

Etude du rôle de la protéine Dlg1 dans le cycle de réplication et la transmission du VIH-1

Maxime Chazal

▶ **To cite this version:**

Maxime Chazal. Etude du rôle de la protéine Dlg1 dans le cycle de réplication et la transmission du VIH-1. Biologie cellulaire. 2012. hal-01468534

HAL Id: hal-01468534
https://ephe.hal.science/hal-01468534

Submitted on 15 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

Mémoire présenté par
Maxime CHAZAL

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude du rôle de la protéine Dlg1 dans le cycle de réplication et la transmission du VIH-1

Soutenu le 14/06/2012 devant le jury suivant :

Frederick ARNAUD – Président
Thierry DUPRESSOIR – Rapporteur
Sarah GALLOIS-MONTBRUN – Examinatrice
Cecilia RAMIREZ – Examinatrice
Claudine PIQUE – Tutrice scientifique
Bruno CANQUE – Tuteur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Claudine PIQUE et Cecilia RAMIREZ
claudine.pique@inserm.fr - cecilia.ramirez@inserm.fr
Laboratoire « Partenaires cellulaires des rétrovirus humains ».
Unité INSERM U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain 75014 PARIS.

et de

Bruno CANQUE (EPHE)
bruno.canque@gmail.com
Laboratoire « Développement du système immunitaire ».
Centre Hayem, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude-Vellefaux PARIS.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Etude du rôle de la protéine Dlg1 dans le cycle de réplication et la transmission du VIH-1

Maxime CHAZAL

RESUME

La propagation du VIH-1 dans l'organisme est un processus dépendant du bourgeonnement de particules correctement assemblées. Pour ce faire, le virus utilise une stratégie de détournement de certaines protéines cellulaires, qui sont souvent des partenaires des protéines de structure virale Gag et Env. Le VIH-1 se transmet de deux façons dans un organisme : par particules libres ou par transfert de cellule à cellule via une structure appelée synapse virologique. Ce dernier moyen de propagation est considéré comme le plus efficace et prédominant in vitro. Nous avons précédemment identifié Dlg1, l'homologue humain de la protéine « Discs Large » de la drosophile, comme un nouveau partenaire de la protéine Gag du VIH-1. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de Dlg1 dans les deux modes de transmission du VIH-1 dans des lymphocytes T, cellules cibles naturelles du virus, où l'extinction stable de Dlg1 est obtenue avec un vecteur shRNA. Nous avons montré que le virus se propage plus efficacement dans les cellules n'exprimant pas Dlg1. Des observations en microscopie confocale nous ont révélé que l'absence de Dlg1 n'empêchait pas la formation de la synapse virologique, et des analyses quantitatives nous ont montré que l'efficacité de la transmission de cellule-à-cellule du virus n'était également pas affectée. La meilleure efficacité de propagation en absence de Dlg1 résulte d'une augmentation significative de l'infectivité des particules relâchées. Ce phénotype des particules virales correspond à une augmentation de leur contenu en cholestérol qui permettrait d'augmenter l'efficacité de la fusion virus-cellule lors de l'étape d'entrée du virus. Nous avons donc montré que Dlg1 est un régulateur négatif de la transmission par particules libres du VIH-1, et que la transmission cellule-à-cellule du virus parvient à contourner cette régulation.

MOTS-CLES : VIH-1, Dlg1, synapse virologique, transmission cellule-à-cellule, transmission par particules libres, cholestérol.

