside conique qui protège l'ARNg. Enfin, la maturation du virion s'achève lorsque la protéase catalyse le clivage des peptides situés aux extrémités de la capside et de la nucléocapside (p1 et p2). La dernière étape de clivage entre la protéine capside et le peptide p1 aboutit à une condensation de la nucléocapside et de l'ARNg (Gross et al., 2000; Krausslich et al., 1995) et à l'apparition d'une structure conique centrale dense aux électrons en microscopie électronique (Wilk and Fuller, 1999).

A l'issue de cette phase de maturation, le virion sera en état d'infecter une nouvelle cellule cible. Le mode de dissémination des virions, qui a fait l'objet de nombreuses investigations ces dernières années, est discuté en détail dans le chapitre suivant.

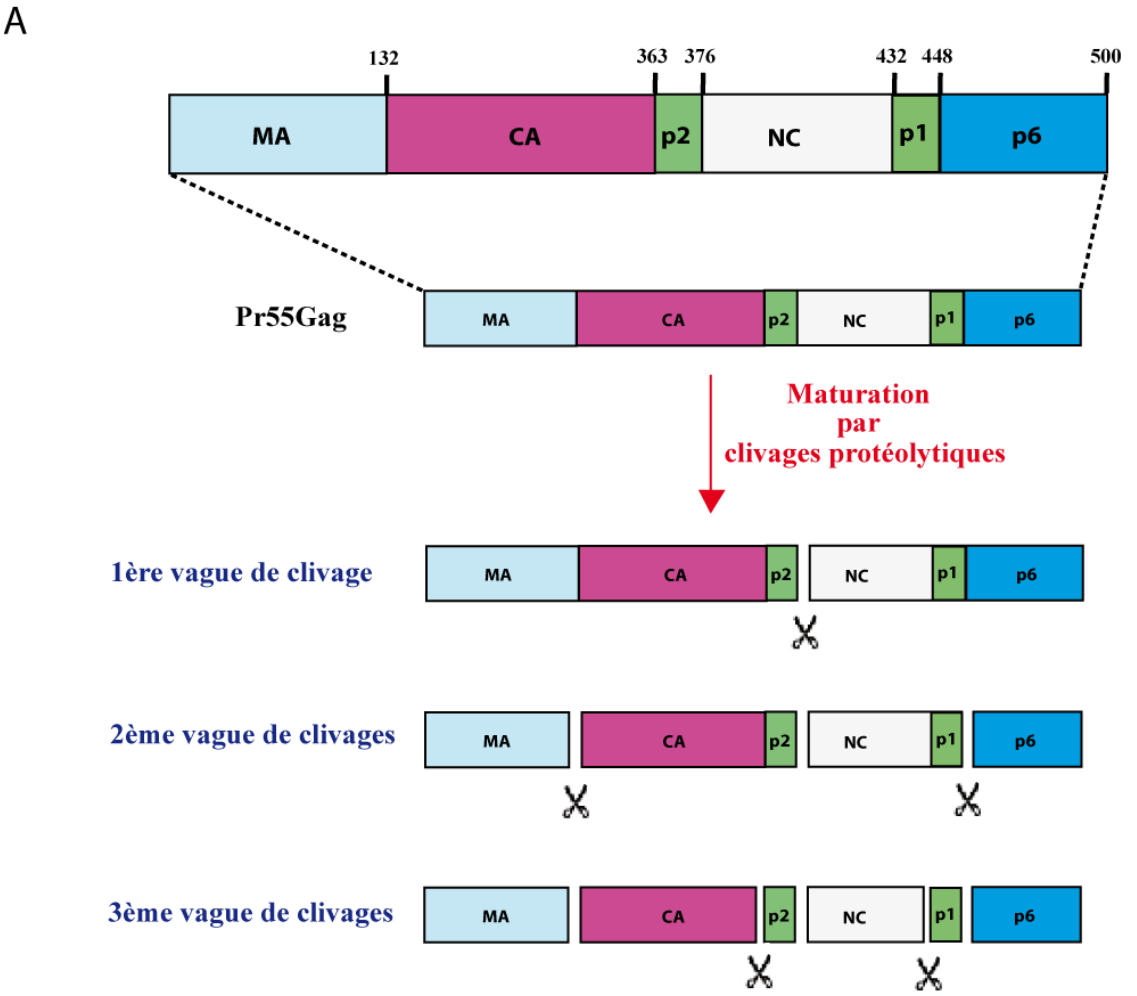


Figure 14. Processus de maturation virale. (A) Maturation protéolytique séquentielle du précurseur Pr55Gag du VIH-1. Ce processus de maturation s'effectuent selon trois vagues successives de clivages protéolytiques assurées par la protéase virale. Une première vague de clivage vise à libérer la nucléocapside qui, avec l'ARN viral, va former le complexe nucléoprotéique central du virion. La seconde vague de clivages permet la libération de la protéine de matrice qui va alors tapisser l'interieur de l'enveloppe virale, mais aussi de la protéine de capside qui va former la capside conique protégeant l'ARN viral. Enfin la troisième vague de clivages aboutit à la libération des deux peptides p1 et p2 et à la condensation de la nucléocapside et de l'ARn génomique. Toutes ces étapes de clivage confèrent à la particule virale ses propriétés infectieuses. **(B) Représentation schématique de particules virales immature (gauche) et mature (droite).**

Chapitre 2 : Dissémination du VIH-1 par transfert direct de cellule à cellule

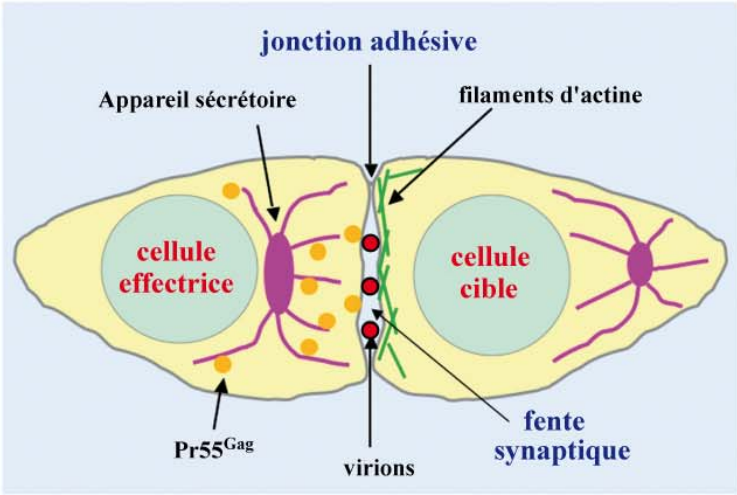
La transmission des virions entre cellules cibles *via* le milieu extracellulaire a longtemps été considérée comme le principal mécanisme de dissémination du VIH-1. Les travaux réalisés ces dernières années ont cependant montré que la transmission directe de cellule à cellule jouait un rôle essentiel dans cette dissémination virale. La propagation du VIH-1 se ferait ainsi préférentiellement *via* un transfert direct de cellule à cellule, au niveau de jonctions intercellulaires transitoires, selon un mécanisme dit de "synapse virologique" (SV) (Hubner et al., 2009; Sattentau, 2008). Ce mode particulier de dissémination virale a été initialement observé en 2003 pour l'HTLV-1, un rétrovirus humain présentant la caractéristique d'être très rarement retrouvé à l'extérieur des cellules qu'il infecte (Bangham, 2003; Igakura et al., 2003). La possibilité d'une transmission directe de cellule à cellule a ensuite été montrée pour d'autres virus enveloppés parmi lesquels se trouve donc le VIH-1 (Johnson and Huber, 2002; Jolly and Sattentau, 2004; Marsh and Helenius, 2006; Sherer et al., 2007).

I. Processus d'établissement de la "synapse virologique"

La SV est une structure supramoléculaire transitoire, analogue à la "synapse immunitaire" (Dustin, 2009). Elle s'établit à une zone de contact entre une cellule infectée par le VIH-1 et une ou plusieurs cellules naïves pour permettre la dissémination du virus **(Figure 15A)**. La formation de cette structure adhésive se caractérise par un recrutement polarisé, sous l'action du cytosquelette, des récepteurs viraux (récepteur CD4 et corécepteurs CXCR4/CCR5) et de molécules d'adhésion à la surface de la cellule cible non-infectée (Jolly et al., 2004), mais aussi par une redistribution dynamique polarisée des composants viraux (Env et $Pr55^{Gag}$ oligomérisés) et de diverses molécules d'adhésion à la surface des cellules infectées (Hubner et al., 2009; Jolly et al., 2004; Jolly and Sattentau, 2004; Piguet and Sattentau, 2004).

Ainsi, cette zone de contact infectieux constitue une véritable plate-forme d'assemblage et de bourgeonnement du virus où est concentré de façon polarisée l'ensemble des protéines virales et cellulaires impliquées dans ce processus (Jolly and Sattentau, 2004; Jolly and Sattentau, 2005). Pour assurer cette phase de dissémination, le VIH-1 va détourner la machinerie cellulaire de façon à orienter son assemblage et son bourgeonnement au sein de la cellule infectée, qui ne présentent pas de polarité constitutive, vers une cellule cible naïve exprimant les récepteurs viraux.

A



B

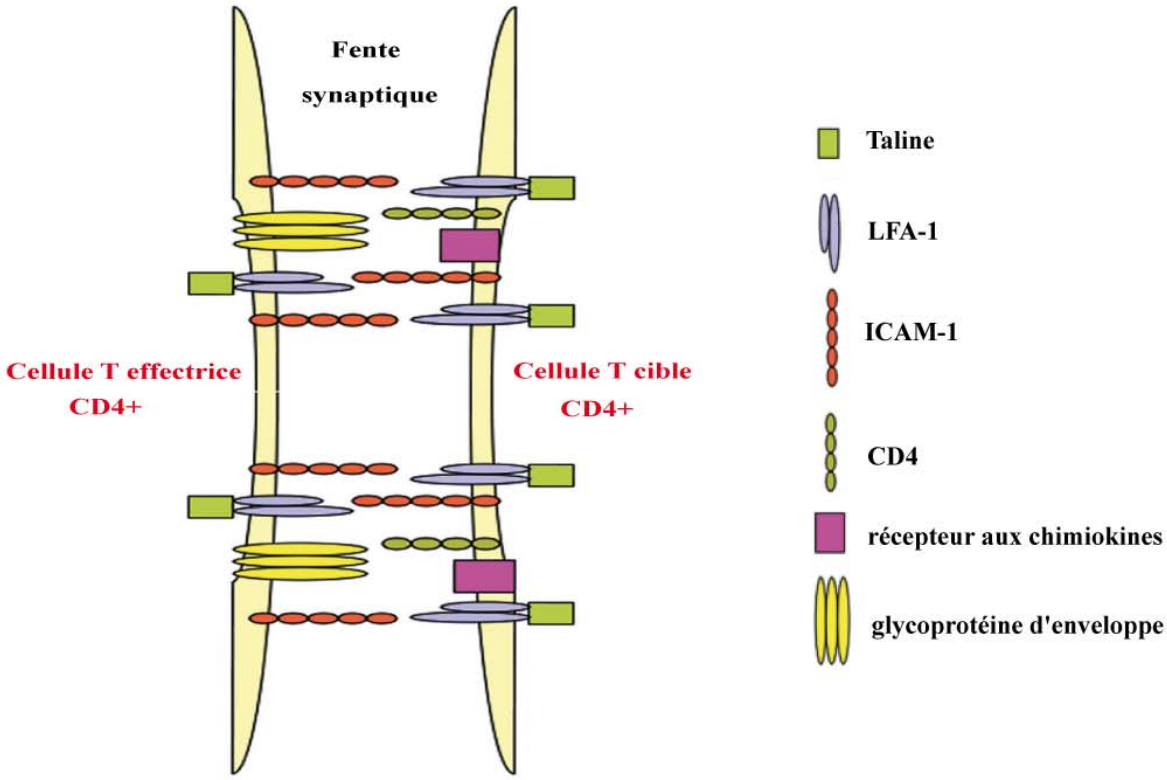


Figure 15. Dissémination du VIH-1 par transfert direct de cellule à cellule selon un mécanisme dit de "synapse virologique". (A) Représentation schématique de la jonction adhésive s'établissant entre une cellule infectée par le VIH-1 et une ou plusieurs cellules naïves pour assurer la dissémination du virus. Cette zone de contact infectieux constitue une véritable plate-forme d'assemblage et de bourgeonnement du virus. **(B) Représentation schématique non exhaustive des interactions moléculaires intervenant dans l'établissement de la synapse virologique.** La formation de cette jonction adhésive est initiée par l'interaction entre les Env du VIH-1 relocalisées au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée et les récepteurs cellulaires CD4 exprimés en surface de la cellule cible naïve. Cette première liaison est ensuite consolidée par un certain nombre d'interactions mettant en oeuvre diverses molécules d'adhésion cellulaires (LFA-1 et ICAM-I par exemple) exprimées en surface des cellules impliquées dans ce contact.
[D'après Jolly & Sattentau, 2004]

A. Processus d'adhésion intercellulaire

De récentes approches par vidéo microscopie 3D ont permis d'accroître nos connaissances sur le sujet, et notamment de définir l'ordre des événements prenant place lors du transfert direct viral (Hubner et al., 2009). L'établissement de la SV est notamment régulé par un certain nombre de processus d'adhésion cellulaire qui mettent en œuvre à la fois des facteurs viraux comme les Env, des facteurs cellulaires tels que les intégrines qui sont des molécules d'adhésion cellulaires (Jolly et al., 2007), l'actine et la tubuline qui sont des protéines dynamiques du cytosquelette cellulaire, et de nombreux signaux cellulaires (Sol-Foulon et al., 2007).

La formation de la SV est, dans un premier temps, initiée par un phénomène de reconnaissance et d'interaction entre les Env du VIH-1 relocalisées au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée et les récepteurs cellulaires CD4 exprimés à la surface de la cellule cible non-infectée (Bosch et al., 2005; Chen et al., 2007; Jolly et al., 2004) **(Figure 15B)**. Un ensemble d'expériences menées avec des clones viraux délétés du gène *env* ont d'ailleurs montré que les Env et le CD4 étaient nécessaires et suffisants à l'établissement de ces contacts intercellulaires. De plus, l'établissement de ces jonctions intercellulaires est inhibé par l'usage d'anticorps dirigés contre la SUgp120 (IgG1b12) (Clotet-Codina et al., 2009). Des études récentes sont cependant à l'origine d'une controverse en rapportant l'existence possible de mécanismes Env-indépendants de transfert direct de virus de cellule à cellule (Gousset et al., 2008; Izquierdo-Useros et al., 2009). Contrairement au processus de propagation du VIH-1 *via* des virions libres, le transfert direct du virus de cellule à cellule parait également corécepteur-indépendant (Blanco et al., 2004; Bosch et al., 2005; Chen et al., 2007; Ruggiero et al., 2008).

Cette première liaison cellule-cellule est ensuite consolidée par un certain nombre d'interactions mettant en œuvre diverses molécules d'adhésion cellulaires présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules impliquées dans l'établissement de la SV **(Figure 15B)**. Les molécules d'adhésion LFA-1, ICAM-I, ICAM-II, ICAM-III (Jolly et al., 2004), et DC-SIGN (Arrighi et al., 2004b; Burleigh et al., 2006; Groot et al., 2006; Nobile et al., 2005) ont ainsi été décrites comme étant impliquées dans ces interactions connectives robustes qui contribueraient à la stabilité de la jonction intercellulaire (Jolly and Sattentau, 2007). Une fois cette jonction établie, les molécules d'adhésion cellulaires telles que l'ICAM-I donnent le signal à la cellule infectée de polariser au niveau de cette zone de contact leur appareil

sécrétoire notamment représenté par le centrosome, le centre organisateur des microtubules, pour assurer le ciblage de l'assemblage et du bourgeonnement viral (Barnard et al., 2005).

Cette forte interaction cellule-cellule induit ensuite un rapide recrutement actine et tubuline-dépendant des diverses protéines virales et cellulaires à la zone de contact (Chen et al., 2007; Jolly et al., 2004; Jolly et al., 2007; McDonald et al., 2003; Rudnicka et al., 2009). Ainsi, le mouvement dynamique du cytosquelette favoriserait la formation de la SV. L'établissement de ce contact intercellulaire conduit à la polarisation des Env (Jolly and Sattentau, 2004), puis du $Pr55^{Gag}$ (Hubner et al., 2009) au niveau de cette zone de contact. La polymérisation du $Pr55^{Gag}$ avait été initialement décrite au niveau de la SV (Fais et al., 1995), mais une étude récente a montré que les polymères de $Pr55^{Gag}$ sont formés dans des régions de la membrane plasmique avoisinant la zone de contact avant d'être recrutés à la SV, ceci menant à l'apparition d'une zone membranaire de déplétion en $Pr55^{Gag}$ autour de la jonction intercellulaire (Hubner et al., 2009).

B. Site de formation de la "synapse virologique"

Ces zones de jonction intercellulaire s'établissent au niveau de microdomaines membranaires de la cellule infectée où convergent les radeaux lipidiques riches en cholestérol, en sphingomyéline et en gangliosides GM-1 (Jolly and Sattentau, 2007). Ces radeaux contiennent aussi des protéines spécifiques comme les tétraspanines (CD63 et CD81) (Garcia et al., 2005). L'intégrité de ces domaines a été montrée comme étant essentielle à l'assemblage et au bourgeonnement de nouveaux virions infectieux au niveau de la SV (Jolly and Sattentau, 2005).

Les SV peuvent prendre des aspects plus complexes qui se caractérisent par des centralisations et des transferts de virus simultanés au niveau de multiples régions de la membrane plasmique de la cellule infectée pour amplifier le phénomène de dissémination virale. On parle alors de "polysynapses" qui mettent en jeu plusieurs phénomènes de jonction intercellulaire entre une cellule infectée et de multiples cellules adjacentes cibles non-infectées (Rudnicka et al., 2009) **(Figure 16)**.

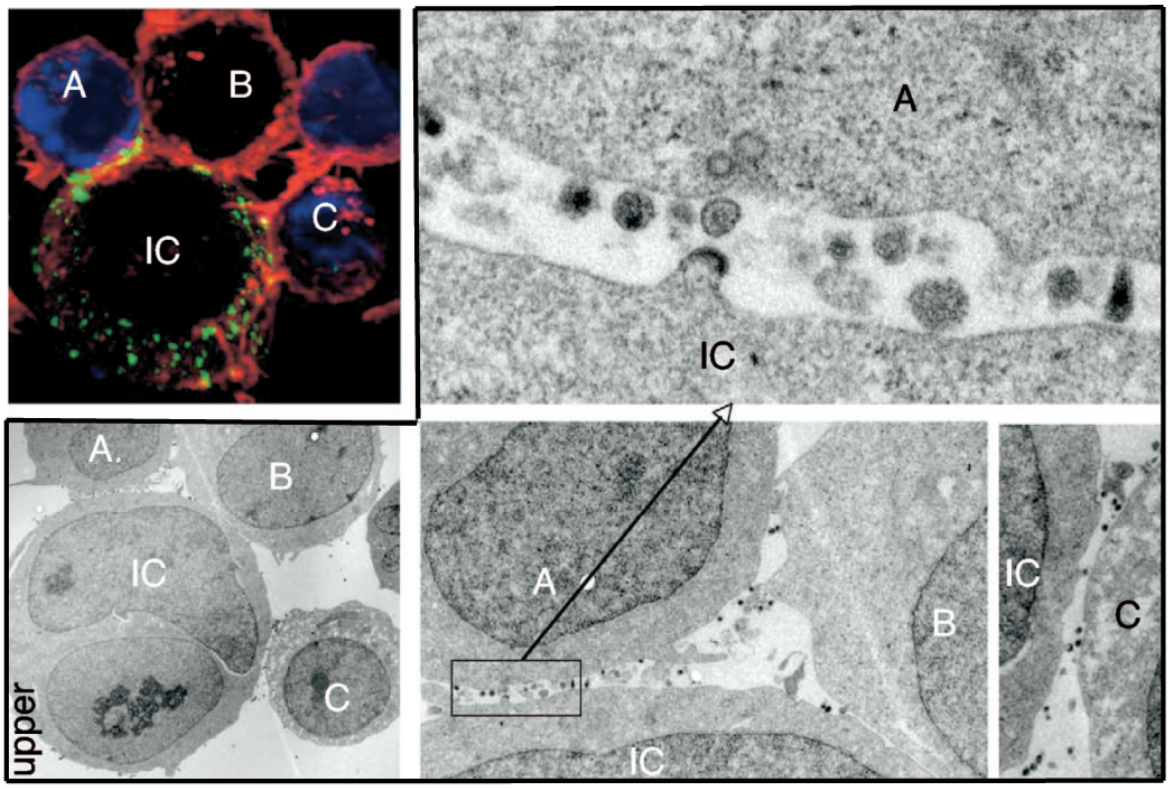
Bien que la SV soit la principale voie de transmission du VIH-1 (Sherer and Mothes, 2008), d'autres types de contacts intercellulaires nettement plus sophistiqués peuvent s'établir pour assurer un transfert viral direct : les filopodes ou nanotubes (Eugenin et al., 2009; Hope, 2007; Sherer et al., 2007; Sowinski et al., 2008) **(Figure 16)**. Ces structures allongées

d'actine, au bout desquelles s'établissent des zones d'adhésion cellulaire, résultent d'un fort remaniement du cytosquelette cellulaire, commandé par le virus. Ces structures présentent la capacité d'assurer rapidement un transport rétrograde actine-dépendant des diverses protéines virales synthétisées au niveau du site de jonction intercellulaire pour assurer la transmission des virions à une cellule non infectée distante de plusieurs centaines de micromètres (300µm) (Gerdes et al., 2007; Sowinski et al., 2008).

II. Mécanisme de transfert direct du VIH-1 au niveau de la "synapse virologique"

De nombreuses expériences de microscopie électronique ont montré que les particules virales néoformées au niveau de la SV bourgeonnaient ensuite dans la fente synaptique (Jolly et al., 2004; Jolly and Sattentau, 2004; Rudnicka et al., 2009) **(Figure 16)**. Cependant, plusieurs aspects de ce processus de transfert viral direct restent à élucider. Trois mécanismes de transfert viral au niveau de la SV peuvent être proposés. Une fusion directe des membranes cellulaires aboutissant à la translocation du core viral dans la cellule cible pourrait être possible. Cependant, aucune observation évidente de ce phénomène de transfert viral direct n'a été faite à ce jour. L'entrée des virus relargués dans la fente synaptique par fusion (Jolly et al., 2004) ou par un processus d'endocytose paraît plus probable. Enfin, un processus d'entrée d'agrégats de virus par la seule voie d'endocytose de la cellule cible dans des compartiments trypsine-résistants a également été décrit (Bosch et al., 2005; Hubner et al., 2009; Ruggiero et al., 2008). Bien qu'il ait été largement rapporté que ce mode d'entrée par endocytose soit responsable de l'établissement d'infections modestement productives (Daecke et al., 2005; Fackler and Peterlin, 2000; Fredericksen et al., 2002; Schaeffer et al., 2004; Wei et al., 2005), le VIH-1 semble pouvoir l'utiliser pour se disséminer efficacement (Bosch et al., 2008). Le VIH-1, normalement sensible au pH acide et aux protéases présentes dans ces compartiments, serait donc capable de modifier le milieu hostile dans lequel il se trouve et de créer un environnement favorable à son échappement à la voie de dégradation endocytique et, de ce fait, à sa survie (Jouve et al., 2007).

A



B

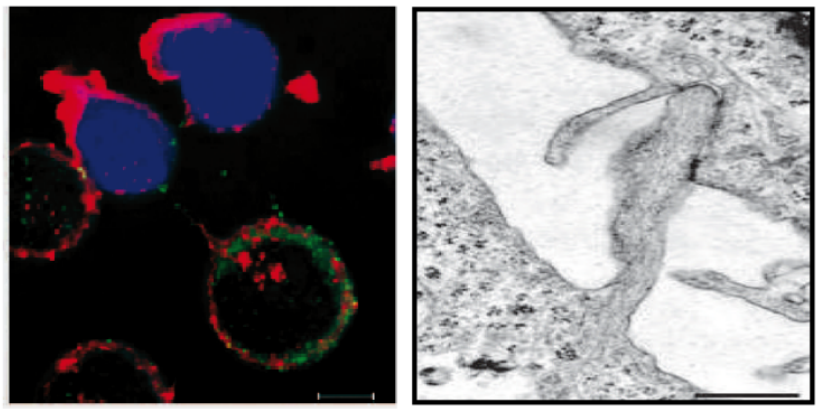


Figure 16. Différents aspects complexes des jonctions adhésives intercellulaires impliquées dans la dissémination du VIH-1 par transfert direct. (A) Polysynapse observée en microscopie confocale et électronique. Les polysynapses mettent en jeu plusieurs phénomènes de jonction intercellulaire entre une cellule infectée (nommée IC) et de multiples cellules adjacentes cibles non-infectées (nommées A, B et C). Sur cette illustration, les particules virales néosynthétisées bourgeonnent clairement dans la fente synaptique, avant leur passage par fusion ou endocytose dans les cellules cibles. **(B) Filopode observé en microscopie confocale et électronique.** Les filopodes sont des structures très allongées d'actine au bout desquelles s'établissent des zones de contact cellulaire. Ces structures, qui résultent d'un fort remaniement du cytosquelette cellulaire commandé par le VIH-1, peuvent assurer la jonction entre deux cellules espacées de plusieurs centaines de micromètres.
[D'après Rudnicka *et al.*, 2008; Sherer *et al.*, 2007]

III. Contribution du transfert direct de cellule à cellule dans l'établissement de l'infection à VIH-1

Le transfert viral de cellule à cellule est reconnu comme étant un moyen efficace de propagation du VIH-1. Ce mode de dissémination permettant initialement le transfert viral des cellules dendritiques ou macrophages infectés vers les cellules T CD4+ prend notamment toute son importance après une contamination par voie mucosale (Arrighi et al., 2004a; Clotet-Codina et al., 2009; Kwon et al., 2002; Nguyen and Hildreth, 2003; Piguet and Sattentau, 2004; Pope and Haase, 2003). Ensuite, au cours de l'infection, le transfert viral direct des lymphocytes T CD4+ infectés vers les lymphocytes T CD4+ naïfs assurerait une propagation rapide du virus dans l'organisme (Jolly et al., 2004; Wiley and Gummuluru, 2006). *In vitro*, le mécanisme de transfert direct du VIH-1 de cellule à cellule s'est ainsi révélé nettement plus efficace (100 fois plus efficace) et plus rapide que celui mettant en œuvre des virions libres (Chen et al., 2007; Dimitrov et al., 1993; Phillips, 1994; Sato et al., 1992; Sattentau, 2008; Sourisseau et al., 2007; Spouge et al., 1996). Ce mécanisme pourrait contribuer tout particulièrement à la propagation virale *in vivo* au sein des tissus lymphoïdes secondaires où la concentration cellulaire est très dense lors de la primo-infection (Brenchley et al., 2004).

Ce mode de dissémination, faisant intervenir notamment un mécanisme d'endocytose, conduit à cibler le VIH-1 au niveau de compartiments vésiculaires internes de la cellule cible pour lui assurer une protection. Ce mécanisme permettrait l'établissement de réservoirs viraux peu accessibles aux défenses immunitaires (Chen et al., 2007; Ganesh et al., 2004; van Montfort et al., 2007) et aux différentes molécules thérapeutiques. Il aboutit ainsi à une infection productive dans des conditions où l'attachement viral, l'engagement du corécepteur et la fusion seraient limités ou entravés par les agents antirétroviraux ou des anticorps neutralisants (Chen et al., 2007).

La découverte de ce nouveau mode de dissémination du VIH-1 a permis de progresser dans la compréhension de la physiopathologie du VIH-1 en apportant notamment des explications potentielles aux échecs des stratégies vaccinales traditionnelles. En effet, l'absence de contact du virus avec le milieu extracellulaire lui permettrait d'échapper aux armes (anticorps notamment) du système immunitaire développées par la vaccination.

Chapitre 3 : Les complexes glycoprotéiques d'enveloppe du VIH-1

Le VIH-1 présente à sa surface des glycoprotéines d'enveloppe (Env) constituées de deux sous-unités associées de manière non covalente, la sous-unité de surface SUgp120 et la sous-unité transmembranaire TMgp41 (Gallaher et al., 1995; Kowalski et al., 1987). Ces Env sont enchâssées dans la bicouche phospholipidique constituant l'enveloppe virale par le domaine hydrophobe de la TMgp41. A la surface du virion, elles se présentent sous forme de complexes trimériques d'hétérodimères SUgp120-TMgp41 (Wyatt and Sodroski, 1998; Yang et al., 2005). Les Env du VIH-1 déterminent le tropisme viral et jouent un rôle primordial dans le cycle de multiplication viral. Elles permettent notamment l'entrée du virus dans la cellule hôte (Hunter and Swanstrom, 1990; Jones et al., 1998; Prabakaran et al., 2007).

I. Biosynthèse et maturation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

A. Biosynthèse des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Les Env du VIH-1 sont codées par le gène *env* qui comporte de 2500 à 2700 paires de bases selon les isolats viraux et qui constitue la région la plus variable du génome viral (Hahn et al., 1985). Dans la cellule hôte, les Env sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) sous forme d'un précurseur polyprotéique de 160-kDa ($Pr160^{Env}$) comportant de 845 à 870 acides aminés **(Figure 17)**. Pour réaliser cette synthèse, le VIH-1 détourne à son profit les voies de biosynthèse et de trafic intracellulaire des protéines membranaires cellulaires. Le $Pr160^{Env}$ est produit à partir d'une version mono-épissée de l'ARNg ne contenant plus les séquences des gènes *gag* et *pol*. Une fois néosynthétisé, le $Pr160^{Env}$ subit différentes étapes de maturation au cours de son trafic à travers la voie secrétoire, et notamment dans le RE et l'appareil de Golgi.

B. Maturation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

a. Maturation dans le réticulum endoplasmique

Le $Pr160^{Env}$ en cours de synthèse présente un peptide signal d'une trentaine d'acides aminés en position N-terminale qui lui permet d'être transloqué dans la lumière du RE pour y débuter sa maturation (Ellerbrok et al., 1992).

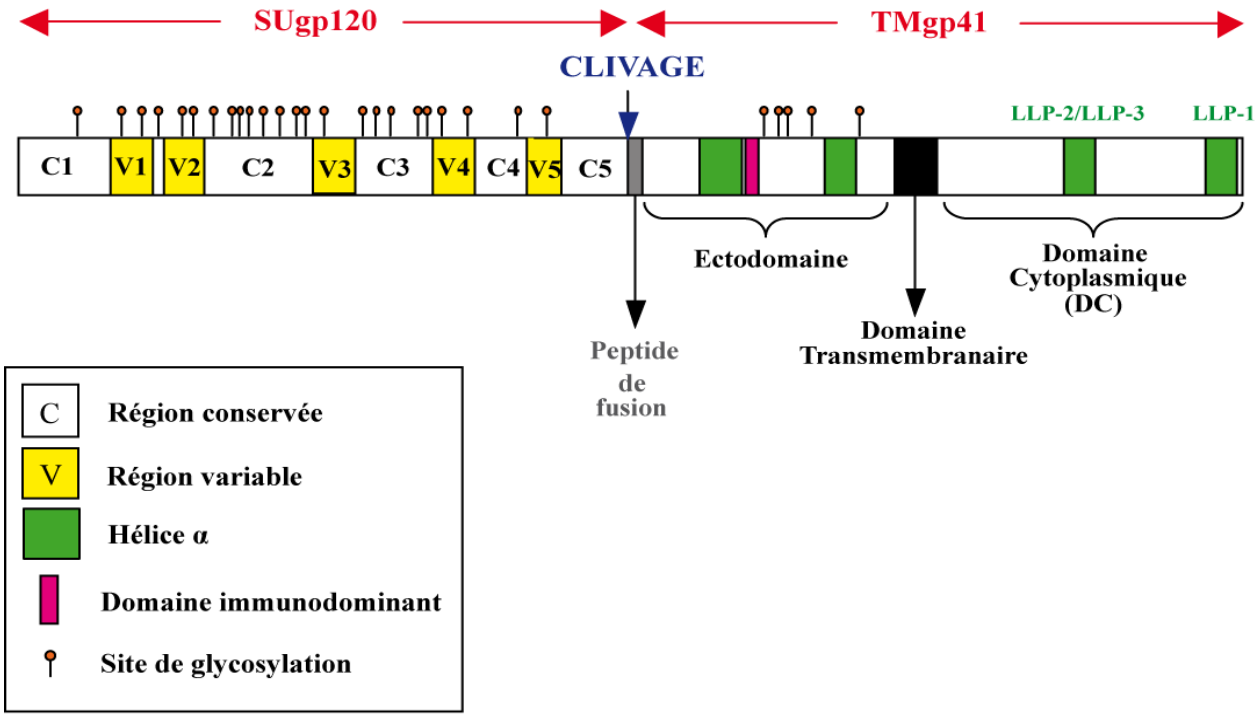


Figure 17. Représentation schématique du précurseur Pr160^{Env}. Après clivage protéolytique et maturation, ce précurseur donne naissance aux deux glycoprotéines d'enveloppe, la SUgp120 et la TMgp41. Contrairement à la SUgp120 qui est fortement glycosylée et qui est caractérisée par la présence de 5 régions variables (V1 à V5) réparties au sein de 5 régions conservées (C1 à C5), la TMgp41 présente une structure plus conservée.

Ce mécanisme de translocation GTP-dépendant du $Pr160^{Env}$ nécessite l'intervention, non seulement d'un complexe ribonucléoprotéique cytosolique appelé SRP ("*Signal Recognition Particle*") indispensable au ciblage du $Pr160^{Env}$ à la membrane du RE, mais aussi d'un complexe multiprotéique transmembranaire appelé translocon, aussi assimilé à un canal permettant le passage des protéines dans la lumière du RE (Abell et al., 2004; Brodsky, 1998; Crowley et al., 1994; Schwartz, 2007) **(Figure 18)**. La translocation des Env dans le RE est arrêtée par leur domaine transmembranaire dont la forte hydrophobicité conduit à leur ancrage dans la bicouche phospholipidique (Einfeld, 1996). Suite à cette translocation du $Pr160^{Env}$ dans la lumière du RE, le peptide signal est alors clivé par des peptidases signal cellulaires (Li et al., 2000; Martoglio and Dobberstein, 1998).

La maturation du $Pr160^{Env}$ débute dans le RE, notamment par le repliement de sa chaîne polypeptidique (Land and Braakman, 2001; Li et al., 2000). Cette étape de maturation est indispensable à l'obtention d'une conformation biologique mature du $Pr160^{Env}$ compatible avec sa capacité à lier le récepteur CD4. Cette action est notamment assurée par la protéine chaperonne, Bip/GRP78 (Earl et al., 1991; Knarr et al., 1999; Molinari and Helenius, 2000). Cette protéine de choc thermique appartenant à la famille des hsp70 est capable de lier le $Pr160^{Env}$ de manière ATP-dépendante et d'assurer son repliement correct (Hendershot et al., 1994). De plus, le RE est le siège d'un contrôle rigoureux de la qualité du repliement des protéines. La calnexine (ancrée à la membrane du RE) et la calréticuline (soluble dans la lumière du RE) sont deux protéines chaperonnes qui présentent la capacité d'intéragir de manière transitoire avec les protéines néosynthétisées au niveau du RE, comme les Env, pour les soumettre à un cycle de déglucosylation-reglucosylation favorisant leur parfait repliement (Oliver et al., 1999; Otteken and Moss, 1996 ; Parodi, 2000; Yamamoto, 2009; Zhang et al., 1997) **(Figure 19)**.

Dans le RE, les N-glycosylations jouent également de multiples rôles dans le processus de repliement du $Pr160^{Env}$. Elles permettent une stabilité des domaines repliés du $Pr160^{Env}$, augmentent la solubilité des protéines pour empêcher l'agrégation des intermédiaires de repliement et interviennent dans l'oligomérisation du $Pr160^{Env}$ (Helenius and Aebi, 2001).

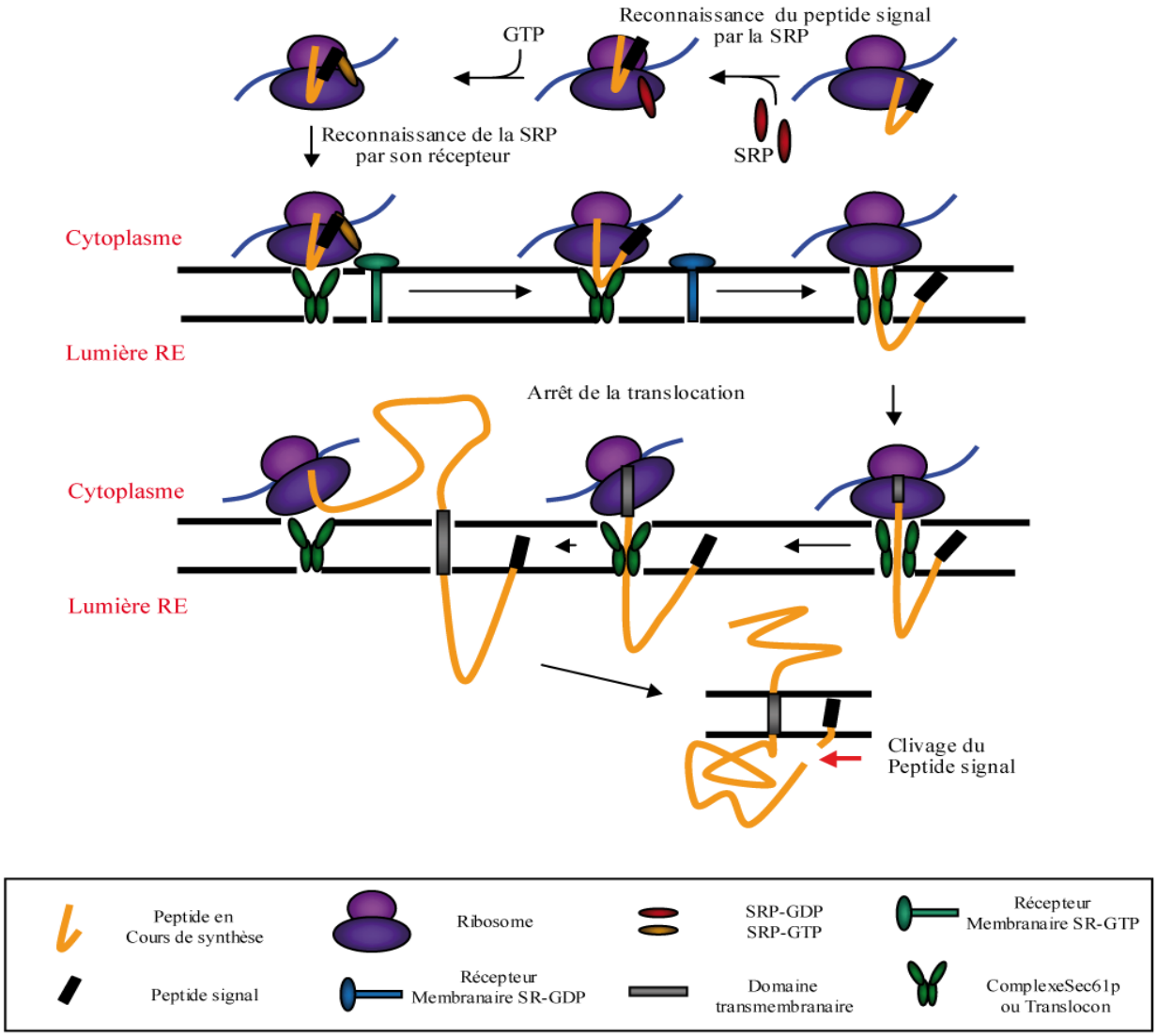


Figure 18. Translocation du précurseur Pr160^{Env} dans la lumière du réticulum endoplasmique. Le précurseur Pr160^{Env} du VIH-1 est transloqué dans la lumière du RE grâce à son peptide signal situé en position N-terminale. Le peptide signal en cours de synthèse est reconnu par un complexe ribonucléoprotéique cytosolique SRP ("*Signal Recognition Particle*") capable de se lier aux ribosomes. Le complexe SRP-Ribosome-protéine en cours de synthèse est adressé à la membrane du RE. La translocation débute après la dissociation du peptide signal de la SRP en présence de GTP et le positionnement du ribosome sur un complexe multiprotéique transmembranaire assimilé à un canal permettant le passage de protéines dans la lumière du RE et appelé translocon. La translocation de l'Env dans le RE est arrêtée par son domaine transmembranaire dont la forte hydrophobicité conduit à son ancrage dans la bicouche phospholipidique. Enfin, le clivage du peptide signal est réalisé par des peptidases signal cellulaires lorsque le Pr160^{Env} a acquis un certain niveau de repliement et de maturation.

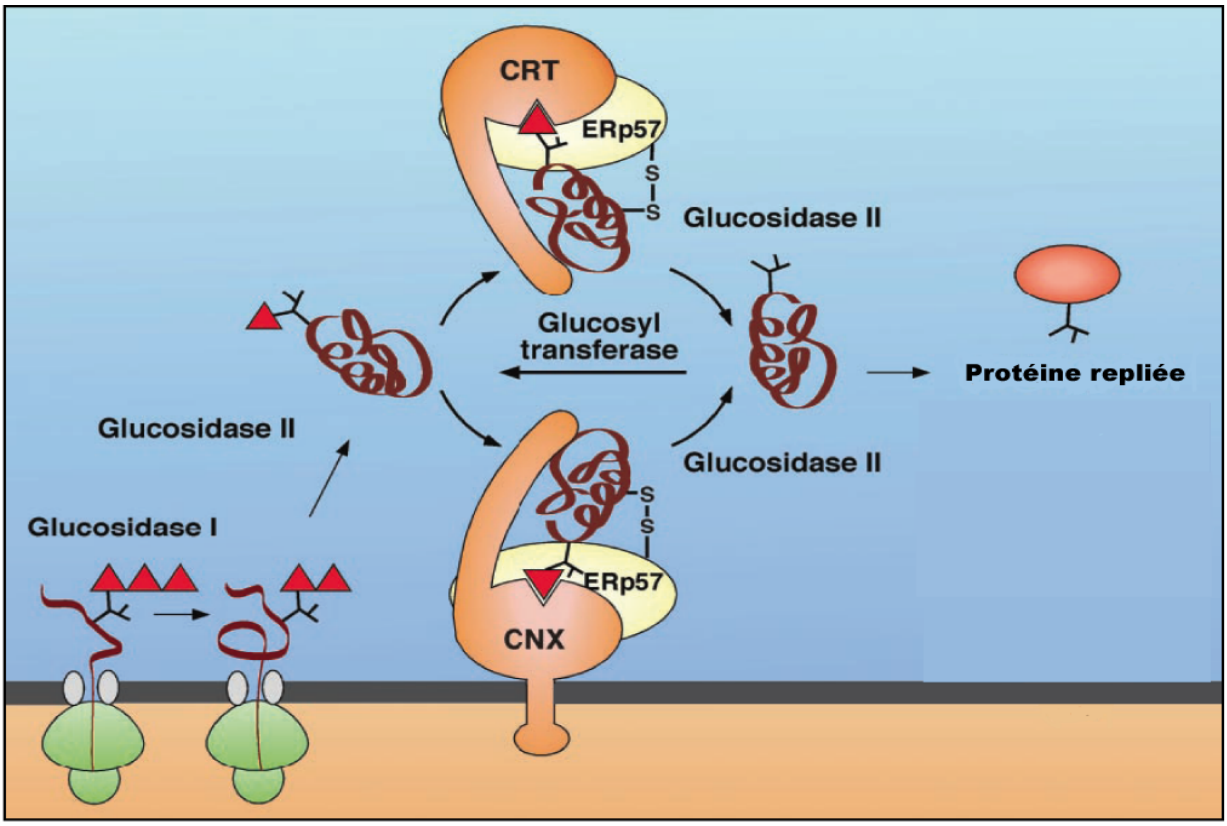


Figure 19. Le cycle calnexine-calréticuline de contrôle de la qualité du repliement des protéines néosynthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. Les précurseurs $Pr160^{Env}$ néosynthétisés dans le RE dont les glycanes ont été maturés par les glucosidases I et II sont reconnus par la calnexine (CNX) et/ou la calréticuline (CRT) qui sont deux protéines chaperonnes de la famille des lectines. Le $Pr160^{Env}$ est alors exposé à une thiol-disulphide oxidoreductase, ERp57, capable d'interagir avec la CNX et la CRT et de former des ponts disulfures responsables du repliement du $Pr160^{Env}$. Lorsque la conformation du $Pr160^{Env}$ est atteinte, celui-ci est exporté vers l'appareil de Golgi où il poursuit sa maturation post-traductionnelle. Par contre, lorsque sa conformation est incorrecte, celui-ci repart dans un cycle de reglucosylation-déglucosylation jusqu'à l'atteinte de sa conformation définitive.
[D'après Helenius & Aebi, 2001]

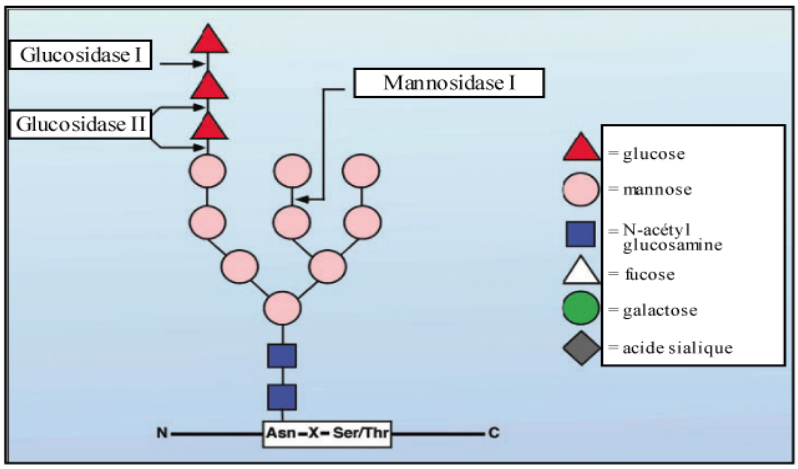
Elles sont également responsables de l'interaction des $Pr160^{Env}$ nouvellement synthétisés avec les protéines chaperonnes, la calnexine et la calréticuline (Trombetta and Helenius, 1998). La N-glycosylation est un événement co-traductionnel qui consiste en l'adjonction d'oligosaccharides ($GlcNac_2Man_9Glc_3$) au niveau de résidus asparagine présents dans les séquences N-X-S/T (avec X n'importe quel acide aminé) du $Pr160^{Env}$ **(Figure 20)**. Cette action est assurée par une oligosaccharyl-transférase membranaire. Ces oligosaccharides sont immédiatement délétés des trois glucoses terminaux et d'un mannose sous l'action des glucosidases I et II et de la mannosidase I de façon à présenter une base $Man_8GlcNAc_2$ (Freeze and Kranz, 2008; Kornfeld and Kornfeld, 1985; Moremen et al., 1994). Le $Pr160^{Env}$ présente approximativement 30 sites potentiels de N-glycosylation (Leonard et al., 1990) **(Figure 17)** et les carbohydrates représentent jusqu'à 50% du poids moléculaire de la SUgp120 (Geyer et al., 1988).