Tables des matières

TABLES DES MATIÈRES 2

LISTE DES ABRÉVIATIONS 3

INTRODUCTION 5

I- LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH) 6

1. Historique et épidémiologie 6

2. Origine et classification 7

3. Physiopathologie de l'infection à VIH-1 7

4. La particule virale 8

5. Le génome viral 9

a) Séquences Terminales Répétées (LTR) 9

b) Protéines produites par le gène gag 9

c) Protéines produites par le gène pol 10

d) Protéines produites par le gène env 10

e) Protéines de régulation et protéines auxiliaires 11

6. Tropisme cellulaire 12

II- CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH 13

1. Les étapes précoces du cycle viral 13

2. Les étapes tardives du cycle viral 14

3. Rôle des lipides dans le cycle de réplication du VIH-1 17

a) Les radeaux lipidiques 17

b) Le cholestérol 18

III- LA TRANSMISSION DU VIH-1 ENTRE LYMPHOCYTES T 19

1. Transmission de cellule à cellule : la synapse virologique 19

a) Importance de la SV pour la transmission du VIH-1 19

b) Composants et organisation de la SV 20

c) Polysynapses 21

d) Synapse virologique et synapse immunologique 21

2. Autres modes de transmission de cellule-à-cellule du VIH-1 : filopodes et nanotubes 23

IV- UN PARTENAIRE CELLULAIRE DU VIH-1 : LA PROTÉINE DLG1 24

1. Les MAGUKs 24

2. Structure et localisation de Dlg1 25

3. Fonctions de Dlg1 26

4. Dlg1 et synapse immunologique 26

5. Dlg1 et les virus 28

a) E6 des Papillomavirus 28

b) Tax d'HTLV-1 29

c) Env d'HTLV-1 29

V- CONTEXTE DE L'ÉTUDE : DLG1 ET LE VIH-1 29

BIBLIOGRAPHIE 32

Liste des abréviations

***CA** : Capside*

***CDC** : Center for Disease Control*

***CD4** : Cluster of Différenciation 4*

***CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

***cSMAC** : central Supramolecular Activation Cluster*

***DC** : cellules dendritiques*

***Dlg** : Discs Large Protein*

***DRM** : detergent-resistant membrane*

***ESCRT**: Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

***gag** : group specific antigen*

***GFP** : Green Fluorescent Protein*

***GUK** : Guanylate Kinase*

***HTLV** : Human T-cell Leukemia Virus*

***ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule 1*

***LFA-1** : Lymphocyte Function-associated Antigen-1*

***Lck** : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

***LT** : Lymphocytes T*

***LTR** : Long Terminal Repeat*

***m_CD** : methyl-_-cyclodextrine*

***MA** : Matrice*

***MAGUK** : Membrane Associated Guanylate Kinase*

***MTOC** : centre organisateur des microtubules*

***NC** : Nucléocapside*

***Nef** : Negative factor*

***PDZ** : PSD95/Dlg/ZO-1*

***PIC** : Pre-Integration Complex*

***pSMAC** : peripherical Supramolecular Activation Complex*

***Rev** : Regulator of Virion expression*

***SAP97** : Synapse-Associated Protein 97*

***SH3** : Src Homology domain type 3*

***SIDA** : Syndrome d'Immunodéficience Acquise*

***SI** : Synapse Immunologique*

***SV** : Synapse Virologique*

***Tat** : Transactivator of Transcription*

***TAR** : Tat Responsive Element*

***TCR** : T Cell Receptor*

***Tsg101**: Tumor Susceptibility Factor 101*

***Vif** : Virion infectivity factor*

***Vpr** : Viral protein R*

***Vpu**: Viral protein U*

***VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine*

***VIS** : Virus de l'Immunodéficience Simienne*

***VLP** : Virus-Like Particle*

***ZAP70** : Zeta-Chain Associated Protein Kinase of 70 kDa*

***WASp** : Wiskott-Aldrich Syndrome protein*

INTRODUCTION

I- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Le VIH appartient à la famille des Retroviridae, et plus particulièrement au genre Lentivirus. Il est responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), une maladie liée à un déficit immunitaire causé par la destruction prolongée de lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) au cours de l'infection virale. L'organisme est alors vulnérable à certains pathogènes normalement contrôlés par le système immunitaire : ce sont des infections dites opportunistes.

1. Historique et épidémiologie

En 1981 aux Etats-Unis, le CDC (Center for Disease Control) identifie les premiers cas de personnes atteintes d'une maladie rare affectant leur système immunitaire. Ce syndrome rendait les patients particulièrement sensibles à différents agents pathogènes normalement peu infectieux, qui provoquaient alors des affections graves comme des pneumonies ou encore une forme de cancer appelée sarcome de Kaposi. Il apparait rapidement que la cause de ce syndrome est un virus transmissible par le sang et par voie sexuelle.

Le virus responsable du SIDA fut isolé la première fois en 1983 par l'équipe du professeur Montagnier à partir de lymphocytes ganglionnaires d'un patient atteint de lymphoadénopathie (Barre-Sinoussi et al., 1983). Aux Etats-Unis, le professeur Robert Gallo réalise l'isolement de la même souche virale dans la même période (Popovic et al., 1984). Initialement appelé « Lymphadenopathy Associated Virus » ou encore « Human T-lymphotropic virus-3 » (HTLV-3), le virus fut nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) en 1986. Au cours de la même année est découvert un nouveau virus : le VIH-2, présentant environ 40% d'homologie avec le VIH-1 mais étant nettement moins infectieux (Clavel et al., 1986).

La SIDA est une maladie sexuellement transmissible, mais sa transmission peut aussi avoir lieu par le sang et le lait maternel. Au niveau individuel, l'utilisation du préservatif et le dépistage des personnes exposées à un quelconque facteur de risque sont deux mesures principales préconisées par l'OMS pour réduire le risque d'infection à VIH. Actuellement, aucun vaccin ne peut prévenir d'une infection par le VIH et celle-ci ne peut pas être guérie. Cependant, des traitements efficaces utilisant des cocktails de différents antirétroviraux ont vus le jour et permettent aux patients de mener une vie productive et en bonne santé. Ces traitements ne permettent pas de supprimer totalement le virus de l'organisme, car ils ne

sont pas efficaces pour éradiquer le virus qui est contenu dans des réservoirs, principalement dans les LT CD4+ mémoires latents (Alexaki et al., 2008; Dahl et al., 2009; Geretti, 2006). De plus, dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires, des millions de personnes attendent toujours un accès au traitement.

L'infection à VIH représente actuellement une pandémie mondiale. Selon l'OMS, il y avait environ 33 millions de personnes vivant avec le VIH en 2009, dont plus de 60% en Afrique subsaharienne. Plus de 25 millions des personnes sont mortes du SIDA au cours de ces trois dernières décennies, ce qui fait de l'infection par le VIH une des maladies les plus mortelles au monde. La recherche sur ce virus reste donc actuellement une des priorités mondiales afin de pouvoir endiguer cette pandémie.

2. Origine et classification

Proche de certains isolats du Virus d'Immunodéficience Simienne (VIS) chez le chimpanzé, l'origine du VIH est due à plusieurs transmissions inter-espèces indépendantes ayant eu lieu en Afrique centrale et en Afrique de l'ouest (Corbet et al., 2000). La théorie actuelle propose que ces transmissions zoonotiques aient probablement eu lieu lors de la capture de primates pour servir de gibier ou d'animal de compagnie. Des blessures et des morsures de primates infectés par le VIS ont alors pu entraîner une exposition à du sang contaminé. Ce sont plusieurs événements de transmission indépendants de primates à humains qui auraient généré de nombreux lignages de VIH-1, créant une grande diversité de virus (Sharp et al., 2001).

Le VIH-1 présente une importante variabilité génétique. Les différents variants sont classés en 3 groupes : le groupe M (« major »), principal responsable de la pandémie, le groupe O (« outlier ») et le groupe N (non-M non-O). Le groupe M comprend lui-même 9 sous-types (ou clade) allant de A à K, et plus d'une trentaine de formes recombinantes. Si dans les pays du nord le type B est prédominant, à l'échelle du monde il représente moins de 10% des virus circulants (Geretti, 2006).

3. Physiopathologie de l'infection à VIH-1

L'évolution de l'infection à VIH-1 est suivie en mesurant le nombre de LT CD4+ sanguins, cellules cibles du virus, ainsi que la charge virale qui correspond à la quantité de virus présente dans le sang. En l'absence de traitement, la cinétique d'infection chez les patients contaminés par le VIH-1 est séparée en 3 phases.

La primo infection va du premier contact avec le virus à la mise en place de la réponse immunitaire, en particulier la production d'anticorps : c'est la séroconversion. Elle dure

quelques semaines, au cours desquelles le virus se multiplie très activement dans le sang, ce qui a pour conséquence une chute rapide et transitoire du taux de LT CD4+. Lorsque la réponse immune se met en place, le taux de LT CD4+ se stabilise puis se rétablit partiellement.

La seconde phase est appelée phase asymptomatique car les personnes infectées ne présentent aucun signe clinique de l'infection. Elle consiste en l'établissement d'une infection chronique où le renouvellement constant des LT CD4+ permet de contrôler la charge virale et ainsi de garder un équilibre qui peut durer une dizaine d'années. Cependant, la destruction des LT CD4+ par le virus entraîne une diminution progressive de leur nombre.

C'est alors que vient la dernière phase : le stade SIDA où le taux de LT CD4+ passe sous le seuil critique de 200 cellules/mm^3 de sang, entrainant un rebond de la virémie. Cette immunosuppression conduit à l'apparition de maladies opportunistes ou de certains types de cancers, allant même jusqu'à la destruction de cellules neuronales chez certains patients. Le stade SIDA dure en moyenne 1 à 3 ans, à l'issue duquel les maladies opportunistes sont responsables de la mort du patient.

4. La particule virale

Le VIH-1 est un virus enveloppé à symétrie icosaédrique de 80 à 120 nm de diamètre. Les particules virales infectieuses sont composées d'un assemblage de diverses protéines associées à l'ARN et à l'enveloppe du virus.

L'enveloppe du virus est constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe : la sous unité transmembranaire gp41 et la sous unité de surface gp120, liées entre elles de façon non covalente et regroupées en trimère. La surface du virus contiendrait en moyenne seulement une dizaine de trimères de protéines d'enveloppe (Zhu et al., 2003). D'autre part, de nombreuses protéines cellulaires sont aussi retrouvées au sein de l'enveloppe du VIH-1 (pour revue : (Ott, 2008).

Sur la face intérieure de l'enveloppe, on retrouve une couche protéique formée par la protéine de matrice MA-p17. Ensuite vient la capside de forme conique dans les virus matures, et composée de la protéine de capside CA-p24. Elle renferme le matériel génétique, qui est composé de deux molécules d'ARN simple brin identiques associées à la protéine de nucléocapside NC-p7. Les enzymes virales protéase, intégrase et transcriptase inverse sont contenues dans la particule virale. Enfin, les protéines auxiliaires Vif (Virion infectivity

factor), Vpr (Viral protein r) et Nef (Negative factor) sont également incorporées dans les virions.

5. Le génome viral

La taille du génome du VIH-1 est de 9,2 kilobases. Ce génome possède neuf gènes qui génèrent 15 protéines virales. Parmi ceux-ci on retrouve les gènes communs à tous les rétrovirus : gag, pol et env qui codent pour des précurseurs protéiques qui donneront en tout naissance à 9 protéines virales après clivage. Les 6 autres gènes, Vif, Vpr, Vpu, Rev, Tat et Nef, codent pour des protéines auxiliaires ou régulatrices.

a) Séquences Terminales Répétées (LTR)

Après l'étape de transcription inverse, l'ADN proviral est encadré de deux structures à chaque extrémité appelées séquences terminales répétées (LTR pour Long Terminal Repeat). Les LTR comprennent trois régions, U3, R et U5 qui comportent les éléments de régulation indispensables à la réplication virale. Bien que ces séquences soient identiques, elles ne jouent pas le même rôle. Le LTR à l'extrémité 5' contient le promoteur permettant l'expression du génome viral et celui à l'extrémité 3' apporte le signal de polyadénylation. Ces séquences interviennent aussi dans le processus d'intégration du provirus dans le génome cellulaire. Au niveau des transcrits, elles contiennent plusieurs sites actifs reconnus par la protéine virale Tat et divers facteurs de transcription cellulaire qui modulent la transcription du VIH-1 (cf. Etapes tardives du cycle viral).

b) Protéines produites par le gène gag

Le gène gag (group specific antigen) code pour les protéines de structure de la particule virale. Il est traduit en un précurseur polypeptidique de 55 kDa (Pr55Gag ou plus simplement Gag) qui a un rôle primordial dans l'assemblage et la libération des particules de VIH-1. La synthèse de la polyprotéine Gag est cytosolique, puis elle est rapidement retrouvée à la membrane plasmique. La myristylation de la protéine à son extrémité N-terminale permet son attachement à la membrane plasmique, à la suite duquel les protéines Gag vont se multimériser.

Lors de la maturation des particules virales, le précurseur Gag est clivé par la protéase virale (codée par le gène pol). Ce clivage génère la protéine de matrice MA-p17, la protéine de capside CA-p24, la protéine de nucléocapside NC-p7 et enfin la protéine p6. La protéine p6 permet le détachement des virions de la membrane plasmique et empêche leur aggrégation lors du bourgeonnement viral (Demirov et al., 2002). De plus, p6 interagit

directement avec la protéine Vpr permettant ainsi son incorporation dans les virions (Bachand et al., 1999).

c) Protéines produites par le gène pol

Le gène pol (polymérase) est exprimé sous forme d'un précurseur commun avec le gène gag (Gag/Pol) qui est clivé lors de l'étape de maturation du virion par la protéase, qui fait partie intégrante de ce précurseur. Gag/Pol est produit par décalage de cadre de lecture du ribosome à l'extrémité 3' de l'ARN génomique viral dans 5% des cas de traduction virale. Le gène pol code pour les trois enzymes virales, qui sont incorporées dans le virus :

- ***La transcriptase inverse**, une ADN polymérase ADN et ARN dépendante, qui assure la transcription de l'ARN viral en ADN. Elle est aussi pourvue d'une activité RNAse H.*
- ***L'intégrase**, qui permet à l'ADN viral rétrotranscrit de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.*
- ***La protéase**, qui permet la maturation des particules virales relachées en clivant les précurseur Gag et Gag/Pol lors du bourgeonnement et après la libération des virions. La protéase est active sous forme de dimère, mais elle doit déjà agir en tant que partie intégrante du précurseur Gag/Pol pour s'auto exciser de ce précurseur.*

d) Protéines produites par le gène env

Le gène env (enveloppe) code pour une polyprotéine (gp160) qui est clivée en deux produits : la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le cycle de réplication du virus en se liant au récepteur (CD4) et corécepteurs (CXCR4 et CCR5) cellulaires du virus et en permettant la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire lors du processus d'entrée.