Le milieu relativement oxydant de la lumière du RE est également propice à la formation de ponts disulfures qui sont impliqués dans la stabilité de la structure tridimensionnelle du $Pr160^{Env}$ (Matthias and Hogg, 2003). L'établissement co-traductionnel de ces ponts entre deux résidus cystéine du $Pr160^{Env}$ est catalysé par une protéine de la superfamille des thioredoxines, la protéine disulfure isomérase (PDI) (Gilbert, 1997; Hawkins and Freedman, 1991; Molinari and Helenius, 1999). La plupart de ces ponts servent transitoirement à la stabilité d'intermédiaires conformationnels du $Pr160^{Env}$. Seule, une dizaine de ponts est conservée dans la conformation mature du $Pr160^{Env}$ (1 au niveau de la TMgp41 et 9 au niveau de la SUgp120) (van Anken et al., 2008).

Après traduction, le processus de maturation du $Pr160^{Env}$ se poursuit dans le RE, notamment par son assemblage oligomérique. Une séquence amphipathique en hélice α, formant une « leucine-zipper » à proximité de l'extrémité N-terminale de la TMgp41 semble responsable de l'oligomérisation du $Pr160^{Env}$ (Binley et al., 2000; Chan et al., 1997; Poumbourios et al., 1997; Shu et al., 1999; Weissenhorn et al., 1997). Des analyses cristallographiques et par tomographie électronique ont clairement démontré que le $Pr160^{Env}$ s'oligomérise à la surface des virions sous forme trimérique (Roux and Taylor, 2007; Zhu et al., 2006; Zhu et al., 2008).

Le $Pr160^{Env}$ est également sujet à une autre modification post-traductionnelle lors de son trafic entre le RE et son site de clivage protéolytique, la palmitoylation (Yang et al., 1995). La palmitoylation consiste en l'ajout d'un acide palmitique sur un groupement thiol d'une cystéine libre avec la formation d'une liaison thioester.

A



B

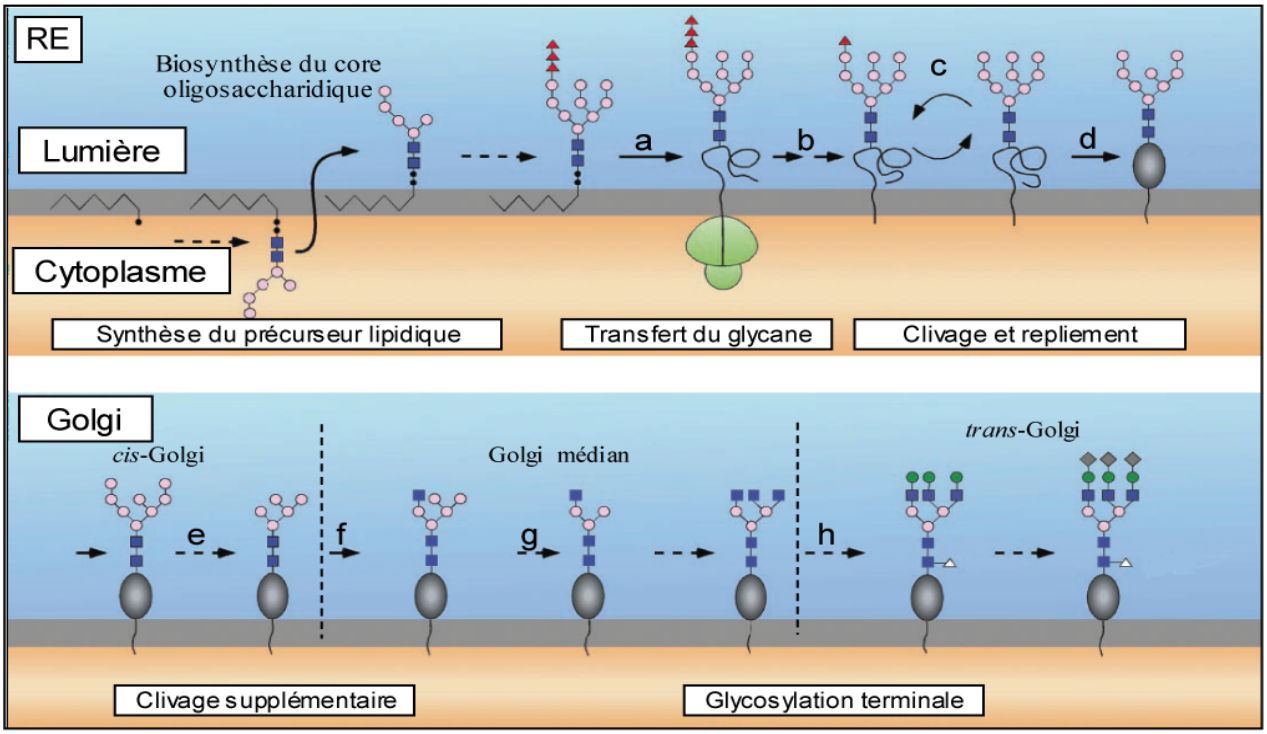


Figure 20. N-glycosylation du précurseur Pr160^{Env} du VIH-1. (A) Composition de la chaîne oligosaccharidique ajoutée au niveau des résidus asparagine (Asn ou N) des séquences N-X-S/T du Pr160^{Env} par une oligosaccharyl-transférase. (B) Représentation schématique des différentes étapes de la N-glycosylation du Pr160^{Env}. Dès l'association des oligosaccharides au Pr160^{Env}, leurs trois glucoses terminaux sont clivés sous l'action des glucosidases I et II (a, b et c) et un résidu mannose est hydrolysé par la mannosidase I (d). Un cycle de déglucosylation-reglucosylation nécessitant l'action en concert de la glucosyl-transférase du RE et de la glucosidase II se met alors en place dans le RE pour permettre au Pr160^{Env} d'acquérir sa conformation mature (c). Dès que le Pr160^{Env} acquiert sa conformation mature, il accède au compartiment Golgien où la maturation des glycanes se poursuit. Cette maturation dans l'appareil de Golgi nécessite l'intervention de nombreuses enzymes comme les mannosidases I (e) et II (g), les N-acétyl glucosamine transférases (f), et enfin les fucosyl-, galactosyl-, et sialyl-transférases (h).
[D'après Helenius & Aebi, 2001]

Elle jouerait un rôle important dans la formation de particules virales infectieuses, notamment en régulant la distribution intracellulaire du $Pr160^{Env}$ et en participant à l'incorporation des Env dans les particules virales (Bhattacharya et al., 2004; Rousso et al., 2000). Le rôle de ces palmitoylations a cependant été récemment remis en question (Chan et al., 2005).

b. Maturation dans l'appareil de Golgi

L'acquisition d'une conformation mature permet au $Pr160^{Env}$ de quitter le RE et d'accéder au réseau *trans*-Golgien (TGN, "*Trans-Golgien Network*") où il va compléter sa maturation post-traductionnelle (Moulard and Decroly, 2000). Dans le compartiment golgien, on assiste initialement à une poursuite de la maturation des glycanes présents au niveau du $Pr160^{Env}$ grâce à l'intervention de nombreuses enzymes telles que les mannosidases I et II, les N-acétyl glucosamine transférases et les fucosyl-, galactosyl- et sialyltransférases (Bernstein et al., 1994; Helenius and Aebi, 2001) **(Figure 20)**. Ensuite, le $Pr160^{Env}$ est soumis à un processus de clivage protéolytique permettant la génération des deux sous-unités glycoprotéiques d'enveloppe, la SUgp120 et la TMgp41 **(Figure 17)**. Ce clivage confère aux Env néosynthétisées une capacité à faire fusionner les membranes cellulaire et virale essentielle au pouvoir infectieux des particules virales. Ce clivage est assuré par des endoprotéases à sérine cellulaires de la famille des subtilisines comme la furine ou la PC7 ("*Proprotein Convertase 7*") (Decroly et al., 1996; Hallenberger et al., 1997; McCune et al., 1988; Moulard et al., 1999). Le $Pr160^{Env}$ serait clivé au niveau d'une séquence consensus $REKR_{511}$/AV très conservée de la partie C-terminale de la SUgp120 (Bahbouhi et al., 2002; Bosch and Pawlita, 1990; Freed et al., 1989). Le $Pr160^{Env}$ présente un second site putatif de clivage localisé huit acides aminés en amont du site physiologique au niveau de la séquence $KXKR_{503}$/R (X représentant n'importe quel résidu). Néanmoins, bien qu'utilisé à hauteur de 15%, ce second site de clivage ne semble pas aboutir à la formation de TMgp41 fusiogènes (Fenouillet and Gluckman, 1992). Cependant, il semble que ce second site soit nécessaire à l'accessibilité du site physiologique aux protéases (Bosch and Pawlita, 1990; Freed et al., 1989; Guo et al., 1990; Kieny et al., 1988). Le compartiment cellulaire où se produit le clivage du $Pr160^{Env}$ reste soumis à controverse. En effet, alors que certaines études concluent à un clivage au niveau de l'appareil de Golgi ou du TGN (Merkle et al., 1991; Pal et al., 1989; Stein and Engleman, 1990), d'autres identifient un compartiment de clivage plus tardif, les endosomes (Kantanen et al., 1995; Moulard and Decroly, 2000; Vollenweider et al., 1996). La proportion de $Pr160^{Env}$ qui arrive à maturation finale sous forme de SUgp120 et TMgp41 est très faible

car seule une petite fraction de $Pr160^{Env}$ (5-15%) est clivée, la majorité retournant au compartiment lysosomal pour y être dégradée et recyclée (Willey et al., 1988).

Suite à cette maturation par clivage protéolytique, les Env sont incorporées à la surface des virions sous forme complexée trimérique, résultant de l'association de trois hétérodimères de SUgp120/TMgp41 (Welman et al., 2007; Yang et al., 2005). De nombreuses études ont montré l'implication dans cette association trimérique de divers domaines constants de la SUgp120 (Helseth et al., 1991; Ivey-Hoyle et al., 1991), de divers domaines de la TMgp41 (Cao et al., 1993; Freed et al., 1990; Kalia et al., 2005) et de la protéine de matrice (Davis et al., 2006).

II. Fonctions des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Les glycoprotéines d'enveloppe exposées à la surface du VIH-1 jouent un rôle primordial dans la détermination du tropisme viral, mais aussi dans le cycle de multiplication viral en permettant notamment l'entrée du virus dans la cellule hôte. En effet, la SUgp120 assure l'étape initiale d'attachement du virus à la cellule cible *via* l'établissement d'interactions avec le récepteur CD4 et un corécepteur spécifique (CCR5 ou CXCR4), alors que la TMgp41 est responsable du phénomène de pénétration virale par induction de la fusion des membranes cellulaire et virale. Les Env sont également indispensables à la transmission directe du VIH-1 de cellule à cellule comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent.

En outre, les glycoprotéines d'enveloppe transmembranaire (TMgp41) du VIH-1, qui présentent la particularité d'avoir un long domaine cytoplasmique (DC), semblent à elles seules jouer d'autres rôles essentiels dans la multiplication virale. En effet, le DC de la TMgp41 a été montré comme étant impliqué dans la régulation de différentes fonctions des Env et dans les mécanismes d'assemblage et de bourgeonnement viral, notamment en contrôlant le trafic intracellulaire des Env et leur incorporation à la surface des virions.

A. Structure de la glycoprotéine transmembranaire (TMgp41) du VIH-1

Contrairement à la SUgp120 qui est hautement glycosylée et qui est caractérisée par la présence de 5 régions variables (V1 à V5) réparties au sein de 5 régions constantes (C1 à C5), la TMgp41 présente une structure bien plus conservée (Modrow et al., 1987).

Elle est composée de trois domaines distincts ayant une fonction propre (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997) **(Figure 21)**:

- L'ectodomaine ou domaine extracellulaire (170 acides aminés) exposé à la surface du virus : il contient une région très hydrophobe correspondant au peptide fusogène responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire lors de l'infection, un épitope immunodominant et deux régions en hélice α impliquées dans le repliement et l'oligomérisation.

- Le court domaine transmembranaire hydrophobe (20 acides aminés) : il permet l'ancrage de la TMgp41 et, par conséquent, du complexe SUgp120/TMgp41 à la surface cellulaire.

- Le domaine cytoplasmique (DC) dont nous allons largement évoquer le rôle essentiel dans la multiplication virale. Ce DC présente la particularité d'être beaucoup plus long (environ 150 acides aminés) chez les lentivirus, et notamment le VIH-1, que celui observé chez la plupart des autres rétrovirus (20 à 50 acides aminés) (Hunter and Swanstrom, 1990). Même si la structure de ce domaine est nettement moins connue que celle du domaine extracellulaire, trois régions hydrophobes organisées en hélice α ont tout de même été mises en évidence sur la base de leurs propriétés structurales et de leurs similarités avec de multiples peptides cytolytiques naturels **(Figure 21)** (Chen et al., 2001; Eisenberg and Wesson, 1990; Kliger and Shai, 1997; Miller et al., 1991; Venable et al., 1989). La première région, nommée LLP-1 "*Lentivirus Lytic Peptides 1*", est localisée en position C-terminale du DC (résidus 828-848). Les deux autres régions localisées dans le centre du DC ont été nommées LLP-2 (résidus 768-788) et LLP-3 (résidus 786-812).

B. Fonctions de la glycoprotéine transmembranaire (TMgp41) du VIH-1

De nombreuses études ont montré qu'outre son implication dans le processus d'entrée virale, la TMgp41 joue un rôle essentiel, *via* son DC, dans la régulation des différentes fonctions des Env, dans leur trafic et leur incorporation à la surface des virions et, par conséquent, dans la multiplication virale (Dubay et al., 1992; Freed and Martin, 1996; Gabuzda et al., 1992; Jiang and Aiken, 2007; Lee et al., 1989; Murakami and Freed, 2000b; Piller et al., 2000; Yu et al., 1993). Cette multiplication virale *in vitro* dans les lymphocytes T CD4+ primaires, les macrophages et la majorité des lignées lymphocytaires T CD4+ sera ainsi étroitement dépendante de l'intégrité de ce DC (Akari et al., 2000; Murakami and Freed, 2000b). Certaines lignées cellulaires T CD4+ (par exemple la lignée MT4) peuvent cependant

rester permissives à la multiplication de VIH-1 portant des TMgp41 avec un DC tronqué dans sa quasi-totalité (Murakami and Freed, 2000b). Un déficit d'incorporation des Env est généralement observé lorsque l'altération du DC de la TMgp41 affecte la cinétique de multiplication virale dans un type cellulaire donné (Jiang and Aiken, 2007; Kalia et al., 2003; Murakami and Freed, 2000b; Newman et al., 2007; Piller et al., 2000). L'intégrité du DC paraît également essentielle pour la multiplication virale *in vivo* où des variants viraux présentant une troncation de DC ont très rarement été mis en évidence. Le premier isolat viral, pour lequel une troncation du DC de la TMgp41 a été décrite, avait en fait été généré lors de la phase d'adaptation à la culture *in vitro* sur lignée lymphocytaire T (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1990). Plus récemment, une étude a rapporté l'isolement d'un VIH-1 « CD4 indépendant » présentant des Env avec un DC fortement tronqué (Zerhouni et al., 2004b). Cependant, cet isolat atypique correspondait à un variant minoritaire *in vivo* au sein de la population virale du patient (Saha et al., 2005). Dans le cas du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), des troncations de DC ont été observées chez le virus en culture *in vitro* sur certaines lignées cellulaires (Kodama et al., 1989). Cependant, les infections de macaques réalisées avec des SIV présentant ces Env tronquées ont abouti à la sélection rapide de variants viraux avec des Env non tronquées (Luciw et al., 1998). L'intégrité de ce domaine joue donc un rôle clé dans la multiplication virale et la persistance des lentivirus comme le VIH-1 et le SIV. Dans leur ensemble, ces observations démontrent clairement l'importance du long DC des lentivirus dans son contexte naturel.

De nombreuses études ont été effectuées pour tenter de définir clairement les différentes fonctions du DC de la TMgp41. Les substitutions, les troncations ou les délétions effectuées dans ce domaine influencent notamment la capacité des Env à faire fusionner les membranes, leur trafic intracellulaire et leur incorporation à la surface des virions (Berlioz-Torrent et al., 1999; Dubay et al., 1992; Edwards et al., 2002; Murakami and Freed, 2000b; Piller et al., 2000; Wyss et al., 2005). Certaines de ces altérations modifient également les propriétés biochimiques et immunologiques de l'ectodomaine des Env (Davis et al., 2006; Kalia et al., 2005). Deux groupes de motifs associés aux différentes fonctions du DC de la TMgp41 peuvent actuellement être distingués : les motifs LLPs et les motifs de trafic.

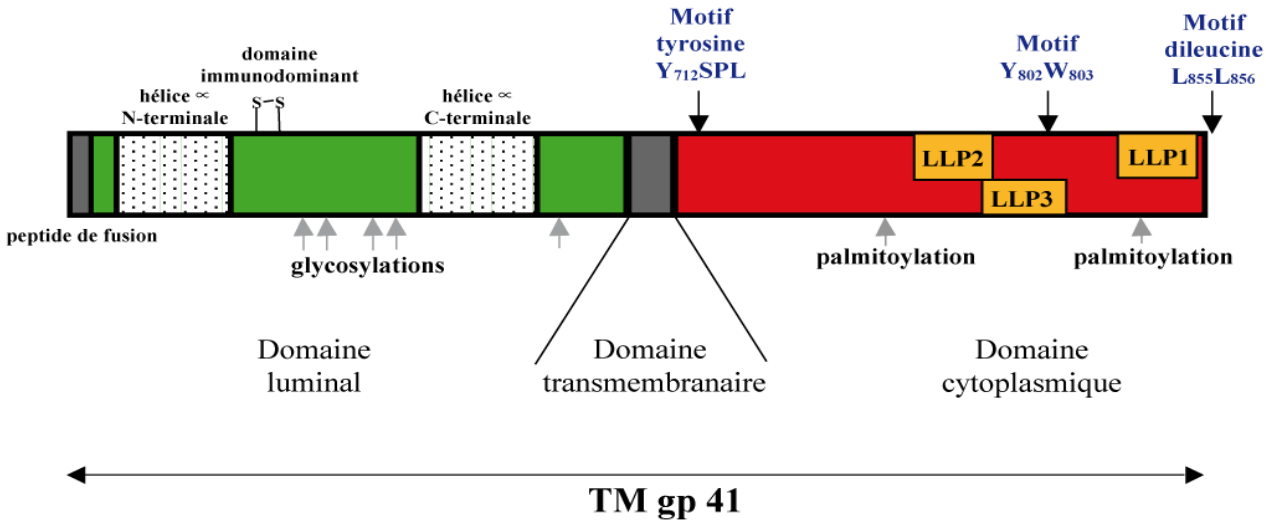


Figure 21 : Représentation schématique de la structure de la sous-unité transmembranaire TMgp41. La sous-unité glycoprotéique transmembranaire TMgp41 est composée de trois domaines distincts, à savoir un domaine luminal, un domaine d'ancrage transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le domaine luminal (extracellulaire) comprend notamment le peptide de fusion, une hélice α N-terminale, une région formant une structure en boucle contenant un épitope immunodominant, et une hélice α C-terminale. Le domaine transmembranaire permet l'ancrage membranaire de la TMgp41 et, par conséquent, du complexe oligomérique TMgp41/SUgp120 à la surface cellulaire. Le domaine cytoplasmique gouverne, via des interactions entre certains de ces motifs (tyrosine Y_{712}SPL, diaromatique $Y_{802}W_{803}$, dileucine $L_{855}L_{856}$) et des partenaires cellulaires (les complexes d'adaptine AP-1, AP-2 et la protéine TIP47), le trafic intracellulaire et l'expression de surface des glycoprotéines d'enveloppe matures. L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions et leur propriétés fusiogènes semblent régulées aussi par ce domaine *via* la présence de trois régions en hélice α appelées "*Lentivirus Lytic Peptide*" 1, 2 et 3 (LLP-1, LLP-2 et LLP-3).
Les numérotations indiquées pour plusieurs acides aminés sont celles correspondant au VIH-1 HXB2.
[D'après Zolla-Pazner, 2004; Kliger & Shai, 1997]

a. Les motifs LLPs

Les motifs LLP-1, 2 et 3 jouent un rôle crucial dans la stabilisation des Env, dans la régulation du processus de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et dans l'incorporation des Env à la surface des virions (Davis et al., 2006; Jiang and Aiken, 2007; Kalia et al., 2003; Murakami and Freed, 2000a; Newman et al., 2007; Piller et al., 2000; Wyss et al., 2005) **(Figure 21)**. Certaines études ont également suggéré que ces domaines pourraient agir comme des "viroporines" en venant s'insérer et s'oligomériser au niveau des membranes lipidiques cellulaires pour former des pores ou canaux ioniques (Chernomordik et al., 1994; Gawrisch et al., 1993; Srinivas et al., 1992). Ils seraient ainsi responsables d'une perturbation de la perméabilité membranaire et d'une redistribution des ions à travers ces membranes (Comardelle et al., 1997). Ces domaines seraient également capables de se lier à des protéines cellulaires telles que la calmoduline (Miller et al., 1993; Tencza et al., 1997; Tencza et al., 1995) pour accroître d'autant plus la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+}. Tous ces phénomènes seraient à l'origine d'une expansion irréversible du volume cellulaire menant à la dégénérescence des cellules infectées par nécrose ou apoptose et seraient donc impliqués dans l'infectivité virale *in vivo* notamment en permettant le relargage des particules virales néoformées (Plymale et al., 1999).

a.1. Implication des LLPs dans le processus de fusion

En ce qui concerne le processus de fusion initié par la TMgp41, il a été montré que cette compétence était étroitement liée à l'état de maturation des particules virales par clivage protéolytique du $Pr55^{Gag}$ (Murakami et al., 2004; Wyma et al., 2004). Le DC de la TMgp41, et plus particulièrement le motif LLP-1, serait responsable de la régulation de ce phénomène via une interaction avec le $Pr55^{Gag}$ (Jiang and Aiken, 2007; Kalia et al., 2003). En effet, l'association du DC de la TMgp41 au $Pr55^{Gag}$ dans les particules virales immatures a été montrée comme inhibant le changement conformationnel des Env requis pour le processus de fusion membranaire. Par ailleurs, il est important de noter que ce défaut de fusion peut être compensé par une troncation du DC de la TMgp41. Ce système de régulation du processus de fusion joue un rôle essentiel dans le cycle de multiplication viral en inhibant l'entrée de particules immatures non-infectieuses au sein de la cellule hôte.

a.2. Implication des LLPs dans l'incorporation des Env

Lors du bourgeonnement viral au niveau de la membrane plasmique, les Env du VIH-1 sont incorporées à la surface des particules virales néoformées. Bien que la présence des Env ne soit pas indispensable à la formation de particules virales, leur incorporation en surface confère aux virions leur pouvoir infectieux. Les mécanismes impliqués dans l'incorporation des Env ne sont pas totalement élucidés, mais beaucoup d'études suggèrent que le DC de la TMgp41 *via* les motifs LLP-1, 2 et 3, en entrant en interaction avec la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice, serait impliqué dans ce processus. Il existe cependant une controverse concernant l'implication de LLP-1 et /ou LLP-2/3 dans le mécanisme d'incorporation (Cosson, 1996; Hourioux et al., 2000; Jiang and Aiken, 2007; Kalia et al., 2003; Lopez-Verges et al., 2006; Murakami and Freed, 2000a; Piller et al., 2000).

Plusieurs études anciennes menées avec des virions présentant des troncations du DC de la TMgp41 ou des Env hétérologues ont suggéré l'existence d'un modèle d'incorporation passive des Env à la surface des virions produits dans des lignées cellulaires le plus souvent non lymphocytaires (HeLa, 293T) (Freed and Martin, 1995; Freed and Martin, 1996; Gabuzda et al., 1992; Yu et al., 1992).

Il semble cependant qu'il s'agisse d'un processus actif nécessitant une interaction spécifique directe ou indirecte entre la protéine de matrice et le DC de la TMgp41 (Dorfman et al., 1994; Yu et al., 1992). Ce modèle repose tout d'abord sur le fait que les Env du VIH-1 soient capables d'adresser le $Pr55^{Gag}$ au site de bourgeonnement basolatéral des cellules polarisées (Lodge et al., 1994; Lodge et al., 1997; Owens et al., 1991). Une étude *in vitro* a également permis l'observation d'une interaction directe entre la protéine de matrice et une protéine de fusion associant la glutathion S-transférase et le DC de la TMgp41 (Cosson, 1996). De la même façon, des peptides synthétiques correspondant à diverses régions du DC de la TMgp41 ont également été montrés comme interagissant directement avec des molécules de $Pr55^{Gag}$ (Hourioux et al., 2000). L'existence de cette interaction matrice-DC TMgp41 a depuis été renforcée par plusieurs études ayant démontré que des délétions, des substitutions d'un seul (par exemple les résidus Leu-12 ou Leu-30) ou de résidus dans la protéine de matrice pouvaient affecter l'efficacité d'incorporation des Env (Dorfman et al., 1994; Freed and Martin, 1995; Freed and Martin, 1996; Mammano et al., 1995; Murakami and Freed, 2000a; Ono et al., 1997; Yu et al., 1992). Ce défaut d'incorporation pouvait être restauré par des troncations du DC de la TMgp41 ou des mutations compensatrices de la matrice telles que celle du résidu Val-34 (Freed and Martin, 1996; Mammano et al., 1995). De

manière similaire, une petite délétion dans le domaine LLP-2/-3 du DC de la TMgp41 a été compensée par une mutation dans la matrice (Murakami and Freed, 2000a). Des travaux récents ont même suggéré que la protéine TIP47, impliquée dans le trafic intracellulaire des Env, suite à son interaction avec le motif diaromatique ($Y_{802}W_{803}$) situé dans le domaine LLP-2/-3, servirait de « connecteur » entre la matrice et le DC de la TMgp41 pour faciliter cette incorporation (Lopez-Verges et al., 2006). D'après tous ces résultats, il est donc évident que le DC de la TMgp41 joue un rôle essentiel dans l'incorporation des Env *via* des interactions directes ou indirectes avec la matrice (Bhattacharya et al., 2006; Cosson, 1996; Davis et al., 2006; Dorfman et al., 1994; Murakami and Freed, 2000a; Yu et al., 1992).

b. Les motifs de trafic

Le second groupe de motifs identifiés comme étant impliqués dans les fonctions du DC de la TMgp41 comprend un motif tyrosine proximal Y_{712}SPL (Boge et al., 1998; Ohno et al., 1997), un motif diaromatique central $Y_{802}W_{803}$ (Blot et al., 2003) et un motif dileucine C-terminal $L_{855}L_{856}$ (Berlioz-Torrent et al., 1999; Byland et al., 2007; Wyss et al., 2001) **(Figure 21)**. Ces motifs, en interagissant avec les protéines cellulaires impliquées dans les voies de transport telles que les complexes d'adaptine (AP), permettent de réguler la distribution intracellulaire des Env, et de ce fait, leur expression de surface. De par ces fonctions, ces motifs seraient également impliqués dans la biogenèse de la particule virale, et plus particulièrement dans le ciblage du bourgeonnement viral.

b.1. Implication dans la distribution intracellulaire des Env

Le contrôle de la distribution intracellulaire et de l'expression à la surface cellulaire des Env du VIH-1 est un élément clé du cycle infectieux viral. La persistance des Env à la membrane plasmique pourrait en effet surexposer le virus à la réponse immune de l'hôte. Il est également essentiel que le trafic intracellulaire des Env favorise leur incorporation à la surface des particules $Pr55^{Gag}$ néoformées.

Dans une cellule exprimant les Env du VIH-1, seule une petite partie des glycoprotéines synthétisées sera exposée à la membrane plasmique. Plusieurs mécanismes sont responsables de ce phénomène. Tout d'abord, les anomalies de maturation (glycosylation, oligomérisation ou clivage) des $Pr160^{Env}$ entraînent leur rétention dans le RE ou l'appareil de Golgi et leur dégradation (Bultmann et al., 2000; Willey et al., 1988). Ensuite, la présence des Env à la surface cellulaire va dépendre de l'efficacité de leur exportation de l'appareil de Golgi jusqu'à

la membrane plasmique, de leur internalisation par endocytose (Berlioz-Torrent et al., 1999; Byland et al., 2007; Wyss et al., 2001) et de leur transport rétrograde vers l'appareil de Golgi (Blot et al., 2003; Bultmann et al., 2001; Rowell et al., 1995). Lorsque l'expression est stabilisée, l'analyse par microscopie confocale de la distribution intracellulaire des Env exprimées en l'absence du $Pr55^{Gag}$ montre que ces glycoprotéines sont principalement localisées dans le réseau *trans*-Golgien (Blot et al., 2003).

Le trafic des Env paraît donc s'effectuer de la manière suivante. Tout d'abord, les Env néosynthétisées semblent rejoindre la surface cellulaire soit directement via des vésicules de transport non-recouvertes, soit par les endosomes de recyclage **(Figure 22)**. Une fois à la surface cellulaire, l'endocytose des Env fait suite à une interaction entre les complexes d'adaptine AP-2 (localisés à la membrane cellulaire) et les motifs tyrosine ($Y_{712}SPL$) et dileucine (L_{855}-L_{856}) présents dans le DC de la TMgp41 (Berlioz-Torrent et al., 1999; Boge et al., 1998; Byland et al., 2007; Ohno et al., 1997). Après leur internalisation et leur adressage aux endosomes précoces, les Env pourraient rejoindre les endosomes tardifs. A ce niveau, la protéine TIP47 entrerait en interaction avec le motif diaromatique $Y_{802}W_{803}$ du DC de la TMgp41 pour induire le transport rétrograde des Env des endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi (Blot et al., 2003). Enfin, l'interaction entre le motif L_{855}-L_{856} C-terminal et les complexes AP-1 permettrait des mouvements des Env du TGN vers les endosomes précoces et inversement (Wyss et al., 2001). Ainsi, les Env du VIH-1 circuleraient de manière permanente entre le TGN, la surface cellulaire et le compartiment endosomal.

En dehors de ces motifs dont les partenaires cellulaires ont pu être identifiés, d'autres séquences de la TMgp41 (is1 et is2) inhibant l'expression de surface des glycoprotéines d'enveloppe ont été décrites (Bultmann et al., 2001). De plus, l'existence de déterminants additionnels encore indéterminés, impliqués dans la régulation du trafic des Env, a été suggérée récemment lors d'une étude du trafic des Env d'isolats primaires (Lambele et al., 2007). La mise en évidence de ces différents signaux suggère une régulation complexe de l'expression de surface des Env et de leur distribution.

b.2. Implication des Env dans la formation et le bourgeonnement de la particule virale

Les Env ne sont pas nécessaires pour la formation et le bourgeonnement des particules $Pr55^{Gag}$. Elles semblent cependant susceptibles d'influencer les dernières phases du cycle de multiplication virale.

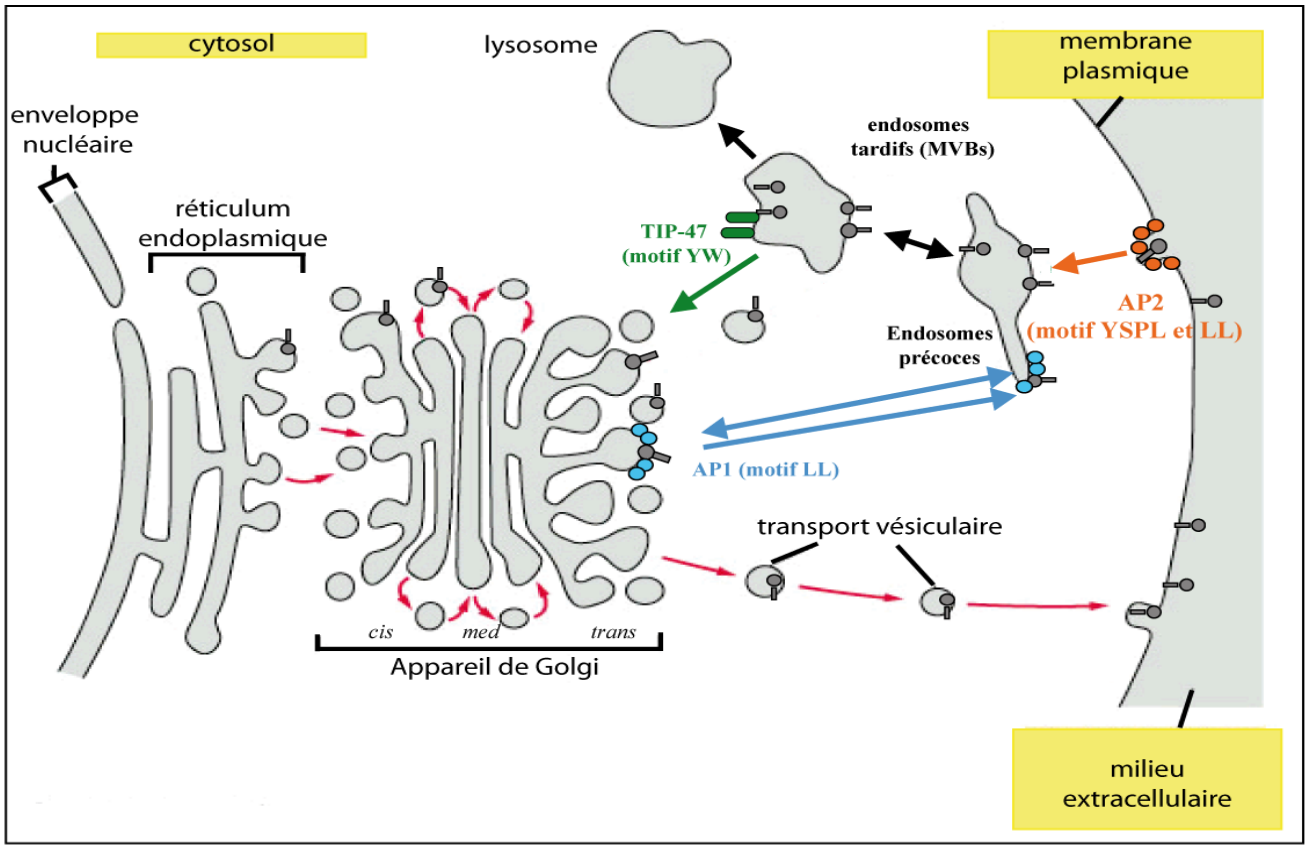


Figure 22. Représentation schématique du trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1. Les glycoprotéines d'enveloppe circulent entre la surface cellulaire, les compartiments endosomaux et le réseau *trans*-Golgien (TGN). En effet, dès leur arrivée en surface cellulaire, les glycoprotéines d'enveloppe subissent une endocytose suite à une interaction entre les complexes d'adaptine AP-2 et les motifs tyrosine ($Y_{712}SPL$) ou dileucine ($L_{855}L_{856}$). Par la suite, leur transport rétrograde et antérograde entre les endosomes précoces et le TGN serait assuré notamment par une interaction entre les complexes d'adaptine AP-1 et le motif dileucine ($L_{855}L_{856}$). Enfin leur transport rétrograde des endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi serait rendu possible par une interaction entre la protéine TIP47 et le motif diaromatique ($Y_{802}W_{803}$).

Elles joueraient ainsi un rôle essentiel dans le ciblage du bourgeonnement viral dans les cellules polarisées puisque leur distribution intracellulaire est déterminante pour la localisation du site de bourgeonnement des virions (Wyss et al., 2001). Cette polarisation du bourgeonnement pourrait se montrer particulièrement importante au cours de la physiopathologie du VIH-1 en conférant ainsi au virus une propagation optimale. Le motif tyrosine Y_{712}SPL localisé dans le DC des Env paraît fortement impliqué dans cette orientation du bourgeonnement viral dans certaines cellules polarisées (Day et al., 2004; Deschambeault et al., 1999; Lodge et al., 1994; Lodge et al., 1997). Ainsi, dans les cellules épithéliales MDCK, la mutation Y_{712}SPL en A_{712}SPL perturbe l'orientation du bourgeonnement viral qui s'effectue normalement vers le pôle basolatéral de la cellule (Lodge et al., 1997).

De manière inattendue, un bourgeonnement polarisé semble également se produire dans les principales cellules cibles du VIH-1, en l'occurrence les lymphocytes T CD4+ et les macrophages, qui ne sont pas habituellement considérées comme étant des cellules polarisées (Deschambeault et al., 1999; Fais et al., 1995; Hubner et al., 2009). Cependant, ces cellules peuvent mobiliser leur cytosquelette pour orienter le bourgeonnement vers les zones de contact entre cellules ou pour former des extensions membranaires polarisées très sophistiquées (filopodes ou nanotubes). Dans ces cellules, le bourgeonnement viral semble orienté vers ces extensions membranaires qui correspondent à des zones de contact entre cellules. En ce qui concerne les lymphocytes, cette polarisation du bourgeonnement viral a été montrée comme étant fortement perturbée par la mutation du motif tyrosine Y_{712}SPL, ceci s'illustrant par une nette diminution de la transmission du virus de cellule à cellule (Deschambeault et al., 1999).

Pour permettre l'assemblage de particules virales infectieuses, il est nécessaire que les composants viraux et cellulaires requis soient concentrés en un même site à un même moment. En outre, le site d'assemblage et de bourgeonnement du VIH-1 semble pouvoir se localiser à la membrane plasmique ou dans les endosomes tardifs/MVBs selon le type cellulaire considéré. Ainsi, les Env doivent contenir les signaux de trafic permettant leur incorporation dans la particule virale en formation. Différents travaux ont montré qu'une mutation des signaux de trafic Y_{712}SPL et $Y_{802}W_{803}$ perturbait le trafic intracellulaire des Env et, par conséquent, la multiplication virale (Blot et al., 2003; Day et al., 2004; Lambele et al., 2007). Ce défaut de multiplication virale était la conséquence directe d'un défaut d'incorporation des Env dans la particule virale. Ces observations suggèrent donc que le trafic

intracellulaire des Env doit être finement régulé pour leur permettre d'être efficacement incorporées dans la particule virale.

Différents arguments suggèrent que l'interaction, direct ou indirecte *via* des cofacteurs cellulaires, entre le domaine matrice du $Pr55^{Gag}$ et le DC de la TMgp41 joueraient un rôle dans l'incorporation des Env à la surface des virions (Cosson, 1996; Freed and Martin, 1995; Gabuzda et al., 1992; Hourioux et al., 2000; Kalia et al., 2003; Mammano et al., 1995; Murakami and Freed, 2000a; Piller et al., 2000; Wyma et al., 2000). Au cours d'une étude récente, la protéine TIP47 a d'ailleurs été impliquée dans ce processus d'incorporation des Env (Lopez-Verges et al., 2006). Cette protéine, qui assure le transport rétrograde des Env des endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi, agirait comme un connecteur entre le précurseur $Pr55^{Gag}$ et les Env. Au cours de ces mêmes travaux, il a été montré que les mutations de la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice ou du DC de la TMgp41 étaient responsables d'un défaut d'incorporation des Env, mais aussi d'une perte d'interaction avec la protéine TIP47 (Lopez-Verges et al., 2006). Le trafic intracellulaire des Env jouerait ainsi probablement un rôle essentiel dans les mécanismes d'assemblage et de bourgeonnement du virus dans une cellule hôte donnée.

Nous allons maintenant aborder l'influence des glycoprotéines d'enveloppe sur différents aspects de la physiopathologie de l'infection à VIH-1, et notamment sur le trospime viral et l'échappement à la réponse immunitaire.

Chapitre 4 : Tropisme du VIH-1, réponse immune de l'hôte et échappement viral

L'infection d'un hôte par le VIH-1 se traduit par l'établissement de réponses immunes innée et adaptative menées par les différents acteurs du système immunitaire. La qualité et la spécificité de cette réponse immunitaire ont un impact certain sur la cinétique d'évolution de l'infection et la survenue du SIDA. De par leurs fonctions, les Env vont jouer un rôle notable dans cette cinétique d'évolution. Elles vont ainsi permettre aux virus de cibler des cellules essentielles à la réponse immunitaire et d'adapter son tropisme cellulaire au cours du temps. Ces Env, qui sont aussi naturellement exposées au système immunitaire de l'hôte, vont être constamment soumises à deux types de pression de sélection, d'une part le maintien de leur intégrité et de leur fonctionnalité et, d'autre part, l'échappement à la reconnaissance du système immunitaire de l'hôte. Il en résulte une grande variabilité génétique dont les limites

sont déterminées par la nécessité de conserver des protéines suffisamment fonctionnelles. Dans ce chapitre, nous aborderons en particulier le tropisme viral, avec une revue des principales cellules cibles du VIH-1, puis nous analyserons ensuite différents aspects de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte susceptibles d'apporter des éléments de compréhension aux travaux personnels présentés dans la seconde partie de cette thèse.

I. Cinétique générale d'évolution de l'infection par le VIH-1

La cinétique d'évolution de l'infection par le VIH-1 se présente classiquement selon trois stades successifs (Fauci, 1993; Pantaleo et al., 1993): le stade de primo-infection, le stade de latence clinique et le stade SIDA **(Figure 23)**.

Le premier stade correspond à la phase de primo-infection (ou infection primaire) caractérisée par le premier contact entre le virus et un individu naïf. Lors d'une contamination par voie sexuelle, elle correspond à la dissémination du virus des tissus muqueux vers les organes lymphoïdes associés, puis à sa propagation à l'ensemble de l'organisme (Kahn and Walker, 1998). Cette phase de primo-infection présente une durée de quelques semaines environ (3 à 8 semaines). Elle est généralement associée à des symptômes cliniques aspécifiques, le plus souvent de type pseudo-grippaux. Au niveau biologique, elle se caractérise par la présence d'un pic virémique transitoire mais élevé, accompagné d'une légère diminution du taux de lymphocytes T CD4+ circulants (Kassutto and Rosenberg, 2004; Mattapallil et al., 2005). Toutefois, très rapidement, une réponse immunitaire anti-virale lymphocytaire cytotoxique est mise en place, permettant le contrôle de l'infection en limitant la multiplication du virus (Koup et al., 1994). La fin de ce stade est généralement associée à l'apparition d'anticorps dirigés contre le VIH-1 caractérisant la séroconversion de l'individu infecté. Le diagnostic biologique de la primo-infection à VIH-1 repose notamment sur la détection d'ARN viraux et d'antigènes de capside p24 dans le sang en l'absence d'anticorps spécifiques. A ce stade, la charge virale plasmatique exprimée en nombre de copies d'ARN viral par millilitre de plasma est très élevée **(Figure 23)**.

Ensuite, l'individu infecté entre dans une phase de latence asymptomatique d'une durée variable selon les individus puisqu'elle peut durer de une à trois années pour les patients dits "progresseurs rapides" ou s'installer sur plus de dix ans chez les patients qualifiés d'asymptomatiques à long terme (ALT).

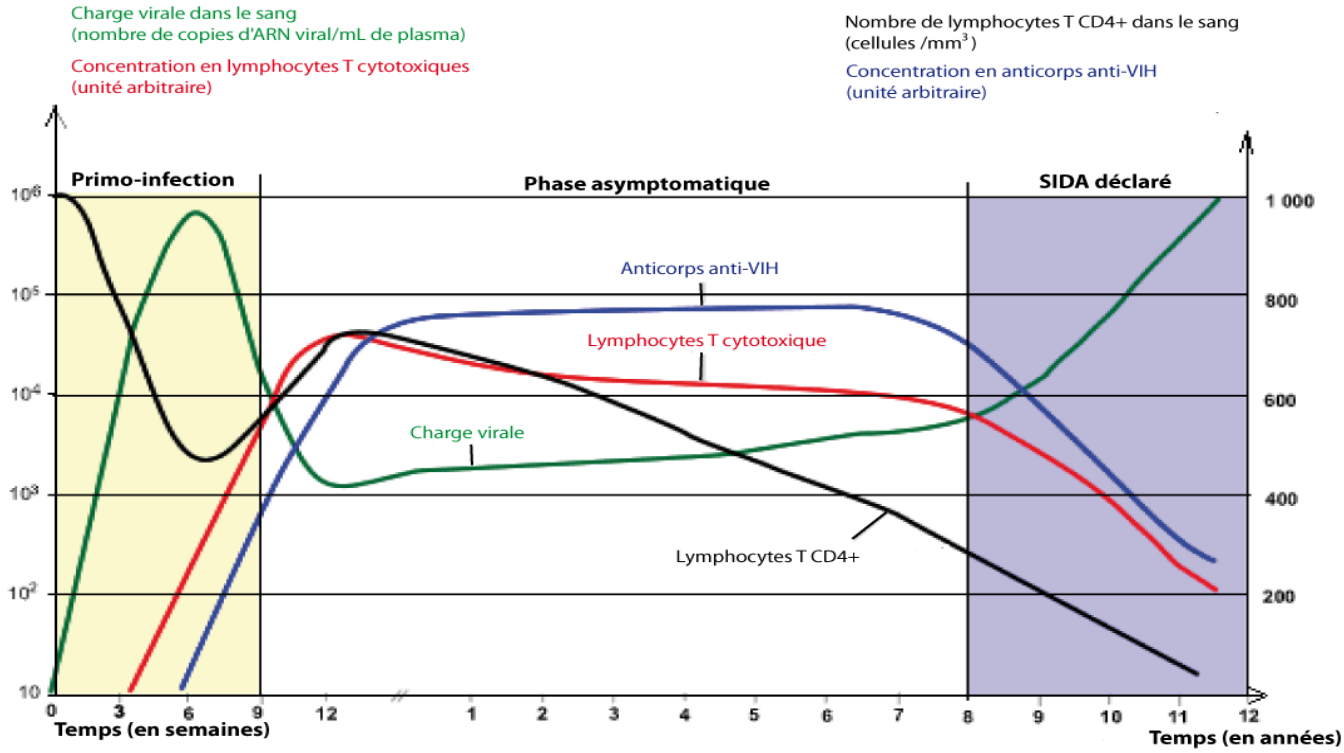


Figure 23. Profil d'évolution des paramètres virologiques et immunologiques sériques au cours de l'infection par le VIH-1. Les trois phases de l'infection par le VIH-1 sont déterminées selon l'évolution de la charge virale plasmatique (en vert), du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants (en noir), de la concentration en lymphocytes T cytotoxiques (en rouge) et de la concentration en anticorps anti-VIH-1(en bleu) au court du temps.

La charge virale et le taux de lymphocytes T CD4+ sont les deux principaux paramètres permettant d'apprécier l'évolution de l'infection (Coffin, 1995). En dépit de la présence d'une réponse humorale et lymphocytaire T cytotoxique antivirale, la multiplication virale va persister et entraîner la destruction progressive du système immunitaire (Koup et al., 1994; Lyles et al., 2000; Mellors et al., 2007; Wei et al., 1995). Cette destruction se traduit par une diminution progressive du taux de lymphocytes T CD4+ circulants qui aboutit finalement, en l'absence de traitement, au SIDA. Au cours de cette phase de SIDA, une augmentation très importante du nombre de virus circulants est observée, traduisant la rupture de l'équilibre relatif installé au cours du stade asymptomatique au profit du virus. L'état de profond déficit immunitaire ainsi instauré va aboutir à l'apparition chez ces patients, d'infections opportunistes et/ou de pathologies malignes fatales. La corrélation entre la sévérité des symptômes et le nombre total de lymphocytes T CD4+ est bien établie et représente toujours un critère de pronostic.

II. Le tropisme viral

A. Notion générale sur le tropisme du VIH-1

La capacité du VIH-1 à infecter différentes populations de cellules détermine le tropisme viral. Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 vont jouer un rôle majeur dans ce tropisme **(Figure 24)**. Les souches de VIH-1 utilisant spécifiquement le corécepteur CCR5 ont la capacité d'infecter les macrophages et sont qualifiées de "M-tropiques" ou "R5" (Alkhatib et al., 1996). Les virus R5 sont présents durant la phase précoce et asymptomatique de la maladie (Huang et al., 1996; Liu et al., 1996). Les souches utilisant préférentiellement le corécepteur CXCR4 infectent principalement les lymphocytes T CD4+. Ces souches sont dites "T-tropiques" ou "X4" (Oberlin et al., 1996). Les virus X4 sont plus fréquemment observés durant la phase tardive de la maladie au moment du SIDA. Une troisième population virale capable de se fixer indifféremment sur les corécepteurs CCR5 et CXCR4 peut exister. Les souches en question sont dites à double tropisme ou "X4R5". Les virus R5X4 sont également observés durant la phase tardive de la maladie au moment du SIDA.

Des études approfondies ont permis de montrer que le tropisme viral était principalement dépendant de domaines localisés dans la SUgp120 qui conditionneraient le choix du corécepteur (boucle variable V3) ou qui seraient impliqués dans la reconnaissance du corécepteur (Rosen et al., 2006).

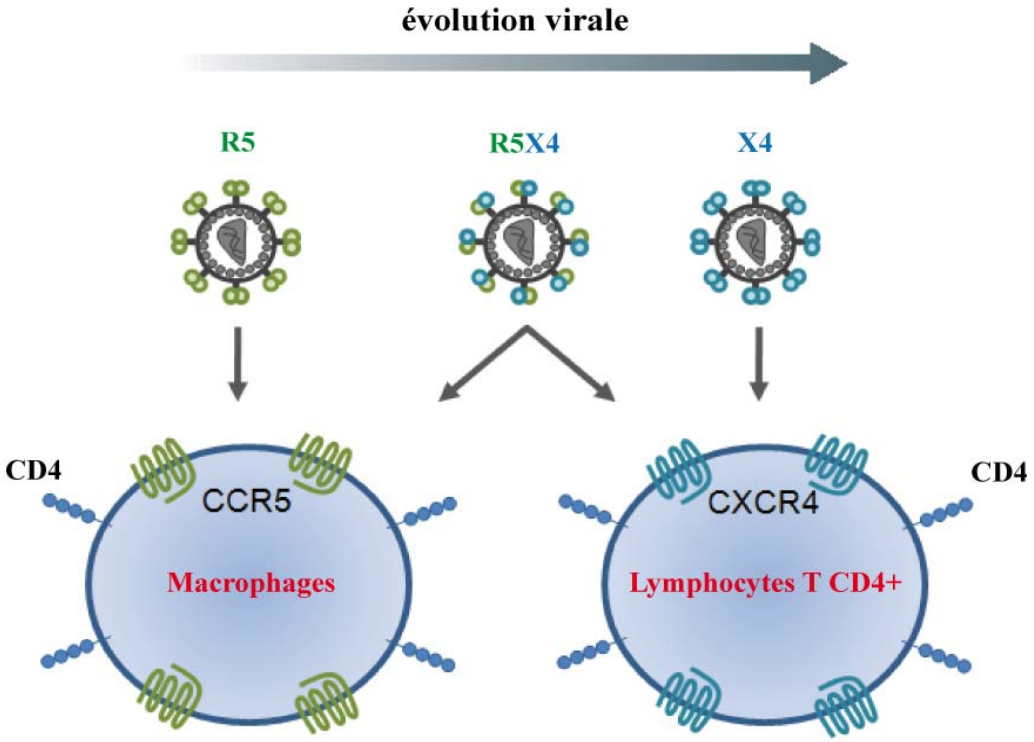


Figure 24. Tropisme du VIH-1. L'entrée du VIH-1 dans une cellule cible nécessite son interaction avec son récepteur principal, le CD4, mais aussi avec un corécepteur, le CCR5 ou le CXCR4. Ce sont d'ailleurs ces corécepteurs qui vont déterminer le tropisme viral. Les souches de VIH-1 utilisant spécifiquement le corécepteur CCR5 ont la capacité d'infecter les macrophages et sont qualifiées de "M-tropiques" ou "R5", alors que celles utilisant préférentiellement le corécepteur CXCR4 infectent principalement les lymphocytes T CD4+ et sont dites "T-tropiques" ou "X4". Une troisième population virale capable de se fixer indifféremment sur les corécepteurs CCR5 et CXCR4 peut exister. Les souches en question sont dites à double tropisme ou "R5X4". Les souches R5 étant responsables de la transmission du VIH-1 et les souches X4 de la pathogénèse virale et de l'avancée vers un stade SIDA, des conversions phénotypiques R5-X4 apparaissent progressivement au cours de l'évolution de la maladie.

Les souches R5 étant responsables de la transmission du VIH-1, des conversions phénotypiques R5-X4 vont apparaître progressivement au cours de l'évolution de la maladie. Des variants X4 très pathogènes émergent ainsi chez environ 50% des individus contaminés lors de l'évolution vers la phase de SIDA. Cette conversion est rendue possible par des substitutions d'acides aminés au niveau de la boucle V3 de la SUgp120 occasionnées par la RT lors de la réplication virale (Fouchier et al., 1992).

B. Les cellules cibles du VIH-1

Le VIH-1 possède la capacité d'infecter de manière prépondérante les cellules du système immunitaire de l'organisme comme les cellules dendritiques (DCs), les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+), les macrophages et les monocytes, mais aussi certaines cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux. Cependant, toutes ces cellules ne présentent pas la même susceptibilité à l'infection. En effet, les lymphocytes T CD4+ activés, ayant pour fonction de coordonner l'ensemble des réactions immunes humorales et cellulaires, constituent la cible privilégiée du VIH-1 et sont le siège d'une multiplication virale intense. A l'inverse, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) représentées par les monocytes et macrophages, les cellules de Langherans, les cellules folliculaires dendritiques ganglionnaires et les cellules microgliales du système nerveux central (SNC) peuvent être nettement plus restrictives quant au cycle de multiplication virale. Enfin, les monocytes et les lymphocytes T CD4+ quiescents sont les plus réfractaires à l'infection, mais peuvent néanmoins être infectés de façon latente et constituer des réservoirs potentiels du virus *in vivo*.

a. Les cellules dendritiques

Dans le cas d'une contamination par voie sexuelle, le VIH-1, libre ou présent dans des cellules mononucléées (lymphocytes, macrophages), doit traverser les muqueuses épithéliales pour atteindre des sites de réplication dans les tissus lymphoïdes. Au niveau de ces muqueuses, les DCs sont les principales cibles du VIH-1. Ces cellules sont classées en fonction des lectines calcium-dépendantes qu'elles expriment : DC-SIGN pour les DC et la langhérine pour les cellules de Langhérans.

Les DCs, stimulées par le VIH-1, subissent un processus de maturation et deviennent des CPA qui transitent dans le sang et les tissus. Cette maturation est associée à la capture d'antigènes viraux au niveau des tissus et à une migration vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire spécifique. Dans les organes lymphoïdes, les

DCs peuvent présenter les antigènes associés aux molécules du CMH de classe II et transmettre le virus aux lymphocytes T CD4+ par divers mécanismes d'infection. La transmission du virus aux lymphocytes T peut se faire consécutivement à l'infection des DCs qui expriment les récepteurs du VIH-1 (CD4 et CCR5) et à une production virale *de novo* (Magerus-Chatinet et al., 2007), mais aussi par un mécanisme de *trans*-infection impliquant la capture du virus par les DCs et son transfert aux lymphocytes T sans qu'il n'y ait eu d'infection productive (Blauvelt et al., 1997; Cameron et al., 1992). Ce dernier phénomène implique l'interaction de la SUgp120 avec des molécules de surface des DCs telles que DC-SIGN et l'internalisation du virus dans des compartiments intracellulaires endosomaux (Geijtenbeek et al., 2000). De plus, il a été récemment montré que la transmission du virus par les DCs se faisait principalement par un transfert direct de cellule à cellule impliquant la formation d'une "synapse virologique" entre une DC et un LT CD4+ (Piguet and Steinman, 2007).

Dans les muqueuses épithéliales, le VIH-1 peut également, en phase précoce de l'infection, infecter les cellules de Langherans qu'il rencontre et qui expriment aussi les récepteurs CD4 et CCR5 (Kawamura et al., 2005; Reece et al., 1998).

b. Les lymphocytes T CD4+

Les LT CD4+ qui expriment le récepteur viral CD4 et les deux types de corécepteurs (CCR5 et CXCR4) selon leur état d'activation, constituent également une cible majeure du VIH-1 *in vivo*. Les lymphocytes T naïfs expriment de façon prépondérante CXCR4, alors que les lymphocytes T activés ou mémoires expriment majoritairement CCR5 (Bleul et al., 1997). Ces cellules sont redistribuées *via* le sang et la lymphe vers la plupart des organes, permettant ainsi une dissémination active du virus dans tout l'organisme, notamment grâce à un transfert direct de cellule à cellule au travers de "synapses virologiques" et "polysynapses" (Piguet and Sattentau, 2004; Rudnicka et al., 2009; Sourisseau et al., 2007).

Même si les lymphocytes T CD4+ peuvent être activés par une CPA au niveau des organes lymphoïdes secondaires, la majorité d'entre eux restent quiescents. Ces LT CD4+ quiescents, bloqués au stade G_0 du cycle cellulaire, sont plus réfractaires à l'infection. Ils peuvent tout de même être infectés de façon latente par le VIH-1 et constituer alors des réservoirs viraux potentiels *in vivo*. Ces cellules quiescentes assurent ainsi non seulement la transmission de l'ADN viral aux cellules descendantes à chaque mitose, mais en plus, confèrent au virus une certaine invisibilité antigénique (Finzi et al., 1997). Cet état de latence

semble résulter du ralentissement ou de l'inhibition d'un certain nombre d'événements du cycle de multiplication virale comme le désassemblage de la nucléocapside (Auewarakul et al., 2005), la transcription inverse (Korin and Zack, 1998; Pierson et al., 2002; Plesa et al., 2007; Swiggard et al., 2004; Zack et al., 1992; Zhou et al., 2005), l'import nucléaire de l'ADNc (Sun et al., 1997) ou encore l'intégration de l'ADNc dans le génome cellulaire (Bukrinsky et al., 1991; Stevenson et al., 1990). Au sein de ces cellules quiescentes, la réplication virale peut cependant reprendre ultérieurement suite à une activation cellulaire.

c. Les macrophages

Les macrophages sont des CPA douées de phagocytose qui sont, de ce fait, capables de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T et d'intervenir dans la réponse immunitaire adaptative. Ils jouent également un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée et notamment dans l'inflammation via la sécrétion de cytokines.

Tout comme les DCs, les macrophages présents au niveau des muqueuses, constituent une cible privilégiée des souches R5 de VIH-1. En effet, ces cellules qui expriment le récepteur viral CD4, ainsi que les corécepteurs CCR5 et CXCR4, sont parmi les premières cellules infectées par le VIH-1 au cours de l'infection. Malgré la présence du corécepteur CXCR4 à la surface des macrophages, la multiplication des souches à tropisme X4 dans ces cellules reste très controversée (Verani et al., 2005). Les macrophages présentent également à leur surface l'intégrine LFA-1 (Hioe et al., 2001) qui, en se liant à son récepteur ICAM-1 parfois exprimé sur l'enveloppe du VIH-1, peut favoriser l'infection (Paquette et al., 1998). Ces cellules, qui résultent de la différenciation de monocytes sanguins, assurent, grâce à leurs propriétés migratoires, une dissémination active du virus dans tout l'organisme.

Parallèlement à l'infection du système immunitaire, les macrophages sont impliqués également de manière prépondérante dans la transmission du VIH-1 aux cellules du SNC puisqu'ils sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Les macrophages migrent à travers cet épithélium vasculaire par différents mécanismes incluant le passage direct entre deux cellules épithéliales ou la transcytose au niveau d'une cellule épithéliale. Ainsi, dans le SNC, les macrophages périvasculaires et les cellules microgliales, constituent les principales cibles du VIH-1. Le VIH ne se réplique que très faiblement au sein des cellules microgliales. Cependant, puisque ces cellules présentent une demi-vie relativement longue, elles peuvent constituer un réservoir potentiel du virus (Cavert and Haase, 1998; Ho, 1998).

d. Les monocytes

Les monocytes sont les cellules de la lignée myéloïde qui sont à l'origine des macrophages et des DCs. Ces cellules, présentes dans le sang, sont capables de transiter vers les tissus où elles subissent, après stimulation, un processus de différenciation en macrophages.

Ces cellules qui expriment en surface le récepteur viral CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 sont réfractaires à l'infection, mais peuvent néanmoins être infectées de façon latente. De ce fait, elles constituent un réservoir non négligeable pour le VIH-1, le protégeant ainsi des thérapies antivirales et du système immunitaire. Comme pour les LT CD4+ quiescents, l'état de latence observé chez les monocytes quiescents semble résulter d'un ralentissement ou de l'inhibition d'un certain nombre d'événements du cycle de multiplication virale comme la transcription inverse (Arfi et al., 2008; Sonza et al., 1996; Triques and Stevenson, 2004), l'import nucléaire de l'ADNc (Arfi et al., 2008; Neil et al., 2001), mais aussi la transcription de l'ADN proviral (Dong et al., 2009; Sung and Rice, 2009; Wang et al., 2009).

Ces cellules jouent également un rôle important dans la transmission du virus aux cellules du SNC en raison de leur capacité à passer la barrière hémato-encéphalique (Crowe et al., 2003).

e. Les autres types cellulaires ciblés par le VIH-1

D'autres cellules du système immunitaire peuvent, à moindre échelle, être la cible du VIH-1 : les lymphocytes B (De Silva et al., 2001), les polynucléaires neutrophiles (Ali et al., 2003), les mastocytes (Sundstrom et al., 2004), les lymphocytes T CD8+ (Zerhouni et al., 2004a) et les cellules NK et NKT ("*Natural Killer & Natural Killer T cells*") (Valentin and Pavlakis, 2003). De plus, le VIH-1 serait également capable d'infecter les cellules intestinales (Fantini et al., 1992). Les cellules épithéliales des muqueuses (CD4-) constitueraient ainsi une autre voie potentielle pour l'entrée du VIH-1 dans l'organisme. En effet, elles peuvent permettre le passage par transcytose du virus de leur surface apicale vers leur partie basolatérale, sans pour autant devenir infectieuses (Bomsel, 1997; Fantini et al., 1993). Le phénomène de transcytose est extrêmement rapide (1h) et semble ne nécessiter qu'une interaction entre les glycoprotéines SUgp120/TMgp41 et les glycosphingolipides et les protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate présents en grande quantité à la surface des cellules épithéliales. De plus, le virus peut traverser la barrière épithéliale de façon directe, en

cas de lésions (Fleming and Wasserheit, 1999) ou en passant entre deux cellules épithéliales (Tan and Phillips, 1996).

III. Réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire

L'infection par le VIH-1 se traduit très précocement par l'établissement d'une forte réponse immunitaire cellulaire menée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTLs) (Plata et al., 1987; Walker et al., 1987). Cette réponse cellulaire est temporellement associée à un contrôle de la multiplication du VIH-1 durant la phase aiguë et chronique de l'infection, à un déclin rapide de la charge virale au cours de la primo-infection et à une progression ralentie de la maladie (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; Ogg et al., 1998; Walker et al., 1986; Yang et al., 1997). Le contrôle de la multiplication virale est notamment associé à un ciblage spécifique du $Pr55^{Gag}$ (Jiao et al., 2006b; Zuniga et al., 2006) plutôt que d'autres protéines virales comme les Env ou les protéines auxiliaires (Jiao et al., 2006a; Kiepiela et al., 2007) par les CTLs.

Les CTLs présentent un large éventail d'activités antivirales. En effet, ces cellules présentent non seulement la capacité de lyser les cellules T CD4+ infectées par le virus (Hadida et al., 1999; Shankar et al., 1999; Yang et al., 1996), mais aussi de sécréter des facteurs solubles tels que des cytokines et des chimiokines permettant le contrôle de l'infection en régulant la multiplication du VIH-1 (Bollinger et al., 1993; Cocchi et al., 1995; Jassoy et al., 1993; Price et al., 1998; Price et al., 1995; Wagner et al., 1998).

Les CTLs sont initialement activés suite à un processus de reconnaissance d'épitopes viraux présentés par diverses molécules du CMH de classe I. Ce mécanisme d'activation des CTLs peut d'ailleurs être inhibé initialement par la protéine Nef du VIH-1 qui est capable de perturber la présentation antigénique en réduisant l'expression à la surface des cellules infectées des molécules du CMH de classe I (Atkins et al., 2008; Lubben et al., 2007; Roeth et al., 2004; Schaefer et al., 2008; Stumptner-Cuvelette et al., 2001; Williams et al., 2002). La cellule infectée échapperait ainsi à la surveillance des CTLs (Collins et al., 1998).

Ces molécules HLA présentent notamment la caractéristique de se différencier par leur capacité à présenter les épitopes viraux à la surface cellulaire et leur susceptibilité à moduler la réponse CTL. La nature des molécules HLA impliquées dans la modulation de la réponse CTL et dans le contrôle de l'infection à VIH-1 constitue d'ailleurs un déterminant important de la progression de l'infection vers un stade SIDA (Carrington et al., 1999; MacDonald et al., 2000; Roger, 1998). De façon intéressante, certains allèles des molécules HLA de classe I ont

été associés à un bon contrôle de la réplication virale et à une lente progression de l'infection (HLA-B27, HLA-B57 et HLA-B5801) en induisant au cours de la phase aiguë de l'infection une réponse CTL immunodominante très efficace à l'encontre d'épitopes spécifiques du VIH-1 (Altfeld et al., 2003; Altfeld et al., 2006; Carrington and O'Brien, 2003; Kaslow et al., 1996; Magierowska et al., 1999; McNeil et al., 1996; Migueles et al., 2000; Scherer et al., 2004; Streeck et al., 2007). A l'inverse, d'autres allèles ont été associés à un mauvais contrôle de la réplication virale et à une augmentation de la susceptibilité d'une évolution rapide de la maladie (HLA-A1, HLA-29, HLA-A68, HLA-B8, HLA-B35) (Carrington et al., 1999; Hendel et al., 1999). De plus, de multiples études ont clairement montré, qu'au cours de la primo-infection, un nombre limité d'épitopes viraux dits "immunodominants" était préférentiellement ciblé par les CTLs (Altfeld et al., 2001; Altfeld et al., 2006; Dalod et al., 1999), ceci suggérant que la spécificité de la réponse CTL soit responsable du contrôle initial de la réplication virale. A l'inverse, à un stade d'infection chronique, les CTLs ciblent un large éventail d'épitopes viraux et la notion d'immunodominance s'estompe.

Peu de choses sont connues quant aux mécanismes déterminant l'immunodominance des épitopes viraux durant la primo-infection. Cependant différents facteurs tels que le niveau d'expression intracellulaire des protéines virales, la cinétique d'apprêtement des épitopes, leur affinité de liaison aux molécules HLA de classe I et l'affinité de liaison des complexes peptides/molécules HLA de classe I aux récepteurs des CTLs (TCR) et leur répertoire, ont été impliqués dans le déterminisme de l'immunodominance des épitopes (Yewdell and Bennink, 1999; Yewdell and Del Val, 2004).

Malgré l'établissement d'une intense réponse CTL, le contrôle de l'infection par le VIH-1 n'est que partiel en raison de l'apparition de populations virales échappant au processus de reconnaissance par les CTLs (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994). En effet, la forte pression exercée par la réponse CTL induit fréquemment la sélection dynamique de variants viraux au cours de la phase aiguë (Borrow et al., 1997; Cao et al., 2003; Lichterfeld et al., 2007; Price et al., 1997) ou chronique (Allen et al., 2004; Allen et al., 2005; Feeney et al., 2004; Geels et al., 2003; Goulder et al., 1997; Liu et al., 2007) de l'infection. Ce phénomène résulte de l'apparition aléatoire de mutations au niveau des épitopes immunodominants (ou des régions flanquantes) reconnus par les CTLs qui perturbent tous les mécanismes de présentation par les molécules HLA de classe I et de reconnaissance des épitopes viraux (Allen et al., 2004; Draenert et al., 2004; Goulder et al., 1997; Kelleher et al., 2001; Leslie et al., 2004; Price et al., 1997; Yokomaku et al., 2004). Cet échappement du VIH-1 aux CTLs se

traduit inéluctablement par une perte du contrôle de la réplication du VIH-1 et une progression accélérée de la maladie vers le stade SIDA (Goulder et al., 1997; Kelleher et al., 2001).

Cependant, il a été clairement montré *in vitro* que les mutations épitopiques permettant un échappement du VIH-1 à la réponse CTL étaient responsables d'une diminution du "*fitness*" de multiplication des mutants viraux (Liu et al., 2007; Martinez-Picado et al., 2006; Peyerl et al., 2004). L'impact de ces mutations sur le "*fitness*" viral est d'ailleurs épitope-dépendant (Iversen et al., 2006; Troyer et al., 2009). En effet, les mutations d'échappement qui affectent les épitopes présents au niveau des Env sont souvent sans effet sur le "*fitness*" ou au contraire l'augmentent, alors que celles qui affectent les épitopes présents au niveau du $Pr55^{Gag}$ le diminuent systématiquement et significativement.

Cet impact des mutations d'échappement sur le "*fitness*" viral est d'ailleurs conforté par un certain nombre d'observations. La mise en évidence de phénomènes de réversion des mutations d'échappement lors d'une transmission à un nouvel hôte présentant d'autres allèles restrictifs de molécules HLA de classe I a notamment suggéré le fait que ces mutations soient associées à une diminution du "*fitness*" viral (Allen et al., 2004; Friedrich et al., 2004; Herbeck et al., 2006; Leslie et al., 2004; Navis et al., 2008). De plus, la mise en évidence de phénomènes compensatoires des mutations d'échappement par des mutations extra-épitopiques, permettant ainsi une restauration partielle du "*fitness*" viral et un retardement de la réversion de la mutation d'échappement, soutient également l'existence de ce phénomène (Crawford et al., 2007; Kelleher et al., 2001). Enfin, l'introduction de mutations d'échappement au niveau des épitopes du VIH-1 a été montrée responsable de la réduction des capacités de multiplication des variants viraux (Brockman et al., 2007; Martinez-Picado et al., 2006; Peyerl et al., 2004).

Ainsi, le VIH-1 est contraint en permanence à un équilibre dynamique entre la conservation de son "*fitness*" de multiplication et son échappement à la réponse CTL (Cao et al., 2003; Martinez-Picado et al., 2006; Prado et al., 2009; Price et al., 1997). De ce fait, les mutations d'échappement viral sont rarement observées au niveau d'épitopes localisés dans des régions du virus structurellement importantes pour sa multiplication (Allen et al., 2005; Goulder et al., 1997; Kelleher et al., 2001; Wagner et al., 1999). C'est pour cette raison que certains épitopes sont donc capables de persister après plusieurs années d'infection malgré une forte réponse CTL (Brander et al., 1998; Hay et al., 1999; Koibuchi et al., 2005; Meyerhans et al., 1991).

L'hétérogénéité et la complexité de la réponse CTL, observées lors d'infections chroniques chez de nombreux patients, résultent de vagues successives d'échappement viral à des populations de CTLs suivies immédiatement de l'établissement de nouvelles réponses des CTLs spécifiques de ces nouveaux épitopes mutants sous-dominants. La situation devient bien évidemment critique chez les patients dont la population lymphocytaire T CD4+ est fortement touchée et ne peut pas assurer l'amorçage de ces réponses CTLs successives.

IV. Réponse immunitaire adaptative à médiation humorale

Au cours de l'infection naturelle par le VIH-1, une réponse humorale s'établit progressivement à l'encontre notamment des protéines virales structurales (Mascola, 2003). Ainsi, dès les premières semaines suivant la primo-infection, des anticorps spécifiques du virus autologue, et plus particulièrement spécifiques des glycoprotéines d'enveloppe (SUgp120 et TMgp41), de la capside (CAp24) et de la matrice (MAp17), sont généralement très rapidement produits et détectables dans le plasma des individus infectés (Aasa-Chapman et al., 2004; Binley et al., 1997; Logvinoff et al., 2004; Pellegrin et al., 1996; Pilgrim et al., 1997; Pincus et al., 1994). Parmi l'ensemble des anticorps synthétisés, seule une petite fraction présente une réelle activité neutralisante permettant l'inhibition de l'infection virale (Parren et al., 1999). On parle alors d'anticorps neutralisants (AcN). De par leur fonction, les Env, et plus particulièrement la SUgp120 qui est largement exposée à la surface virale, constituent une cible privilégiée de ces AcN. Les régions structurales de la SUgp120 qui sont préférentiellement reconnues par ces anticorps correspondent aux boucles variables V1/V2 et V3 et aux sites de liaison au CD4 (CD4bs, "*CD4 binding site*") ou aux corécepteurs (Kwong et al., 1998; McKeating et al., 1996; Moore and Sodroski, 1996; Sattentau, 1996; Wyatt and Sodroski, 1998). Parmi toutes les régions qui induisent une réponse neutralisante, la boucle V3 de la TMgp120 est d'ailleurs considérée comme une cible majeure de la réponse immune de l'hôte (Javaherian et al., 1989; LaRosa et al., 1991; Zolla-Pazner, 2004). A l'inverse, très peu d'AcN semblent être dirigés spécifiquement contre la TMgp41 du fait de sa séquestration dans le cytoplasme cellulaire et de sa faible accessibilité lorsqu'elle se présente dans sa conformation native trimérique (Binley et al., 1996; Earl et al., 1997; Miller et al., 2005; Sattentau et al., 1995). De ce fait, les AcN interfèrent avec l'étape essentielle d'entrée du virus dans la cellule cible lors du cycle de multiplication virale (Dimmock, 1993; Humbert and Dietrich, 2006; Klasse and Sattentau, 2001; Pierson and Doms, 2003). En effet, la majorité des AcN neutralise les virions libres en prévenant initialement leur attachement aux récepteurs présents à la surface des cellules

cibles du VIH-1 (CD4, CCR5 et CXCR4) (Decker et al., 2005; Klasse and Sattentau, 2002; Pantophlet and Burton, 2006; Parren and Burton, 2001; Trkola et al., 1996a; Xiang et al., 2002). Ce phénomène d'inhibition de l'adsorption du virus à la surface cellulaire résulterait d'ailleurs d'un encombrement stérique de la particule virale engendré par la fixation de ces AcN (Klasse and Moore, 1996; Parren and Burton, 2001). Ces AcN interfèrent également avec le processus de fusion des membranes virale et cellulaire médié par la TMgp41 (Golding et al., 2002; Gorny and Zolla-Pazner, 2000; He et al., 2003).

Malgré l'absence d'activité neutralisante, des anticorps dits "non-neutralisants" pourraient également participer au contrôle de l'infection par le VIH-1 en activant les fonctions de plusieurs effecteurs du système immunitaire (Huber and Trkola, 2007) **(Figure 25)**. De ce fait, ces anticorps seraient impliqués dans la clairance du virus, notamment en provoquant la phagocytose des agrégats immuns de particules virales, la lyse des virions par le complément (Blue et al., 2004; Spear et al., 1994) et la lyse des cellules infectées *via* l'activation des cellules NK (ADCC, "*Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity*") ou du complément (CDCC, "*Complement-Dependant Cellular Cytotoxicity*") (Aasa-Chapman et al., 2005; Ahmad and Menezes, 1996; Ahmad et al., 2001; Sinclair et al., 1988).

Plus rarement, sont également mis en évidence des AcN de large spectre, c'est-à-dire capables de neutraliser *in vitro* un grand nombre d'isolats primaires hétérologues, appartenant même à différents sous-types (Barin et al., 2004). Ces AcN de large spectre, lorsqu'ils sont présents, apparaissent plusieurs années après la primo-infection et sont le plus fréquemment rencontrés chez les patients asymptomatiques à long terme (Braibant et al., 2006; Cao et al., 1995; Carotenuto et al., 1998; Cecilia et al., 1999). A ce jour, seulement quelques anticorps monoclonaux humains neutralisants de large spectre ont été isolés à partir d'individus infectés (Binley et al., 2004).

Il s'agit des anticorps 2G12 et IgG1b12 qui reconnaissent au niveau de la SUgp120 respectivement un épitope conformationnel glycanes-dépendant (Sanders et al., 2002; Scanlan et al., 2002; Scanlan et al., 2003; Trkola et al., 1996b) et un épitope chevauchant le site de liaison au récepteur CD4 de la SUgp120 (Zhou et al., 2007), mais aussi des anticorps 2F5 et 4E10 qui reconnaissent des épitopes adjacents situés sur l'ectodomaine de la TMgp41 au niveau de la région proximale à la membrane virale (MPER, "*Membrane Proximal External Region*") (Alam et al., 2007; Cardoso et al., 2005; de Rosny et al., 2004; Muster et al., 1993; Ofek et al., 2004; Parker et al., 2001; Purtscher et al., 1994; Stiegler et al., 2001; Zwick et al., 2001).

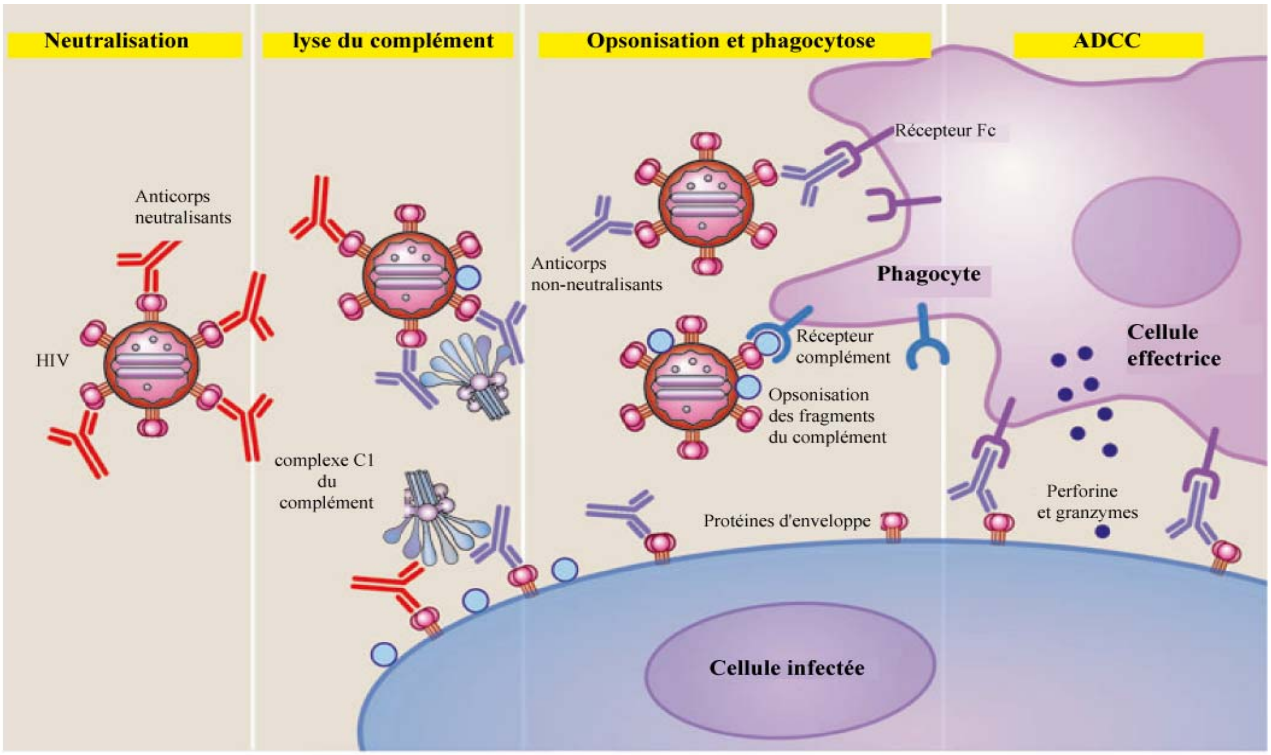


Figure 25. Différents mécanismes d'action des anticorps intervenant dans le contrôle de l'infection par le VIH-1. Initialement, les virions libres néosynthétisés peuvent être reconnus par des anticorps dits "neutralisants" (AcN) qui se fixent au niveau des Env exprimées en leur surface et être lysés suite à une activation de la voie du complément. Ces AcN peuvent aussi induire la lyse complément-dépendante des cellules infectées (CDCC) suite à leur fixation sur les Env virales exprimées en surface cellulaire. Les anticorps dits "non neutralisants" peuvent selon le même procédé que les AcN permettre la lyse complément-dépendante des cellules infectées. De plus, ces anticorps peuvent provoquer la clairance virale notamment en provoquant la phagocytose des agrégats immuns de particules virales, suite à une reconnaissance par les phagocytes de molécules du complément ou d'anticorps associés à la surface virale. Enfin ces mêmes anticorps peuvent aussi induire une lyse des cellules infectées médiée par les cellules NK ("*Natural Killer*") (ADCC) qui libèrent des protéines telles que la perforine et les granzymes.
[D'après Huber & Trkola, 2007]

Très récemment, Burton et collaborateurs ont mis en évidence deux nouveaux anticorps neutralisants de large spectre, nommé PG9 et PG16, reconnaissant spécifiquement des épitopes du VIH-1 localisés dans des régions conservées des boucles V2 et V3 de la SUgp120 dans sa conformation trimérique (Walker et al., 2009).

Au cours de nombreuses études, il a été clairement montré que la réponse neutralisante autologue était dirigée uniquement contre les variants viraux plasmatiques présents plusieurs semaines avant le prélèvement et non pas contre les variants contemporains présents dans le prélèvement. Ce phénomène suggère donc un échappement continuel du VIH-1 à la réponse humorale de l'hôte. En effet, la forte pression de sélection exercée par les AcN induit une rapide évolution génétique du VIH-1 qui se traduit par l'émergence de multiples mutants d'échappements aux AcN ayant développés des stratégies pour réduire le niveau d'exposition des épitopes reconnus par les AcN (Albert et al., 1990; Humbert and Dietrich, 2006; Johnson and Desrosiers, 2002; Richman et al., 2003; Wei et al., 2003). Cette diversité génétique est cependant susceptible d'affecter le "fitness" viral (Deeks et al., 2006).

L'échappement des variants contemporains à la réponse des AcN est dû en partie à l'augmentation et surtout à la redistribution des sites de N-glycosylation au niveau de la SUgp120 qui est richement N-glycosylée (Bunnik et al., 2008; Dacheux et al., 2004; Kwong et al., 2002; Lue et al., 2002; McCaffrey et al., 2004; Wei et al., 2003) **(Figure 26)**. En effet, les N-glycanes, de par leur taille imposante, constituent un "bouclier glycanique" qui, par encombrement stérique, limite l'accessibilité aux épitopes neutralisants avoisinants et empêche la liaison des AcN. A l'inverse, l'élimination de certains sites de N-glycosylation au niveau des Env du VIH-1 a été montrée se traduire par une sensibilité accrue aux AcN (Kolchinsky et al., 2001; McCaffrey et al., 2004; Quinones-Kochs et al., 2002). L'échappement viral à la neutralisation a été également corrélé à l'apparition de nombreuses mutations au niveau des épitopes reconnus par les AcN (Blay et al., 2007; D'Costa et al., 2001; Frost et al., 2005; Richman et al., 2003; Yoshida et al., 1997) **(Figure 26)**.

En dépit du fait que l'implication du DC des Env dans le processus de neutralisation ne soit que très peu étudiée, une étude a d'ailleurs mis en évidence un mécanisme selon lequel une simple mutation d'un motif structural très conservé du DC de la TMgp41 (motif LLP-2) induirait une résistance des virus mutants à la neutralisation (Kalia et al., 2005).

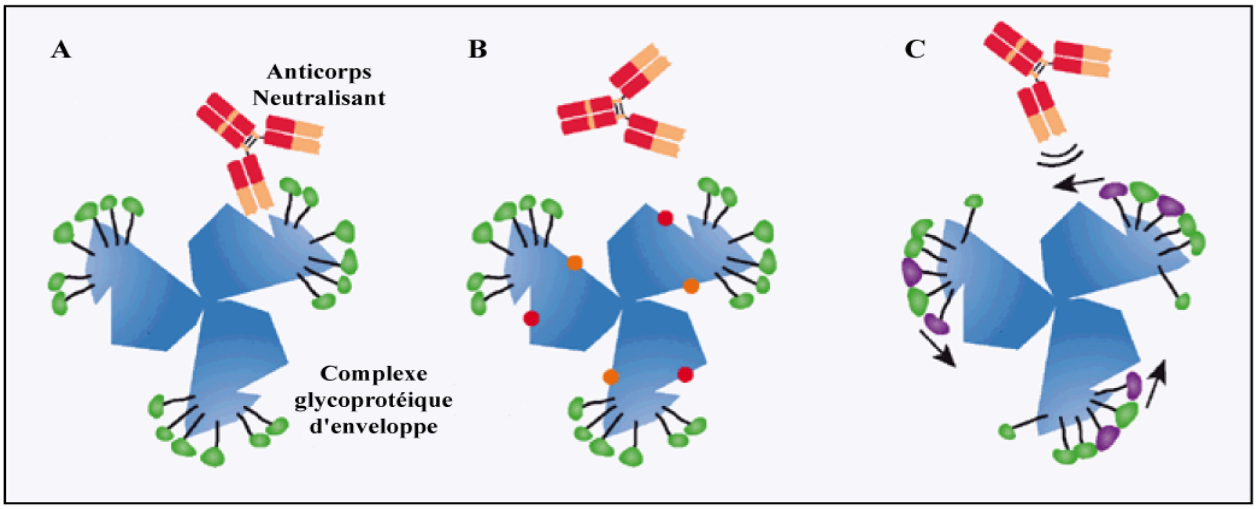


Figure 26. Mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse humorale neutralisante. Les anticorps neutralisants (AcN) sont normalement capables de neutraliser les virions néosynthétisés en se fixant au niveau d'épitopes localisés dans les Env virales (A). Cependant, des modifications conformationnelles de ces épitopes résultant de l'apparition de mutations au sein des Env (B) ou un encombrement stérique de ces épitopes résultant de l'addition ou de la redistribution des sites de N-glycosylation des Env (C) peuvent être à l'origine d'une limitation de l'accès des AcN aux épitopes et, de ce fait, d'un échappement du VIH-1 à la réponse humorale neutralisante.
[D'après Mascola *et al.*, 2003]

Cette mutation du DC de la TMgp41 serait à l'origine d'un changement conformationnel des ectodomaines de la SUgp120 et de la TMgp41, alors mal reconnus par les AcN. Un rôle du DC des Env du SIV dans la modulation de la conformation de leur ectodomaine avait d'ailleurs été déjà souligné lors d'études impliquant des virus arborant des DC fortement tronqués (Spies et al., 1994). De cette manière, les variations antigéniques observées au niveau du DC de la TMgp41 modulerait l'antigénicité de l'ectodomaine des Env du VIH-1.