Après synthèse dans le réticulum endoplasmique, la polyprotéine Env est transportée dans l'appareil de Golgi où elle est clivée par des protéases de type furine pour donner les protéines d'enveloppe gp120 et gp41. La région du gène env qui code pour la gp120 est composée de 5 domaines constants (C1-C5) alternés avec 5 domaines variables (V1-V5). Le regroupement des régions C1, C3 et C4 dans la structure tertiaire de la gp120 forme le site de liaison à la protéine CD4 (Checkley et al., 2011). La gp41 contient quant à elle un peptide de fusion à l'extrémité N-terminale, ainsi que deux région hydrophobes qui forment des structures en hélice-_. Ces éléments sont responsables de la fusion des membranes virales et cellulaires. La gp41 présente également une région transmembranaire composée

d'environ 25 acides aminés très conservés, et une région intracytoplasmique à l'extrémité C-terminale. Cette dernière contient des motifs d'interaction avec les complexes AP (Adaptator Protein) qui sont importants pour le trafic intracellulaire des protéines d'enveloppe (Wyss et al., 2001).

Durant l'assemblage, le complexe gp41/gp120 est incorporé en trimère dans la membrane lipidique du virus naissant.

e) Protéines de régulation et protéines auxiliaires

Le VIH-1 est qualifié de rétrovirus complexe car en plus des gènes Gag Pol et Env communs à tous les rétrovirus, il code pour des protéines de régulations (Tat et Rev) et des protéines auxiliaires (Nef, Vif, Vpr et Vpu). Contrairement aux protéines régulatrices nécessaires aussi bien in vitro que in vivo, les protéines auxiliaires ne sont pas nécessaires à la réplication du virus in vitro, mais sont essentielles in vivo. Ces protéines permettent d'adapter l'environnement cellulaire afin de le rendre favorable à la réplication virale. En particulier, les protéines auxiliaires Vif, Vpr et Vpu contrecarrent des facteurs de restriction, protéines cellulaires qui inhibent différentes étapes de la réplication virale.

- *Protéines régulatrices*

▪ ***Tat*** *(transactivator of transcription) est une protéine multifonctionnelle codée par deux exons. Il s'agit d'un puissant transactivateur : Tat se lie à l'ARN viral au niveau d'une région structurée appelée TAR (Tat Responsive Element) et permet l'élongation des ARNm viraux (Romani et al., 2010).*

▪ ***Rev*** *(regulator of virion expression) est une protéine navette qui permet d'exporter les ARN viraux hors du noyau, empêchant leur épissage. Les ARNm ne peuvent normalement pas être exportés sans avoir été épissés. Rev est donc indispensable pour la formation des protéines dont l'ARN n'est pas épissé (Gag et Pol), et pour l'export de l'ARN génomique (Suhasini and Reddy, 2009).*

- *Protéines auxiliaires*

▪ ***Nef*** *(negative factor) est une protéine qui régule l'expression de surface des protéines cellulaires CD4 et CMH-1 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I), permettant ainsi au virus de prévenir la destruction de la cellule infectée par des LT*

cytotoxiques. Nef joue également de nombreux autres rôles lors du cycle viral (pour revue : (Foster et al., 2011)).

- ***Vif** (virion infectivity factor) dégrade le facteur de restriction APOBEC3G, une enzyme cellulaire créant des hypermutations dans l'ADN viral néosynthétisé au cours de la transcription inverse, le rendant totalement inactif. Pour cela, Vif entraîne l'ubiquitinylation de APOBEC3G et sa dégradation par le protéasome (Yu et al., 2003).*

- ***Vpr** (Viral protein R) est une protéine incorporée dans les particules virales. Sa présence est requise lors des étapes précoces du cycle viral, où elle participe à l'import nucléaire de l'ARN viral (Le Rouzic and Benichou, 2005). De plus, il a été montré que Vpr détourne l'E3 Ubiquitine ligase CUL4A en interagissant avec la protéine DCAF1 et dégraderait une cible non connue à ce jour, entraînant l'arrêt du cycle en phase G2 et la mort cellulaire (Maudet et al., 2011).*

- ***Vpu** (Viral protein U) est exclusive au VIH-1. Elle permet la dégradation du CD4 de la cellule infectée, permettant aux particules virales qui bourgeonnent de ne pas être bloquées par l'interaction avec le récepteur cellulaire. Vpu permet aussi d'augmenter la capacité de relâchement des particules virales en inactivant la tetherine, un facteur de restriction cellulaire qui retient les virus produits à la surface de la membrane plasmique (Neil et al., 2008).*

6. Tropisme cellulaire

Les principales cellules cibles du VIH sont les cellules du système immunitaire, principalement les LT CD4+ (LT CD4+) mais aussi les monocytes et macrophages. Il a été décrit que les cellules dendritiques (DC) peuvent également être infectées, mais à une fréquence bien plus faible. Cependant, ce point reste débattu pour savoir si le VIH-1 est juste internalisé dans les DC, ou s'il les infecte réellement (Piguet and Steinman, 2007). Le tropisme particulier du virus est intimement lié à sa pathogenèse car c'est la destruction des LT CD4+ qui est à l'origine de l'immunodéficience sévère qui caractérise la phase SIDA.