Le VIH-1 est donc un virus qui présente une grande plasticité qui lui permet de s'adapter de façon optimale à l'environnement immunologique auquel l'hôte infecté le soumet. En effet, au cours du temps, ce virus a développé toute une panoplie de stratégies lui permettant de se multiplier efficacement et de persister *in vivo* en dépit de l'établissement d'une forte réponse immune de l'hôte et de l'initiation d'une éventuel traitement antirétroviral. De ce fait, ce virus est vraiment difficilement contrôlable par les acteurs du système immunitaire.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

I. Objectifs de l'étude

Dans le cadre de précédents travaux sur la diversité antigénique des enveloppes de VIH-1 primaires, notre équipe a publié en 2004 une étude confortant l'hypothèse d'un bouclier glycanique évolutif au niveau des glycoprotéines d'enveloppe de VIH-1 primaires. Cette étude avait été réalisée en analysant les propriétés antigéniques des glycoprotéines d'enveloppe codées par des gènes *env* isolés à partir de prélèvements effectués lors de la primo-infection (clones précoces) et au moins 4 ans plus tard (clones tardifs) chez quatre patients infectés par le VIH-1 (Dacheux et al., 2004). Lors de l'analyse des séquences, nous avons observé que l'ensemble des clones tardifs (15 clones obtenus à partir d'un prélèvement effectué 6 ans après la primo-infection) de gènes *env* isolés chez le patient 153 présentaient la particularité de coder des TMgp41 tronquées. Il s'agissait d'une troncation supprimant les 20 acides aminés C-terminaux du DC. Cette troncation, qui n'affectait pas le gène *rev*, conduisait à l'élimination de motifs connus dans le DC de la TMgp41 pour être impliqués dans la régulation du trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe (motif dileucine $L_{855}L_{856}$) ou dans leur incorporation à la surface des virions (motif LLP-1). Il est à noter que les clones précoces de gène *env* obtenus à partir d'un prélèvement effectué lors de la primo-infection codaient des TMgp41 qui n'étaient pas tronquées. Par ailleurs, sur le plan biologique, le patient 153 avait une charge virale à 11550 copies d'ARN VIH/mL lors du prélèvement utilisé pour obtenir les clones tardifs. Ce patient n'avait jamais été traité.

Une telle troncation aurait dû affecter les différentes fonctions des Env et aboutir à la production de virions dont la capacité infectieuse était très réduite. La description de ce cas contribuait en soi à l'originalité de mon projet. Mon travail de thèse a ensuite consisté à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une telle troncation du DC des Env du patient 153 sur la multiplication virale et à explorer les mécanismes moléculaires permettant au virus présentant cette anomalie structurale de se multiplier efficacement *in vivo*.

II. Résumé des résultats obtenus (les figures auxquelles il sera fait référence sont celles du manuscrit)

Dans un premier temps, nous avons entrepris d'analyser l'impact de la troncation du DC de la TMgp41 sur la multiplication du clone viral de référence NL(AD8) dans la lignée lymphocytaire MT4.R5. Pour cela, nous avons construit des clones viraux réplicatifs NL(AD8) recombinants contenant des séquences codant les DC des Env retrouvées aux stades

précoce (clone E) et tardif (clone L1 et L2) de l'infection **(figure 1A et 2A)**. Au cours de cette expérience, nous avons pu montrer que le virus NL(AD8) arborant un DC non tronqué (pNL(AD8)-E) était capable de se multiplier à un niveau équivalent à celui du virus NL(AD8) sauvage, alors que les virus présentant un DC tronqué (pNL(AD8)-L1, pNL(AD8)-L2) échouaient à établir une infection productive **(Figure 3A)**. Cette première analyse nous a ainsi permis de démontrer *in vitro* l'effet délétère d'une telle troncation sur la multiplication virale dans notre système d'étude et de souligner l'importance de l'intégrité du DC de la TMgp41. Des résultats similaires ont également été obtenus en cellules mononucléées du sang périphérique et en macrophages **(Figure 3D)**.

Compte tenu des interactions potentielles entre le DC de la TMgp41 et la matrice lors de l'assemblage viral et de la persistance *in vivo* du virus présentant cette anomalie structurale, nous avons émis l'hypothèse que la troncation du DC de la TMgp41 puisse être compensée par des mutations survenues dans la protéine de matrice. Cette hypothèse reposait notamment sur des travaux ayant montré un phénomène de compensation d'une altération du DC de la TMgp41 par des changements dans la protéine de matrice (Murakami and Freed, 2000a). Nous avons alors mené une analyse comparative des séquences de protéines de matrice retrouvées aux stades précoce et tardif de l'infection chez le patient 153. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence 3 substitutions (K25R, V34I et I45L) communes à toutes les séquences de matrice tardives **(Figure 2B)**. Suite à cette observation, nous avons mis en œuvre des clones viraux réplicatifs NL(AD8) recombinants arborant des protéines de matrice du VIH-1 présent chez le patient 153 au stade précoce (ME) ou tardif (ML) de l'infection associées à des Env présentant des DC tronqués ou non issues de ce même patient **(Figure 1B)**. Les cinétiques de multiplication des différents virus ont été comparées dans la lignée lymphocytaire MT4.R5 **(Figure 3B)**. Cette étude nous a permis de démontrer que l'expression de la protéine de matrice tardive était capable de compenser le défaut de multiplication viral induit par la troncation du DC de la TMgp41 des Env tardives.

Pour déterminer le potentiel compensatoire des 3 substitutions identifiées, nous avons ensuite analysé les capacités de multiplication de virus exprimant des séquences codant la matrice précoce (ME) dans laquelle toutes les combinaisons des substitutions K25R, V34I et I45L ont été introduites par mutagenèse, couplées à une séquence codant une Env tronquée tardive (L1) **(Figure 1C)**. Seuls les virus arborant des Env tronquées dans leur DC et présentant une protéine de matrice avec la substitution V34I, seule ou en combinaison avec les autres substitutions (ME/V34I-L1, ME/K25R/V34I-L1, ME/V34I/I45L-L1 et ME/K25R/V34I/I45L-L1), ont été capables de se multiplier efficacement **(Figure 3C)**. Nous

avons ainsi pu montrer que le défaut de multiplication résultant de la troncation du DC de la TMgp41 était essentiellement compensé par l'émergence progressive d'une seule substitution valine/isoleucine en position 34 de la protéine de matrice. Des expériences identiques, menées avec des cellules mononuclées du sang périphérique et des macrophages, nous ont permis de confirmer ces résultats et de montrer que l'ensemble de ces phénomènes étaient indépendants du type cellulaire **(Figure 3D)**.

Nous avons ensuite montré que la troncation du DC de la TMgp41 affectait plus spécifiquement les étapes précoces d'entrée virale, comme en témoignent les résultats des tests d'infectivité en cycle unique réalisés sur les cellules indicatrices TZM-bl (cellules HeLa CD4+, CCR5+, exprimant la luciférase et la ß-galactosidase sous contrôle d'un promoteur LTR du VIH) **(Figure 4)**. Dans la littérature, les troncations touchant le DC de la TMgp41 étant souvent associées à un déficit d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe, nous avons alors évalué par ELISA et par western blot la composition en protéines SUgp120, TMgp41 et CAp24 de virus purifiés. Seuls les virus arborant un DC tronqué et une matrice précoce (ME-L1) exhibaient clairement des niveaux d'incorporation des Env réduits **(Figure 5)**. Ce défaut d'incorporation se révélait d'ailleurs compensé par l'expression de la protéine de matrice tardive (ML-L1) ou de la protéine de matrice précoce présentant la mutation V34I (ME/V34I-L1). L'analyse par western blot est venue conforter ces résultats en montrant qu'il s'agissait bien d'un défaut d'incorporation des Env et non d'un processus de " *sheeding*" de la SUgp120 **(Figure 5)**.

L'étude du défaut d'assemblage des virus recombinants arborant un DC tronqué a été complétée par une analyse comparative en microscopie confocale de la distribution intracellulaire des protéines Gag et Env et de leur colocalisation au site d'assemblage des virions dans plusieurs modèles cellulaires, ceci à l'aide d'un anticorps anti-p17 reconnaissant spécifiquement la forme mature de la protéine de matrice et de l'anticorps anti-Env 2G12. Cette analyse nous a permis de montrer que la distribution des Env à la surface cellulaire était très affectée durant l'assemblage viral par la troncation du DC de la TMgp41 et que la substitution V34I, apparue dans la protéine de matrice, pouvait corriger cette localisation anormale des Env **(Figure 6)**. Cette observation était en accord avec le défaut d'incorporation des Env à la surface des virions observé précédemment. La perte d'infectivité due à la troncation du DC était donc au moins en partie liée à un déficit d'incorporation des Env pouvant être compensé par la substitution valine/isoleucine identifiée dans la matrice.

Par la suite, une analyse séquentielle des différents échantillons collectés chez ce patient 153 au cours du suivi de l'infection a montré que l'émergence de la troncation du DC de la

TMgp41 avait précédé l'émergence des changements apparus dans la matrice **(Table1)**. Il est cependant à noter que la rapide sélection de variants arborant une troncation du DC de la gp41 (10 clones positifs pour la troncation sur 10 testés en 1995) contrastait avec l'émergence progressive de variants portant des substitutions dans la matrice, la substitution V34I étant logiquement la première à apparaître (3 clones V34I positifs sur les 10 testés en 1995). L'évolution de la charge virale du patient 153 suggère d'ailleurs qu'une forte pression de sélection aurait été capable de restreindre la multiplication virale jusqu'à l'émergence de variants arborant la troncation du DC de la TMgp41. Ensuite, l'émergence progressive de la susbstitution V34I aurait contribué à restaurer le potentiel pathogène du virus *in vivo*.

L'émergence des mutations compensatrices dans la matrice n'ayant été que progressive, le virus présentant des Env tronquées devait avoir développé un mécanisme lui permettant de se multiplier et de persister *in vivo*. Nous avons alors entrepris d'explorer les capacités d'un tel virus à se propager par un transfert direct de cellule à cellule (Sattentau, 2008; Sourisseau et al., 2007). Nous avons ainsi montré, qu'en l'absence de mutations compensatrices dans la matrice, le virus présentant des Env avec un DC tronqué était capable de se transmettre de cellule à cellule et de se multiplier **(Figure 7)**. Cette transmission de cellule à cellule aurait d'ailleurs permis l'émergence progressive de la mutation compensatoire.

En conclusion, toutes ces données montrent clairement que le VIH-1 est capable *in vivo* de surmonter l'effet délétère d'une troncation de 20 acides aminés du DC de la gp41 affectant le motif dileucine $L_{855}L_{856}$ et une large partie du domaine LLP-1. Ce virus peut effectivement mettre en œuvre un mécanisme compensatoire impliquant le résidu Valine en position 34 dans la protéine de matrice pour contrecarrer cette altération structurale. Nous avons également mis en évidence une possible transmission directe de cellule à cellule des virus présentant un défaut d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe important. Ce phénomène aurait permis la poursuite de la multiplication virale jusqu'à l'apparition du mécanisme compensatoire dans la protéine de matrice. À notre connaissance, il s'agirait de la première description d'un cas de restauration *in vivo* des capacités de multiplication d'un virus portant des Env naturellement tronquées dans leur DC par des mutations compensatrices apparues dans la protéine de matrice.

III. Article

JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 2009, p. 9875–9889 Vol. 83, No. 19
0022-538X/09/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.01213-09
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Matrix and Envelope Coevolution Revealed in a Patient Monitored since Primary Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1[▽]

Elodie Beaumont,[1,2] Daniela Vendrame,[3] Bernard Verrier,[4] Emmanuelle Roch,[1,2] François Biron,[5] Françis Barin,[1,2] Fabrizio Mammano,[3] and Denys Brand[1,2]*

Université François Rabelais, Tours, France[1]; INSERM U966, Tours, France[2]; Institut Pasteur, Virus and Immunity Unit, URA 3015 CNRS, Paris, France[3]; IBCP, UMR 5086, CNRS, Université de Lyon, Lyon, France[4]; and Service des Maladies Infectieuses, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France[5]

Received 12 June 2009/Accepted 13 July 2009

Lentiviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), typically encode envelope glycoproteins (Env) with long cytoplasmic tails (CTs). The strong conservation of CT length in primary isolates of HIV-1 suggests that this factor plays a key role in viral replication and persistence in infected patients. However, we report here the emergence and dominance of a primary HIV-1 variant carrying a natural 20-amino-acid truncation of the CT in vivo. We demonstrated that this truncation was deleterious for viral replication in cell culture. We then identified a compensatory amino acid substitution in the matrix protein that reversed the negative effects of CT truncation. The loss or rescue of infectivity depended on the level of Env incorporation into virus particles. Interestingly, we found that a virus mutant with defective Env incorporation was able to spread by cell-to-cell transfer. The effects on viral infectivity of compensation between the CT and the matrix protein have been suggested by in vitro studies based on T-cell laboratory-adapted virus mutants, but we provide here the first demonstration of the natural occurrence of similar mechanisms in an infected patient. Our findings provide insight into the potential of HIV-1 to evolve in vivo and its ability to overcome major structural alterations.

The envelope glycoprotein complex of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is involved principally in virion attachment to target cell surfaces and in the entry process (15, 18, 27, 29, 52). Envelope glycoproteins (Env) are initially translated as a gp160 precursor glycoprotein, which is then processed during its trafficking through the secretory pathway, to yield a surface subunit gp120 noncovalently attached to a transmembrane subunit gp41. During HIV-1 assembly, Env proteins are incorporated at the surface of the viral particle as a trimeric structure consisting of three gp120/gp41 dimers (59, 62).

The gp41 consists of an ectodomain, a hydrophobic transmembrane anchor, and a cytoplasmic tail (CT). Lentiviruses, including HIV-1 and simian immunodeficiency virus (SIV), are unusual in having a transmembrane subunit with much longer CTs (~150 amino acids) than most other retroviruses (20 to 50 amino acids) (27). Early studies with T-cell laboratory-adapted HIV-1 mutants showed that the gp41 CT region played an important role in regulating Env functions, the incorporation of Env into virus particles and, consequently, viral replication (16, 21, 35, 63). The integrity of the gp41 CT thus appears to be crucial for replication in primary T cells, macrophages, and in many transformed T-cell lines (1, 44). Viral variants with truncated gp41 are rarely isolated from infected patients. One study reported the isolation of a CD4-independent variant harboring a sharply truncated CT (64). However, this atypical isolate existed as a minority variant in the original quasispecies of the patient (54). SIV variants with truncated CTs obtained in cell culture in vitro have also been shown to revert rapidly (to full-length CT) when introduced into macaques (39). These observations indicate that the long CTs of lentiviruses, such as HIV-1 and SIV, have functions specific to viral replication and persistence in vivo.

Two groups of conserved sequence motifs have been identified in the gp41 CT that are likely to be involved in its functions. The first group, involved in regulating the intracellular trafficking of Env, includes a membrane-proximal tyrosine-based endocytic motif, Y_{712}SPL, (9, 47); a diaromatic motif, $Y_{802}W_{803}$, implicated in the retrograde transport of Env to the trans-Golgi network (8), and a C-terminal dileucine motif recently identified as a second endocytic motif (7, 10, 60). We have also provided evidence for the existence of additional as-yet-unidentified signals in studies of primary HIV-1 (34). The second group of motifs consists of three structurally conserved amphipathic α-helical domains: lentivirus lytic peptides 1, 2, and 3 (LLP-1, LLP-2, and LLP-3) (11, 17, 33). LLP domains have been implicated in various functions, including Env fusogenicity and the incorporation of Env into HIV-1 particles (28, 32, 43, 45, 50, 61).

Several lines of evidence suggest that Env incorporation requires direct or indirect interactions between the matrix domain of the structural protein precursor $Pr55^{Gag}$ (matrix) and the gp41 CT during HIV-1 assembly. This possibility was first suggested by the observation that HIV-1 Env drives the basolateral budding of Gag in polarized cells (37, 48). A direct interaction between the matrix and a glutathione *S*-transferase

* Corresponding author. Mailing address: INSERM U966, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France. Phone: (33) 2 47 36 60 66. Fax: (33) 2 47 36 61 26. E-mail: denys.brand@univ-tours.fr.

▽ Published ahead of print on 22 July 2009.

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

TABLE 1. Characteristics of patient 153 at the time of blood sample collection

Date of blood sample[b]	Viral load (log RNA copies/ml)[c]	gp41 CT truncation[a]	Matrix mutation[a]		
			K25R	V34I	I45L
05.03.1993 (early stage)	4.96	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)
10.18.1993	4.12	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)
05.31.1994	2.87	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)	– (0/10)
01.12.1995	3.22	+ (10/10)	– (0/10)	+ (3/10)	– (0/10)
07.03.1997	3.86	+ (10/10)	– (0/10)	+ (5/10)	– (0/10)
06.02.1998	4.1	+ (10/10)	+ (1/10)	+ (6/10)	+ (4/10)
09.03.1999 (late stage)	4.25	+ (10/10)	+ (10/10)	+ (10/10)	+ (10/10)
02.04.2002	3.15	+ (10/10)	+ (10/10)	+ (10/10)	+ (10/10)

[a] The number of positive clones over the total number of clones tested is indicated in parentheses for each sample analyzed.
[b] A treatment associating Combivir and Viramune was initiated in March 2000. Dates are given in the format "month.day.year."
[c] Plasma HIV RNA was quantified by using the Abbott RealTime HIV-1 assay.

fusion protein containing Env CT was subsequently observed in vitro (13). Synthetic peptides corresponding to various domains of the gp41 CT have also been shown to interact directly with $Pr55^{Gag}$ molecules (26). Furthermore, effects on viral infectivity of compensation between the CT and the matrix protein have been suggested by studies based on T-cell laboratory-adapted virus mutants (19, 40, 43). Finally, the cellular protein TIP47 was recently implicated in Env incorporation, based on its ability to bind both the matrix protein and the gp41 CT (38).

In a previous study describing the evolutionary dynamics of the glycan shield of HIV-1 Env, we identified a patient (patient 153) for whom the 15 *env* clones obtained during primary infection (early stage) encoded full-length Env, whereas the 15 *env* sequences from the HIV-1 present 6 years later (late stage) encoded truncated gp41 CTs (14). These late-stage sequences contained a deletion introducing an in-frame stop codon, resulting in a 20-amino-acid truncation of the Env. Note that, unlike a point mutation, this deletion cannot easily revert to the full-length form. Such a deletion affecting various known motifs of the gp41 CT would be expected to impair viral replication. However, the plasma viral load measured in patient 153 demonstrated that the virus had retained its ability to replicate.

In the present study, we explored the molecular mechanisms by which a primary HIV-1 maintained its capacity to replicate efficiently in this patient and demonstrated for the first time the occurrence of matrix and Env coevolution in vivo, providing insight into the ability of HIV-1 to overcome major structural alterations.

MATERIALS AND METHODS

Patient, samples, *env*, and *matrix* sequences. Patient 153 is a man infected with an HIV-1 clade B virus selected from a cohort of patients identified at the time of symptomatic primary infection in the Department of Infectious Diseases of the Croix-Rousse Hospital, Lyon, France (5). The patient signed an informed consent form. Study protocols were approved by the Human Subjects Committee of the Hospices Civils de Lyon. The procedure used to clone full-length *env* genes from the DNA of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) extracted from blood samples collected from patient 153 at the time of primary infection and six years later, has been described elsewhere (14). The corresponding *env* nucleotide sequences (15 early and 15 late clones) have been deposited in the GenBank database under accession numbers AY535489 through AY535518 (14). All of the late *env* clones contain a 23-bp deletion introducing an in-frame stop codon resulting in a 20-amino-acid truncation. This deletion does not affect the *rev* and *tat* gene sequences. One early *env* clone (E; accession number AY535491) and two late *env* clones (L1 and L2, accession numbers AY535509 and AY535516, respectively) were selected for further study.

The viral *gag* gene sequences encoding the matrix protein were also cloned from the DNA of PBMC collected from patient 153 at early and late stages. Amplification reactions were conducted by nested PCR, using the Platinum PCR SuperMix High Fidelity kit (Invitrogen). The outer primer pair used was M(+) (5′-GAAGCGCGCACGGCAAGAGG-3′) and M(−) (5′-GTTCCTGAAGGG TACTAGTAGTTCCTGC-3′). The inner primer pair AatII(+) (5′-CTAGCGG AGGCTAGACGTCGAGAGATGGGTGC-3′) and $BsrGI_{153}$(−) (5′-GCCCTT GTAGGTTCTGTACAATAGGGTAATTTTGGCTG-3′) was designed to generate an AatII and a BsrGI restriction site at the 5′ and 3′ ends of the amplified sequence, respectively. The PCR products were inserted into pCR2.1 (Topo TA cloning kit; Invitrogen). Six early and ten late clones were sequenced. The nucleotide sequences were analyzed (Applied Biosystems) and the corresponding deduced amino-acid sequences were aligned by using CLUSTAL W (57), with manual corrections. One early *gag* clone (ME) and one late *gag* clone (ML) were selected for further study.

Six additional blood samples, collected from patient 153 between the early and late stages ($n = 5$) or 3 years after the late stage ($n = 1$), were used to analyze the evolution of viral *env* and *gag* sequences. Amplification reactions were conducted by nested PCR on PBMC DNA, using the Platinum PCR SuperMix High Fidelity kit (Invitrogen). The outer primer pair used to amplify the *env* gene sequences encoding the gp41 CT was CT(+) (5′-CACTGCTGTGCCTTGGAA TG-3′) and CT(−) (5′-CTTGTAAGTCATTGGTCTTAAAGGTAC-3′). The inner primers used were NheI(+) (5′-ATAGTAGGAGGGCTAGCAGGTTTA AGAATAG-3′) and XbaI(−) (5′-TTATTGCAAAGCCCTTTCTAGACCCTG TCTCAC-3′). The *gag* sequences encoding the matrix protein were amplified with the primer pairs M(+)/M(−) and AatII(+)/$BsrGI_{153}$(−) described above. All PCR products were inserted into pCR2.1 (Topo TA cloning kit; Invitrogen) and 10 clones of each were sequenced. The nucleotide sequences were analyzed (Applied Biosystems) and the corresponding deduced amino acid sequences of gp41 CTs or matrix proteins were aligned, using CLUSTAL W (57), with manual corrections.

In addition to the various sequence analyses conducted, HIV-1 RNA viral loads were determined on all blood samples from patient 153 available for the present study (Table 1). Treatment was initiated in March 2000, with a combination of Combivir (GlaxoSmithKline) and Viramune (Boehringer Ingelheim), and the patient was still on this treatment regimen when the last blood sample studied here was collected in February 2002.

Proviral constructs. Replication-competent proviruses carrying *env* sequences encoding E, L1, or L2 gp41 CTs, alone or in combination with *gag* sequences encoding early or late matrix proteins, were constructed in a pNL(AD8) background. pNL(AD8) is an R5 derivative of pNL4-3 (20). We used pNL(AD8)-NX, which has been described elsewhere (34), as the starting material. This clone differed from pNL(AD8) by the insertion of NheI and XbaI restriction sites into the sequences corresponding to the membrane-spanning domain of gp41 and at the end of the *env* gene, respectively. The DNA sequences encoding the gp41 CTs of the E, L1, and L2 *env* genes were amplified by PCR with the Platinum PCR SuperMix High Fidelity kit (Invitrogen), using the primer pair NheI(+)/XbaI(−) described above. This primer pair was designed to generate NheI and XbaI restriction sites at the 5′ and 3′ ends of the amplified product, respectively. The PCR products were inserted into pCR2.1 (Topo TA cloning kit; Invitrogen), excised by digestion with NheI/XbaI and inserted into the corresponding sites of

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

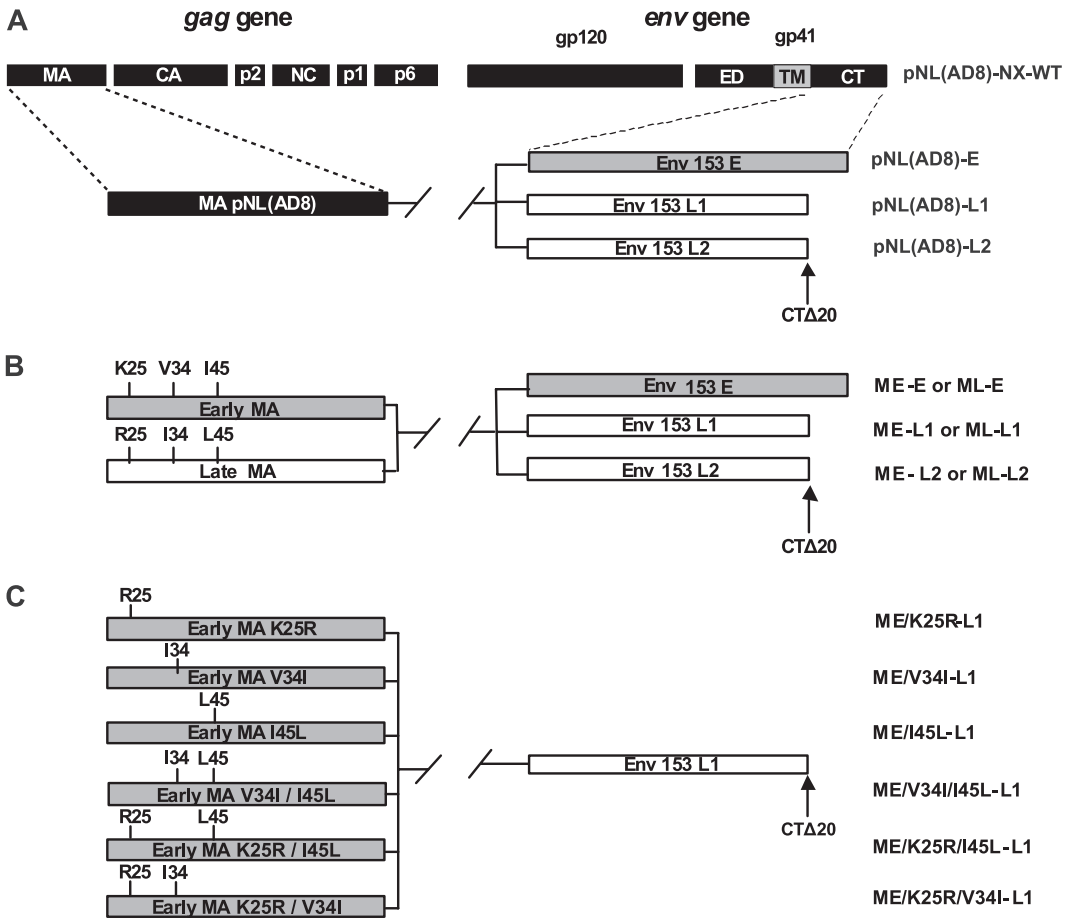


FIG. 1. Schematic representation of the proviral constructs used. The upper diagram shows the HIV-1 *gag* and *env* genes with the corresponding proteins. The parental viral proteins are indicated by boxes of different colors: black, NL(AD8); gray, early clones of HIV-1 from patient 153; white, late clones of HIV-1 from patient 153. The arrows indicate the stop codons shortening the gp41 CTs by 20 amino acids (clones L1 and L2). (A) Schematic representation of pNL(AD8)-NX proviral constructs harboring the sequences encoding the gp41 CTs derived from HIV-1 present at early (clone E) and late stages (clones L1 and L2) in patient 153. (B) Schematic representation of pNL(AD8)-NX proviral constructs carrying various combinations of sequences encoding the gp41 CTs (clones E, L1, and L2) and matrix proteins (early clone ME, late clone ML) derived from HIV-1 present at early or late stages in patient 153. (C) Schematic representation of pNL(AD8)-NX proviral constructs harboring the sequence encoding the truncated gp41 CT (clone L1) associated with the sequence encoding the early matrix protein (clone ME) with various combinations of the three amino acid substitutions (K25R, V34I, or I45L) found in all HIV-1 variants present at the late stage in patient 153.

pNL(AD8)-NX, giving rise to pNL(AD8)-E, -L1, or -L2 (Fig. 1A). pNL(AD8)-E_{del23} and pNL(AD8)-$L1_{ins23}$ were obtained by overlap PCR, using appropriate primers. pNL(AD8)-E_{del23} is a pNL(AD8)-E derivative containing the 23-bp deletion in the *env* sequence encoding the gp41 CT of the early clone E. Conversely, pNL(AD8)-$L1_{ins23}$ was derived from pNL(AD8)-L1, in which the full-length *env* sequence of the late clone L1 has been restored.

Mutagenesis was then carried out in a pCR2.1 construct, which contained a 408-kb BssHII-SpeI fragment from pNL(AD8)-NX encompassing the sequence of the *gag* gene encoding the matrix protein. Sequences were modified with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the following primers: AatII(+) described above, AatII(−) (5′-GCACCCATCTCTCGACGTCT AGCCTCCGCTAG-3′), BsrGI(+) (5′-CAGCCAAAATTACCCTATTGTACA GAACCTCCAGGGGC-3′), and BsrGI(−) (5′-GCCCCTGGAGGTTCTGTA CAATAGGGTAATTTTGGCTG-3′). The resulting construct, pCR2.1(AD8)-M, contains AatII and BsrGI restriction sites at the 5′ and 3′ ends of the matrix coding sequence, respectively. The DNA sequences encoding the matrix proteins ME and ML, previously inserted into pCR2.1, were excised by digestion with AatII and BsrGI and inserted into the corresponding sites of pCR2.1(AD8)-M, giving rise to pCR2.1(AD8)-ME and -ML. Finally, the BssHII-SpeI fragment was excised from pCR2.1(AD8)-ME or -ML and inserted into the corresponding sites of pNL(AD8)-E, -L1, or -L2, as summarized in Fig. 1B.

Six additional pNL(AD8) constructs encoding early matrix mutants associated with the L1 gp41 CT were designed to test the relevance of the various amino acid substitutions distinguishing between early and late matrix proteins (Fig. 1C). Mutagenesis was carried out on the DNA sequence encoding the ME matrix protein inserted into the pCR2.1 vector. Sequences were modified with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), using appropriate primers. After mutagenesis, the DNA sequences encoding the matrix mutants were excised by digestion with AatII and BsrGI before insertion into the corresponding sites of ME-L1, as described above. All of the proviral constructs generated were verified by DNA sequencing.

NLΔenv and NL F522Y proviruses were used as controls in some experiments (6, 46). NL F522Y encodes a nonfusogenic gp120/gp41 complex.

Cell culture. 293T and HeLa cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics (100 IU of penicillin and 100 μg of streptomycin/ml). MT4.R5 T cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (4). TZM.bl cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, gentamicin (50 μg/ml), and 25 mM HEPES (51, 58). PBMC were obtained from the buffy coats of HIV-seronegative donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Monocytes were purified from PBMC by adhesion to the plastic of culture plates, as previously described (49). Monocyte-derived macrophages (MDMs) were obtained by allowing harvested monocytes to differentiate into macrophages for 7 days in 12-well plates (8×10^5 cells/well) containing RPMI 1640 medium supplemented with 10% human AB serum and antibiotics. Nonadherent PBMC were treated with phy-

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

tohemagglutinin (5 μg/ml) in RPMI 1640 medium supplemented with interleukin-2 (10 ng/ml; Roche), 20% fetal calf serum, and antibiotics for 3 days. They were then washed free of phytohemagglutinin and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with interleukin-2, 20% fetal calf serum, and antibiotics. Purified $CD4^+$ T lymphocytes were negatively selected with biotin-antibody cocktail microbeads ($CD4^+$ T-cell isolation kit II; Miltenyi Biotec, Germany).

Production of viral stocks. Viruses for the analysis of replication kinetics in T cells and MDMs were obtained by transfecting 293T cells with proviral DNA constructs, as previously described (34). All virus stocks were sampled for detection of the p24 capsid protein by an Innotest HIV antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Ingen) before freezing at −80°C.

Viruses for Env incorporation assays were generated by transfecting 293T cells and HeLa cells or infecting MT4.R5 cells, PBMC and MDMs. The procedure used to transfect HeLa cells with proviral DNA constructs has been described elsewhere (34). Viral supernatants were harvested 48 h after transfection, centrifuged at low speed, filtered, and used immediately for virus purification. For MT4.R5 and PBMC infections, the cells were exposed to the viruses produced in 293T cells (100 or 200 ng of p24 virus equivalent/3×10^6 cells/ml, respectively) for 2 h at 37°C, washed, and seeded at a concentration of 0.3×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented either with 10% fetal calf serum and antibiotics (MT4.R5 cells) or with interleukin-2, 20% fetal calf serum, and antibiotics (PBMC). Cells producing the viruses encoded by the ME-L1 construct, NLΔenv or NL F522Y were obtained after infection by vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G)-pseudotyped viruses to compensate for the loss of infectivity. Pseudotyped viruses were generated by cotransfecting 293T cells with the proviral DNA constructs and a VSV-G expression plasmid (41). After infection, the MT4.R5 cells and PBMC were incubated for 3 days at 37°C and then washed, resuspended in an equal volume of medium, and incubated at 37°C for a further 3 days. Viral supernatants were harvested, centrifuged at low speed, filtered, and used immediately for virus purification. For MDM infection, the cells were also exposed to the virus produced in 293T cells (500 ng of p24 virus equivalent/1 ml/8×10^5 cells per well in 12-well plates) for 2 h at 37°C and washed extensively. Then, 2 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% human AB serum and antibiotics was added per well, and the cells were incubated again at 37°C. Viral supernatants were harvested every 3 days over a 2-week period, centrifuged at low speed, filtered, and immediately used for virus purification. All virus stocks were sampled for quantification of the p24 capsid protein before virus purification.

Lysates of 293T cells were prepared at the time of virus collection for evaluation of the expression and processing of the viral envelope. Pelleted cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), repelleted by centrifugation, and resuspended in a 1% Triton in PBS supplemented with protease inhibitors. A sample was removed for p24 analysis, and cell lysates were then frozen at −80°C for subsequent Western blot analysis, as described below.

Viral replication kinetics. The concentration of the viral stocks produced as described above from 293T cells was normalized on the basis of p24 capsid protein concentration. MT4.R5 cells were infected with 5 ng of p24 virus equivalent/10^6 cells/ml. Samples of culture supernatants were taken every 2 days for p24 capsid protein determination. After removal of the sample, cell suspensions were split 1:4 and returned to the incubator at 37°C. Phytohemagglutinin-stimulated PBMC were infected with 20 ng of p24 virus equivalent/10^6 cells/ml. The culture medium was sampled every 2 days for p24 capsid protein determination and was then completely replaced with fresh medium. MDMs were infected with 50 ng of p24 virus equivalent/8×10^5 cells/ml. The culture medium was sampled every 2 days for p24 capsid protein determination and was then completely replaced with fresh medium.

Determination of viral infectivity. The infectivity of the virus stocks generated for Env incorporation assays was determined on TZM-bl cells in 96-well plates. TZM-bl cells express high levels of CD4 and CCR5 and contain β-galactosidase and luciferase reporter genes under the control of an HIV long terminal repeat (51). Eight 10-fold serial dilutions of each virus stock were prepared in complete medium (DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, gentamicin [50 μg/ml], and 25 mM HEPES) containing 15 μg of DEAE-dextran/ml directly in the plates. TZM-bl cells (2×10^4/well) were then added. After 48 h, target cell infection was determined by staining with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Briefly, cells were washed twice with PBS and fixed with 80% acetone for 10 min at −20°C. A 50-μl portion of an X-Gal solution (4 mM potassium ferricyanide, 4 mM potassium ferrocyanide, 0.4 mg of X-Gal, and 2 mM $MgCl_2$ in PBS) was added to each well. After 2 h at 37°C, the reaction was stopped by replacing the X-Gal solution with PBS, and the blue cells were counted, using a light microscope, for the last dilution giving more than 10 infected cells. The infectivity was determined as the number of infected cells per nanogram of p24 in the inoculum.

Env incorporation assays. Viruses produced, as described previously, from 293T cells, HeLa cells, MT4.R5 cells, PBMC, and MDMs were used to assess Env incorporation into virions. Medium containing the viruses was overlaid on a 20% sucrose cushion in a Beckman SW28 tube, and particles were pelleted by centrifugation for 90 min at 50,000 × *g* and 4°C. Viral pellets were resuspended in a small volume of TNE buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) supplemented with 1% Triton X-100 and protease inhibitors. An aliquot was removed for p24 capsid protein determination by ELISA, and resuspended pellets were frozen at −80°C for quantitative gp120 ELISA and Western blot analysis.

The quantitative gp120 ELISA was performed in Immulon-2 plates (Dynex) as previously described (34). Human monoclonal antibody (MAb) 2G12 was used for the detection of gp120 captured on the solid phase. Dilutions of purified $gp120_{IIIB}$ (Advanced Bioscience Laboratories) were used to construct a standard curve. Similar ELISA tests were also carried out with a pool of HIV-1-positive human sera for the detection of gp120.

Env incorporation was also assessed by Western blotting for viruses produced in HeLa cells, essentially as previously described (34). The membrane was initially probed for gp120 and p24, with specific goat polyclonal antibodies (AbD Serotec). After blot development, the antibodies were removed from the blot by incubation with Restore Western blot stripping buffer (Pierce), and the Western blotting procedure was then repeated with the 2F5 human MAb (Polymun Scientific) directed against gp41.

Subcellular distribution of Env and matrix proteins. HeLa cells were transfected with DNA proviral construct and processed for immunofluorescence as previously described (34) with a mouse MAb specific for the matrix (p17) obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) centralized facility for AIDS reagents (ARP342, from R.B. Ferns and R. S. Tedder) and an anti-Env human MAb 2G12 (Polymun Scientific). The transfection conditions used yielded ca. 5% positive cells with moderate Env staining. Images of representative cells were acquired with an Olympus FluoView 500 confocal microscope equipped with Argon (488-nm) and HeNe (546-nm) lasers, a 60× PlanApo oil-immersion objective lens, and Fluoview 4.3 software. The colocalization of Env and matrix proteins was quantified with Imariscoloc (Imaris, Bitplane), as previously described (34). Pearson channel correlation coefficients (*R*) in a studied volume ("1" indicating perfect colocalization and "0" indicating no correlation) were calculated for 10 cells for each sample and are expressed as means ± the standard deviation.

Analysis of cell-to-cell HIV transfer by flow cytometry. Donor cells (primary $CD4^+$ T lymphocytes or MT4.R5 cells) were infected with VSV-G-pseudotyped virions carrying various combinations of matrix and gp41 CT sequences. We used 10 and 100 ng of p24 virus equivalent per ml to infect 10^6 MT4.R5 cells, and 10, 100, or 500 ng of p24 virus equivalent per ml for 10^6 primary lymphocytes. At 36 h after infection, donor and target cells were mixed (1:1) in 96-well plates at a final concentration of 10^6 cells/ml, in a final volume of 200 μl. Before coculture, target cells were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; 2.5 μM; Molecular Probes) for 10 min at 37°C to distinguish them from donor cells. After the times indicated, cells were stained for intracellular Gag expression (see below) and analyzed by flow cytometry, as previously described (56). HIV Gag protein was assayed after permeabilization and intracellular staining with anti-Gagp24 phycoerythrin MAb (KC57; Coulter). An isotype-matched MAb was used as negative control. Flow cytometry data were acquired with a FACSCalibur instrument (Becton Dickinson) and CellQuest software and were analyzed with FlowJo software (TreeStar).

RESULTS

The gp41 CT truncation of late-stage viruses from patient 153 markedly impairs virus replication. We first investigated the effects on virus replication of the truncation observed in the gp41 CT encoded by late HIV-1 *env* clones from patient 153. We transferred the gp41 CT coding sequences into an R5 molecular clone pNL(AD8) derivative [pNL(AD8)-NX-WT], as described in Materials and Methods (Fig. 1A). The gp41 CT coding sequences retained for the present study were derived from one early *env* clone (clone E) and two late *env* clones (clones L1 and L2) (Fig. 2A). The dominant sequence during the early stage of infection was that found in clone E (6 of 15 clones). The remaining early *env* clones encoded gp41 CTs differing by only one or two amino acid substitutions in differ-

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

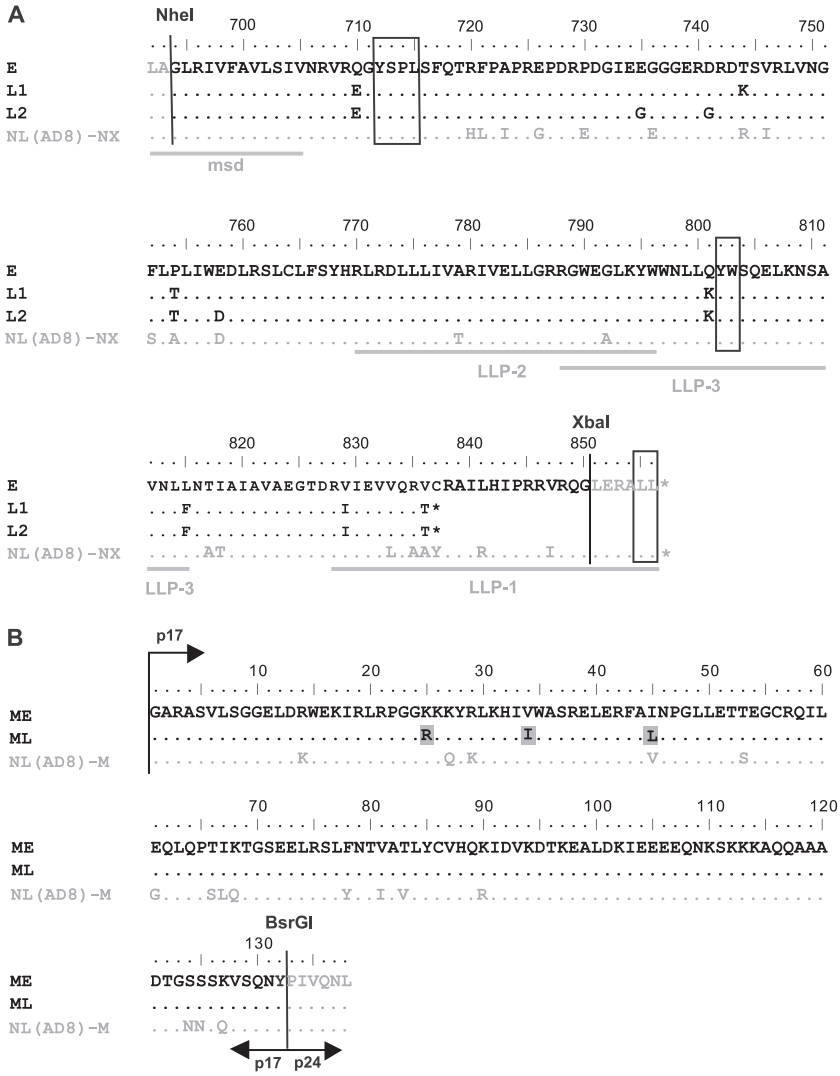


FIG. 2. Amino acid sequences of gp41 CTs and matrix proteins from patient 153. (A) Sequence alignments for gp41 CTs are shown for an early viral variant with a full-length sequence (clone E), for two late viral variants harboring a 20-amino-acid truncation (clones L1 and L2), and for the NL(AD8)-NX-WT virus. The Env sequences upstream from the NheI restriction site and downstream from the XbaI restriction site are derived from NL(AD8). The highlighted domains include the C-terminal region of the membrane-spanning domain (msd) and the amphipathic alpha-helical domains LLP-1, LLP-2, and LLP-3. Trafficking motifs (Y_{712}SPL, $Y_{802}W_{803}$, and $L_{855}L_{856}$) are boxed. Amino acid identity (.), stop codons (*), and substitutions are indicated. (B) Sequence alignments for matrix proteins are shown for an early viral variant (clone ME) and for a late viral variant (clone ML). The three amino acid substitutions specific to late matrix proteins are highlighted by gray shading. The matrix sequences upstream from the AatII restriction site (localized in the 5′ noncoding region of the viral genome) and downstream from the BsrGI restriction site (localized at the junction between the matrix protein p17 and the capsid protein p24) are derived from NL(AD8). Amino acid identity (.) and substitutions are indicated. Amino acid numbers correspond to the HXB2 sequence.

ent positions. The gp41 CT encoded by all 15 late *env* clones had a 20-amino-acid truncation, due to a 23-bp deletion introducing a stop codon. In addition, the sequences of the truncated gp41 CT encoded by the 15 late *env* clones differed from that encoded by the early clone E by five- to nine-amino-acid substitutions, most of these substitutions being common to several clones. The late gp41 CT coding sequences selected were derived from two representative late *env* clones (clone L1 and L2).

Viral stocks of NL(AD8) carrying early and late gp41 CT sequences were produced in 293T cells by transient transfection. No significant difference in p24 (capsid protein) production was found between clones, demonstrating the absence of unanticipated defects in the RNA sequence or Rev protein function. Western blot analysis on 293T cell lysates showed that the various glycoproteins were synthesized in a manner indistinguishable from that of the wild type (data not shown). We analyzed replication kinetics with the MT4.R5 T-cell line (Fig. 3A). Cells were infected with the viruses produced in 293T cells (5 ng of p24 virus equivalent/10^6 cells/ml), and p24 protein accumulation in the culture supernatants was quantified to compare replication kinetics between viruses. All of the data shown in Fig. 3A, B, and C were obtained in the same experiment, which simultaneously included all of the

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

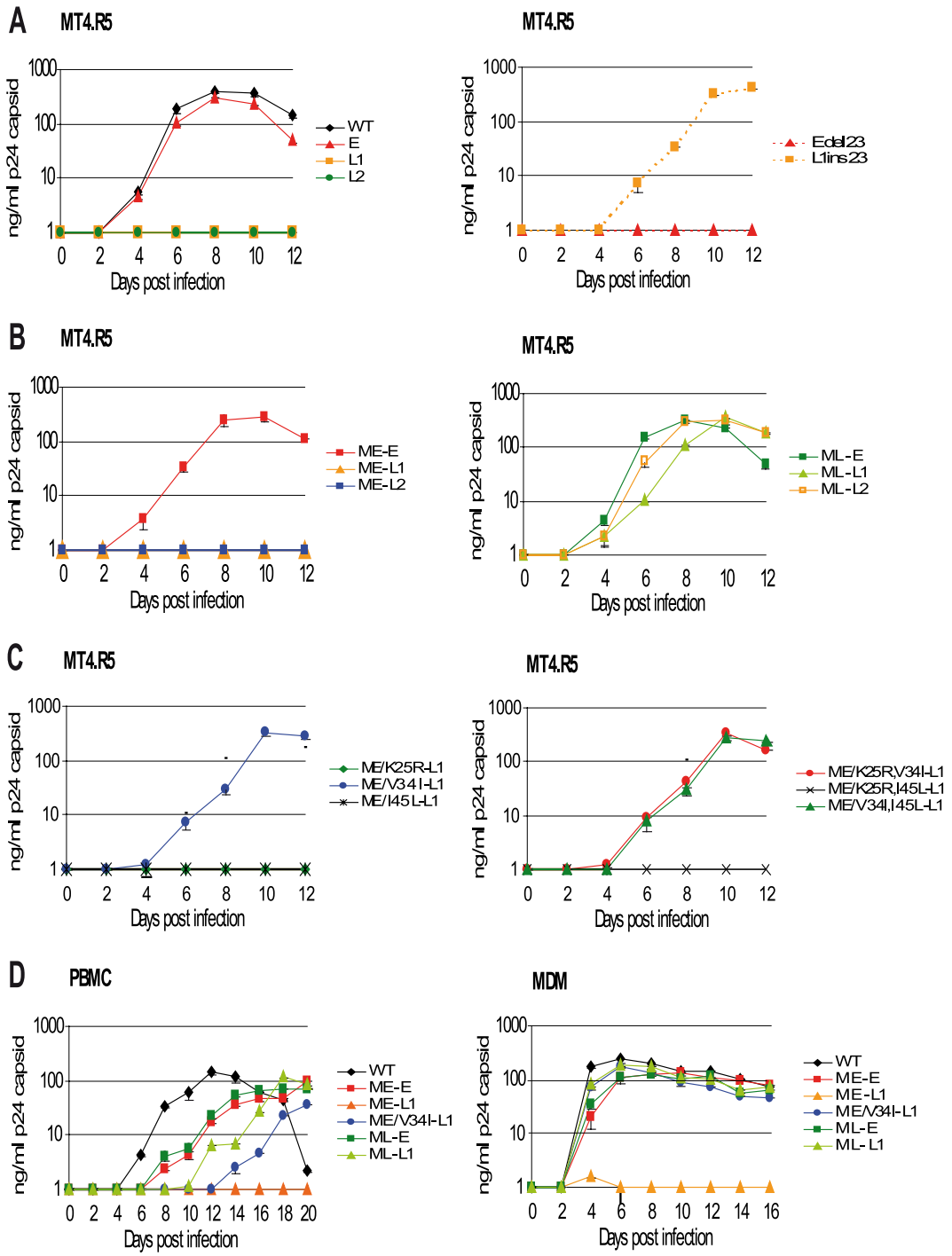


FIG. 3. Replication kinetics of NL(AD8)-NX viruses carrying gp41 CTs and matrix proteins derived from the HIV-1 present at early or late stages in patient 153. Virus stocks, obtained by transfecting 293T cells with the indicated molecular clones, were normalized as a function of p24 capsid protein concentration and used to infect MT4.R5 cells (A, B, and C), PBMC (D, left), or MDMs (D, right), as described in Materials and Methods. Variations in p24 concentrations were monitored in the culture supernatant over time. Each experiment was performed at least twice in duplicate, with similar results obtained in terms of both the hierarchy and the extent of replication. Errors bars indicate the standard deviation for duplicate infections.

pNL(AD8)-NX constructs sequentially engineered during the present study, to facilitate comparative analyses. The replication kinetics of the virus carrying the early gp41 CT (E) closely resembled that of wild-type NL(AD8)-NX (Fig. 3A). In contrast, no virus replication was detected for the two late viruses encoding shortened gp41 CT (L1 and L2). As a negative control, we used the NLΔenv clone (12), which lacks Env and produced no detectable p24 in any of the cell types used here

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

(data not shown). Thus, the NL(AD8)-NX virus harboring a truncated gp41 CT encoded by the late *env* clones from patient 153 failed to establish productive infection in MT4.R5 cells, whereas the NL(AD8)-NX virus carrying a full-length gp41 CT encoded by early *env* clones replicated at levels similar to those for the wild-type virus.

We generated the proviral constructs pNL(AD8)-E_{del23}, containing the 23-bp deletion in the sequence encoding the early clone, and pNL(AD8)-$L1_{ins23}$, harboring a restored CT sequence in the context of the late clone L1, to exclude the possibility that changes other than gp41 CT truncation were responsible for the dramatic loss of replication capacity. NL(AD8)-$L1_{ins23}$ and NL(AD8)-E had similar replication kinetics, whereas NL(AD8)-E_{del23} and NL(AD8)-L1 displayed markedly impaired replication, demonstrating that the effects on viral replication observed for the NL(AD8)-NX virus carrying gp41 CT encoded by late *env* clones were due to the gp41 CT truncation (Fig. 3A).

Late-stage matrix protein restores the replication capacity of viruses harboring truncated gp41 CTs. The plasma viral load measured in patient 153 at the late stage of infection (4.25 log viral RNA copies/ml) demonstrates the replication competence of the primary HIV-1 present in vivo, despite the presence of the gp41 CT truncation (Table 1). We hypothesized that the truncations observed in the gp41 CTs encoded by late *env* clones from patient 153 might be complemented by compensatory mutations in the matrix. We conducted a comparative analysis of matrix sequences obtained from patient 153 at early and late stages of infection. Six early and ten late *gag* clones were analyzed. Four of the six early *gag* clones encoded matrix proteins with identical amino acid sequences. The other two early clones differed by a single amino acid substitution. The 10 late *gag* clones encoded matrix proteins differing from those encoded by the early clones by three to six amino acid substitutions. Three of these substitutions (K25R, V34I, and I45L) were common to all late matrix sequences. One of the four identical early *gag* clones (ME) was selected for further analyses, together with one late *gag* clone (ML) encoding a matrix protein harboring only the three amino acid substitutions specific to late-stage viruses (Fig. 2B).

The selected early (ME) and late (ML) matrix sequences were cloned into the proviral constructs containing early and late *env* sequences (Fig. 1B). The viruses produced by the transfection of 293-T cells were used to infect MT4.R5 cells (Fig. 3B), as described above. Of the clones encoding the early matrix sequence, only the clone carrying the early *env* sequence (ME-E) replicated efficiently. Clones with the truncated gp41 CT (ME-L1 and ME-L2) did not produce detectable amounts of p24 in the supernatant. In contrast, expression of the late matrix sequence (ML) allowed the replication of clones carrying either early (ML-E) or late (ML-L1 and ML-L2) *env* sequences. Thus, the truncation observed in the gp41 CT encoded by the late *env* clones strongly decreased levels of virus replication in the presence of the early matrix sequence, whereas expression of a contemporary late matrix allele restored the ability of the virus to replicate.

The single V34I change in the matrix restores the replication capacity of viruses encoding truncated gp41. The results described above demonstrate that the late matrix protein ML compensates for the viral replication defect induced by truncation of the gp41 CT L1 and L2. We evaluated the compensatory potential of the three amino acid substitutions between the early and late matrix proteins, using site-directed mutagenesis to introduce all of the possible combinations of the K25R, V34I, and I45L substitutions into the construct encoding the early matrix sequence coupled to a truncated late Env sequence (ME-L1) (Fig. 1C). Mutant virus phenotypes for viral spread in MT4.R5 cells were characterized as previously described (Fig. 3C). The ME-L1 viruses carrying the V34I substitution, alone or in combination with the K25R or I45L substitutions, replicated with kinetics similar to that of the ML-L1 virus (Fig. 3B and C). In contrast, viruses carrying the K25R and the I45L substitutions, alone or in combination, in matrix proteins with a valine residue in position 34, did not replicate during this experiment (Fig. 3C). Thus, the replication defect resulting from the truncation of the gp41 CT L1 and L2 may be reversed by a single amino acid substitution at position 34 in the late matrix protein.

As cell type may influence the replication capacity of viruses carrying mutated gp41 CT sequences, we characterized the replication kinetics of viruses with relevant combinations of matrix and envelope sequences, using PBMC and macrophages. Viral stocks were produced in 293T cells transiently transfected with the various proviral DNA constructs. An inoculum adapted to each cell type (20 ng of p24 virus equivalent/10^6 cells/ml for PBMC, 50 ng of p24 virus equivalent/8×10^5 cells/ml for macrophages), based on permissiveness to NL(AD8)-NX viruses, was used. We compared the replication kinetics between viruses by quantifying p24 protein accumulation in the culture supernatants. In PBMC, the reference clone NL(AD8)-NX replicated most rapidly (Fig. 3D). The two viruses carrying an early envelope sequence and different matrix alleles (ME-E and ML-E) replicated to similar extents. For viruses carrying a truncated CT, clear differences were observed as a function of matrix sequences: the clone carrying the early matrix sequence failed to replicate (ME-L1), the late matrix sequence allowed efficient virus replication (ML-L1), and the V34I mutation alone partially compensated for the loss of infectivity (ME/V34I-L1).

In macrophages, all of the NL(AD8)-NX viruses replicated with similar kinetics, with the exception of the ME-L1 virus, which displayed strong impairment of replication capacity, with p24 production peaking at 1.65 ng/ml 4 days after infection and then falling below 1 ng/ml for the rest of the experiment (Fig. 3D). Thus, the replication kinetics in relevant HIV target cells confirmed the impairment of virus replication due to gp41 truncation and its restoration by the late matrix protein. Residue 34 of the matrix protein was also confirmed to be a key element in compatibility with truncated gp41 CT.

The rescue of virus infectivity by matrix mutations is cell type independent. Several studies have reported differences in the intracellular transport and assembly process between cell types (22, 23, 30, 53). There may therefore be different requirements for compatibility between the viral matrix and envelope sequences. We thus analyzed the infectivity of virions produced in different cell types and carrying relevant combinations of matrix coding sequences and *env* genes from the early and late viruses found in patient 153. We used a single-round reporter assay based on $CD4^+$ $CCR5^+$ β-galactosidase indicator (TZM-bl) cells. This single-cycle assay tests for completion of

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

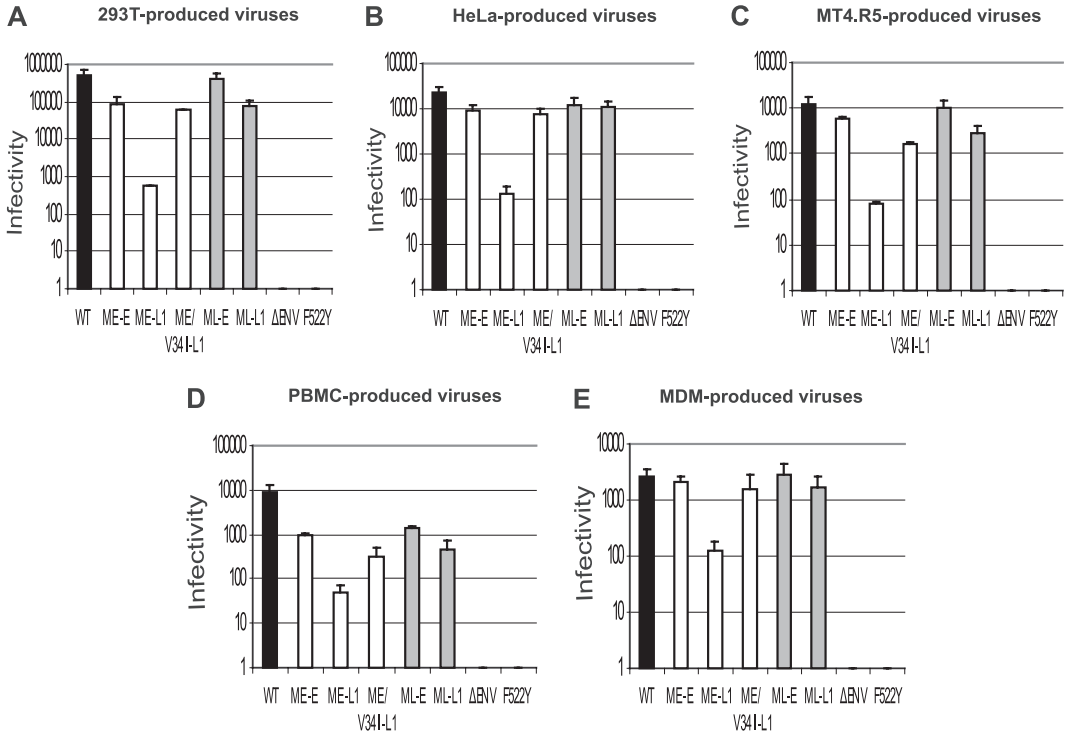


FIG. 4. Singe-round infectivity of NL(AD8)-NX viruses carrying gp41 CTs and matrix proteins derived from HIV-1 present at the early or late stages in patient 153. Virus stocks of the indicated molecular clones, obtained by transfecting 293T (A) and HeLa cells (B) or by infecting MT4.R5 cells (C), PBMC (D), or MDMs (E), were used to infect TZM-bl cells, as described in Materials and Methods. Eight 10-fold serial dilutions of each virus stock were tested in 96-well plates. After 48 h, infection of the target cells was assessed by staining with X-Gal. The infectivity of each virus is expressed as the number of infected cells per ng of p24. The data are expressed as means ± the standard deviations.

the steps in the virus life cycle up to and including Tat expression and is therefore a useful tool for probing blocks of the early viral life cycle. The NL F522Y virus, which carries a nonfusogenic Env, and the NLΔenv virus were used as negative controls (6, 46). Viruses were produced by transiently transfecting 293T cells and HeLa cells with the various proviral DNA constructs or by infecting MT4.R5 cells, PBMC, or macrophages with the corresponding viruses, as described in Materials and Methods. To ensure efficient infection with defective ME-L1, NLΔenv, and NL F522Y viruses, we used VSV-G pseudotyping. Endpoint dilutions of each viral supernatant were used to infect TMZ-bl cells. After 48 h, we assessed target cell infection levels by staining with X-Gal. The infectivity was quantified as the number of infected cells per ng of p24 in the inoculum.

The infectious titer per ng of p24 was highest for viruses produced in 293-T cells, followed by viruses produced in HeLa and MT4.R5 cells (Fig. 4). Viruses carrying patient-derived sequences produced in PBMC and macrophages had lower levels of infectivity. The hierarchy of viral infectivities was conserved between cell types, suggesting similar requirements for matrix and envelope compatibility. In all cell types, virions carrying a truncated gp41 CT and the early matrix sequence (ME-L1) were markedly less infectious (1 to 2 logs less infectious) than viruses carrying full-length Env (ME-E and ML-E) and viruses in which the truncated CT was complemented by the late matrix (ML-L1) or an early matrix sequence carrying the V34I substitution (ME/V34I-L1). The replication defect observed for ME-L1 virus may therefore be attributed to a defect in the early steps of the virus replication cycle. The measurable single-cycle infectivity for the ME-L1 virus, however, suggests that the lack of detectable virus replication in multiple-cycle experiments is due to a cumulative effect of each infection cycle rather than to a complete loss of infectivity.

The gp41 CT truncation decreases Env incorporation into virus particles, and this effect is reversed by matrix mutations. Studies with T-cell laboratory-adapted virus mutants have shown that the decrease in infectivity associated with certain substitutions, deletions, or truncations in the gp41 CT is accompanied by defective Env incorporation into virions (28, 32, 43, 45, 50). Our results for the single-cycle assay suggest that a lower efficiency of Env incorporation may be responsible for the impaired replication of the truncated CT variant, when not compensated for by the appropriate matrix mutations. We thus evaluated the particle protein composition of purified viruses encoding different combinations of matrix and envelope sequences. Virions were produced in 293T cells, HeLa cells, MT4.R5 cells, PBMC, and macrophages, as described above. Virions were pelleted from viral supernatants by centrifugation through a sucrose cushion. Virion-associated gp120 levels were quantified by a sensitive Env ELISA as described in Materials and Methods. Various antibodies (human MAb 2G12 and a pool of human sera from HIV-1-infected patients) for detecting the gp120 captured on the solid phase were tested. The data obtained with the human MAb 2G12 are reported here, since the background was lowest for this antibody. However,

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

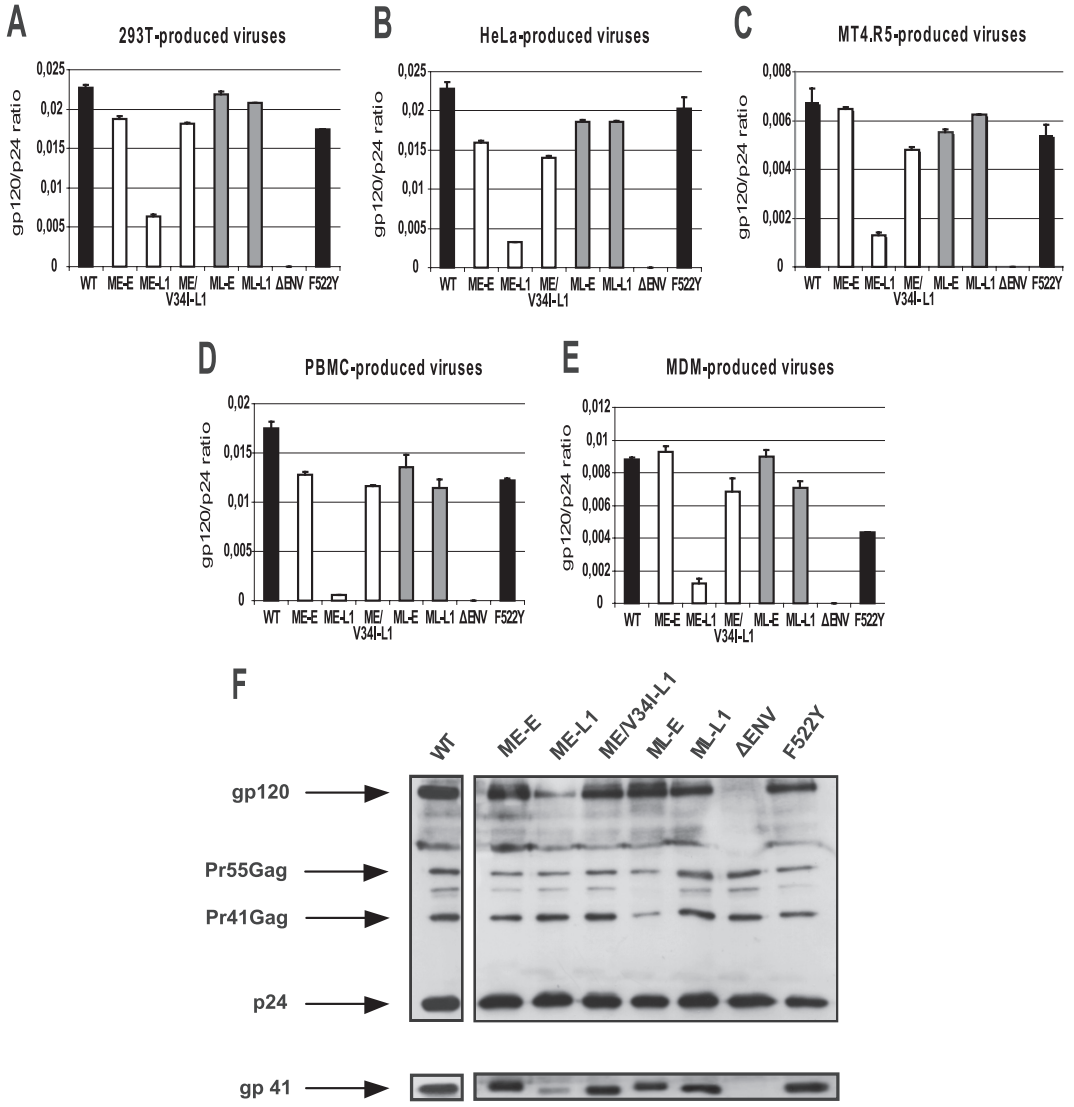


FIG. 5. Env incorporation of NL(AD8)-NX viruses carrying gp41 CTs and matrix proteins derived from HIV-1 present at the early or late stages in patient 153. Virus stocks of the indicated molecular clones were obtained by transfecting 293T (A) and HeLa cells (B) or by infecting MT4.R5 cells (C), PBMC (D), or MDMs (E), as described in Materials and Methods. Env incorporation into virions was assessed, using viruses purified by centrifugation through a 20% sucrose cushion. Viral pellets were lysed in TNE buffer containing 1% Triton X-100 and gp120 was quantified by ELISA. The results shown were obtained from a representative experiment performed in duplicate. Errors bars indicate standard deviations. (F) Western blot analysis of Env incorporation into virions produced by HeLa cells. The upper panel shows the blot probed with anti-gp120 and anti-p24 antibodies. The positions of the Env glycoprotein gp120, the Gag precursor Pr55, the Gag processing intermediate Pr41 and the processed p24 capsid protein are indicated. The blot was stripped and reprobed with an anti-gp41 antibody to detect the Env glycoprotein gp41 (lower panel; see Materials and Methods).

similar results were obtained with the pool of human sera, showing that the differences in gp120 incorporation between the various viruses did not depend on variations in the antigenic properties of Env. The highest Env incorporation levels, measured as the gp120/p24 ratio, were obtained for viruses produced by transfected 293-T cells (Fig. 5). Slightly lower levels of Env incorporation were observed for viruses produced by HeLa cells and PBMC. The gp120/p24 ratio was markedly lower for viruses produced in MT4.R5 cells and macrophages. Despite cell type-related differences, a comparison of virus clones clearly showed Env incorporation to be reduced only when the truncated CT gp41 was expressed together with the early matrix allele. This confirms that the replication defect of the ME-L1 virus is largely due to the impairment of Env incorporation. The matrix protein from the late virus population (ML-L1) and the single V34I mutation in the early matrix sequence (ME/V34I-L1) rescued the incorporation defect.

For HeLa cells, the amounts of gp120, gp41, and p24 found in the various virus lysates were also assessed by Western blotting (Fig. 5F). The results were consistent with those obtained by ELISA, demonstrating that the observed difference in gp120 incorporation in ELISA reflected Env incorporation rather than excess shedding.

These results demonstrate that the defect in infectivity and

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

replication kinetics of the ME-L1 virus resulted largely from the impaired incorporation of Env into virions. In addition, mutations selected in the late virus population in patient 153, including the V34I substitution in particular, compensated for the loss of Env incorporation in viruses harboring truncated gp41 CT in the various cell types.

The abnormal subcellular distribution of CT-truncated Env is reversed by the coexpression of matrix proteins carrying compensatory mutations. HeLa cells are a convenient model for analyzing the subcellular distribution of viral proteins. Confocal microscopy has shown that most of the assembling HIV-1 particles are present at the plasma membrane in these cells, giving a punctate pattern coinciding with Env staining (24, 34). We therefore investigated possible differences in the intracellular distribution of Env carrying full-length or truncated gp41 CTs produced together with the early, late, or ME/V34I matrix proteins by transiently transfecting HeLa cells. The steady-state intracellular distribution of Env was compared to that of the matrix protein, by labeling with an anti-p17 antibody that specifically recognizes the mature form of the protein. Cells were analyzed 40 h after transfection and treated with cycloheximide to eliminate newly synthesized Env from the early secretory pathway. The ImarisColoc module was used to assess the colocalization of Env and matrix protein, as described in Materials and Methods. Pearson channel correlation coefficient (R) for the studied volume ("1" indicating perfect colocalization, "0" indicating no correlation) was calculated for 10 cells from each sample and is expressed as the mean ± the standard deviation.

The NL(AD8)-NX-WT virus displayed punctate staining at the cell surface, with the highest degree of colocalization between Env and the p17 matrix protein ($R = 0.77 \pm 0.07$) (Fig. 6). Similar levels of Env/p17 colocalization at the cell surface were observed for all other viruses, with the notable exception of the ME-L1 virus. For this virus, the colocalization of staining for Env and p17 was much weaker ($R = 0.40 \pm 0.06$), whereas the intensity of diffuse cytosolic Env staining was markedly higher. Thus, the distribution of Env at the cell surface during viral assembly was strongly affected by truncation of the gp41 CT, which is consistent with the defect in Env incorporation observed for the ME-L1 virus. Expression of the late matrix protein gene normalized the distribution of the CT-truncated Env. The V34I substitution in the matrix protein was sufficient to restore a high degree of colocalization between Env and the p17 matrix protein at the cell surface for the virus harboring the truncated gp41 CT. These observations are consistent with the compensatory effect of matrix mutations on viral infectivity, replication kinetics, and Env incorporation.

gp41 CT truncation preceded the emergence of the V34I substitution in the matrix protein. Our data show that mutations in the matrix sequence found in the late sample from patient 153 rescued an intrinsic replication defect associated with gp41 CT truncation. We investigated the order of appearance of these mutations in vivo by analyzing the matrix and gp41 CT sequences from five additional blood samples collected from patient 153 between the early and late stages of infection (Table 1). For each time point, 10 matrix and 10 gp41 CT sequence clones were analyzed (Table 1). The sequences encoding the truncated gp41 CT and the V34I substitution in the matrix protein were simultaneously detected in the proviral DNA isolated from PBMC collected 20 months after primary infection. At this time point, all 10 *env* sequences analyzed encoded the truncated gp41 CT, whereas only 3 of 10 *gag* sequence clones encoded a matrix protein harboring the V34I substitution, suggesting that gp41 CT truncation preceded the emergence of matrix mutations. The proportion of *gag* clones encoding a matrix protein with the V34I substitution gradually increased to 10 of 10 by the late stage. Two other substitutions (K25R and I45L) specific to the late matrix protein appeared after the V34I substitution, and their proportions increased over time. These results strongly suggest that gp41 CT truncation preceded the emergence of matrix changes, with V34I being the earliest and most prevalent mutation. These data are consistent with our data on the major role played by the V34I substitution in overcoming the deleterious effects of gp41 CT truncation. Note that the gp41 CT truncation and the three substitutions specific to the late matrix protein were still present in the 10 matrix and 10 gp41 CT sequence clones analyzed 29 months after the late stage (Table 1).

gp41 CT-truncated HIV-1 may spread by direct cell-to-cell transfer in the absence of matrix compensation. The analysis of sequential samples from patient 153 suggested that the gp41 truncation preceded the emergence of matrix mutations. We analyzed cell-to-cell spread as a possible mechanism supporting the replication of gp41-truncated viruses and facilitating the emergence of compensatory mutations. Cell-to-cell transfer is a more potent and rapid mechanism of viral propagation than infection by cell-free virus (55). The requirements for these two infection routes may differ. We used a previously described flow cytometry-based cell-to-cell virus transfer assay (56). Primary $CD4^+$ T lymphocytes were infected with VSV-G-pseudotyped HIV-1 particles (100 ng of p24 virus equivalent/10^6 cells/ml), carrying different combinations of matrix and Env. At 36 h after infection, the cells were cocultured with autologous CFSE-labeled target T lymphocytes. CFSE labeling allows targets to be distinguished from donors and, thus, analysis of the emergence of newly infected cells in culture. The percentage of Gag^+ cells among CFSE-labeled lymphocytes was determined at various times up to 60 h postcoculture to measure early productive virus-transfer events (Fig. 7A). Under the experimental conditions used here, infection with cell-free virus has a negligible impact on the emergence of Gag^+ target cells (56). The percentage of Gag^+ target cells in culture increased with time in experiments in which donor cells were infected by the reference clone NL(AD8)-NX-WT or by viruses carrying combinations of matrix and Env from patient 153, including that encoding a truncated gp41 not compensated by matrix mutations (ME-L1) (Fig. 7A). Thus, the ME-L1 virus can be transferred from infected cells to target cells in culture, although slightly less efficiently. A functional Env is required for cell-to-cell transfer of virus (56). Accordingly, when donor cells were infected by a VSV-G-pseudotyped virus defective for HIV-1 Env (NLΔenv) and cocultured with target cells, only a very small percentage of target cells became Gag^+ (Fig. 7A). For this control virus, the proportion of Gag^+ cells decreased over time, suggesting that the signal represents the endocytosis and degradation of viral particles by primary T lymphocytes. The transmission efficiency was calculated by comparing the area under the curve for each virus to that of the reference NL(AD8)-NX-WT clone in three independent

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

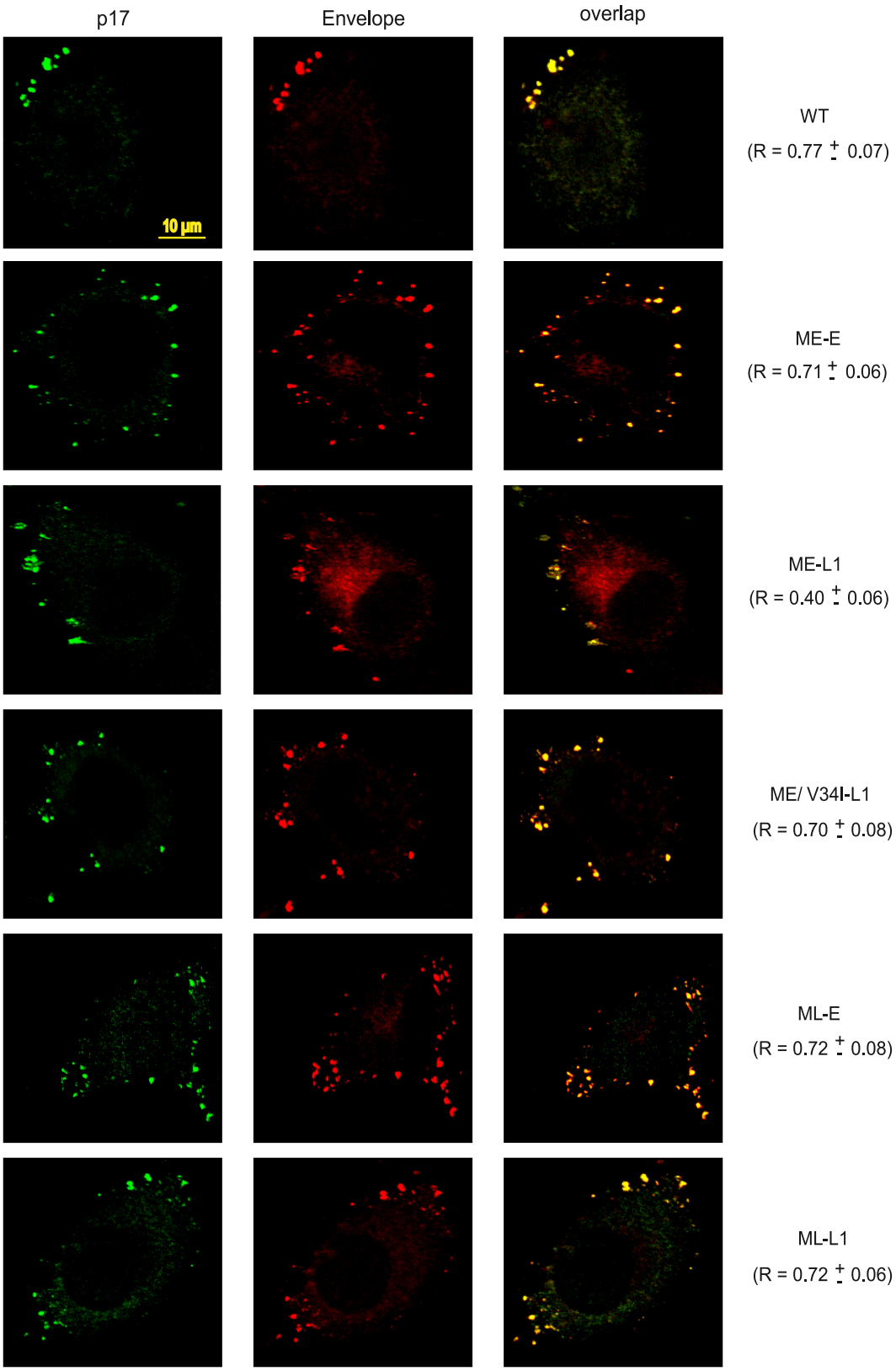


FIG. 6. Analysis of Gag and Env intracellular distributions by confocal microscopy. HeLa cells transfected with the indicated molecular clones were fixed and processed for immunofluorescence analysis with 2G12 anti-Env MAb and a mouse MAb specific for the matrix p17 protein. Before fixation, all of the cells were treated with 50 μg of cycloheximide/ml for 3 h. Protein distribution was assessed by confocal microscopy and the Pearson channel correlation coefficient (*R*) ("1" indicating perfect colocalization, "0" indicating no correlation) was calculated for each sample, as described in Materials and Methods. Scale bar, 10 μm.

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

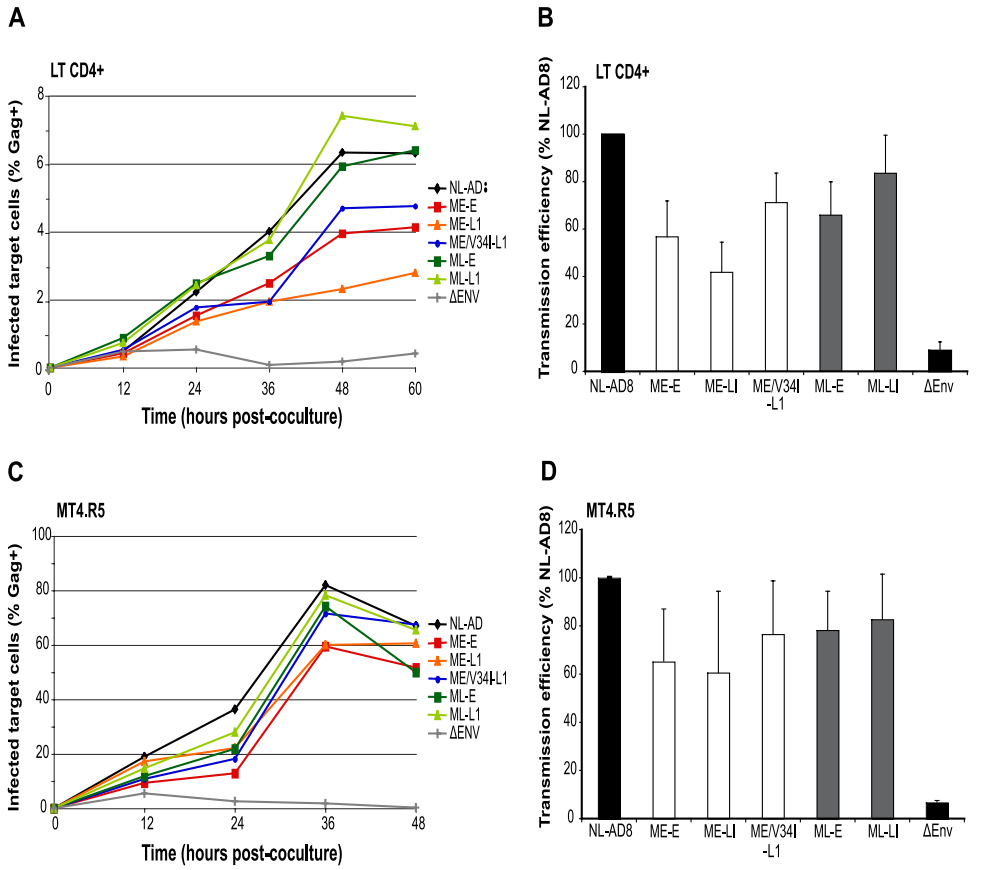


FIG. 7. Cell-to-cell HIV transfer. Cell-to-cell viral transfer was measured by a flow cytometry-based assay. Primary $CD4^+$ T lymphocytes (A and B) or MT4R5 cells (C and D) were infected with VSV-G-pseudotyped HIV-1 particles carrying different combinations of matrix and Env. The cells were then cocultured with CFSE-labeled target cells, such that targets could be distinguished from donors. The appearance of Gag^+ target cells was followed over time (A and C). The efficiency of transmission (B and D) was measured by calculating the area under the curve in three independent experiments, with values for the NL(AD8) clone being defined as 100%. Means and standard deviations are shown.

cell-to-cell transfer experiments using different multiplicities of infection (Fig. 7B). Viruses encoding early or late Env displayed similar transfer efficiencies, suggesting that the size of the CT does not affect HIV-1 transfer. However, a trend toward slightly more efficient transfer was observed for viruses carrying the late matrix sequence, but this difference was not statistically significant.

Similar results were obtained with MT4R5 cells (Fig. 7C and D). Gag^+ cells appeared more rapidly among targets in this cell line than in primary lymphocytes and higher percentages of the target cells were productively infected. Also, in MT4.R5 cells, the ME-L1 virus displayed replication kinetics and a transfer efficiency similar to those for the other viruses. Overall, these findings demonstrate that cells producing the gp41-truncated virus, in the absence of matrix compensation, may productively infect target cells by cell-to-cell virus transfer.

DISCUSSION

The important role of the HIV-1 gp41 CT in regulating Env functions, incorporating Env into virus particles and, consequently, in viral replication has clearly been demonstrated in vitro with T-cell laboratory-adapted virus mutants (16, 19, 28, 43, 44, 50, 63). The strong conservation of CT length in primary isolates of HIV-1 and SIV also suggests that this factor plays a key role in viral replication and persistence in vivo (39, 54, 64). However, we describe here the emergence and dominance in vivo of a primary HIV-1 variant carrying a natural truncation of the gp41 CT. Env sequence analysis on longitudinal samples from patient 153 showed that the dominant virus population 6 years after primary infection harbored a C-terminal 20-amino-acid truncation, whereas the virus population present at the early stage of infection had a full-length Env sequence. This deletion may affect Env trafficking, incorporation, and function. The aims of the present study were thus to assess the functional consequences of the gp41 truncation and to identify the mechanisms allowing this virus to replicate efficiently in an infected patient despite this major Env alteration. Compensatory mutations emerged in the matrix protein, restoring Env incorporation and virus replication. To our knowledge, this is the first description of in vivo rescue of the impairment of viral replication due to a gp41 CT truncation.

The observed deletion in the gp41 encoded by late *env* clones from patient 153 encompassed both the C-terminal dileucine trafficking motif and much of the LLP-1 domain. We investigated its effects on virus replication by placing the gp41 CT coding sequences of early and late HIV-1 *env* clones from

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

patient 153 in the context of the molecular clone pNL(AD8). NL(AD8)-NX viruses carrying the gp41 CT encoded by late *env* clones failed to establish productive infection in MT4.R5 cells. Analyses of purified virions demonstrated that the CT deletion strongly affected the efficiency of Env incorporation into virus particles and provided an explanation for the impairment of replication. These findings are consistent with previous studies showing that decreases in infectivity due to certain substitutions, deletions, or truncations in the gp41 CT, including those specifically affecting the LLP-1 domain, resulted from a defect in Env incorporation into virions (28, 32, 43, 50).

However, despite this deleterious truncation of the gp41 CT, the virus remained detectable in the plasma of patient 153 throughout the 9 years of follow-up, suggesting that functional complementation of gp41 CT truncation, probably involving the matrix protein, might have helped to maintain viral replication capacity. This hypothesis is based principally on the observation of compensation between the CT and matrix protein on viral infectivity of T-cell laboratory-adapted virus mutants (19, 40, 43). A comparative analysis of matrix sequences obtained from patient 153 at early and late stages of infection confirmed the occurrence of three substitutions (K25R, V34I, and I45L) in all late matrix sequences. Consistent with our hypothesis, the expression of a late matrix allele rescued replication of the CT-truncated virus. The restoration of virus replication by matrix mutations demonstrates that the CT-truncated Env is competent for all Env functions other than incorporation into virus particles. Furthermore, viruses carrying the late matrix protein and the early full-length gp41 CT were clearly replication competent. Thus, the substitutions observed in the late matrix protein are functionally compatible with a full-length Env. These data demonstrate the suitability of our model, derived from the NL(AD8) molecular clone, for use in the studies of the effects of compensation between the CT and matrix protein described here. However, it may be necessary to take into account more extensively the primary genetic context in which CT truncation arose, in analyses of other CT-truncated Env properties, such as their antigenicity.

We investigated the respective roles of the three amino acid substitutions differentiating early from late matrix proteins, by carrying out further studies with proviral constructs encoding early matrix sequences and all possible combinations of the K25R, V34I, and I45L substitutions coupled to the truncated late *env* sequence. Analyses of replication kinetics in MT4.R5 cells showed that the replication defect resulting from truncation of the gp41 CT was reversed by the single Val/Ile substitution at position 34 in the matrix protein. The V34I substitution in the matrix protein has been shown to restore the replication defect resulting from a small deletion in the LLP2/LLP3 domains of a T-cell laboratory-adapted virus mutant (43). However, we provide here the first demonstration of such mechanisms occurring in viruses circulating in a patient. Furthermore, these results represent the first description of a compensatory effect of amino acid substitutions in the matrix protein on the impairment of replication resulting from a truncation of the gp41 CT removing much of the LLP-1 domain. Restoration of the replication capacities of viruses harboring truncated gp41 CTs by the late matrix protein or V34I substitution was confirmed in PBMC and macrophages, demonstrating the key role of matrix residue 34 in compatibility with truncated CT gp41 in relevant HIV-1 target cells. The late matrix sequence and the V34I mutation alone restored the replication of viruses harboring the gp41 truncation in macrophages, whereas, in PBMC, the V34I substitution alone compensated only partially for the loss of infectivity. This difference suggests that the two additional substitutions (K25R and I45L) may help to optimize viral replication fitness in this cellular context.