Le tropisme du VIH-1 pour ces cellules est déterminé par la protéine gp120 qui va se lier à la molécule CD4, le récepteur du VIH-1 exprimé à la surface des cellules cibles. L'expression des corécepteurs CXCR4 ou CCR5 qui sont tous deux des récepteurs de chimiokines est également indispensable pour l'entrée du virus dans la cellule. La région hypervariable V3 de la protéine d'enveloppe de surface gp120 interagit avec le corécepteur, CCR5 ou CXCR4 selon la souche virale. Les souches virales « T » ou X4 tropiques utilisent la molécule CXCR4 exprimée par les LT CD4+ et les souches « M » ou R5 tropiques utilisent la

molécule CCR5 exprimée par les macrophages, les LT CD4+ et les DC. De manière intéressante, il a été montré qu'au cours de la primo-infection, on retrouve principalement des souches R5 tropiques (Zhu et al., 1993). Ensuite, des souches R5X4 tropiques (qui peuvent utiliser CCR5 ou CXCR4 comme corécepteur) apparaissent au cours de la phase asymptomatique, et enfin la population virale évolue vers des souches qui sont toutes R5X4 ou uniquement X4 tropiques lors de la phase SIDA (Gorry and Ancuta, 2011).

II- Cycle de réplication du VIH

Classiquement, le cycle de réplication du VIH-1 est séparé en deux phases : les phases précoces allant de l'entrée du virus jusqu'à l'intégration du génome viral, et les phases tardives allant de la transcription des protéines virales jusqu'à la libération de nouveaux virus.

1. Les étapes précoces du cycle viral

- ***Entrée virale***

L'entrée virale est la première étape du cycle du VIH-1. Elle est initiée par la fixation du virus à son récepteur cellulaire CD4 par l'intermédiaire de la protéine d'enveloppe virale gp120. Cette interaction va entrainer un changement de conformation de la protéine d'enveloppe qui va alors pouvoir interagir avec l'un des deux corécepteurs, CCR5 ou CXCR4. Cette nouvelle interaction conduit à d'autres modifications structurelles des protéines d'enveloppe qui vont permettre l'exposition du peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale de la sous unité gp41. Ce peptide va alors s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible et conduire à la fusion des membranes virales et cellulaires. La capside virale est alors délivrée dans le cytoplasme.

- ***Décapsidation et transcription inverse***

L'entrée du virus est suivie par les étapes de décapsidation de la particule virale et de transcription inverse. Le virus est progressivement désassemblé dans le cytoplasme, et transformé en « complexe de transcription inverse » au sein d'une capside déstructurée, contenant les deux molécules d'ARN simples brins qui composent le génome du VIH-1 et les enzymes virales, dont la transcriptase inverse. C'est dans ce complexe multiprotéique que l'étape de transcription inverse est réalisée, permettant de convertir le génome sous forme ARN simple brin en ADN double brin. Cette étape est réalisée par la transcriptase inverse à partir d'une amorce d'origine cellulaire ($ARNt^{lys}$) qui se fixe à son site de liaison (primer binding site), situé dans la région U5 au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN viral. La transcriptase inverse possède trois activités: une activité ADN polymérase ARN dépendante,

une activité RNase H qui dégrade sélectivement le brin d'ARN dans un hybride ADN/ARN et une activité ADN polymérase ADN dépendante.

De nombreuses mutations du génome viral peuvent apparaître durant cette étape, du fait que l'enzyme transcriptase inverse ne possède pas d'activité de relecture exonucléase 3'-5' et qu'elle passe d'un brin à l'autre durant le processus de transcription inverse. Ceci contribue à la création d'une grande variabilité de la population virale au sein d'un seul et même individu (Ramirez et al., 2008).

- ***Import nucléaire et intégration***

Le VIH-1, et les lentivirus en général, sont capables d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, comme les LT latents ou encore les macrophages. Cette propriété est associée à leur capacité à entrer de façon active dans le noyau. L'ADN complémentaire nouvellement synthétisé associé à la MA-p17, l'intégrase, la transcriptase inverse et à Vpr forme un complexe nucléoprotéique : le complexe de pré-intégration (pre-integration complex PIC). Ce complexe est activement transporté dans le noyau de la cellule infectée via les pores nucléaires, notamment grâce à l'interaction de Vpr avec les nucléoporines. La MA-p17 et l'intégrase interagissent également avec des importines, responsables de l'import de grosses protéines dans le noyau (Bukrinsky, 2004).

Une fois le PIC dans le noyau, l'intégrase virale catalyse l'insertion de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte. Le virus est alors sous sa forme de provirus. L'intégration est non ciblée, mais il a été montré que l'ADN proviral s'intégrait préférentiellement dans des zones transcriptionnellement actives (Han et al., 2004).

2. Les étapes tardives du cycle viral

- ***Transcription et traduction des protéines virales***

L'ADN viral étant intégré, la transcription des gènes viraux va commencer, à partir du promoteur contenu dans la région 5' du LTR. Dans un premier temps, la transcription est réalisée sous le contrôle de facteurs cellulaires : l'ARN polymérase II se lie à la matrice ADN via divers éléments de la région U3 du LTR. Ensuite, c'est la protéine Tat qui va assurer l'efficience de la transcription virale en se fixant sur la région TAR du LTR présente en 5' de l'ARNm viral et favorisant l'élongation des transcrits (Berkhout et al., 1989). En effet, Tat recrute différentes protéines cellulaires à l'origine d'un remodelage de la chromatine et de l'activation par phosphorylation de l'ARN polymérase II, augmentant l'activité transcriptionnelle de 2 logs (Deng et al., 2000). Les produits de la transcription sont soit épissés pour servir d'ARNm codant pour les différentes protéines virales, soit utilisés comme

ARNs génomiques et incorporés dans les nouvelles particules virales. Les transcrits non épissés du VIH-1 sont exportés vers le cytoplasme par un mécanisme de transport qui est dirigé par la protéine virale Rev (comme décrit précédemment).