The efficiency of Env incorporation into virus particles (expressed as the ratio of gp120 to p24) differed between cell types, but markedly low levels of CT-truncated Env incorporation and the rescue of Env incorporation by matrix mutations were observed in all cell types tested. Thus, the requirement for matrix and envelope compatibility with respect to the 20-amino acid CT truncation was similar in different cellular contexts, consistent with the infectivity data obtained for the single-round reporter assay. The single V34I substitution in the matrix protein, in particular, played a major role in compensating for Env truncation. The defective incorporation of CT-truncated Env and its rescue by matrix mutation were corroborated by confocal microscopy analyses conducted on HeLa cells. Only a partial redistribution of Env at the cell surface was observed for the virus harboring truncated gp41 CT and the early matrix sequence, whereas the V34I substitution in the matrix protein appeared to be sufficient to restore typical punctate pattern of p17 matrix protein staining coinciding with Env staining (24, 34). The exact nature of the mechanism of compensation between gp41 CT and matrix protein remains unclear. Matrix protein oligomerization creates holes into which the cytoplasmic tail of the gp41 envelope protein is thought to be inserted (2, 25, 43). The location of the V34I residue seems compatible with direct or indirect interaction with the LLP-1 domain (25). However, several aspects of this model remain undetermined, including the relevance of matrix protein-driven oligomerization in the context of the uncleaved Gag precursor and whether this process occurs in cells producing virus. Structural data for the intact CT of gp41 are also currently lacking.

Sequential analyses of samples collected from patient 153 between the early and late stages of infection indicated that gp41 CT truncation occurred before the emergence of matrix changes. The rapid selection of variants harboring a truncation in the gp41 CT contrasted with the slower emergence of variants carrying compensatory matrix substitutions over a period of several years, with V34I being the first and most prevalent matrix substitution (Table 1). The progressive emergence of the compensatory V34I matrix mutation was accompanied by an increase in viral load, which reached 4.25 log RNA copies/ml after 6 years (corresponding to the late stage) and 4.9 log 6 months later, when antiretroviral treatment was initiated. The changes in viral load observed in patient 153 suggest that strong selective pressure restrained virus replication 1 year after primary infection, leading to the selection of a variant harboring the truncated Env sequence. The progressive emergence of compensatory matrix mutations subsequently increased virus replication in vivo, conferring full pathogenic potential on the virus.

The radical switch observed in the *env* quasispecies is reminiscent of the purifying selection exerted by CTL responses on HIV-1 (36, 42). Two T-cell epitopes compatible with the HLA

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

haplotype of patient 153 (A2 and B7) were identified (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/gp160.html) in the 20-amino-acid sequence deleted by CT truncation. A strong T-cell response specific for one of these epitopes inducing the selection of variants with a truncated gp41 CT is therefore a plausible hypothesis. Moreover, such T-cell responses against the B7 epitope were previously found in more than 20% of patients expressing this allele during primary infection (3). Unfortunately, we were unable to explore this possibility, because no cell samples from patient 153 were available. We cannot rule out the alternative possibility that CT truncation may be involved in antigenic variation of the ectodomain of Env and viral escape from neutralizing antibodies. Indeed, a potentially critical effect of even minor variations of the sequence of the CT on the antigenicity of the ectodomain of Env has recently been reported (31). To our knowledge, no treatment likely to affect HIV-1 replication was given to the patient before March 2000.

Our data also provide a potential mechanism for CT-truncated virus replication, allowing the emergence of compensatory matrix mutations. We have shown that, in the absence of compensatory matrix mutations, the HIV-1 variant harboring a truncated Env CT can spread by cell-to-cell transfer, a potent means of virus replication (55). This finding also suggests that the molecular requirements for direct virus transfer are less stringent than those underlying cell-free virus infection. Mutations affecting Gag or Env that strongly reduce Env incorporation into virus particles result in the number of Env spikes on the virus surface being insufficient for fusion pore formation and enlargement. In the context of cell-cell contacts, provided that the viral Env is competent for receptor binding and membrane fusion, several factors may facilitate the translocation of virus material. Even in the absence of syncytia, the large areas involved in cell-cell contact and the density of viral proteins and cellular receptors at these contact sites are likely to favor virus transfer. Furthermore, viral protein trafficking may be differently regulated in the presence of cellular contacts. Sustained virus replication creates suitable conditions for the emergence of compensatory mutations, which, in the case reported here, restored the infectivity of cell-free virions.

In conclusion, these data show that HIV-1 can undergo gp41 CT truncation removing a large part of the LLP-1 domain in vivo. In the patient studied here, the virus overcame this major structural change through a compensatory mechanism involving a single amino acid change in the matrix. Our data also reveal that it is possible for a virus with highly impaired Env incorporation to replicate through cell-to-cell transmission until the recovery of its full replicative and pathogenic capacity. These findings provide new insight into HIV-1 assembly and evolution potential in vivo.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eric O. Freed (National Cancer Institute at Frederick, Frederick, MD) for providing the pNL(AD8) proviral construct and Ali Amara (Unité de Pathogénie Virale, Institut Pasteur, Paris, France) for the MT4.R5 cell line. The TZM-bl cells were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH; TZM-bl was obtained from John C. Kappes, Xiaoyun Wu, and Tranzyme, Inc. We thank Marie Lambelé, Alain Moreau, Pierre-Yves Sizaret, and Sylvie Brunet for technical assistance. We are grateful to Arnaud Moris, Béatrice Labrosse, and Philippe Roingeard for helpful discussions on this work. Our confocal data were generated with the help of the RIO/IBiSA Microscopy Facility of François Rabelais University.

This work was supported by grants from SIDACTION (Paris, France) and from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). E.B. was supported by fellowships from the French Ministry of Research and SIDACTION. D.V. was supported by a fellowship from the ANRS.

REFERENCES

1. **Akari, H., T. Fukumori, and A. Adachi.** 2000. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. J. Virol. **74:**4891–4893.
2. **Alfadhli, A., R. L. Barklis, and E. Barklis.** 2009. HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. Virology **387:**466–472.
3. **Altfeld, M., E. T. Kalife, Y. Qi, H. Streeck, M. Lichterfeld, M. N. Johnston, N. Burgett, M. E. Swartz, A. Yang, G. Alter, X. G. Yu, A. Meier, J. K. Rockstroh, T. M. Allen, H. Jessen, E. S. Rosenberg, M. Carrington, and B. D. Walker.** 2006. HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial $CD8^+$ T cell response against HIV-1. PLoS Med. **3:**e403.
4. **Amara, A., A. Vidy, G. Boulla, K. Mollier, J. Garcia-Perez, J. Alcami, C. Blanpain, M. Parmentier, J. L. Virelizier, P. Charneau, and F. Arenzana-Seisdedos.** 2003. G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. J. Virol. **77:**2550–2558.
5. **Ataman-Onal, Y., C. Coiffier, A. Giraud, A. Babic-Erceg, F. Biron, and B. Verrier.** 1999. Comparison of complete env gene sequences from individuals with symptomatic primary HIV type 1 infection. AIDS Res. Hum. Retrovir. **15:**1035–1039.
6. **Bergeron, L., N. Sullivan, and J. Sodroski.** 1992. Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus. J. Virol. **66:**2389–2397.
7. **Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar, and R. Benarous.** 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. J. Virol. **73:**1350–1361.
8. **Blot, G., K. Janvier, S. Le Panse, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2003. Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. J. Virol. **77:**6931–6945.
9. **Boge, M., S. Wyss, J. S. Bonifacino, and M. Thali.** 1998. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. J. Biol. Chem. **273:**15773–15778.
10. **Byland, R., P. J. Vance, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** 2007. A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. Mol. Biol. Cell **18:**414–425.
11. **Chen, S. S., S. F. Lee, and C. T. Wang.** 2001. Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41. J. Virol. **75:**9925–9938.
12. **Clavel, F., M. D. Hoggan, R. L. Willey, K. Strebel, M. A. Martin, and R. Repaske.** 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. J. Virol. **63:**1455–1459.
13. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. EMBO J. **15:**5783–5788.
14. **Dacheux, L., A. Moreau, Y. Ataman-Onal, F. Biron, B. Verrier, and F. Barin.** 2004. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. J. Virol. **78:**12625–12637.
15. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. Nature **381:**661–666.
16. **Dubay, J. W., S. J. Roberts, B. H. Hahn, and E. Hunter.** 1992. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. J. Virol. **66:**6616–6625.
17. **Eisenberg, D., and M. Wesson.** 1990. The most highly amphiphilic alpha-helices include two amino acid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein 41. Biopolymers **29:**171–177.
18. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science **272:**872–877.
19. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. J. Virol. **70:**341–351.
20. **Freed, E. O., J. M. Orenstein, A. J. Buckler-White, and M. A. Martin.** 1994.

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. J. Virol. **68:**5311–5320.
21. **Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. J. Virol. **66:**3306–3315.
22. **Gousset, K., S. D. Ablan, L. V. Coren, A. Ono, F. Soheilian, K. Nagashima, D. E. Ott, and E. O. Freed.** 2008. Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. PLoS Pathog. **4:**e1000015.
23. **Grigorov, B., F. Arcanger, P. Roingeard, J. L. Darlix, and D. Muriaux.** 2006. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. J. Mol. Biol. **359:**848–862.
24. **Hermida-Matsumoto, L., and M. D. Resh.** 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. J. Virol. **74:**8670–8679.
25. **Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93:**3099–3104.
26. **Hourioux, C., D. Brand, P. Y. Sizaret, F. Lemiale, S. Lebigot, F. Barin, and P. Roingeard.** 2000. Identification of the glycoprotein 41(TM) cytoplasmic tail domains of human immunodeficiency virus type 1 that interact with Pr55Gag particles. AIDS Res. Hum. Retrovir. **16:**1141–1147.
27. **Hunter, E., and R. Swanstrom.** 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **157:**187–253.
28. **Jiang, J., and C. Aiken.** 2007. Maturation-dependent human immunodeficiency virus type 1 particle fusion requires a carboxyl-terminal region of the gp41 cytoplasmic tail. J. Virol. **81:**9999–10008.
29. **Jones, P. L., T. Korte, and R. Blumenthal.** 1998. Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and coreceptors. J. Biol. Chem. **273:**404–409.
30. **Jouve, M., N. Sol-Foulon, S. Watson, O. Schwartz, and P. Benaroch.** 2007. HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. Cell Host Microbe **2:**85–95.
31. **Kalia, V., S. Sarkar, P. Gupta, and R. C. Montelaro.** 2005. Antibody neutralization escape mediated by point mutations in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41. J. Virol. **79:**2097–2107.
32. **Kalia, V., S. Sarkar, P. Gupta, and R. C. Montelaro.** 2003. Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. J. Virol. **77:**3634–3646.
33. **Kliger, Y., and Y. Shai.** 1997. A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers. Biochemistry **36:**5157–5169.
34. **Lambele, M., B. Labrosse, E. Roch, A. Moreau, B. Verrier, F. Barin, P. Roingeard, F. Mammano, and D. Brand.** 2007. Impact of natural polymorphism within the gp41 cytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 on the intracellular distribution of envelope glycoproteins and viral assembly. J. Virol. **81:**125–140.
35. **Lee, S. J., W. Hu, A. G. Fisher, D. J. Looney, V. F. Kao, H. Mitsuya, L. Ratner, and F. Wong-Staal.** 1989. Role of the carboxy-terminal portion of the HIV-1 transmembrane protein in viral transmission and cytopathogenicity. AIDS Res. Hum. Retrovir. **5:**441–449.
36. **Leslie, A. J., K. J. Pfafferott, P. Chetty, R. Draenert, M. M. Addo, M. Feeney, Y. Tang, E. C. Holmes, T. Allen, J. G. Prado, M. Altfeld, C. Brander, C. Dixon, D. Ramduth, P. Jeena, S. A. Thomas, A. St John, T. A. Roach, B. Kupfer, G. Luzzi, A. Edwards, G. Taylor, H. Lyall, G. Tudor-Williams, V. Novelli, J. Martinez-Picado, P. Kiepiela, B. D. Walker, and P. J. Goulder.** 2004. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. Nat. Med. **10:**282–289.
37. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. EMBO J. **16:**695–705.
38. **Lopez-Verges, S., G. Camus, G. Blot, R. Beauvoir, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2006. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103:**14947–14952.
39. **Luciw, P. A., K. E. Shaw, B. L. Shacklett, and M. L. Marthas.** 1998. Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. Virology **252:**9–16.
40. **Mammano, F., E. Kondo, J. Sodroski, A. Bukovsky, and H. G. Gottlinger.** 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. J. Virol. **69:**3824–3830.
41. **Marechal, V., F. Clavel, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 1998. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. **72:**2208–2212.
42. **Martinez-Picado, J., J. G. Prado, E. E. Fry, K. Pfafferott, A. Leslie, S. Chetty, C. Thobakgale, I. Honeyborne, H. Crawford, P. Matthews, T. Pillay, C. Rousseau, J. I. Mullins, C. Brander, B. D. Walker, D. I. Stuart, P. Kiepiela, and P. Goulder.** 2006. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. **80:**3617–3623.
43. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. J. Virol. **74:**3548–3554.
44. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97:**343–348.
45. **Newman, J. T., T. J. Sturgeon, P. Gupta, and R. C. Montelaro.** 2007. Differential functional phenotypes of two primary HIV-1 strains resulting from homologous point mutations in the LLP domains of the envelope gp41 intracytoplasmic domain. Virology **367:**102–116.
46. **Nobile, C., C. Petit, A. Moris, K. Skrabal, J. P. Abastado, F. Mammano, and O. Schwartz.** 2005. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. J. Virol. **79:**5386–5399.
47. **Ohno, H., R. C. Aguilar, M. C. Fournier, S. Hennecke, P. Cosson, and J. S. Bonifacino.** 1997. Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. Virology **238:**305–315.
48. **Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans.** 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88:**3987–3991.
49. **Perez-Bercoff, D., A. David, H. Sudry, F. Barre-Sinoussi, and G. Pancino.** 2003. Fcgamma receptor-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. J. Virol. **77:**4081–4094.
50. **Piller, S. C., J. W. Dubay, C. A. Derdeyn, and E. Hunter.** 2000. Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. J. Virol. **74:**11717–11723.
51. **Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. **72:**2855–2864.
52. **Prabakaran, P., A. S. Dimitrov, T. R. Fouts, and D. S. Dimitrov.** 2007. Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. Adv. Pharmacol. **55:**33–97.
53. **Rudner, L., S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott.** 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. J. Virol. **79:**4055–4065.
54. **Saha, K., H. Yan, J. A. Nelson, and B. Zerhouni-Layachi.** 2005. Infection of human and non-human cells by a highly fusogenic primary CD4-independent HIV-1 isolate with a truncated envelope cytoplasmic tail. Virology **337:**30–44.
55. **Sattentau, Q.** 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. Nat. Rev. Microbiol. **6:**815–826.
56. **Sourisseau, M., N. Sol-Foulon, F. Porrot, F. Blanchet, and O. Schwartz.** 2007. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. J. Virol. **81:**1000–1012.
57. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22:**4673–4680.
58. **Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes.** 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1896–1905.
59. **Wyatt, R., and J. Sodroski.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science **280:**1884–1888.
60. **Wyss, S., C. Berlioz-Torrent, M. Boge, G. Blot, S. Honing, R. Benarous, and M. Thali.** 2001. The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor. J. Virol. **75:**2982–2992.
61. **Wyss, S., A. S. Dimitrov, F. Baribaud, T. G. Edwards, R. Blumenthal, and J. A. Hoxie.** 2005. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. J. Virol. **79:**12231–12241.
62. **Yang, X., S. Kurteva, S. Lee, and J. Sodroski.** 2005. Stoichiometry of antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. **79:** 3500–3508.
63. **Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. J. Virol. **67:**213–221.
64. **Zerhouni, B., J. A. Nelson, and K. Saha.** 2004. Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for $CD8^+$ lymphocytes. J. Virol. **78:**1243–1255.

Downloaded from jvi.asm.org by on September 20, 2009

IV. Discussion

De nombreuses études menées avec des mutants de laboratoire ont d'ores et déjà clairement démontré le rôle du DC de la TMgp41 dans la régulation des fonctions des Env, dans l'incorporation des Env à la surface des particules virales néoformées et, par conséquent, dans la multiplication virale *in vitro* (Dubay et al., 1992; Freed and Martin, 1995; Jiang and Aiken, 2007; Murakami and Freed, 2000a; Murakami and Freed, 2000b; Piller et al., 2000; Yu et al., 1992). L'intégrité de ce domaine semble ainsi essentielle à la multiplication du VIH-1 dans les lymphocytes T $CD4^+$ primaires, les macrophages et de nombreuses lignées cellulaires T. Le DC de la TMgp41 paraît également impliqué dans la multiplication et la persistance *in vivo* du VIH-1 puisque la présence de variants viraux présentant une troncation de ce domaine reste très exceptionnelle chez les patients infectés (Saha et al., 2005; Zerhouni et al., 2004b). De manière similaire, l'intégrité du DC de la glycoprotéine transmembranaire d'autres lentivirus comme le SIV a été également décrite comme essentielle à la multiplication virale *in vivo* (Luciw et al., 1998).

En dépit de ces observations, nous avons pu identifier un patient infecté par le VIH-1 chez lequel un variant portant une troncation naturelle du DC de la TMgp41 avait pu émergé et devenir dominant. L'analyse des séquences de gènes *env* menée sur des prélèvements effectués tout au long du suivi de ce patient a montré que la population virale observée 6 ans après la primo-infection (stade tardif) présentait une troncation des 20 acides aminés C-terminaux du DC de la TMgp41 alors que la population virale présente au stade précoce de l'infection avait une séquence *env* codant une TMgp41 complète. Cette troncation affectant les motifs reconnus comme impliqués dans les différentes fonctions du DC de la TMgp41 aurait potentiellement dû perturber le trafic, l'incorporation et les fonctions des Env et, par conséquent, la multiplication du virus présent au stade tardif. Cependant, les mesures de charge virale plasmatique réalisées tout au long du suivi du patient attestaient d'une multiplication efficace *in vivo* de ce variant du VIH-1 présentant une TMgp41 tronquée. La description de ce cas était en soi originale dans la mesure où l'intégrité du DC de la TMgp41 est considérée comme essentielle à la multiplication virale *in vivo.*

Le but de mon travail de thèse a consisté à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une telle troncation de la TMgp41 sur la multiplication virale et d'identifier les mécanismes permettant à ce virus mutant de conserver sa capacité de multiplication en dépit de l'apparition de cette troncation délétère.

A. Conséquences fonctionnelles de la troncation du DC de la TMgp41

L'analyse des séquences des clones tardifs de gènes *env* du patient 153 a révélé que ces gènes codaient une TMgp41 tronquée de ses 20 acides aminés C-terminaux. Cette troncation affecte non seulement le motif de trafic C-terminal dileucine ($L_{855}L_{856}$) mais aussi une majeure partie du domaine LLP-1. Dans la littérature, le motif C-terminal dileucine a été décrit comme interagissant avec les complexes d'adaptine AP-1 présents au niveau du réseau *trans*-Golgien et des endosomes précoces pour assurer un trafic des Env entre ces deux compartiments cellulaires (Wyss et al., 2001). Il serait également capable d'interagir avec le complexe d'adaptine AP-2 permettant l'endocytose clathrine-dépendante des Env arrivées à la surface cellulaire (Byland et al., 2007). Le motif dileucine contribuerait ainsi à la régulation complexe du trafic et de la distribution des Env au cours de l'assemblage, ce qui est essentiel pour une production optimale de nouvelles particules virales infectieuses. Le motif LLP-1 est, quant à lui, impliqué notamment dans le processus de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire au cours de l'infection, et dans l'incorporation des Env à la surface des particules virales (Jiang and Aiken, 2007; Kalia et al., 2003; Piller et al., 2000).

Dans un premier temps, nous avons tenté d'évaluer l'effet de la troncation observée dans le DC de la TMgp41 en comparant la cinétique de multiplication en cellules MT4.R5 de virus produits à partir de virus recombinants pNL(AD8)-NX arborant les séquences de clones de gènes *env* précoces (clone E) et tardifs (clones L1 et L2) du patient 153. Le choix de ces clones de gènes *env* se justifiait par leur représentativité au sein des populations virales retrouvées aux stades précoce et tardif de l'infection. Les virus NL(AD8)-NX arborant les DC de TMgp41 tronqués codés par les clones de gènes *env* tardifs ont échoué à établir une infection productive en cellules MT4.R5, alors que les virus NL(AD8)-NX arborant les DC de TMgp41 non-tronqués codés par les clones de gènes *env* précoces se sont multipliés à des niveaux similaires à celui du virus sauvage. Les cinétiques de multiplication des provirus recombinants contrôles, NL(AD8)-E_{del23} et NL(AD8)-$L1_{ins23}$, sont d'ailleurs venues confirmer le fait que la perte importante des capacités de multiplication observée était due à la troncation du DC de la TMgp41 plutôt qu'à un autre polymorphisme du DC.

De manière similaire, un défaut majeur de multiplication virale en lymphocytes T primaires et en macrophages a été observé pour les virus NL(AD8)-ME-L1 arborant des séquences codant des Env tronquées et une protéine de matrice précoce non-compensatrice. Cette observation suggérait ainsi que les capacités de multiplication de nos virus présentant des Env tronquées étaient pas influencées par les types cellulaires étudiés. Il est d'ailleurs à

noter que la lignée cellulaire MT4.R5 n'a pas permis la multiplication des virus NL(AD8)-NX arborant les DC de TMgp41 tronqués codés par les clones de gènes *env* tardifs contrairement à ce qui avait pu être observé avec un VIH-1 NL4.3 portant une TMgp41 avec un DC tronqué dans sa quasi-totalité (Murakami and Freed, 2000b).

Nous avons ensuite poursuivi nos investigations pour essayer de déterminer quelles étaient les mécanismes responsables du défaut de multiplication virale imposé par la troncation du DC de la TMgp41. Nous avons ainsi réalisé des tests d'infectivité en cycle unique avec des virus produits dans différents types cellulaires (cellules 293T, HeLa, MT4.R5, lymphocytes T $CD4^+$ et macrophages). Une nette diminution des capacités infectieuses des virus arborant des Env tronquées et une protéine de matrice non-compensatrice (NL(AD8)-ME-L1) a été mise en évidence. Cette observation suggérait une perturbation des étapes précoces du cycle de multiplication viral. Bien qu'une hiérarchie similaire des niveaux d'infectivité de l'ensemble des virus recombinants étudiés ait été observée quel que soient les cellules utilisées pour la production virale, les titres infectieux pour un même virus se sont montrés variables selon le type cellulaire. Cet écart entre les niveaux d'infectivité pourrait notamment s'expliquer par l'existence de différences dans le trafic intracellulaire des protéines virales et dans les voies d'assemblage entre les types cellulaires comme plusieurs études le suggèrent (Gousset et al., 2008; Grigorov et al., 2006; Jouve et al., 2007). Par ailleurs, une infectivité résiduelle a pu être observée lors des tests d'infectivité en cycle unique effectués avec le virus NL(AD8)-ME-L1 alors qu'aucune multiplication virale n'était détectée dans les analyses de cinétique en cycles multiples. Cette apparente incohérence peut s'expliquer par une accumulation des effets délétères à chacun des cycles infectieux plutôt que par une perte complète de l'infectivité virale.

Enfin, une analyse approfondie de la composition des particules virales produites dans les différents types cellulaires a permis de révéler un défaut majeur d'incorporation des Env sur les virions arborant des Env tronquées et une protéine de matrice non-compensatrice (NL(AD8)-ME-L1). L'observation de ce défaut d'incorporation des Env nous a alors permis d'expliquer le défaut de multiplication virale observé précédemment. L'ensemble de ces données concordent avec celles d'études antérieures ayant montré que la diminution des capacités infectieuses des virions, résultant de substitutions, délétions ou troncations du DC de la TMgp41, était associée à un défaut d'incorporation des Env dans les virions (Jiang and

Aiken, 2007; Kalia et al., 2003; Murakami and Freed, 2000a; Newman et al., 2007; Piller et al., 2000; Wyss et al., 2005).

B. Compensation fonctionnelle de la troncation du DC de la TMgp41 par des mutations apparues dans la protéine de matrice

Comme nous venons de le voir précédemment, la troncation du DC de la TMgp41 affecte fortement la multiplication virale, notamment en empêchant l'incorporation des Env sur les particules virales néoformées. Au vue de ces observations, une élimination de ces virus arborant des Env tronquées paraissait inévitable. Cependant, ces mêmes virus ont continué à se multiplier efficacement au cours du temps comme en témoignent les mesures de charge virale réalisées tout au long du suivi du patient 153. Ce phénomène de persistance virale *in vivo* suggérait donc l'existence d'un phénomène compensatoire contribuant au maintien des capacités de multiplication du virus. Étant donné l'existence d'interactions potentielles entre le DC de la TMgp41 et la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice au cours de l'assemblage, nous avons alors émis une hypothèse selon laquelle les effets délétères de la troncation du DC de la TMgp41 seraient compensés par des mutations survenues dans la protéine de matrice. Cette hypothèse était également basée sur les observations de précédentes études ayant montrées qu'un défaut d'infectivité résultant de substitutions ou délétions dans la protéine de matrice pouvait être compensé par des troncations du DC de la TMgp41 (Freed and Martin, 1996; Mammano et al., 1995) ou inversement, qu'un défaut d'infectivité imposé par une petite délétion du DC de la TMgp41 pouvait être compensé par une mutation de la protéine de matrice (Murakami and Freed, 2000a).

Une analyse comparative des séquences des protéines de matrice du patient 153 présentes à un stade précoce ou tardif de l'infection a confirmé l'émergence de trois substitutions (K25R, V34I et I45L) très conservées chez l'ensemble des clones tardifs de matrice par comparaison à l'ensemble des clones précoces. Nous avons alors testé par la suite la multiplication de virus recombinants arborant des combinaisons de séquences de nos DC de TMgp41 (E, L1 et L2) ou de matrices (ME et ML) primaires. En accord avec notre hypothèse, l'expression d'une protéine de matrice tardive, présentant les trois substitutions K25R, V34I et I45L, permettait de restaurer la multiplication des virus présentant des Env tronquées. Ce phénomène de compensation de la multiplication virale par des mutations apparues dans la protéine de matrice montrait que les Env tronquées étaient compétentes pour toutes les fonctions autres que leur incorporation dans les particules virales. De plus, les virus arborant une protéine de matrice tardive et un DC de TMgp41 précoce non-tronqué se sont montrés

clairement compétents pour la multiplication, ceci suggérant que les substitutions observées dans la protéine de matrice tardive étaient fonctionnellement compatibles avec les Env complètes.

Nous avons ensuite évalué le potentiel compensatoire de chacune des trois substitutions différenciant les protéines de matrice tardives des protéines de matrice précoces. Pour cela nous avons étudié les cinétiques de multiplication de virus recombinants arborant la séquence codant la protéine de matrice précoce (ME) présentant elle-même toutes les combinaisons possibles de mutations K25R, V34I et I45L, couplée à une séquence codant des Env tardives tronquées. L'analyse des cinétiques de multiplication en cellules MT4.R5 a montré que le défaut de multiplication résultant de la troncation du DC de la TMgp41 pouvait être restauré par la substitution Val/Ile en position 34 de la protéine de matrice. De manière similaire, un effet compensatoire de la substitution V34I apparue dans la protéine de matrice avait été décrit dans une précédente étude conduite *in vitro* avec des mutants de laboratoire. Cette substitution restaurait le défaut de multiplication résultant d'une petite délétion de 5 acides aminés dans les domaines LLP-2/LLP-3 (Murakami and Freed, 2000a). La substitution V34I avait également été décrite comme étant capable de compenser le défaut de multiplication causé par la mutation du résidu 12 de la protéine de matrice (Freed and Martin, 1996). Par contre, un effet compensatoire de la substitution V34I sur un défaut de multiplication virale résultant d'une troncation du DC de la TMgp41 affectant une bonne partie du motif LLP-1 n'avait encore jamais été montré.

La restauration des capacités de multiplication des virus arborant des Env tronquées par la protéine de matrice tardive, et plus particulièrement par la substitution V34I, a été confirmée dans les principales cellules cibles du VIH-1, à savoir les lymphocytes T $CD4^+$ primaires et les macrophages. Toutes ces expériences ont montré le rôle clé de ce résidu 34 dans la compatibilité entre la protéine de matrice tardive et les DC de TMgp41 tronqués. L'expression de la protéine de matrice tardive et la seule présence de la substitution V34I ont suffit à restaurer la multiplication dans les macrophages des virus arborant un TMgp41 tronquée, alors qu'en lymphocytes T primaires, la substitution V34I ne compensait que partiellement le défaut d'infectivité. Cette différence suggérait donc que les deux substitutions additionnelles (K25R et I45L) peuvaient aider à optimiser le "fitness" de multiplication virale dans ce contexte cellulaire.

C. Compensation du défaut d'incorporation des Env présentant un DC de TMgp41 tronqué par les mutations apparues dans la protéine de matrice

Au cours de notre étude, nous avons pu observer des différences dans l'efficacité d'incorporation des Env sur les particules virales (exprimée par un ratio SUgp120/CAp24) produites dans différents types de cellules (cellules 293T, HeLa, MT4.R5, lymphocytes T $CD4^+$ et macrophages). Par contre, de faibles niveaux d'incorporation des Env tronquées et une compensation du défaut d'incorporation de celles-ci par des mutations apparues dans la protéine de matrice ont été constatés quel que soit le type cellulaire considéré. Ainsi, les éléments requis pour une bonne compatibilité matrice/Env tronquée semblent similaires dans différents environnements cellulaires. La seule présence de la substitution V34I dans la protéine de matrice tardive joue un rôle particulièrement important dans la compensation du défaut d'incorporation des Env résultant de la troncation du DC de la TMgp41. Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent une étude avec des mutants de laboratoire ayant montré un effet compensatoire sur la multiplication virale de la mutation V34I dans la protéine de matrice par rapport à une délétion de 5 acides aminés dans les domaines LLP-2/3. Cet effet compensatoire portait également sur une correction d'un défaut d'incorporation d'Env (Murakami and Freed, 2000a). Il est à noter que cette délétion de 5 acides aminés dans les domaines LLP-2/3 supprimait le motif diaromatique $Y_{802}W_{803}$ impliqué dans le transport rétrograde des Env au réseau *trans*-Golgien via la protéine TIP-47 (Blot et al., 2003). La protéine TIP-47 a ensuite été présentée comme étant un connecteur potentiel entre l'Env et la matrice indispensable à l'incorporation des Env (Blot et al., 2003; Lopez-Verges et al., 2006). Au vue de toutes ces observations, la substitution Val/Ile en position 34 de la protéine de matrice semble impliquée de manière similaire dans les mécanismes compensatoires de défauts d'incorporation d'Env résultant d'altérations structurales affectant les domaines LLP-2/LLP-3 ou le domaine LLP-1. La nature exacte de ce mécanisme reste incertaine. Quelques données concernant la structure et l'oligomérisation de la protéine de matrice peuvent cependant contribuer à l'explication de certains points. En effet, l'oligomérisation de la protéine de matrice avait été initialement décrite sous forme de trimères (Hill et al., 1996; Rao et al., 1995). Un rapport récent a toutefois suggéré la formation de complexes hexamériques de protéine de matrice à la membrane plasmique (Alfadhli et al., 2009). Ainsi, cette oligomérisation de la protéine de matrice permettrait la création d'une cavité centrale dans laquelle le DC de la TMgp41 viendrait s'insérer (Hill et al., 1996; Murakami and Freed, 2000a). La localisation du résidu 34 de la protéine de matrice en bordure de la cavité serait ainsi compatible avec une interaction directe ou indirecte avec les domaines LLP-1 et LLP-

2/LLP-3 du DC de la TMgp41 (Hill et al., 1996). Plusieurs aspects de ce modèle reste cependant à élucider. Il serait notamment très informatif de savoir si l'oligomérisation de la protéine de matrice présente la même configuration dans le contexte d'un précurseur $Pr55^{Gag}$ non clivé et si elle se produit de manière similaire dans les cellules productrice de virus.

De plus, nous manquons actuellement de données structurales concernant le DC complet de la TMgp41. De ce fait, il n'est pas exclu que la troncation affectant le domaine LLP-1 ait un effet sur l'exposition du motif diaromatique $Y_{802}W_{803}$ localisé dans les domaines LLP-2/LLP-3. Ce phénomène pourrait d'ailleurs expliquer nos données dans le contexte d'un modèle d'incorporation des Env basé sur l'intervention du cofacteur cellulaire TIP47 supposé impliqué dans la liaison des Env avec la région du $Pr55^{Gag}$ correspondant à la protéine de matrice (Lopez-Verges et al., 2006).

Pour compléter notre étude sur l'incorporation des Env, nous avons analysé la colocalisation de la protéine de matrice mature avec les Env aux sites d'assemblage du virus. Lors de précédentes études, le $Pr55^{Gag}$ a été clairement détecté dans des microdomaines membranaires assimilés à des radeaux lipidiques (Bhattacharya et al., 2006; Ono and Freed, 2001). Le processus selon lequel le $Pr55^{Gag}$ recrute les complexes trimériques d'enveloppe au sein de ces microdomaines n'est cependant pas clairement compris. Il a néanmoins été montré que l'apparition de mutations dans la protéine de matrice ou dans le DC de la TMgp41 pouvait entraîner un défaut d'incorporation des Env sur les virions en raison d'un mauvais recrutement aux sites d'assemblage viral (Bhattacharya et al., 2006). Dans notre étude, les analyses par microscopie confocale effectuées sur des cellules HeLa ont permis la mise en évidence d'un marquage ponctiforme à la surface cellulaire contenant de la protéine de matrice mature (MAp17) et coïncidant avec celui des Env. Des observations similaires avaient été faites lors de précédents travaux (Hermida-Matsumoto and Resh, 2000; Lambele et al., 2007). La colocalisation MAp17/Env a été observée pour tous les virus étudiés (NL(AD8)-ME-E, NL(AD8)-ME/V34I-L1, NL(AD8)-ML-E et NL(AD8)-ML-L1) à l'exception du virus (NL(AD8)-ME-L1) arborant des séquences codant un DC de TMgp41 tronqué et une protéine de matrice précoce non-compensatrice. En ce qui concerne ce virus, seule une redistribution partielle des Env à la surface cellulaire a été mise en évidence. La substitution V34I apparue dans la protéine de matrice est donc apparue comme étant suffisante pour compenser le défaut de recrutement des Env tronquées au site d'assemblage viral. Ainsi, le défaut de recrutement des Env au site d'assemblage viral induit par la troncation du DC de la TMgp41 paraissait

responsable du faible niveau d'incorporation des Env tronquées à la surface des particules virales, et par conséquent, du défaut de multiplication des virus arborant cette troncation.

D. Emergence séquentielle des mutations dans les Env et la protéine de matrice *in vivo*

Des analyses des prélèvements séquentiels réalisés chez le patient 153 entre les stades précoce et tardif de l'infection ont indiqué que la troncation du DC de la TMgp41 était apparue avant l'émergence des mutations dans la protéine de matrice. La sélection rapide des variants présentant une troncation du DC de la TMgp41 paraissait d'ailleurs contraster fortement avec la lente et progressive émergence des variants présentant les mutations compensatrices dans la protéine de matrice, avec la V34I étant la première et la plus importante en terme de potentiel compensatoire (Table I). Cette donnée est venue corroborer l'ensemble de nos résultats concernant la compensation des effets délétères de la troncation du DC de la TMgp41 par la mutation V34I de la protéine de matrice.

Les variations de charges virales observées chez le patient 153 au cours des 20 mois précédents l'émergence de la troncation de l'Env suggèrent qu'une forte pression de sélection serait à l'origine du défaut de multiplication virale et de la sélection de variants viraux arborant des séquences d'Env tronquées. Vingt mois post-infection, une transformation complète de la population clonale de gènes *env* a d'ailleurs été observée alors que seulement quelques séquences des clones de matrice analysées à cet instant présentaient la mutation V34I. L'émergence progressive de la mutation compensatoire V34I, conférant un pouvoir pathogène pleinement effectif aux virus arborant des Env tronquées, s'est d'ailleurs accompagnée d'une augmentation de la charge virale jusqu'à l'initiation d'un traitement anti-rétroviral. Il est important de noter que la troncation du DC de la TMgp41 et les mutations dans la protéine de matrice étaient encore observées dans les séquences d'Env et de matrice analysées 29 mois après le stade tardif de l'infection. Cette observation suggérait une grande stabilité de ces mutations et l'absence de réversion dans le temps. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la délétion de 23 paires de base à l'origine de cette troncation ne puisse pas subir facilement de réversion vers une forme non tronquée contrairement à une mutation ponctuelle.

La transformation radicale observée au sein de la population clonale de gènes *env* rappelle le processus de purification sélective mené par les lymphocytes T cytotoxiques à l'encontre du VIH-1 (Leslie et al., 2004; Martinez-Picado et al., 2006). Deux épitopes aux cellules T compatibles avec l'haplotype HLA du patient 153 (A2, B7) ont été identifiés dans la séquence

de 20 acides aminés délétée par troncation. Une forte réponse cellulaire T spécifique d'un de ces épitopes, induisant la sélection de variants avec une troncation du DC de la TMgp41, peut être une hypothèse expliquant le phénomène observé. Une réponse cellulaire T contre l'épitope B7 a d'ailleurs été précédemment observée chez plus de 20% des patients exprimant cet allèle durant la primoinfection (Altfeld et al., 2006). Malheureusement, nous n'avons pas pu explorer cette possibilité puisque aucun échantillon de cellules T $CD8^+$ cytotoxiques du patient 153 n'était disponible. A notre connaissance, aucune administration de traitement sur cette période aurait pu affecter la multiplication virale. Par contre, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette troncation affectant le domaine LLP-1 puisse avoir eu des répercussions sur la conformation et l'antigénicité de l'ectodomaine des Env et qu'elle puisse avoir contribué à l'échappement du virus à la réponse imunitaire humorale neutralisante comme le montre une précédente étude (Kalia et al., 2005).

E. Transfert viral de cellule à cellule

Toutes nos données suggéraient fortement l'existence d'un mécanisme permettant la multiplication des virus arborant une TMgp41 tronquée, ceci jusqu'à l'apparition de mutations compensatoires dans la protéine de matrice. Nous avons alors montré qu'en l'absence de mutations compensatrices dans la protéine de matrice, les variants du VIH-1 arborant une troncation des Env pouvaient se propager par un transfert direct de cellule à cellule. Le transfert direct de cellule à cellule apparaît donc nettement moins restrictif que l'infection de cellules cibles par des virions libres. En effet, ce mode de dissémination ne requiert que la fonctionnalité des Env (Sourisseau et al., 2007). Il n'a pas été compromis par la présence du nombre anormalement faible de spicules d'enveloppe en surface virale observé pour les virus NL(AD8)-ME-L1. De plus, ce mode de dissémination virale présente la caractéristique d'établir des conditions favorables à l'émergence progressive de mutations compensatrices qui, dans notre cas, ont permis de restaurer l'infectivité des virions libres.

Plusieurs aspects de ce processus de transfert viral direct de cellule à cellule restent cependant à élucider. En particulier, les mécanismes d'activation et de polarisation des cellules engagées dans la formation de la SV demeurent à ce jour insuffisamment compris. Une perspective de ces travaux pourrait être d'utiliser le variant viral présentant une incompatibilité Gag/Env tronquées, qui s'est montré capable de se disséminer par transfert direct de cellule à cellule au cours de notre étude, pour l'étude du trafic de Gag/Env au travers de ces contacts cellule-cellule. Cette approche pourrait également permettre d'évaluer l'effet

de perturbations du trafic des protéines virales sur l'efficacité de la transmission de cellule à cellule. Les résultats obtenus pourraient permettre de comparer les requis de trafic de Gag et Env nécessaires pour une transmission directe du virus à ceux nécessaires pour une production de particules virales infectieuses.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont abouti à l'identification de mécanismes permettant à un virus arborant une troncation du DC de la TMgp41 affectant le domaine LLP-1 de conserver sa capacité à se multiplier et à persister *in vivo*. A notre connaissance, il s'agit de la première description d'un cas de restauration *in vivo* des capacités de multiplication d'un virus portant des Env naturellement tronquées dans leur DC par des mutations compensatrices apparues dans la protéine de matrice. Bien qu'il s'agisse d'un cas isolé, tous ces résultats viennent corroborer un certain nombre de données de la littérature obtenues *via* des expériences menées avec des mutants de laboratoire et donnent, de ce fait, du poids à cette étude. Ce travail apporte également des informations nouvelles sur l'assemblage du VIH-1 et son fort potentiel d'évolution *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasa-Chapman, M. M., Hayman, A., Newton, P., Cornforth, D., Williams, I., Borrow, P., Balfe, P., and McKnight, A. (2004). Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. Aids *18*, 371-381.
- Aasa-Chapman, M. M., Holuigue, S., Aubin, K., Wong, M., Jones, N. A., Cornforth, D., Pellegrino, P., Newton, P., Williams, I., Borrow, P., and McKnight, A. (2005). Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *79*, 2823-2830.
- Abell, B. M., Pool, M. R., Schlenker, O., Sinning, I., and High, S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. Embo J *23*, 2755-2764.
- Adamson, C. S., and Freed, E. O. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. Adv Pharmacol *55*, 347-387.
- Ahmad, A., and Menezes, J. (1996). Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. Faseb J *10*, 258-266.
- Ahmad, R., Sindhu, S. T., Toma, E., Morisset, R., Vincelette, J., Menezes, J., and Ahmad, A. (2001). Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. J Clin Immunol *21*, 227-233.
- Aiken, C., and Trono, D. (1995). Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. J Virol *69*, 5048-5056.
- Akari, H., Fukumori, T., and Adachi, A. (2000). Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. J Virol *74*, 4891-4893.
- Alam, S. M., McAdams, M., Boren, D., Rak, M., Scearce, R. M., Gao, F., Camacho, Z. T., Gewirth, D., Kelsoe, G., Chen, P., and Haynes, B. F. (2007). The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. J Immunol *178*, 4424-4435.
- Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nystrom, G., and Fenyo, E. M. (1990). Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. Aids *4*, 107-112.
- Alfadhli, A., Barklis, R. L., and Barklis, E. (2009). HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. Virology *387*, 466-472.
- Alfadhli, A., Dhenub, T. C., Still, A., and Barklis, E. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. J Virol *79*, 14498-14506.
- Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. J Biol Chem *277*, 25649-25659.
- Ali, A., Pillai, S., Ng, H., Lubong, R., Richman, D. D., Jamieson, B. D., Ding, Y., McElrath, M. J., Guatelli, J. C., and Yang, O. O. (2003). Broadly increased sensitivity to cytotoxic T lymphocytes resulting from Nef epitope escape mutations. J Immunol *171*, 3999-4005.

- Alkhatib, G., Broder, C. C., and Berger, E. A. (1996). Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. J Virol *70*, 5487-5494.
- Allen, T. M., Altfeld, M., Yu, X. G., O'Sullivan, K. M., Lichterfeld, M., Le Gall, S., John, M., Mothe, B. R., Lee, P. K., Kalife, E. T., *et al.* (2004). Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *78*, 7069-7078.
- Allen, T. M., Yu, X. G., Kalife, E. T., Reyor, L. L., Lichterfeld, M., John, M., Cheng, M., Allgaier, R. L., Mui, S., Frahm, N., *et al.* (2005). De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *79*, 12952-12960.
- Altfeld, M., Addo, M. M., Eldridge, R. L., Yu, X. G., Thomas, S., Khatri, A., Strick, D., Phillips, M. N., Cohen, G. B., Islam, S. A., *et al.* (2001). Vpr is preferentially targeted by CTL during HIV-1 infection. J Immunol *167*, 2743-2752.
- Altfeld, M., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Hecht, F. M., Lee, P. K., Vogel, M., Yu, X. G., Draenert, R., Johnston, M. N., Strick, D., *et al.* (2003). Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. Aids *17*, 2581-2591.
- Altfeld, M., Kalife, E. T., Qi, Y., Streeck, H., Lichterfeld, M., Johnston, M. N., Burgett, N., Swartz, M. E., Yang, A., Alter, G., *et al.* (2006). HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. PLoS Med *3*, e403.
- Andersen, J. L., Le Rouzic, E., and Planelles, V. (2008). HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. Exp Mol Pathol *85*, 2-10.
- Ao, Z., Fowke, K. R., Cohen, E. A., and Yao, X. (2005). Contribution of the C-terminal tri-lysine regions of human immunodeficiency virus type 1 integrase for efficient reverse transcription and viral DNA nuclear import. Retrovirology *2*, 62.
- Ao, Z., Huang, G., Yao, H., Xu, Z., Labine, M., Cochrane, A. W., and Yao, X. (2007). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication. J Biol Chem *282*, 13456-13467.
- Arfi, V., Riviere, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Goujon, C., Rigal, D., Darlix, J. L., and Cimarelli, A. (2008). Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1. J Virol *82*, 6557-6565.
- Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K. A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J. C., Shorte, S., and Charneau, P. (2006). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. Nat Methods *3*, 817-824.
- Arrighi, J. F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J. M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T. B., and Piguet, V. (2004a). DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. J Exp Med *200*, 1279-1288.
- Arrighi, J. F., Pion, M., Wiznerowicz, M., Geijtenbeek, T. B., Garcia, E., Abraham, S., Leuba, F., Dutoit, V., Ducrey-Rundquist, O., van Kooyk, Y., *et al.* (2004b). Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. J Virol *78*, 10848-10855.
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. J Biol Chem *273*, 33414-33422.

- Atkins, K. M., Thomas, L., Youker, R. T., Harriff, M. J., Pissani, F., You, H., and Thomas, G. (2008). HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multikinase cascade that triggers major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation: analysis using short interfering RNA and knock-out mice. J Biol Chem *283*, 11772-11784.
- Auewarakul, P., Wacharapornin, P., Srichatrapimuk, S., Chutipongtanate, S., and Puthavathana, P. (2005). Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. Virology *337*, 93-101.
- Ayouba, A., Souquieres, S., Njinku, B., Martin, P. M., Muller-Trutwin, M. C., Roques, P., Barre-Sinoussi, F., Mauclere, P., Simon, F., and Nerrienet, E. (2000). HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. Aids *14*, 2623-2625.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. Dev Cell *3*, 283-289.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003a). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. J Cell Biol *162*, 435-442.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003b). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. J Biol Chem *278*, 12513-12521.
- Bahbouhi, B., Chazal, N., Seidah, N. G., Chiva, C., Kogan, M., Albericio, F., Giralt, E., and Bahraoui, E. (2002). Effects of L- and D-REKR amino acid-containing peptides on HIV and SIV envelope glycoprotein precursor maturation and HIV and SIV replication. Biochem J *366*, 863-872.
- Bampi, C., Jacquenet, S., Lener, D., Decimo, D., and Darlix, J. L. (2004). The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. Int J Biochem Cell Biol *36*, 1668-1686.
- Bangham, C. R. (2003). The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. J Gen Virol *84*, 3177-3189.
- Barin, F., Brunet, S., Brand, D., Moog, C., Peyre, R., Damond, F., Charneau, P., and Barre-Sinoussi, F. (2004). Interclade neutralization and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 identified by an assay using HeLa cells expressing both CD4 receptor and CXCR4/CCR5 coreceptors. J Infect Dis *189*, 322-327.
- Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P., and Bangham, C. R. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. Blood *106*, 988-995.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science *220*, 868-871.
- Basu, V. P., Song, M., Gao, L., Rigby, S. T., Hanson, M. N., and Bambara, R. A. (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. Virus Res *134*, 19-38.
- Batonick, M., Favre, M., Boge, M., Spearman, P., Honing, S., and Thali, M. (2005). Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2. Virology *342*, 190-200.

- Bebenek, K., Abbotts, J., Wilson, S. H., and Kunkel, T. A. (1993). Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots. J Biol Chem *268*, 10324-10334.
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B. L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M. C., and Benarous, R. (1999). Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. J Virol *73*, 1350-1361.
- Bernstein, H. B., Tucker, S. P., Hunter, E., Schutzbach, J. S., and Compans, R. W. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides. J Virol *68*, 463-468.
- Bhattacharya, J., Peters, P. J., and Clapham, P. R. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins that lack cytoplasmic domain cysteines: impact on association with membrane lipid rafts and incorporation onto budding virus particles. J Virol *78*, 5500-5506.
- Bhattacharya, J., Repik, A., and Clapham, P. R. (2006). Gag regulates association of human immunodeficiency virus type 1 envelope with detergent-resistant membranes. J Virol *80*, 5292-5300.
- Bieniasz, P. D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. Virology *344*, 55-63.
- Bieniasz, P. D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. Cell Host Microbe *5*, 550-558.
- Binley, J. M., Ditzel, H. J., Barbas, C. F., 3rd, Sullivan, N., Sodroski, J., Parren, P. W., and Burton, D. R. (1996). Human antibody responses to HIV type 1 glycoprotein 41 cloned in phage display libraries suggest three major epitopes are recognized and give evidence for conserved antibody motifs in antigen binding. AIDS Res Hum Retroviruses *12*, 911-924.
- Binley, J. M., Klasse, P. J., Cao, Y., Jones, I., Markowitz, M., Ho, D. D., and Moore, J. P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *71*, 2799-2809.
- Binley, J. M., Sanders, R. W., Clas, B., Schuelke, N., Master, A., Guo, Y., Kajumo, F., Anselma, D. J., Maddon, P. J., Olson, W. C., and Moore, J. P. (2000). A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. J Virol *74*, 627-643.
- Binley, J. M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., *et al.* (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. J Virol *78*, 13232-13252.
- Blanco, J., Bosch, B., Fernandez-Figueras, M. T., Barretina, J., Clotet, B., and Este, J. A. (2004). High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. J Biol Chem *279*, 51305-51314.
- Blauvelt, A., Asada, H., Saville, M. W., Klaus-Kovtun, V., Altman, D. J., Yarchoan, R., and Katz, S. I. (1997). Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. J Clin Invest *100*, 2043-2053.

- Blay, W. M., Kasprzyk, T., Misher, L., Richardson, B. A., and Haigwood, N. L. (2007). Mutations in envelope gp120 can impact proteolytic processing of the gp160 precursor and thereby affect neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses. J Virol *81*, 13037-13049.
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., and Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 1925-1930.
- Blot, G., Janvier, K., Le Panse, S., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2003). Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. J Virol *77*, 6931-6945.
- Blue, C. E., Spiller, O. B., and Blackbourn, D. J. (2004). The relevance of complement to virus biology. Virology *319*, 176-184.
- Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P. A. (2003). Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. Immunity *18*, 27-39.
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J. S., and Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. J Biol Chem *273*, 15773-15778.
- Bollinger, R. C., Quinn, T. C., Liu, A. Y., Stanhope, P. E., Hammond, S. A., Viveen, R., Clements, M. L., and Siliciano, R. F. (1993). Cytokines from vaccine-induced HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes: effects on viral replication. AIDS Res Hum Retroviruses *9*, 1067-1077.
- Bomsel, M. (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. Nat Med *3*, 42-47.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *68*, 6103-6110.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B., and Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. Nat Med *3*, 205-211.
- Bosch, B., Blanco, J., Pauls, E., Clotet-Codina, I., Armand-Ugon, M., Grigorov, B., Muriaux, D., Clotet, B., Darlix, J. L., and Este, J. A. (2005). Inhibition of coreceptor-independent cell-to-cell human immunodeficiency virus type 1 transmission by a CD4-immunoglobulin G2 fusion protein. Antimicrob Agents Chemother *49*, 4296-4304.
- Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J. L., Muriaux, D., and Este, J. A. (2008). A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. Antiviral Res *80*, 185-193.
- Bosch, V., and Pawlita, M. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. J Virol *64*, 2337-2344.
- Botbol, Y., Raghavendra, N. K., Rahman, S., Engelman, A., and Lavigne, M. (2008). Chromatinized templates reveal the requirement for the LEDGF/p75 PWWP domain during HIV-1 integration in vitro. Nucleic Acids Res *36*, 1237-1246.

- Bour, S., Geleziunas, R., and Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. Microbiol Rev *59*, 63-93.
- Bowers, K., Piper, S. C., Edeling, M. A., Gray, S. R., Owen, D. J., Lehner, P. J., and Luzio, J. P. (2006). Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. J Biol Chem *281*, 5094-5105.
- Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B., and Barin, F. (2006). Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. Aids *20*, 1923-1930.
- Brander, C., Hartman, K. E., Trocha, A. K., Jones, N. G., Johnson, R. P., Korber, B., Wentworth, P., Buchbinder, S. P., Wolinsky, S., Walker, B. D., and Kalams, S. A. (1998). Lack of strong immune selection pressure by the immunodominant, HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte response in chronic human immunodeficiency virus-1 infection. J Clin Invest *101*, 2559-2566.
- Brandt, S., Blissenbach, M., Grewe, B., Konietzny, R., Grunwald, T., and Uberla, K. (2007). Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. PLoS Pathog *3*, e54.
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., and Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. J Exp Med *200*, 749-759.
- Brockman, M. A., Schneidewind, A., Lahaie, M., Schmidt, A., Miura, T., Desouza, I., Ryvkin, F., Derdeyn, C. A., Allen, S., Hunter, E., *et al.* (2007). Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A. J Virol *81*, 12608-12618.
- Brodsky, J. L. (1998). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. Int Rev Cytol *178*, 277-328.
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T., and Krausslich, H. G. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 2641-2646.
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 523-527.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., and Stevenson, M. (1998). Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. J Exp Med *188*, 2113-2125.
- Bukrinskaya, A. G., Ghorpade, A., Heinzinger, N. K., Smithgall, T. E., Lewis, R. E., and Stevenson, M. (1996). Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 367-371.
- Bukrinskaya, A. G., Vorkunova, G. K., Burshtein, M. E., and Stevenson, M. (2006). The matrix protein of human immunodeficiency virus is cleaved and packed into virion cores. Dokl Biol Sci *408*, 249-252.
- Bukrinsky, M. (2004). A hard way to the nucleus. Mol Med *10*, 1-5.

- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993a). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. Nature *365*, 666-669.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 6580-6584.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G., and Stevenson, M. (1993b). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 6125-6129.
- Bukrinsky, M. I., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. Science *254*, 423-427.
- Bultmann, A., Eberle, J., and Haas, J. (2000). Ubiquitination of the human immunodeficiency virus type 1 env glycoprotein. J Virol *74*, 5373-5376.
- Bultmann, A., Muranyi, W., Seed, B., and Haas, J. (2001). Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. J Virol *75*, 5263-5276.
- Bunnik, E. M., Pisas, L., van Nuenen, A. C., and Schuitemaker, H. (2008). Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *82*, 7932-7941.
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., and Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. J Virol *81*, 10209-10219.
- Burleigh, L., Lozach, P. Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (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*, 2949-2957.
- Burniston, M. T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S. P., and Luban, J. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. J Virol *73*, 8527-8540.
- Byland, R., Vance, P. J., Hoxie, J. A., and Marsh, M. (2007). A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. Mol Biol Cell *18*, 414-425.
- Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R. M. (1992). Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. Science *257*, 383-387.
- Campbell, S. M., Crowe, S. M., and Mak, J. (2001). Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. J Clin Virol *22*, 217-227.
- Camus, G., Segura-Morales, C., Molle, D., Lopez-Verges, S., Begon-Pescia, C., Cazevieille, C., Schu, P., Bertrand, E., Berlioz-Torrent, C., and Basyuk, E. (2007). The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. Mol Biol Cell *18*, 3193-3203.

- Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E., Thali, M., Repke, H., and Sodroski, J. (1993). Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. J Virol *67*, 2747-2755.
- Cao, J., McNevin, J., Malhotra, U., and McElrath, M. J. (2003). Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. J Immunol *171*, 3837-3846.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med *332*, 201-208.
- Cardoso, R. M., Zwick, M. B., Stanfield, R. L., Kunert, R., Binley, J. M., Katinger, H., Burton, D. R., and Wilson, I. A. (2005). Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. Immunity *22*, 163-173.
- Carlton, J. G., and Martin-Serrano, J. (2009). The ESCRT machinery: new functions in viral and cellular biology. Biochem Soc Trans *37*, 195-199.
- Carotenuto, P., Looij, D., Keldermans, L., de Wolf, F., and Goudsmit, J. (1998). Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. Aids *12*, 1591-1600.
- Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. J. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. Science *283*, 1748-1752.
- Carrington, M., and O'Brien, S. J. (2003). The influence of HLA genotype on AIDS. Annu Rev Med *54*, 535-551.
- Carteau, S., Hoffmann, C., and Bushman, F. (1998). Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. J Virol *72*, 4005-4014.
- Carter, C. A., and Ehrlich, L. S. (2008). Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. Annu Rev Microbiol *62*, 425-443.
- Cavert, W., and Haase, A. T. (1998). A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstruction. Science *280*, 1865-1866.
- Cecilia, D., Kleeberger, C., Munoz, A., Giorgi, J. V., and Zolla-Pazner, S. (1999). A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. J Infect Dis *179*, 1365-1374.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. Cell *89*, 263-273.
- Chan, W. E., Lin, H. H., and Chen, S. S. (2005). Wild-type-like viral replication potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope mutants lacking palmitoylation signals. J Virol *79*, 8374-8387.
- Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M. A., and Chen, B. K. (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. J Virol *81*, 12582-12595.
- Chen, S. S., Lee, S. F., and Wang, C. T. (2001). Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41. J Virol *75*, 9925-9938.

- Chen, S. W., Chiu, H. C., Liao, W. H., Wang, F. D., Chen, S. S., and Wang, C. T. (2004). The virus-associated human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol carrying an active protease domain in the matrix region is severely defective both in autoprocessing and in trans processing of gag particles. Virology *318*, 534-541.
- Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P. A., and Engelman, A. (2004). Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. J Biol Chem *279*, 48883-48892.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A. N., Suss-Toby, E., Nora, E., and Zimmerberg, J. (1994). An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. J Virol *68*, 7115-7123.
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C., 2nd, Barsov, E., Hood, B. L., Fisher, R. J., *et al.* (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. J Virol *80*, 9039-9052.
- Chukkapalli, V., Hogue, I. B., Boyko, V., Hu, W. S., and Ono, A. (2008). Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding. J Virol *82*, 2405-2417.
- Cimarelli, A., Sandin, S., Hoglund, S., and Luban, J. (2000). Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. J Virol *74*, 3046-3057.
- Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. Curr Gene Ther *8*, 419-429.
- Ciuffi, A., and Bushman, F. D. (2006). Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. Trends Genet *22*, 388-395.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. Nat Med *11*, 1287-1289.
- Clapham, P. R., and McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. J Gen Virol *83*, 1809-1829.
- Clotet-Codina, I., Bosch, B., Senserrich, J., Fernandez-Figueras, M. T., Pena, R., Ballana, E., Bofill, M., Clotet, B., and Este, J. A. (2009). HIV endocytosis after dendritic cell to T cell viral transfer leads to productive virus infection. Antiviral Res *83*, 94-98.
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science *270*, 1811-1815.
- Cochrane, A. W., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1990). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 1198-1202.
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science *267*, 483-489.

- Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., and Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. Nature *391*, 397-401.
- Comardelle, A. M., Norris, C. H., Plymale, D. R., Gatti, P. J., Choi, B., Fermin, C. D., Haislip, A. M., Tencza, S. B., Mietzner, T. A., Montelaro, R. C., and Garry, R. F. (1997). A synthetic peptide corresponding to the carboxy terminus of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein induces alterations in the ionic permeability of Xenopus laevis oocytes. AIDS Res Hum Retroviruses *13*, 1525-1532.
- Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, P., Darlix, J. L., and Muriaux, D. (2008). [Revisiting HIV-1 assembly]. Med Sci (Paris) *24*, 49-55.
- Cosson, P. (1996). Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. Embo J *15*, 5783-5788.
- Crawford, H., Prado, J. G., Leslie, A., Hue, S., Honeyborne, I., Reddy, S., van der Stok, M., Mncube, Z., Brander, C., Rousseau, C., *et al.* (2007). Compensatory mutation partially restores fitness and delays reversion of escape mutation within the immunodominant HLA-B*5703-restricted Gag epitope in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *81*, 8346-8351.
- Crowe, S., Zhu, T., and Muller, W. A. (2003). The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. J Leukoc Biol *74*, 635-641.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. Cell *78*, 461-471.
- Curtis, B. M., Scharnowske, S., and Watson, A. J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 8356-8360.
- D'Costa, S., Slobod, K. S., Webster, R. G., White, S. W., and Hurwitz, J. L. (2001). Structural features of HIV envelope defined by antibody escape mutant analysis. AIDS Res Hum Retroviruses *17*, 1205-1209.
- Dacheux, L., Moreau, A., Ataman-Onal, Y., Biron, F., Verrier, B., and Barin, F. (2004). Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. J Virol *78*, 12625-12637.
- Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., and Krausslich, H. G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. J Virol *79*, 1581-1594.
- Dalod, M., Dupuis, M., Deschemin, J. C., Goujard, C., Deveau, C., Meyer, L., Ngo, N., Rouzioux, C., Guillet, J. G., Delfraissy, J. F., *et al.* (1999). Weak anti-HIV CD8(+) T-cell effector activity in HIV primary infection. J Clin Invest *104*, 1431-1439.
- Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M., and Desrosiers, R. C. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. Science *228*, 1201-1204.

- Daniel, R., Greger, J. G., Katz, R. A., Taganov, K. D., Wu, X., Kappes, J. C., and Skalka, A. M. (2004). Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. J Virol *78*, 8573-8581.
- Davis, M. R., Jiang, J., Zhou, J., Freed, E. O., and Aiken, C. (2006). A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein destabilizes the interaction of the envelope protein subunits gp120 and gp41. J Virol *80*, 2405-2417.
- Day, J. R., Munk, C., and Guatelli, J. C. (2004). The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. J Virol *78*, 1069-1079.
- de Rosny, E., Vassell, R., Jiang, S., Kunert, R., and Weiss, C. D. (2004). Binding of the 2F5 monoclonal antibody to native and fusion-intermediate forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for fusion-inducing conformational changes. J Virol *78*, 2627-2631.
- De Silva, F. S., Venturini, D. S., Wagner, E., Shank, P. R., and Sharma, S. (2001). CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA. AIDS Res Hum Retroviruses *17*, 1585-1598.
- Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Wang, S., Levy, D. N., Wang, W., Delaporte, E., Peeters, M., Derdeyn, C. A., Allen, S., *et al.* (2005). Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. J Exp Med *201*, 1407-1419.
- Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruysschaert, J. M., and Seidah, N. G. (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. J Biol Chem *271*, 30442-30450.
- Deeks, S. G., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J. M., Martin, J. N., Petropoulos, C. J., and Hecht, F. M. (2006). Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. J Virol *80*, 6155-6164.
- Demirov, D. G., and Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. Virus Res *106*, 87-102.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. J Cell Biol *177*, 329-341.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature *381*, 661-666.
- Depienne, C., Mousnier, A., Leh, H., Le Rouzic, E., Dormont, D., Benichou, S., and Dargemont, C. (2001). Characterization of the nuclear import pathway for HIV-1 integrase. J Biol Chem *276*, 18102-18107.
- Derdowski, A., Ding, L., and Spearman, P. (2004). A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. J Virol *78*, 1230-1242.

- Deschambeault, J., Lalonde, J. P., Cervantes-Acosta, G., Lodge, R., Cohen, E. A., and Lemay, G. (1999). Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. J Virol *73*, 5010-5017.
- Dimitrov, D. S., Willey, R. L., Sato, H., Chang, L. J., Blumenthal, R., and Martin, M. A. (1993). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. J Virol *67*, 2182-2190.
- Dimmock, N. J. (1993). Neutralization of animal viruses. Curr Top Microbiol Immunol *183*, 1-149.
- Doms, R. W., Earl, P. L., and Moss, B. (1991). The assembly of the HIV-1 env glycoprotein into dimers and tetramers. Adv Exp Med Biol *300*, 203-219; discussion 220-201.
- Dong, C., Kwas, C., and Wu, L. (2009). Transcriptional restriction of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in undifferentiated primary monocytes. J Virol *83*, 3518-3527.
- Dong, X., Li, H., Derdowski, A., Ding, L., Burnett, A., Chen, X., Peters, T. R., Dermody, T. S., Woodruff, E., Wang, J. J., and Spearman, P. (2005). AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. Cell *120*, 663-674.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. J Virol *68*, 1689-1696.
- Douglas, J. L., Viswanathan, K., McCarroll, M. N., Gustin, J. K., Fruh, K., and Moses, A. V. (2009). Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. J Virol *83*, 7931-7947.
- Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferott, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., Chang, S. C., Feeney, M. E., Addo, M. M., *et al.* (2004). Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. J Exp Med *199*, 905-915.
- Dubay, J. W., Roberts, S. J., Hahn, B. H., and Hunter, E. (1992). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. J Virol *66*, 6616-6625.
- Dussupt, V., Javid, M. P., Abou-Jaoude, G., Jadwin, J. A., de La Cruz, J., Nagashima, K., and Bouamr, F. (2009). The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. PLoS Pathog *5*, e1000339.
- Dustin, M. L. (2009). The cellular context of T cell signaling. Immunity *30*, 482-492.
- Earl, P. L., Broder, C. C., Doms, R. W., and Moss, B. (1997). Epitope map of human immunodeficiency virus type 1 gp41 derived from 47 monoclonal antibodies produced by immunization with oligomeric envelope protein. J Virol *71*, 2674-2684.
- Earl, P. L., Moss, B., and Doms, R. W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. J Virol *65*, 2047-2055.

- Edwards, T. G., Wyss, S., Reeves, J. D., Zolla-Pazner, S., Hoxie, J. A., Doms, R. W., and Baribaud, F. (2002). Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. J Virol *76*, 2683-2691.
- Einfeld, D. (1996). Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. Curr Top Microbiol Immunol *214*, 133-176.
- Eisenberg, D., and Wesson, M. (1990). The most highly amphiphilic alpha-helices include two amino acid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein 41. Biopolymers *29*, 171-177.
- Ellerbrok, H., D'Auriol, L., Vaquero, C., and Sitbon, M. (1992). Functional tolerance of the human immunodeficiency virus type 1 envelope signal peptide to mutations in the amino-terminal and hydrophobic regions. J Virol *66*, 5114-5118.
- Eugenin, E. A., Gaskill, P. J., and Berman, J. W. (2009). Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. Cell Immunol *254*, 142-148.
- Fackler, O. T., and Peterlin, B. M. (2000). Endocytic entry of HIV-1. Curr Biol *10*, 1005-1008.
- Fais, S., Capobianchi, M. R., Abbate, I., Castilletti, C., Gentile, M., Cordiali Fei, P., Ameglio, F., and Dianzani, F. (1995). Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. Aids *9*, 329-335.
- Fantini, J., Bolmont, C., and Yahi, N. (1992). Tumor necrosis factor-alpha stimulates both apical and basal production of HIV in polarized human intestinal HT29 cells. Immunol Lett *34*, 85-90.
- Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L., and Gonzalez-Scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 2700-2704.
- Fassati, A., and Goff, S. P. (2001). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *75*, 3626-3635.
- Fauci, A. S. (1993). Immunopathogenesis of HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr *6*, 655-662.
- Feeney, M. E., Tang, Y., Roosevelt, K. A., Leslie, A. J., McIntosh, K., Karthas, N., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004). Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. J Virol *78*, 8927-8930.
- Fenouillet, E., and Gluckman, J. C. (1992). Immunological analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein proteolytic cleavage. Virology *187*, 825-828.
- Fevrier, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Curr Opin Cell Biol *16*, 415-421.

- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *et al.* (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science *278*, 1295-1300.
- Fisher, R. D., Chung, H. Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W. I., and Hill, C. P. (2007). Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. Cell *128*, 841-852.
- Fleming, D. T., and Wasserheit, J. N. (1999). From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. Sex Transm Infect *75*, 3-17.
- Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. J Virol *71*, 3588-3596.
- Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F., and Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. J Virol *66*, 3183-3187.
- Fredericksen, B. L., Wei, B. L., Yao, J., Luo, T., and Garcia, J. V. (2002). Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. J Virol *76*, 11440-11446.
- Freed, E. O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. Virology *251*, 1-15.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. Somat Cell Mol Genet *26*, 13-33.
- Freed, E. O. (2003). The HIV-TSG101 interface: recent advances in a budding field. Trends Microbiol *11*, 56-59.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. J Virol *69*, 1984-1989.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. J Virol *70*, 341-351.
- Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. (1989). Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. J Virol *63*, 4670-4675.
- Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 4650-4654.
- Freeze, H. H., and Kranz, C. (2008). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. Curr Protoc Immunol *Chapter 8*, Unit 8 15.
- Friedrich, T. C., Dodds, E. J., Yant, L. J., Vojnov, L., Rudersdorf, R., Cullen, C., Evans, D. T., Desrosiers, R. C., Mothe, B. R., Sidney, J., *et al.* (2004). Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. Nat Med *10*, 275-281.

- Frost, S. D., Liu, Y., Pond, S. L., Chappey, C., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Little, S. J., and Richman, D. D. (2005). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B. J Virol *79*, 6523-6527.
- Gabuzda, D. H., Lever, A., Terwilliger, E., and Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. J Virol *66*, 3306-3315.
- Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Martin-Amedee, A. M., and Montelaro, R. C. (1995). A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses. AIDS Res Hum Retroviruses *11*, 191-202.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (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*, 9825-9830.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. Cell *83*, 569-576.
- Ganesh, L., Leung, K., Lore, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R. A., and Nabel, G. J. (2004). Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. J Virol *78*, 11980-11987.
- Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M., and Sundquist, W. I. (2008). The structural biology of HIV assembly. Curr Opin Struct Biol *18*, 203-217.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., *et al.* (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature *397*, 436-441.
- Gao, F., Chen, Y., Levy, D. N., Conway, J. A., Kepler, T. B., and Hui, H. (2004). Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. J Virol *78*, 2426-2433.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demaurex, N., Marsh, M., and Piguet, V. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. Traffic *6*, 488-501.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., *et al.* (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. Cell *107*, 55-65.
- Gatignol, A. (2007). Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. Adv Pharmacol *55*, 137-159.
- Gawrisch, K., Han, K. H., Yang, J. S., Bergelson, L. D., and Ferretti, J. A. (1993). Interaction of peptide fragment 828-848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type I with lipid bilayers. Biochemistry *32*, 3112-3118.
- Geels, M. J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J. T., Baan, E., Zorgdrager, F., van den Burg, R., *et al.* (2003). Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. J Virol *77*, 12430-12440.

- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell *100*, 587-597.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M. A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. Virology *156*, 171-176.
- Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Martin, M. A., Ferrua, C., Mitra, R., Phipps, T., Wahl, L. A., Lane, H. C., Fauci, A. S., Burke, D. S., and et al. (1988). Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. J Exp Med *167*, 1428-1441.
- Gerdes, H. H., Bukoreshtliev, N. V., and Barroso, J. F. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. FEBS Lett *581*, 2194-2201.
- Geyer, H., Holschbach, C., Hunsmann, G., and Schneider, J. (1988). Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. J Biol Chem *263*, 11760-11767.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. Cell *59*, 103-112.
- Gilbert, H. F. (1997). Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. J Biol Chem *272*, 29399-29402.
- Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Emr, S. D., and Williams, R. L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. Embo J *26*, 600-612.
- Goila-Gaur, R., and Strebel, K. (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. Retrovirology *5*, 51.
- Golding, H., Zaitseva, M., de Rosny, E., King, L. R., Manischewitz, J., Sidorov, I., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S., Dimitrov, D. S., and Weiss, C. D. (2002). Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. J Virol *76*, 6780-6790.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Jr., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Henderson, L. E., and Rein, A. (1990). Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. J Virol *64*, 3207-3211.
- Gorny, M. K., and Zolla-Pazner, S. (2000). Recognition by human monoclonal antibodies of free and complexed peptides representing the prefusogenic and fusogenic forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41. J Virol *74*, 6186-6192.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med *305*, 1425-1431.
- Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. A., and Haseltine, W. A. (1993). Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 7381-7385.

- Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 3195-3199.
- Gottwein, E., Jager, S., Habermann, A., and Krausslich, H. G. (2006). Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect. J Virol *80*, 6267-6275.
- Gottwein, E., and Krausslich, H. G. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. J Virol *79*, 9134-9144.
- Gould, S. J., Booth, A. M., and Hildreth, J. E. (2003). The Trojan exosome hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 10592-10597.
- Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., *et al.* (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. Nat Med *3*, 212-217.
- Gousset, K., Ablan, S. D., Coren, L. V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D. E., and Freed, E. O. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. PLoS Pathog *4*, e1000015.
- Graham, D. R., Chertova, E., Hilburn, J. M., Arthur, L. O., and Hildreth, J. E. (2003). Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. J Virol *77*, 8237-8248.
- Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J. L., and Muriaux, D. (2006). Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. J Mol Biol *359*, 848-862.
- Grigorov, B., Attuil-Audenis, V., Perugi, F., Nedelec, M., Watson, S., Pique, C., Darlix, J. L., Conjeaud, H., and Muriaux, D. (2009). A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. Retrovirology *6*, 28.
- Groot, F., Kuijpers, T. W., Berkhout, B., and de Jong, E. C. (2006). Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to T cells of LAD-1 patients is impaired due to the defect in LFA-1. Retrovirology *3*, 75.
- Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wiegers, K., Grattinger, M., Muller, B., Fuller, S., and Krausslich, H. G. (2000). A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. Embo J *19*, 103-113.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol *5*, 317-323.
- Guo, H. G., Veronese, F. M., Tschachler, E., Pal, R., Kalyanaraman, V. S., Gallo, R. C., and Reitz, M. S., Jr. (1990). Characterization of an HIV-1 point mutant blocked in envelope glycoprotein cleavage. Virology *174*, 217-224.
- Hadida, F., Vieillard, V., Mollet, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Debre, P. (1999). Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. J Immunol *163*, 1105-1109.
- Haffar, O. K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S. G., and Bukrinsky, M. (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*, 359-368.

- Haglund, K., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. Trends Biochem Sci *28*, 598-603.
- Hahn, B. H., Gonda, M. A., Shaw, G. M., Popovic, M., Hoxie, J. A., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1985). Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. Proc Natl Acad Sci U S A *82*, 4813-4817.
- Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H. D., and Garten, W. (1997). The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. J Virol *71*, 1036-1045.
- Harila, K., Prior, I., Sjoberg, M., Salminen, A., Hinkula, J., and Suomalainen, M. (2006). Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. J Virol *80*, 3765-3772.
- Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. Science *253*, 320-323.
- Harrich, D., Ulich, C., Garcia-Martinez, L. F., and Gaynor, R. B. (1997). Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. Embo J *16*, 1224-1235.
- Hawkins, H. C., and Freedman, R. B. (1991). The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulphide-isomerase. Biochem J *275 (Pt 2)*, 335-339.
- Hay, C. M., Ruhl, D. J., Basgoz, N. O., Wilson, C. C., Billingsley, J. M., DePasquale, M. P., D'Aquila, R. T., Wolinsky, S. M., Crawford, J. M., Montefiori, D. C., and Walker, B. D. (1999). Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. J Virol *73*, 5509-5519.
- He, Y., Vassell, R., Zaitseva, M., Nguyen, N., Yang, Z., Weng, Y., and Weiss, C. D. (2003). Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites. J Virol *77*, 1666-1671.
- Hearps, A. C., Wagstaff, K. M., Piller, S. C., and Jans, D. A. (2008). The N-terminal basic domain of the HIV-1 matrix protein does not contain a conventional nuclear localization sequence but is required for DNA binding and protein self-association. Biochemistry *47*, 2199-2210.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (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*, 7311-7315.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. Science *291*, 2364-2369.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C., and Sodroski, J. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. J Virol *65*, 2119-2123.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., and Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. Aids *20*, W13-23.

- Hendel, H., Caillat-Zucman, S., Lebuanec, H., Carrington, M., O'Brien, S., Andrieu, J. M., Schachter, F., Zagury, D., Rappaport, J., Winkler, C., *et al.* (1999). New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. J Immunol *162*, 6942-6946.
- Hendershot, L. M., Valentine, V. A., Lee, A. S., Morris, S. W., and Shapiro, D. N. (1994). Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. Genomics *20*, 281-284.
- Henderson, L. E., Sowder, R., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Arthur, L. O., Robey, W. G., and Fischinger, P. J. (1987). Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. J Virol *61*, 629-632.
- Henriet, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R. J., Marquet, R., and Paillart, J. C. (2007). Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. Nucleic Acids Res *35*, 5141-5153.
- Herbeck, J. T., Nickle, D. C., Learn, G. H., Gottlieb, G. S., Curlin, M. E., Heath, L., and Mullins, J. I. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 env evolves toward ancestral states upon transmission to a new host. J Virol *80*, 1637-1644.
- Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55(gag) and p17MA. J Virol *73*, 1902-1908.
- Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (2000). Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. J Virol *74*, 8670-8679.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annu Rev Cell Dev Biol *19*, 141-172.
- Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M., and Sundquist, W. I. (1996). Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 3099-3104.
- Hioe, C. E., Chien, P. C., Jr., Lu, C., Springer, T. A., Wang, X. H., Bandres, J., and Tuen, M. (2001). LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission. J Virol *75*, 1077-1082.
- Ho, D. D. (1998). Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. Science *280*, 1866-1867.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature *373*, 123-126.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J., and Dabauvalle, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. J Cell Biol *152*, 895-910.

- Hong, P. W., Flummerfelt, K. B., de Parseval, A., Gurney, K., Elder, J. H., and Lee, B. (2002). Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. J Virol *76*, 12855-12865.
- Hope, T. J. (2007). Bridging efficient viral infection. Nat Cell Biol *9*, 243-244.
- Hoshikawa, N., Kojima, A., Yasuda, A., Takayashiki, E., Masuko, S., Chiba, J., Sata, T., and Kurata, T. (1991). Role of the gag and pol genes of human immunodeficiency virus in the morphogenesis and maturation of retrovirus-like particles expressed by recombinant vaccinia virus: an ultrastructural study. J Gen Virol *72 (Pt 10)*, 2509-2517.
- Hourioux, C., Brand, D., Sizaret, P. Y., Lemiale, F., Lebigot, S., Barin, F., and Roingeard, P. (2000). Identification of the glycoprotein 41(TM) cytoplasmic tail domains of human immunodeficiency virus type 1 that interact with Pr55Gag particles. AIDS Res Hum Retroviruses *16*, 1141-1147.
- Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., *et al.* (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med *2*, 1240-1243.
- Huber, M., and Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. J Intern Med *262*, 5-25.
- Hubner, W., McNerney, G. P., Chen, P., Dale, B. M., Gordon, R. E., Chuang, F. Y., Li, X. D., Asmuth, D. M., Huser, T., and Chen, B. K. (2009). Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. Science *323*, 1743-1747.
- Humbert, M., and Dietrich, U. (2006). The role of neutralizing antibodies in HIV infection. AIDS Rev *8*, 51-59.
- Hunter, E., and Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. Curr Top Microbiol Immunol *157*, 187-253.
- Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. Curr Opin Cell Biol *20*, 4-11.
- Hurley, J. H., and Emr, S. D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. Annu Rev Biophys Biomol Struct *35*, 277-298.
- Hymes, K. B., Cheung, T., Greene, J. B., Prose, N. S., Marcus, A., Ballard, H., William, D. C., and Laubenstein, L. J. (1981). Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. Lancet *2*, 598-600.
- Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. Science *299*, 1713-1716.
- Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F., and Bukrinsky, M. (2006). Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. Retrovirology *3*, 4.
- Ivanov, D., Tsodikov, O. V., Kasanov, J., Ellenberger, T., Wagner, G., and Collins, T. (2007). Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 4353-4358.

- Iversen, A. K., Stewart-Jones, G., Learn, G. H., Christie, N., Sylvester-Hviid, C., Armitage, A. E., Kaul, R., Beattie, T., Lee, J. K., Li, Y., *et al.* (2006). Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. Nat Immunol *7*, 179-189.
- Ivey-Hoyle, M., Clark, R. K., and Rosenberg, M. (1991). The N-terminal 31 amino acids of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 contain a potential gp41 contact site. J Virol *65*, 2682-2685.
- Iwatani, Y., Rosen, A. E., Guo, J., Musier-Forsyth, K., and Levin, J. G. (2003). Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription in vitro. Requirement for RNA sequences downstream of the primer binding site abrogated by nucleocapsid protein-dependent primer-template interactions. J Biol Chem *278*, 14185-14195.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Archer, J., Hatch, S. C., Erkizia, I., Blanco, J., Borras, F. E., Puertas, M. C., Connor, J. H., Fernandez-Figueras, M. T., *et al.* (2009). Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. Blood *113*, 2732-2741.
- Jassoy, C., Harrer, T., Rosenthal, T., Navia, B. A., Worth, J., Johnson, R. P., and Walker, B. D. (1993). Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes release gamma interferon, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and TNF-beta when they encounter their target antigens. J Virol *67*, 2844-2852.
- Javaherian, K., Langlois, A. J., McDanal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D., and et al. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 6768-6772.
- Jiang, J., and Aiken, C. (2007). Maturation-dependent human immunodeficiency virus type 1 particle fusion requires a carboxyl-terminal region of the gp41 cytoplasmic tail. J Virol *81*, 9999-10008.
- Jiao, Y., Li, T. S., Xie, J., Han, Y., Qiu, Z. F., Zuo, L. Y., Mourez, T., and Wang, A. X. (2006a). Association between Nef-specific CD8 T-cell responses and disease progression in HIV-1 subtype B infection. Chin Med J (Engl) *119*, 1609-1615.
- Jiao, Y., Xie, J., Li, T., Han, Y., Qiu, Z., Zuo, L., and Wang, A. (2006b). Correlation between gag-specific CD8 T-cell responses, viral load, and CD4 count in HIV-1 infection is dependent on disease status. J Acquir Immune Defic Syndr *42*, 263-268.
- Johnson, D. C., and Huber, M. T. (2002). Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. J Virol *76*, 1-8.
- Johnson, W. E., and Desrosiers, R. C. (2002). Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. Annu Rev Med *53*, 499-518.
- Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M., and Sattentau, Q. J. (2004). HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. J Exp Med *199*, 283-293.
- Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q. J. (2007). Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. J Virol *81*, 13916-13921.
- Jolly, C., and Sattentau, Q. J. (2004). Retroviral spread by induction of virological synapses. Traffic *5*, 643-650.

- Jolly, C., and Sattentau, Q. J. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. J Virol *79*, 12088-12094.
- Jolly, C., and Sattentau, Q. J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. J Virol *81*, 7873-7884.
- Jones, P. L., Korte, T., and Blumenthal, R. (1998). Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. J Biol Chem *273*, 404-409.
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. Cell Host Microbe *2*, 85-95.
- Jouvenet, N., Neil, S. J., Bess, C., Johnson, M. C., Virgen, C. A., Simon, S. M., and Bieniasz, P. D. (2006). Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. PLoS Biol *4*, e435.
- Kahn, J. O., and Walker, B. D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med *339*, 33-39.
- Kalia, V., Sarkar, S., Gupta, P., and Montelaro, R. C. (2003). Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. J Virol *77*, 3634-3646.
- Kalia, V., Sarkar, S., Gupta, P., and Montelaro, R. C. (2005). Antibody neutralization escape mediated by point mutations in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41. J Virol *79*, 2097-2107.
- Kanevsky, I., Chaminade, F., Ficheux, D., Moumen, A., Gorelick, R., Negroni, M., Darlix, J. L., and Fosse, P. (2005). Specific interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and the TAR element. J Mol Biol *348*, 1059-1077.
- Kanki, P. J., McLane, M. F., King, N. W., Jr., Letvin, N. L., Hunt, R. D., Sehgal, P., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C., and Essex, M. (1985). Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. Science *228*, 1199-1201.
- Kantanen, M. L., Leinikki, P., and Kuismanen, E. (1995). Endoproteolytic cleavage of HIV-1 gp160 envelope precursor occurs after exit from the trans-Golgi network (TGN). Arch Virol *140*, 1441-1449.
- Kaslow, R. A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, A. J., Goedert, J. J., Winkler, C., O'Brien, S. J., Rinaldo, C., *et al.* (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. Nat Med *2*, 405-411.
- Kassutto, S., and Rosenberg, E. S. (2004). Primary HIV type 1 infection. Clin Infect Dis *38*, 1447-1453.
- Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. Annu Rev Biochem *63*, 133-173.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 893-905.
- Kawamura, T., Kurtz, S. E., Blauvelt, A., and Shimada, S. (2005). The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. J Dermatol Sci *40*, 147-155.

- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., *et al.* (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science *313*, 523-526.
- Kelleher, A. D., Booth, B. L., Jr., Sewell, A. K., Oxenius, A., Cerundolo, V., McMichael, A. J., Phillips, R. E., and Price, D. A. (2001). Effects of retroviral protease inhibitors on proteasome function and processing of HIV-derived MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes. AIDS Res Hum Retroviruses *17*, 1063-1066.
- Khorchid, A., Halwani, R., Wainberg, M. A., and Kleiman, L. (2002). Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. J Virol *76*, 4131-4137.
- Kieny, M. P., Lathe, R., Riviere, Y., Dott, K., Schmitt, D., Girard, M., Montagnier, L., and Lecocq, J. (1988). Improved antigenicity of the HIV env protein by cleavage site removal. Protein Eng *2*, 219-225.
- Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. Nat Med *13*, 46-53.
- Kiernan, R. E., Ono, A., Englund, G., and Freed, E. O. (1998). Role of matrix in an early postentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. J Virol *72*, 4116-4126.
- Klasse, P. J., and Moore, J. P. (1996). Quantitative model of antibody- and soluble CD4-mediated neutralization of primary isolates and T-cell line-adapted strains of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *70*, 3668-3677.
- Klasse, P. J., and Sattentau, Q. J. (2001). Mechanisms of virus neutralization by antibody. Curr Top Microbiol Immunol *260*, 87-108.
- Klasse, P. J., and Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. J Gen Virol *83*, 2091-2108.
- Kliger, Y., and Shai, Y. (1997). A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers. Biochemistry *36*, 5157-5169.
- Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M. J., and Buchner, J. (1999). BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip. J Biol Chem *274*, 29850-29857.
- Kodama, T., Silva, D. P., Daniel, M. D., Phillips-Conroy, J. E., Jolly, C. J., Rogers, J., and Desrosiers, R. C. (1989). Prevalence of antibodies to SIV in baboons in their native habitat. AIDS Res Hum Retroviruses *5*, 337-343.
- Koibuchi, T., Allen, T. M., Lichterfeld, M., Mui, S. K., O'Sullivan, K. M., Trocha, A., Kalams, S. A., Johnson, R. P., and Walker, B. D. (2005). Limited sequence evolution within persistently targeted CD8 epitopes in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *79*, 8171-8181.
- Kolchinsky, P., Kiprilov, E., Bartley, P., Rubinstein, R., and Sodroski, J. (2001). Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. J Virol *75*, 3435-3443.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. Science *288*, 1789-1796.

- Korin, Y. D., and Zack, J. A. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. J Virol *72*, 3161-3168.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem *54*, 631-664.
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. J Virol *68*, 4650-4655.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. Science *237*, 1351-1355.
- Krausslich, H. G., Facke, M., Heuser, A. M., Konvalinka, J., and Zentgraf, H. (1995). The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. J Virol *69*, 3407-3419.
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., and Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. Immunity *16*, 135-144.
- Kwong, P. D., Doyle, M. L., Casper, D. J., Cicala, C., Leavitt, S. A., Majeed, S., Steenbeke, T. D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., *et al.* (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. Nature *420*, 678-682.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature *393*, 648-659.
- Lambele, M., Labrosse, B., Roch, E., Moreau, A., Verrier, B., Barin, F., Roingeard, P., Mammano, F., and Brand, D. (2007). Impact of natural polymorphism within the gp41 cytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 on the intracellular distribution of envelope glycoproteins and viral assembly. J Virol *81*, 125-140.
- Land, A., and Braakman, I. (2001). Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. Biochimie *83*, 783-790.
- Larkin, M., Childs, R. A., Matthews, T. J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A. M., Savill, J. S., Haslett, C., Diaz, R., and Feizi, T. (1989). Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. Aids *3*, 793-798.
- LaRosa, G. J., Weinhold, K., Profy, A. T., Langlois, A. J., Dreesman, G. R., Boswell, R. N., Shadduck, P., Bolognesi, D. P., Matthews, T. J., Emini, E. A., and et al. (1991). Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant: further clarifications. Science *253*, 1146.
- Laude, A. J., and Prior, I. A. (2004). Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. Mol Membr Biol *21*, 193-205.
- Lee, S. J., Hu, W., Fisher, A. G., Looney, D. J., Kao, V. F., Mitsuya, H., Ratner, L., and Wong-Staal, F. (1989). Role of the carboxy-terminal portion of the HIV-1 transmembrane protein in viral transmission and cytopathogenicity. AIDS Res Hum Retroviruses *5*, 441-449.

- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem *265*, 10373-10382.
- Leslie, A. J., Pfafferott, K. J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M. M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E. C., Allen, T., Prado, J. G., *et al.* (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. Nat Med *10*, 282-289.
- Lever, A. M. (2007). HIV-1 RNA packaging. Adv Pharmacol *55*, 1-32.
- Levin, J. G., Guo, J., Rouzina, I., and Musier-Forsyth, K. (2005). Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *80*, 217-286.
- Lewinski, M. K., and Bushman, F. D. (2005). Retroviral DNA integration--mechanism and consequences. Adv Genet *55*, 147-181.
- Lewinski, M. K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannenhalli, S., *et al.* (2006). Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. PLoS Pathog *2*, e60.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. Embo J *11*, 3053-3058.
- Lewis, P. F., and Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. J Virol *68*, 510-516.
- Li, X., Quan, Y., Arts, E. J., Li, Z., Preston, B. D., de Rocquigny, H., Roques, B. P., Darlix, J. L., Kleiman, L., Parniak, M. A., and Wainberg, M. A. (1996). Human immunodeficiency virus Type 1 nucleocapsid protein (NCp7) directs specific initiation of minus-strand DNA synthesis primed by human tRNA(Lys3) in vitro: studies of viral RNA molecules mutated in regions that flank the primer binding site. J Virol *70*, 4996-5004.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (2000). The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. Virology *272*, 417-428.
- Lichterfeld, M., Yu, X. G., Mui, S. K., Williams, K. L., Trocha, A., Brockman, M. A., Allgaier, R. L., Waring, M. T., Koibuchi, T., Johnston, M. N., *et al.* (2007). Selective depletion of high-avidity human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T cells after early HIV-1 infection. J Virol *81*, 4199-4214.
- Lindwasser, O. W., and Resh, M. D. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. J Virol *78*, 6013-6023.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell *86*, 367-377.
- Liu, Y., McNevin, J., Zhao, H., Tebit, D. M., Troyer, R. M., McSweyn, M., Ghosh, A. K., Shriner, D., Arts, E. J., McElrath, M. J., and Mullins, J. I. (2007). Evolution of human immunodeficiency virus type 1 cytotoxic T-lymphocyte epitopes: fitness-balanced escape. J Virol *81*, 12179-12188.

- Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., Teo, W., and Poeschla, E. M. (2006a). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. Science *314*, 461-464.
- Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S., and Poeschla, E. M. (2006b). Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. J Mol Biol *360*, 760-773.
- Lodge, R., Gottlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E. A., and Lemay, G. (1994). The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. J Virol *68*, 4857-4861.
- Lodge, R., Lalonde, J. P., Lemay, G., and Cohen, E. A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. Embo J *16*, 695-705.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 10149-10154.
- Lopez-Verges, S., Camus, G., Blot, G., Beauvoir, R., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2006). Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 14947-14952.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., and Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7626-7631.
- Lubben, N. B., Sahlender, D. A., Motley, A. M., Lehner, P. J., Benaroch, P., and Robinson, M. S. (2007). HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. Mol Biol Cell *18*, 3351-3365.
- Luciw, P. A., Shaw, K. E., Shacklett, B. L., and Marthas, M. L. (1998). Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. Virology *252*, 9-16.
- Lue, J., Hsu, M., Yang, D., Marx, P., Chen, Z., and Cheng-Mayer, C. (2002). Addition of a single gp120 glycan confers increased binding to dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin and neutralization escape to human immunodeficiency virus type 1. J Virol *76*, 10299-10306.
- Luhtala, N., and Odorizzi, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. J Cell Biol *166*, 717-729.
- Lusso, P. (2006). HIV and the chemokine system: 10 years later. Embo J *25*, 447-456.
- Lyles, R. H., Munoz, A., Yamashita, T. E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C. R., Margolick, J. B., Phair, J. P., and Mellors, J. W. (2000). Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. J Infect Dis *181*, 872-880.
- MacDonald, K. S., Fowke, K. R., Kimani, J., Dunand, V. A., Nagelkerke, N. J., Ball, T. B., Oyugi, J., Njagi, E., Gaur, L. K., Brunham, R. C., *et al.* (2000). Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. J Infect Dis *181*, 1581-1589.

- Magerus-Chatinet, A., Yu, H., Garcia, S., Ducloux, E., Terris, B., and Bomsel, M. (2007). Galactosyl ceramide expressed on dendritic cells can mediate HIV-1 transfer from monocyte derived dendritic cells to autologous T cells. Virology *362*, 67-74.
- Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charron, D., and Costagliola, D. (1999). Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. Blood *93*, 936-941.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature *338*, 254-257.
- Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A., and Gottlinger, H. G. (1995). Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. J Virol *69*, 3824-3830.
- Markosyan, R. M., Cohen, F. S., and Melikyan, G. B. (2003). HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. Mol Biol Cell *14*, 926-938.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. Cell *124*, 729-740.
- Marshall, H. M., Ronen, K., Berry, C., Llano, M., Sutherland, H., Saenz, D., Bickmore, W., Poeschla, E., and Bushman, F. D. (2007). Role of PSIP1/LEDGF/p75 in lentiviral infectivity and integration targeting. PLoS One *2*, e1340.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P. D. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 12414-12419.
- Martinez-Picado, J., Prado, J. G., Fry, E. E., Pfafferott, K., Leslie, A., Chetty, S., Thobakgale, C., Honeyborne, I., Crawford, H., Matthews, P., *et al.* (2006). Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *80*, 3617-3623.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends Cell Biol *8*, 410-415.
- Mascola, J. R. (2003). Defining the protective antibody response for HIV-1. Curr Mol Med *3*, 209-216.
- Massiah, M. A., Starich, M. R., Paschall, C., Summers, M. F., Christensen, A. M., and Sundquist, W. I. (1994). Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. J Mol Biol *244*, 198-223.
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. Nature *434*, 1093-1097.
- Matthias, L. J., and Hogg, P. J. (2003). Redox control on the cell surface: implications for HIV-1 entry. Antioxid Redox Signal *5*, 133-138.
- McCaffrey, R. A., Saunders, C., Hensel, M., and Stamatatos, L. (2004). N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. J Virol *78*, 3279-3295.

- McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R., and Weissman, I. L. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. Cell *53*, 55-67.
- McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. J Med Virol *78 Suppl 1*, S7-S12.
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., and Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. J Cell Biol *159*, 441-452.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D., and Hope, T. J. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. Science *300*, 1295-1297.
- McKeating, J. A., Shotton, C., Jeffs, S., Palmer, C., Hammond, A., Lewis, J., Oliver, K., May, J., and Balfe, P. (1996). Immunogenicity of full length and truncated forms of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein. Immunol Lett *51*, 101-105.
- McNeil, A. J., Yap, P. L., Gore, S. M., Brettle, R. P., McColl, M., Wyld, R., Davidson, S., Weightman, R., Richardson, A. M., and Robertson, J. R. (1996). Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. Qjm *89*, 177-185.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., and Cohen, F. S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. J Cell Biol *151*, 413-423.
- Mellors, J. W., Margolick, J. B., Phair, J. P., Rinaldo, C. R., Detels, R., Jacobson, L. P., and Munoz, A. (2007). Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. Jama *297*, 2349-2350.
- Merkle, R. K., Helland, D. E., Welles, J. L., Shilatifard, A., Haseltine, W. A., and Cummings, R. D. (1991). gp160 of HIV-I synthesized by persistently infected Molt-3 cells is terminally glycosylated: evidence that cleavage of gp160 occurs subsequent to oligosaccharide processing. Arch Biochem Biophys *290*, 248-257.
- Meyerhans, A., Dadaglio, G., Vartanian, J. P., Langlade-Demoyen, P., Frank, R., Asjo, B., Plata, F., and Wain-Hobson, S. (1991). In vivo persistence of a HIV-1-encoded HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope despite specific in vitro reactivity. Eur J Immunol *21*, 2637-2640.
- Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W., Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J., and Connors, M. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 2709-2714.
- Miller, M. A., Cloyd, M. W., Liebmann, J., Rinaldo, C. R., Jr., Islam, K. R., Wang, S. Z., Mietzner, T. A., and Montelaro, R. C. (1993). Alterations in cell membrane permeability by the lentivirus lytic peptide (LLP-1) of HIV-1 transmembrane protein. Virology *196*, 89-100.
- Miller, M. A., Garry, R. F., Jaynes, J. M., and Montelaro, R. C. (1991). A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides. AIDS Res Hum Retroviruses *7*, 511-519.
- Miller, M. D., Farnet, C. M., and Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. J Virol *71*, 5382-5390.

- Miller, M. D., Geleziunas, R., Bianchi, E., Lennard, S., Hrin, R., Zhang, H., Lu, M., An, Z., Ingallinella, P., Finotto, M., *et al.* (2005). A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 14759-14764.
- Mirambeau, G., Lyonnais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J., Borde, I., Reboud-Ravaux, M., Restle, T., Gorelick, R. J., and Le Cam, E. (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. PLoS One *2*, e669.
- Mitchell, R. S., Katsura, C., Skasko, M. A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E. B., Margottin-Goguet, F., Benarous, R., and Guatelli, J. C. (2009). Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. PLoS Pathog *5*, e1000450.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., and Melikyan, G. B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. Cell *137*, 433-444.
- Modrow, S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Gallo, R. C., Wong-Staal, F., and Wolf, H. (1987). Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. J Virol *61*, 570-578.
- Molinari, M., and Helenius, A. (1999). Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. Nature *402*, 90-93.
- Molinari, M., and Helenius, A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. Science *288*, 331-333.
- Mondor, I., Ugolini, S., and Sattentau, Q. J. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. J Virol *72*, 3623-3634.
- Montavon, C., Toure-Kane, C., Liegeois, F., Mpoudi, E., Bourgeois, A., Vergne, L., Perret, J. L., Boumah, A., Saman, E., Mboup, S., *et al.* (2000). Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. J Acquir Immune Defic Syndr *23*, 363-374.
- Moore, J. P., and Sodroski, J. (1996). Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. J Virol *70*, 1863-1872.
- Moremen, K. W., Trimble, R. B., and Herscovics, A. (1994). Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. Glycobiology *4*, 113-125.
- Morikawa, Y., Zhang, W. H., Hockley, D. J., Nermut, M. V., and Jones, I. M. (1998). Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. J Virol *72*, 7659-7663.
- Morita, E., and Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. Annu Rev Cell Dev Biol *20*, 395-425.
- Moulard, M., and Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. Biochim Biophys Acta *1469*, 121-132.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W., and Klenk, H. D. (1999). Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. Virus Res *60*, 55-65.

- Munshi, U. M., Kim, J., Nagashima, K., Hurley, J. H., and Freed, E. O. (2007). An Alix fragment potently inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPXL late domains. J Biol Chem *282*, 3847-3855.
- Murakami, T., Ablan, S., Freed, E. O., and Tanaka, Y. (2004). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. J Virol *78*, 1026-1031.
- Murakami, T., and Freed, E. O. (2000a). Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. J Virol *74*, 3548-3554.
- Murakami, T., and Freed, E. O. (2000b). The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 343-348.
- Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., and Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 5246-5251.
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Ruker, F., and Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *67*, 6642-6647.
- Muthumani, K., Choo, A. Y., Premkumar, A., Hwang, D. S., Thieu, K. P., Desai, B. M., and Weiner, D. B. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. Cell Death Differ *12 Suppl 1*, 962-970.
- Namy, O., Moran, S. J., Stuart, D. I., Gilbert, R. J., and Brierley, I. (2006). A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. Nature *441*, 244-247.
- Narayan, S., and Young, J. A. (2004). Reconstitution of retroviral fusion and uncoating in a cell-free system. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 7721-7726.
- Navis, M., Matas, D. E., Rachinger, A., Koning, F. A., van Swieten, P., Kootstra, N. A., and Schuitemaker, H. (2008). Molecular evolution of human immunodeficiency virus type 1 upon transmission between human leukocyte antigen disparate donor-recipient pairs. PLoS One *3*, e2422.
- Neil, S., Martin, F., Ikeda, Y., and Collins, M. (2001). Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. J Virol *75*, 5448-5456.
- Neil, S. J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature *451*, 425-430.
- Nekhai, S., and Jeang, K. T. (2006). Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. Future Microbiol *1*, 417-426.
- Nermut, M. V., Zhang, W. H., Francis, G., Ciampor, F., Morikawa, Y., and Jones, I. M. (2003). Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. Virology *305*, 219-227.
- Newman, J. T., Sturgeon, T. J., Gupta, P., and Montelaro, R. C. (2007). Differential functional phenotypes of two primary HIV-1 strains resulting from homologous point mutations in the LLP domains of the envelope gp41 intracytoplasmic domain. Virology *367*, 102-116.

- Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J., and Hildreth, J. E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. J Biol Chem *278*, 52347-52354.
- Nguyen, D. G., and Hildreth, J. E. (2003). Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. Eur J Immunol *33*, 483-493.
- Nguyen, D. H., and Hildreth, J. E. (2000). Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. J Virol *74*, 3264-3272.
- Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R. A., Yao, X. J., Checroune, F., Rougeau, N., and Cohen, E. A. (1998). The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. J Virol *72*, 4104-4115.
- Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J. P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. J Virol *79*, 5386-5399.
- Nydegger, S., Khurana, S., Krementsov, D. N., Foti, M., and Thali, M. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. J Cell Biol *173*, 795-807.
- O'Neil, P. K., Sun, G., Yu, H., Ron, Y., Dougherty, J. P., and Preston, B. D. (2002). Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. J Biol Chem *277*, 38053-38061.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature *382*, 833-835.
- Odorizzi, G. (2006). The multiple personalities of Alix. J Cell Sci *119*, 3025-3032.
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J. R., Wyatt, R., and Kwong, P. D. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. J Virol *78*, 10724-10737.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., *et al.* (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. Science *279*, 2103-2106.
- Ohno, H., Aguilar, R. C., Fournier, M. C., Hennecke, S., Cosson, P., and Bonifacino, J. S. (1997). Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. Virology *238*, 305-315.
- Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. Mol Biol Cell *10*, 2573-2582.
- Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K., and Freed, E. O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 14889-14894.

- Ono, A., Demirov, D., and Freed, E. O. (2000). Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. J Virol *74*, 5142-5150.
- Ono, A., and Freed, E. O. (1999). Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. J Virol *73*, 4136-4144.
- Ono, A., and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 13925-13930.
- Ono, A., and Freed, E. O. (2004). Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. J Virol *78*, 1552-1563.
- Ono, A., Huang, M., and Freed, E. O. (1997). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions. J Virol *71*, 4409-4418.
- Ono, A., Waheed, A. A., and Freed, E. O. (2007). Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. Virology *360*, 27-35.
- Orenstein, J. M., Meltzer, M. S., Phipps, T., and Gendelman, H. E. (1988). Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. J Virol *62*, 2578-2586.
- Ott, D. E., Coren, L. V., and Gagliardi, T. D. (2005). Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. J Virol *79*, 13839-13847.
- Otteken, A., and Moss, B. (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*, 97-103.
- Ottmann, M., Gabus, C., and Darlix, J. L. (1995). The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. J Virol *69*, 1778-1784.
- Owens, R. J., Dubay, J. W., Hunter, E., and Compans, R. W. (1991). Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 3987-3991.
- Pal, R., Hoke, G. M., and Sarngadharan, M. G. (1989). Role of oligosaccharides in the processing and maturation of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 3384-3388.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993). New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med *328*, 327-335.
- Pantophlet, R., and Burton, D. R. (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. Annu Rev Immunol *24*, 739-769.
- Paquette, J. S., Fortin, J. F., Blanchard, L., and Tremblay, M. J. (1998). Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity. J Virol *72*, 9329-9336.

- Parker, C. E., Deterding, L. J., Hager-Braun, C., Binley, J. M., Schulke, N., Katinger, H., Moore, J. P., and Tomer, K. B. (2001). Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. J Virol *75*, 10906-10911.
- Parodi, A. J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. Annu Rev Biochem *69*, 69-93.
- Parren, P. W., and Burton, D. R. (2001). The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. Adv Immunol *77*, 195-262.
- Parren, P. W., Moore, J. P., Burton, D. R., and Sattentau, Q. J. (1999). The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. Aids *13 Suppl A*, S137-162.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. J Cell Biol *162*, 443-455.
- Pellegrin, I., Legrand, E., Neau, D., Bonot, P., Masquelier, B., Pellegrin, J. L., Ragnaud, J. M., Bernard, N., and Fleury, H. J. (1996). Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12 patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol *11*, 438-447.
- Perlman, M., and Resh, M. D. (2006). Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. Traffic *7*, 731-745.
- Pettit, S. C., Clemente, J. C., Jeung, J. A., Dunn, B. M., and Kaplan, A. H. (2005). Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. J Virol *79*, 10601-10607.
- Pettit, S. C., Everitt, L. E., Choudhury, S., Dunn, B. M., and Kaplan, A. H. (2004). Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. J Virol *78*, 8477-8485.
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A. H., Nantermet, P. V., Klein, C. A., and Swanstrom, R. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. J Virol *68*, 8017-8027.
- Peyerl, F. W., Bazick, H. S., Newberg, M. H., Barouch, D. H., Sodroski, J., and Letvin, N. L. (2004). Fitness costs limit viral escape from cytotoxic T lymphocytes at a structurally constrained epitope. J Virol *78*, 13901-13910.
- Phillips, D. M. (1994). The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. Aids *8*, 719-731.
- Pierson, T. C., and Doms, R. W. (2003). HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel therapies. Immunol Lett *85*, 113-118.
- Pierson, T. C., Zhou, Y., Kieffer, T. L., Ruff, C. T., Buck, C., and Siliciano, R. F. (2002). Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *76*, 8518-8531.
- Piguet, V., and Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. J Clin Invest *114*, 605-610.
- Piguet, V., and Steinman, R. M. (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. Trends Immunol *28*, 503-510.

- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S., and Montefiori, D. C. (1997). Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. J Infect Dis *176*, 924-932.
- Piller, S. C., Dubay, J. W., Derdeyn, C. A., and Hunter, E. (2000). Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. J Virol *74*, 11717-11723.
- Pincus, S. H., Messer, K. G., Nara, P. L., Blattner, W. A., Colclough, G., and Reitz, M. (1994). Temporal analysis of the antibody response to HIV envelope protein in HIV-infected laboratory workers. J Clin Invest *93*, 2505-2513.
- Piyasirisilp, S., McCutchan, F. E., Carr, J. K., Sanders-Buell, E., Liu, W., Chen, J., Wagner, R., Wolf, H., Shao, Y., Lai, S., *et al.* (2000). A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. J Virol *74*, 11286-11295.
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D. L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med *15*, 871-872.
- Plata, F., Autran, B., Martins, L. P., Wain-Hobson, S., Raphael, M., Mayaud, C., Denis, M., Guillon, J. M., and Debre, P. (1987). AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. Nature *328*, 348-351.
- Plesa, G., Dai, J., Baytop, C., Riley, J. L., June, C. H., and O'Doherty, U. (2007). Addition of deoxynucleosides enhances human immunodeficiency virus type 1 integration and 2LTR formation in resting CD4+ T cells. J Virol *81*, 13938-13942.
- Plymale, D. R., Tang, D. S., Comardelle, A. M., Fermin, C. D., Lewis, D. E., and Garry, R. F. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1-induced killing of CD4 cells. Aids *13*, 1827-1839.
- Pope, M., and Haase, A. T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. Nat Med *9*, 847-852.
- Poumbourios, P., Wilson, K. A., Center, R. J., El Ahmar, W., and Kemp, B. E. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomerization requires the gp41 amphipathic alpha-helical/leucine zipper-like sequence. J Virol *71*, 2041-2049.
- Prabakaran, P., Dimitrov, A. S., Fouts, T. R., and Dimitrov, D. S. (2007). Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. Adv Pharmacol *55*, 33-97.
- Prado, J. G., Honeyborne, I., Brierley, I., Puertas, M. C., Martinez-Picado, J., and Goulder, P. J. (2009). Functional consequences of human immunodeficiency virus escape from an HLA-B*13-restricted CD8+ T-cell epitope in p1 Gag protein. J Virol *83*, 1018-1025.
- Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., and Phillips, R. E. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 1890-1895.
- Price, D. A., Sewell, A. K., Dong, T., Tan, R., Goulder, P. J., Rowland-Jones, S. L., and Phillips, R. E. (1998). Antigen-specific release of beta-chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes. Curr Biol *8*, 355-358.

- Price, P., Johnson, R. P., Scadden, D. T., Jassoy, C., Rosenthal, T., Kalams, S., and Walker, B. D. (1995). Cytotoxic CD8+ T lymphocytes reactive with human immunodeficiency virus-1 produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and variable amounts of interleukins 2, 3, and 4 following stimulation with the cognate epitope. Clin Immunol Immunopathol *74*, 100-106.
- Provitera, P., Goff, A., Harenberg, A., Bouamr, F., Carter, C., and Scarlata, S. (2001). Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. Biochemistry *40*, 5565-5572.
- Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A., and et al. (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. AIDS Res Hum Retroviruses *10*, 1651-1658.
- Quinones-Kochs, M. I., Buonocore, L., and Rose, J. K. (2002). Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. J Virol *76*, 4199-4211.
- Raiborg, C., Rusten, T. E., and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. Curr Opin Cell Biol *15*, 446-455.
- Rao, Z., Belyaev, A. S., Fry, E., Roy, P., Jones, I. M., and Stuart, D. I. (1995). Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. Nature *378*, 743-747.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. Traffic *3*, 718-729.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., and et al. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature *313*, 277-284.
- Reece, J. C., Handley, A. J., Anstee, E. J., Morrison, W. A., Crowe, S. M., and Cameron, P. U. (1998). HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. J Exp Med *187*, 1623-1631.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R., and Gottlinger, H. G. (1998). Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. Embo J *17*, 2699-2708.
- Resh, M. D. (2004). A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 417-418.
- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., and Petropoulos, C. J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 4144-4149.
- Rizzuto, C. D., and Sodroski, J. G. (1997). Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. J Virol *71*, 4847-4851.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. Science *280*, 1949-1953.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., *et al.* (2000). HIV-1 nomenclature proposal. Science *288*, 55-56.
- Roeth, J. F., and Collins, K. L. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. Microbiol Mol Biol Rev *70*, 548-563.

- Roeth, J. F., Williams, M., Kasper, M. R., Filzen, T. M., and Collins, K. L. (2004). HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. J Cell Biol *167*, 903-913.
- Roger, M. (1998). Influence of host genes on HIV-1 disease progression. Faseb J *12*, 625-632.
- Rosen, O., Sharon, M., Quadt-Akabayov, S. R., and Anglister, J. (2006). Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 13950-13955.
- Rousso, I., Mixon, M. B., Chen, B. K., and Kim, P. S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13523-13525.
- Roux, K. H., and Taylor, K. A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. Curr Opin Struct Biol *17*, 244-252.
- Rowell, J. F., Stanhope, P. E., and Siliciano, R. F. (1995). Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. J Immunol *155*, 473-488.
- Rudnicka, D., Feldmann, J., Porrot, F., Wietgrefe, S., Guadagnini, S., Prevost, M. C., Estaquier, J., Haase, A. T., Sol-Foulon, N., and Schwartz, O. (2009). Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. J Virol *83*, 6234-6246.
- Ruggiero, E., Bona, R., Muratori, C., and Federico, M. (2008). Virological consequences of early events following cell-cell contact between human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ cells. J Virol *82*, 7773-7789.
- Saad, J. S., Loeliger, E., Luncsford, P., Liriano, M., Tai, J., Kim, A., Miller, J., Joshi, A., Freed, E. O., and Summers, M. F. (2007). Point mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. J Mol Biol *366*, 574-585.
- Saha, K., Yan, H., Nelson, J. A., and Zerhouni-Layachi, B. (2005). Infection of human and non-human cells by a highly fusogenic primary CD4-independent HIV-1 isolate with a truncated envelope cytoplasmic tail. Virology *337*, 30-44.
- Sandefur, S., Smith, R. M., Varthakavi, V., and Spearman, P. (2000). Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). J Virol *74*, 7238-7249.
- Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D., and Moore, J. P. (2002). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. J Virol *76*, 7293-7305.
- Sandrin, V., Muriaux, D., Darlix, J. L., and Cosset, F. L. (2004). Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. J Virol *78*, 7153-7164.
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., and Gallay, P. A. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells. Immunol Res *21*, 211-217.

- Sato, H., Orenstein, J., Dimitrov, D., and Martin, M. (1992). Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. Virology *186*, 712-724.
- Sattentau, Q. (2008). Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. Nat Rev Microbiol *6*, 815-826.
- Sattentau, Q. J. (1996). Neutralization of HIV-1 by antibody. Curr Opin Immunol *8*, 540-545.
- Sattentau, Q. J., Zolla-Pazner, S., and Poignard, P. (1995). Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. Virology *206*, 713-717.
- Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and Burton, D. R. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. J Virol *76*, 7306-7321.
- Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Saphire, E. O., Calarese, D., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Burton, D. R., and Rudd, P. M. (2003). The carbohydrate epitope of the neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. Adv Exp Med Biol *535*, 205-218.
- Schaefer, M. R., Wonderlich, E. R., Roeth, J. F., Leonard, J. A., and Collins, K. L. (2008). HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. PLoS Pathog *4*, e1000131.
- Schaeffer, E., Soros, V. B., and Greene, W. C. (2004). Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. J Virol *78*, 1375-1383.
- Scherer, A., Frater, J., Oxenius, A., Agudelo, J., Price, D. A., Gunthard, H. F., Barnardo, M., Perrin, L., Hirschel, B., Phillips, R. E., and McLean, A. R. (2004). Quantifiable cytotoxic T lymphocyte responses and HLA-related risk of progression to AIDS. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 12266-12270.
- Schols, D., Pauwels, R., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1992). Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis. Virology *189*, 374-376.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. Cell *110*, 521-529.
- Schwartz, T. U. (2007). Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. Adv Exp Med Biol *607*, 52-60.
- Seddiki, N., Ramdani, A., Saffar, L., Portoukalian, J., Gluckman, J. C., and Gattegno, L. (1994). A monoclonal antibody directed to sulfatide inhibits the binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein to macrophages but not their infection by the virus. Biochim Biophys Acta *1225*, 289-296.
- Shankar, P., Xu, Z., and Lieberman, J. (1999). Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. Blood *94*, 3084-3093.
- Shehu-Xhilaga, M., Kraeusslich, H. G., Pettit, S., Swanstrom, R., Lee, J. Y., Marshall, J. A., Crowe, S. M., and Mak, J. (2001). Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage

site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. J Virol *75*, 9156-9164.

- Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Horensavitz, C., Pypaert, M., and Mothes, W. (2007). Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. Nat Cell Biol *9*, 310-315.
- Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Ingmundson, A., Horner, S. M., Cicchetti, G., Allen, P. G., Pypaert, M., Cunningham, J. M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. Traffic *4*, 785-801.
- Sherer, N. M., and Mothes, W. (2008). Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. Trends Cell Biol *18*, 414-420.
- Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D., and Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. Nat Cell Biol *4*, 389-393.
- Shimizu, H., Hasebe, F., Tsuchie, H., Morikawa, S., Ushijima, H., and Kitamura, T. (1992). Analysis of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a truncated transmembrane glycoprotein. Virology *189*, 534-546.
- Shimizu, H., Morikawa, S., Yamaguchi, K., Tsuchie, H., Hachimori, K., Ushijima, H., and Kitamura, T. (1990). Shorter size of transmembrane glycoprotein of an HIV-1 isolate. Aids *4*, 575-576.
- Shu, W., Ji, H., and Lu, M. (1999). Trimerization specificity in HIV-1 gp41: analysis with a GCN4 leucine zipper model. Biochemistry *38*, 5378-5385.
- Shun, M. C., Raghavendra, N. K., Vandegraaff, N., Daigle, J. E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2007). LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. Genes Dev *21*, 1767-1778.
- Simon, F., Mauclere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. Nat Med *4*, 1032-1037.
- Sinclair, A. L., Habeshaw, J. A., Muir, L., Chandler, P., Forster, S., Cruickshank, K., and Dalgleish, A. G. (1988). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: comparison between HTLV-I and HIV-1 assays. Aids *2*, 465-472.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. Trends Cell Biol *16*, 317-326.
- Sol-Foulon, N., Sourisseau, M., Porrot, F., Thoulouze, M. I., Trouillet, C., Nobile, C., Blanchet, F., di Bartolo, V., Noraz, N., Taylor, N., *et al.* (2007). ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. Embo J *26*, 516-526.
- Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J., and Crowe, S. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. J Virol *70*, 3863-3869.
- Sourisseau, M., Sol-Foulon, N., Porrot, F., Blanchet, F., and Schwartz, O. (2007). Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. J Virol *81*, 1000-1012.

- Sowinski, S., Jolly, C., Berninghausen, O., Purbhoo, M. A., Chauveau, A., Kohler, K., Oddos, S., Eissmann, P., Brodsky, F. M., Hopkins, C., *et al.* (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. Nat Cell Biol *10*, 211-219.
- Spear, G. T., Takefman, D. M., Sharpe, S., Ghassemi, M., and Zolla-Pazner, S. (1994). Antibodies to the HIV-1 V3 loop in serum from infected persons contribute a major proportion of immune effector functions including complement activation, antibody binding, and neutralization. Virology *204*, 609-615.
- Spearman, P., Horton, R., Ratner, L., and Kuli-Zade, I. (1997). Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. J Virol *71*, 6582-6592.
- Spies, C. P., Ritter, G. D., Jr., Mulligan, M. J., and Compans, R. W. (1994). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. J Virol *68*, 585-591.
- Spouge, J. I., Shrager, R. I., and Dimitrov, D. S. (1996). HIV-1 infection kinetics in tissue cultures. Math Biosci *138*, 1-22.
- Srinivas, S. K., Srinivas, R. V., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., and Compans, R. W. (1992). Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. J Biol Chem *267*, 7121-7127.
- Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., and 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*, 637-648.
- Stark, L. A., and Hay, R. T. (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*, 3037-3044.
- Stein, B. S., and Engleman, E. G. (1990). Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. J Biol Chem *265*, 2640-2649.
- Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G., and Engleman, E. G. (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. Cell *49*, 659-668.
- Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Lamonica, C. A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. Embo J *9*, 1551-1560.
- Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., and Katinger, H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. AIDS Res Hum Retroviruses *17*, 1757-1765.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Gottlinger, H. G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. Cell *114*, 689-699.
- Strebel, K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. Aids *17 Suppl 4*, S25-34.

- Streeck, H., Lichterfeld, M., Alter, G., Meier, A., Teigen, N., Yassine-Diab, B., Sidhu, H. K., Little, S., Kelleher, A., Routy, J. P., *et al.* (2007). Recognition of a defined region within p24 gag by CD8+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. J Virol *81*, 7725-7731.
- Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2001). HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 12144-12149.
- Sun, Y., Pinchuk, L. M., Agy, M. B., and Clark, E. A. (1997). Nuclear import of HIV-1 DNA in resting CD4+ T cells requires a cyclosporin A-sensitive pathway. J Immunol *158*, 512-517.
- Sundstrom, J. B., Little, D. M., Villinger, F., Ellis, J. E., and Ansari, A. A. (2004). Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. J Immunol *172*, 4391-4401.
- Sung, T. L., and Rice, A. P. (2009). miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1. PLoS Pathog *5*, e1000263.
- Swiggard, W. J., O'Doherty, U., McGain, D., Jeyakumar, D., and Malim, M. H. (2004). Long HIV type 1 reverse transcripts can accumulate stably within resting CD4+ T cells while short ones are degraded. AIDS Res Hum Retroviruses *20*, 285-295.
- Takahashi, H., Matsuda, M., Kojima, A., Sata, T., Andoh, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W. W. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: enhancement of activity by interaction with cellular topoisomerase I. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 5694-5698.
- Takahashi, H., Sawa, H., Hasegawa, H., Sata, T., Hall, W., and Kurata, T. (2002). Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. Biochem Biophys Res Commun *297*, 593-599.
- Tan, X., and Phillips, D. M. (1996). Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. Arch Virol *141*, 1177-1189.
- Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., and Summers, M. F. (2004). Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 517-522.
- Tardif, M. R., and Tremblay, M. J. (2003). Presence of host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 virions increases productive infection of CD4+ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material. J Virol *77*, 12299-12309.
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., and Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med *358*, 1590-1602.
- Tencza, S. B., Mietzner, T. A., and Montelaro, R. C. (1997). Calmodulin-binding function of LLP segments from the HIV type 1 transmembrane protein is conserved among natural sequence variants. AIDS Res Hum Retroviruses *13*, 263-269.
- Tencza, S. B., Miller, M. A., Islam, K., Mietzner, T. A., and Montelaro, R. C. (1995). Effect of amino acid substitutions on calmodulin binding and cytolytic properties of the LLP-1 peptide segment of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein. J Virol *69*, 5199-5202.

- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J., and Gottlinger, H. G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. Nature *372*, 363-365.
- Triques, K., and Stevenson, M. (2004). Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. J Virol *78*, 5523-5527.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., and Moore, J. P. (1996a). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. Nature *384*, 184-187.
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P., and Katinger, H. (1996b). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *70*, 1100-1108.
- Trombetta, E. S., and Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. Curr Opin Struct Biol *8*, 587-592.
- Troyer, R. M., McNevin, J., Liu, Y., Zhang, S. C., Krizan, R. W., Abraha, A., Tebit, D. M., Zhao, H., Avila, S., Lobritz, M. A., *et al.* (2009). Variable fitness impact of HIV-1 escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. PLoS Pathog *5*, e1000365.
- Turlure, F., Maertens, G., Rahman, S., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2006). A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. Nucleic Acids Res *34*, 1653-1665.
- Uchil, P. D., and Mothes, W. (2009). HIV Entry Revisited. Cell *137*, 402-404.
- Ulich, C., Dunne, A., Parry, E., Hooker, C. W., Gaynor, R. B., and Harrich, D. (1999). Functional domains of Tat required for efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. J Virol *73*, 2499-2508.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and H, G. G. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. Biochem Soc Trans *37*, 181-184.
- Valentin, A., and Pavlakis, G. N. (2003). Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1. Anticancer Res *23*, 2071-2075.
- van Anken, E., Sanders, R. W., Liscaljet, I. M., Land, A., Bontjer, I., Tillemans, S., Nabatov, A. A., Paxton, W. A., Berkhout, B., and Braakman, I. (2008). Only five of 10 strictly conserved disulfide bonds are essential for folding and eight for function of the HIV-1 envelope glycoprotein. Mol Biol Cell *19*, 4298-4309.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B., and Guatelli, J. (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*, 245-252.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., *et al.* (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. Nature *444*, 164.
- van Montfort, T., Nabatov, A. A., Geijtenbeek, T. B., Pollakis, G., and Paxton, W. A. (2007). Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes. J Immunol *178*, 3177-3185.

- Venable, R. M., Pastor, R. W., Brooks, B. R., and Carson, F. W. (1989). Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein. AIDS Res Hum Retroviruses *5*, 7-22.
- Verani, A., Gras, G., and Pancino, G. (2005). Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. Mol Immunol *42*, 195-212.
- Verli, H., Calazans, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., and Guimaraes, J. A. (2007). Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: clarifying differences between crystallographic and solution structures. J Mol Graph Model *26*, 62-68.
- VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., and Carter, C. A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 7724-7729.
- Vollenweider, F., Benjannet, S., Decroly, E., Savaria, D., Lazure, C., Thomas, G., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1996). Comparative cellular processing of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp160 by the mammalian subtilisin/kexin-like convertases. Biochem J *314 (Pt 2)*, 521-532.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R. S., and Trono, D. (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*, 6992-6996.
- von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbora, D. M., *et al.* (2003). The protein network of HIV budding. Cell *114*, 701-713.
- Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S., and Luster, A. D. (1998). Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. Nature *391*, 908-911.
- Wagner, R., Leschonsky, B., Harrer, E., Paulus, C., Weber, C., Walker, B. D., Buchbinder, S., Wolf, H., Kalden, J. R., and Harrer, T. (1999). Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. J Immunol *162*, 3727-3734.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. Cell *40*, 9-17.
- Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., Paradis, T. J., Flynn, T., Durno, A. G., Blumberg, R. S., Kaplan, J. C., Hirsch, M. S., and Schooley, R. T. (1987). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. Nature *328*, 345-348.
- Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P., and Levy, J. A. (1986). CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. Science *234*, 1563-1566.
- Walker, L. M., Phogat, S. K., Chan-Hui, P. Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J. L., Wrin, T., Simek, M. D., Fling, S., Mitcham, J. L., *et al.* (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science *326*, 285-289.
- Wang, X., Ye, L., Hou, W., Zhou, Y., Wang, Y. J., Metzger, D. S., and Ho, W. Z. (2009). Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. Blood *113*, 671-674.

- Wei, B. L., Denton, P. W., O'Neill, E., Luo, T., Foster, J. L., and Garcia, J. V. (2005). Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *79*, 5705-5712.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., *et al.* (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature *422*, 307-312.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature *373*, 117-122.
- Weinberg, J. B., Matthews, T. J., Cullen, B. R., and Malim, M. H. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. J Exp Med *174*, 1477-1482.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. Nature *387*, 426-430.
- Welman, M., Lemay, G., and Cohen, E. A. (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*, 103-112.
- Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., and Krausslich, H. G. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. PLoS Pathog *3*, e36.
- Wiegers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., and Krausslich, H. G. (1998). Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. J Virol *72*, 2846-2854.
- Wiley, R. D., and Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 738-743.
- Wilk, T., and Fuller, S. D. (1999). Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer. Curr Opin Struct Biol *9*, 231-243.
- Willey, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A., and Klausner, R. D. (1988). Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 9580-9584.
- Willey, R. L., Rutledge, R. A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C. E., and Martin, M. A. (1986). Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A *83*, 5038-5042.
- Williams, M., Roeth, J. F., Kasper, M. R., Fleis, R. I., Przybycin, C. G., and Collins, K. L. (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*, 12173-12184.
- Williams, R. L., and Urbe, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 355-368.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hehl, E., Kalpana, G. V., Prasad, V., and Kappes, J. C. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. J Virol *73*, 2126-2135.

- Wu, Y., and Marsh, J. W. (2003). Gene transcription in HIV infection. Microbes Infect *5*, 1023-1027.
- Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science *280*, 1884-1888.
- Wyma, D. J., Jiang, J., Shi, J., Zhou, J., Lineberger, J. E., Miller, M. D., and Aiken, C. (2004). Coupling of human immunodeficiency virus type 1 fusion to virion maturation: a novel role of the gp41 cytoplasmic tail. J Virol *78*, 3429-3435.
- Wyma, D. J., Kotov, A., and Aiken, C. (2000). Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. J Virol *74*, 9381-9387.
- Wyss, S., Berlioz-Torrent, C., Boge, M., Blot, G., Honing, S., Benarous, R., and Thali, M. (2001). The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]. J Virol *75*, 2982-2992.
- Wyss, S., Dimitrov, A. S., Baribaud, F., Edwards, T. G., Blumenthal, R., and Hoxie, J. A. (2005). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. J Virol *79*, 12231-12241.
- Xiang, S. H., Doka, N., Choudhary, R. K., Sodroski, J., and Robinson, J. E. (2002). Characterization of CD4-induced epitopes on the HIV type 1 gp120 envelope glycoprotein recognized by neutralizing human monoclonal antibodies. AIDS Res Hum Retroviruses *18*, 1207-1217.
- Yamamoto, K. (2009). Intracellular lectins involved in folding and transport in the endoplasmic reticulum. Biol Pharm Bull *32*, 767-773.
- Yamashita, M., and Emerman, M. (2004). Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. J Virol *78*, 5670-5678.
- Yang, C., Spies, C. P., and Compans, R. W. (1995). The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 9871-9875.
- Yang, O. O., Kalams, S. A., Rosenzweig, M., Trocha, A., Jones, N., Koziel, M., Walker, B. D., and Johnson, R. P. (1996). Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. J Virol *70*, 5799-5806.
- Yang, O. O., Kalams, S. A., Trocha, A., Cao, H., Luster, A., Johnson, R. P., and Walker, B. D. (1997). Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. J Virol *71*, 3120-3128.
- Yang, X., Kurteva, S., Ren, X., Lee, S., and Sodroski, J. (2005). Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *79*, 12132-12147.
- Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. Annu Rev Immunol *17*, 51-88.
- Yewdell, J. W., and Del Val, M. (2004). Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. Immunity *21*, 149-153.

- Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K. (2004). Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *78*, 1324-1332.
- Yoshida, K., Nakamura, M., and Ohno, T. (1997). Mutations of the HIV type 1 V3 loop under selection pressure with neutralizing monoclonal antibody NM-01. AIDS Res Hum Retroviruses *13*, 1283-1290.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. J Virol *66*, 4966-4971.
- Yu, X., Yuan, X., McLane, M. F., Lee, T. H., and Essex, M. (1993). Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. J Virol *67*, 213-221.
- Zack, J. A., Haislip, A. M., Krogstad, P., and Chen, I. S. (1992). Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. J Virol *66*, 1717-1725.
- Zapp, M. L., and Green, M. R. (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. Nature *342*, 714-716.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell *101*, 173-185.
- Zerhouni, B., Nelson, J. A., and Saha, K. (2004a). CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. J Virol *78*, 12288-12296.
- Zerhouni, B., Nelson, J. A., and Saha, K. (2004b). Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for CD8+ lymphocytes. J Virol *78*, 1243-1255.
- Zhang, J. X., Braakman, I., Matlack, K. E., and Helenius, A. (1997). Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. Mol Biol Cell *8*, 1943-1954.
- Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessell, A. J., Van Ryk, D., Xiang, S. H., Yang, X., Zhang, M. Y., Zwick, M. B., Arthos, J., *et al.* (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. Nature *445*, 732-737.
- Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W., and Resh, M. D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. J Virol *68*, 2556-2569.
- Zhou, Y., Zhang, H., Siliciano, J. D., and Siliciano, R. F. (2005). Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells. J Virol *79*, 2199-2210.
- Zhu, K., Dobard, C., and Chow, S. A. (2004). Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. J Virol *78*, 5045-5055.

- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., and Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature *441*, 847-852.
- Zhu, P., Winkler, H., Chertova, E., Taylor, K. A., and Roux, K. H. (2008). Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. PLoS Pathog *4*, e1000203.
- Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. Nat Rev Immunol *4*, 199-210.
- Zuniga, R., Lucchetti, A., Galvan, P., Sanchez, S., Sanchez, C., Hernandez, A., Sanchez, H., Frahm, N., Linde, C. H., Hewitt, H. S., *et al.* (2006). Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. J Virol *80*, 3122-3125.
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R., and Parren, P. W. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. J Virol *75*, 10892-10905.

Elodie BEAUMONT

Etude de l'émergence *in vivo* d'un variant du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 portant des glycoprotéines d'enveloppe naturellement tronquées dans leur domaine cytoplasmique

RÉSUMÉ

Les glycoprotéines d'enveloppe (Env) du VIH-1 se caractérisent par leur long domaine cytoplasmique (DC) qui joue un rôle essentiel dans la morphogenèse et l'infectivité virales. La multiplication virale *in vitro* et *in vivo* dépend ainsi étroitement de l'intégrité de ce domaine.
Nous avons cependant identifié un patient infecté par un VIH-1 présentant des Env avec un DC tronqué de 20 acides aminés. Cette anomalie structurale aurait dû aboutir à la production de virions dont la capacité infectieuse était fortement diminuée. Mon travail de thèse a donc consisté à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une telle troncation et à explorer les mécanismes moléculaires permettant au virus présentant cette anomalie de se multiplier efficacement *in vivo*. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont abouti à l'identification de mécanismes de compensation des capacités de multiplication de ce virus portant des Env tronquées dans leur DC impliquant des mutations dans la protéine de matrice.
En conclusion, toutes ces données ont permis d'apporter des éléments de compréhension nouveaux quant à l'assemblage du VIH-1 et son fort potentiel d'évolution *in vivo.*

Mots clé : VIH-1, glycoprotéines d'enveloppe, matrice, compensation, évolution

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) typically encodes envelope glycoprotein transmembrane subunits with long cytoplasmic tails (CTs) involved in viral infectivity and morphogenesis. The integrity of the gp41 CT thus seems to be essential for viral replication *in vitro* and *in vivo.*
However, we report here the emergence and dominance *in vivo* of a primary HIV-1 variant carrying a natural 20-amino-acid truncation of the gp41 CT. Such a deletion would therefore be expected to impair viral replication. The aims of this study were thus to assess the functional consequences of the gp41 truncation and to identify the molecular mechanisms by which a primary HIV-1 harboring such a deletion in the gp41 CT maintained its ability to replicate efficiently *in vivo*. Our findings reveal that replication capacity of a primary HIV-1 carrying truncated CT could be rescued by compensatory mechanisms involving mutations in the matrix protein.
In conclusion, our findings provide new insignt into HIV-1 assembly and evolution potential *in vivo*.

Keywords : HIV-1, envelope glycoproteins, matrix, complementation, evolution