- ***Assemblage des particules virales***

Les protéines virales nouvellement synthétisées et deux copies d'ARN génomique simple brin s'assemblent pour former des particules virales. Dans les lymphocytes T, l'assemblage a lieu au niveau de la membrane plasmique (Bieniasz, 2009). Dans les macrophages, il a été montré que les nouveaux virus se forment dans des compartiments intracellulaires qui portent des marqueurs des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires, comme les tétraspanines (Ono et al., 2004; Ono and Freed, 2004; Pelchen-Matthews et al., 2003). Néanmoins, des études ont ensuite montré que ces compartiments internes assimilés à des endosomes représentaient en réalité des invaginations de la membrane plasmique, accessibles à des colorants cellulaires imperméables à la membrane (Bieniasz, 2009; Deneka et al., 2007; Welsch et al., 2007).

L'assemblage de nouvelles particules de VIH-1 est régulé à la fois par des facteurs viraux et des facteurs cellulaires, mais c'est principalement la protéine virale de structure Gag qui est responsable de l'assemblage. En effet, son expression seule dans des cellules eucaryotes conduit à l'assemblage, le bourgeonnement et le relargage de particules appelées « virus like particles » (Gheysen et al., 1989). Après leur synthèse, les protéines Gag et Gag/Pol vont s'insérer dans la membrane plasmique grâce à leur groupement myrisryl et l'interaction de la MA avec un phospolipide du feuillet intracellulaire de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (Ono et al., 2004). Ces protéines vont ensuite se multimériser par les domaines CA et recruter les molécules d'ARN génomique qui interagissent avec un motif de la nucléocapside NC. Les polyprotéines Gag et GagPol interagissent entre elles par des séquences similaires à celles impliquées dans les interactions Gag-Gag. La formation de nouveaux virus correspond au rassemblement de ces protéines avec l'ARN viral et les protéines d'enveloppe.

Pour expliquer l'incorporation des trimères d'enveloppe dans les virions naissants, il existe actuellement plusieurs modèles (Checkley et al., 2011). Le premier correspond à une incorporation de manière passive, due à une simple colocalisation des protéines Env et Gag au niveau des sites d'assemblage. Un second modèle propose qu'une interaction directe entre le domaine MA de Gag et le domaine Cter de la gp41 soit responsable de l'incorporation de l'enveloppe, tandis qu'un troisième modèle propose que ce soit une interaction indirecte entre Gag et Env. Dans ce dernier modèle, il s'agirait de la protéine cellulaire Tip47 qui connecterait les deux protéines virales. En effet, en l'absence de cette

protéine, un défaut de l'incorporation de l'enveloppe au sein des virions a été observé (Lopez-Verges et al., 2006).

D'un point de vue quantitatif, on sait désormais qu'une dizaine de trimères d'enveloppe seulement sont en moyenne incorporés dans les virions naissants (Zhu et al., 2003).

- ***Bourgeonnement et maturation des particules virales***

La dernière étape du cycle du VIH-1 correspond au bourgeonnement, c'est-à-dire à la libération des particules virales immatures dans le milieu extracellulaire. La protéine Gag joue là encore un rôle essentiel en recrutant les protéines cellulaires nécessaires au processus de bourgeonnement. En effet, Gag détourne la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui est normalement impliquée dans la cytokinèse et la biogenèse des corps multivésiculaires (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Gruenberg and Stenmark, 2004). Cette machinerie est composée de 4 complexes multiprotéiques : ESCRT 0, ESCRT I, ESCRT II et ESCRT III ainsi que de facteurs associés tels qu'Alix et l'ATPase Vps4 qui a un rôle de recyclage des protéines ESCRT. Ce sont ces protéines qui assurent la séparation entre le virion naissant et la membrane cellulaire.

Le domaine p6 de Gag possède deux motifs fonctionnels impliqués dans le relâchement des particules : les motifs « L » (ou Late domains) qui interagissent avec les membres de la machinerie ESCRT. Les motifs ***P(T/S)AP*** *et* ***YPLTSL*** *interagissent respectivement avec la protéine Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) du complexe ESCRT I (Martin-Serrano et al., 2001) et la protéine adaptatrice Alix (Fujii et al., 2007). La mutation de ces motifs ou la suppression de Tsg101 bloque totalement la libération de nouveaux virus, ceux-ci restant attachés à la membrane cellulaire. L'interaction de Gag avec ces deux protéines permet de recruter le complexe ESCRT III. Il est désormais admis que le rôle des ESCRT dans le bourgeonnement viral est d'induire la formation du bourgeon qui est ensuite scindé par ESCRT III qui va cliver le fin morceau de membrane reliant encore le virus à la cellule.*

Le virus est alors libre dans le milieu extracellulaire et va subir l'étape de maturation. Les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag/Pol sont clivés par la troisième enzyme virale : la protéase. Ce clivage est responsable d'un changement morphologique visible en microscopie électronique : le cœur du virus, en forme d'anneau dans les particules immatures, devient conique après le clivage par la protéase. Cette ultime étape dans le cycle du virus est absolument nécessaire pour créer des virus infectieux. Les virions sont alors matures et vont pouvoir commencer un nouveau cycle d'infection.

Avec cette vue d'ensemble sur le cycle viral du VIH-1, on se rend compte que de nombreuses interactions interviennent entre les protéines virales et des protéines cellulaires. Cependant, les protéines cellulaires ne sont pas les seules à influencer le cycle viral : les lipides sont aussi mis à profit par le virus.

3. Rôle des lipides dans le cycle de réplication du VIH-1

Le VIH-1 doit traverser la membrane lipidique à deux reprises durant son cycle de réplication : lors de l'entrée (fusion membranaire) et lors de la sortie (fission membranaire) de la cellule hôte. Dans les deux cas, les lipides tels que le cholestérol et les sphingolipides qui composent les membranes virales et cellulaires jouent un rôle important.

a) Les radeaux lipidiques

Les membranes lipidiques ne sont pas des entités homogènes. Elles sont composées de micro-domaines ayant chacun une composition lipidique et protéique spécifique. Les radeaux lipidiques sont des petits domaines de 10 à 200nm, hautement dynamiques, enrichis en cholestérol et sphingolipides (Pralle et al., 2000). Ils constituent des plateformes associées à la membrane plasmique, au sein desquelles sont concentrés des lipides et protéines, favorisant ainsi leurs interactions. Les radeaux lipidiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions, comme le trafic membranaire, la polarisation et les mouvements cellulaires, ou encore la formation de la synapse immunologique.

On sait que de nombreux virus utilisent les micro-domaines au cours de leur cycle de réplication. Pour les virus enveloppés en particulier, les récepteurs cellulaires sont souvent associés à ces micro-domaines, comme pour le virus de l'herpès (Bender et al., 2003) et interviennent dans les mécanismes d'entrée de ces virus. Dans le cas du VIH-1, il a été montré que le récepteur cellulaire CD4 est associé aux radeaux lipidiques (Kozak et al., 2002; Popik et al., 2002). Lorsqu'un mutant de CD4 ne pouvant plus s'associer à ceux-ci est utilisé, l'infection par le VIH-1 est inhibée dans les LT CD4+ (Del Real et al., 2002), démontrant un rôle des radeaux lipidiques dans l'entrée du virus.

Au niveau des étapes tardives du virus, il a été montré que le marqueur ganglioside GM1 des radeaux lipidiques colocalise avec la protéine virale Gag (Ono and Freed, 2001) et que Gag est associé à des complexes de haut contenu lipidique qui résistent aux détergents (DRM : detergent-resistant membrane). De plus, si l'on perturbe les radeaux lipidiques, il y a un défaut de production des particules virales dû à un défaut de multimérisation de la polyprotéine virale Gag. Ces résultats indiquent que l'assemblage des particules virales a lieu au niveau des radeaux lipidiques.

b) Le cholestérol

*Le cholestérol est le principal stérol dans les cellules mammifères. Il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et est retrouvé dans les deux feuillets de la membrane plasmique, bien qu'il puisse avoir une distribution asymétrique. Il est connu pour pouvoir passer spontanément d'un feuillet à l'autre. Pour étudier le rôle du cholestérol, les études sont souvent réalisées en utilisant des molécules comme la méthyl-*_-cyclodextrine (m_CD), *qui enlèvent le cholestérol des membranes lipidiques.*

Il a été montré par différentes équipes que l'enveloppe lipidique du VIH-1 est enrichie en cholestérol (Aloia et al., 1993; Brugger et al., 2006; Chan et al., 2008). En effet, le ratio cholestérol sur phospholipides totaux de la membrane virale est 2,5 fois supérieur à celui de la membrane plasmique de la cellule hôte. Cet enrichissement constitue le premier indice du rôle du cholestérol dans le cycle du virus.

*Il a également été prouvé que le cholestérol à la membrane plasmique de la cellule cible est important dans différentes étapes du cycle viral. En effet, lorsqu'on utilise la m*_CD sur les membranes de cellules cibles du VIH-1, on observe une inhibition de l'infection par le VIH-*1 (Liao et al., 2001; Manes et al., 2000; Popik et al., 2002). La composition en cholestérol de la membrane de la cellule cible affecte donc l'entrée du virus. L'utilisation de m*_CD sur des cellules produisant du virus entra*îne quant à elle une diminution de la production et de l'infectiosité des particules virales (Waheed and Freed, 2009), indiquant un autre rôle du cholestérol membranaire, mais dans les étapes tardives cette fois. De plus, une autre étude a mis en évidence que l'altération de la composition des membranes cellulaires en cholestérol entraîne une inhibition de la liaison de la protéine Gag à la membrane plasmique ainsi que sa multimérisation (Ono et al., 2007).*

*Le cholestérol contenu dans les particules virales semble lui aussi avoir un rôle crucial pour le virus (Waheed and Freed, 2009). En effet, une étude a montré que si l'on diminue la quantité de cholestérol dans l'enveloppe lipidique du virus de 50% en utilisant la m*_CD, on observait une diminut*ion de 50% de l'infectiosité des virus (Campbell et al., 2002). Une autre étude a obtenu des résultats plus drastiques : pour une diminution de 20% du contenu en cholestérol du virus, son infectiosité est diminuée de 80% (Guyader et al., 2002). Dans ce dernier cas, les auteurs ont montré que le virus peut toujours se lier à la membrane plasmique, mais ne peut pas entrer, suggérant un problème lors de la fusion membranaire. Le cholestérol dans le virus est donc important pour son infectiosité, son entrée dans la cellule et plus précisément sa capacité de fusionner avec la cellule cible.*

En conclusion, les radeaux lipidiques et plus particulièrement le cholestérol sont impliqués à la fois dans les étapes précoces et tardives du cycle de réplication du VIH-1. La perturbation des radeaux lipidiques avec des agents réduisant le cholestérol inhibe la fusion et l'assemblage du virus.

III- La transmission du VIH-1 entre lymphocytes T

La transmission du virus constitue le lien entre la fin des étapes tardives d'un cycle, aboutissant à la libération de nouveaux virus, et le commencement des étapes précoces par l'entrée de ces virus dans une cellule cible, initiant ainsi un nouveau cycle viral. Le VIH-1 utilise deux principaux modes de transmission pour infecter des LT: la transmission par virus libres et le transfert direct de cellule-à-cellule.

La transmission par particules libres correspond à l'image classique de la transmission du VIH-1 : les virus bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique d'une cellule infectée et sont libérés dans le milieu extracellulaire. Ils vont ensuite se fixer au récepteur CD4 d'une nouvelle cellule cible afin d'initier un nouveau cycle d'infection. L'interaction du VIH-1 avec ses cellules hôtes a longtemps été étudiée à l'aide de particules virales en milieu liquide, ne tenant compte que de la transmission par particules libres. Des études plus récentes ont cependant permis de mettre en évidence le rôle des contacts cellulaires entre une cellule infectée et une cellule cible pour la transmission du virus.

1. Transmission de cellule à cellule : la synapse virologique

Le transfert du VIH-1 de cellule-à-cellule se fait principalement par l'intermédiaire de structures appelées synapse virologique (SV) (Chen et al., 2007; Jolly et al., 2004).

La SV est définie comme une structure intercellulaire adhésive stable qui est initiée quand la protéine d'enveloppe virale exprimée à la surface de la cellule infectée interagit avec les récepteurs CD4 de la cellule non infectée. C'est grâce à ce contact étroit entre une cellule infectée et une cellule saine que le virus est transmis. En effet, suite au contact, les virus bourgeonnent et sont libérés au niveau de la fente synaptique. L'infection de la cellule cible est alors facilitée par la proximité créée par la SV entre la cellule effectrice et la cellule cible.

a) Importance de la SV pour la transmission du VIH-1

Ex vivo, il a été démontré que la transmission cellule-à-cellule du VIH-1 est le moyen prédominant de propagation du virus dans des cultures de LT. En effet, il a été démontré que la propagation du virus est drastiquement réduite quand on empêche les contacts

cellulaires entre LT (Martin et al., 2010; Sourisseau et al., 2007). La transmission par particules libres est nettement moins efficace que la transmission directe de cellule à cellule, d'un facteur 10 selon Sourisseau et al. 2007 à un facteur 100 pour Chen et al. 2007. Dans le cadre de la SV, la proximité de la cellule cible et la polarisation des récepteurs favorisent une transmission efficace. En effet, le transfert par particules libres, le virus est relargué dans le milieu extracellulaire et la probabilité qu'il rencontre une cellule cible et se lie à son récepteur est très différente et demande plus de temps : c'est l'étape limitante de ce type de transfert. D'autre part, les particules qui viennent de bourgeonner ne sont pas immédiatement infectieuses. C'est l'étape de maturation qui correspond au clivage des précurseurs protéiques par la protéase qui doit encore avoir lieu pour aboutir à la structure finale du VIH-1 et ainsi à des virions infectieux. Durant toute la période où les virus se trouvent dans le milieu extracellulaire, ils sont exposés aux anticorps générés par l'hôte, ce qui va limiter l'efficacité de la propagation virale.

La transmission de cellule-à-cellule du VIH-1 présente quant à elle différents avantages pour le virus. Le premier est une réplication plus rapide que par virus libre en facilitant l'étape limitante de l'attachement viral. Le second est que ce mécanisme permettrait au virus d'échapper à la réponse immune humorale (anticorps neutralisants et complément). En effet, le transfert de cellule à cellule peut protéger le virus de la neutralisation par des anticorps de patients qui reconnaissent les épitopes de l'enveloppe exposés pendant la fusion (Chen et al., 2007; Hubner et al., 2009).

In vivo, le passage direct du virus d'une cellule infectée à une cellule non infectée est estimé comme probablement très important au sein des tissus où les cellules sont en contact étroit, comme dans les organes lymphoïdes.

b) Composants et organisation de la SV

La SV débute par le contact entre un LT infecté et un LT cible. Suite à ce contact, du côté de la cellule infectée, les protéines virales Env et Gag s'accumulent à l'interface synaptique. Du côté de la cellule cible, ce sont le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 qui sont recrutés. On retrouve aussi une polarisation des molécules d'adhésion : ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) sur la cellule infectée qui interagit avec l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) de la cellule cible. La talline, protéine se liant aux intégrines et à l'actine est elle aussi enrichie du côté de la cellule cible. La formation de la SV est actine et tubuline dépendante (Jolly et al., 2007b; Rudnicka et al., 2009). Le centre organisateur des microtubules (MTOC) est relocalisé à la SV du côté de la cellule effectrice (Jolly et al., 2011; Sol-Foulon et al., 2007), et l'actine permet le recrutement des récepteurs et corécepteurs du côté de la cellule cible. De plus, l'utilisation de différents inhibiteurs des

microfilaments d'actine ou des microtubules dans la cellule donneuse altère fortement la polarisation des protéines virales Gag et Env (Jolly et al., 2004). Le cytosquelette joue donc un rôle important dans la formation de la structure de la SV, tant dans la cellule infectée que dans la cellule cible.

Une étude a établi que les radeaux lipidiques riches en cholestérol et sphingolipides sont aussi importants pour la formation de la SV (Jolly and Sattentau, 2005). Il a été montré que les marqueurs des radeaux lipidiques GM1 et CD59 colocalisent avec la protéine d'enveloppe du VIH-1 du côté de la cellule infectée. De plus, la déplétion en cholestérol dans la cellule infectée entraîne une dispersion de la protéine d'enveloppe et de GM1 au sein de la membrane plasmique et élimine l'accumulation de Gag au site du contact cellule-cellule, abolissant ainsi l'assemblage de la SV.

Suite à la formation de la SV, le virus est libéré et transmis à la cellule cible pendant une heure en moyenne et s'accumule dans des compartiments endosomaux de la cellule cible (Hubner et al., 2009). D'après une récente étude, les particules virales internalisées sont initialement immatures et non permissives à la fusion des membranes (Dale et al., 2011). Cela entraîne alors un délai de l'infection qui correspond au temps nécessaire au clivage des précurseurs Gag et Gag/Pol par la protéase aboutissant à la formation de virions matures qui vont pouvoir réaliser une fusion efficace des membranes virales et cellulaires. En effet, il a été montré dans le cas de la transmission par virus libres que le stade de maturation des particules virales est lié à leur capacité fusogénique (Murakami et al., 2004; Wyma et al., 2004). Donc, selon ce modèle, la morphogenèse du virus et le transfert dans la cellule cible étant quasiment simultané, la maturation des virus a lieu dans des compartiments endosomaux après leur transfert.

c) Polysynapses

La formation de polysynapses entre une seule cellule T infectée et plusieurs LT CD4+ cibles a été décrite par Rudnicka et al. en 2009. Cette structure particulière permet le transfert simultané du virus à chaque contact cellulaire entre la cellule donneuse et les cellules cibles. Ces structures pourraient intervenir dans les tissus lymphoïdes, où une cellule infectée peut potentiellement être en contact avec de nombreuses cellules cibles.

d) Synapse virologique et synapse immunologique

Le VIH-1 usurpe des composants de la synapse immunologique (SI) pour assurer la formation de la SV et ainsi sa transmission d'une cellule infectée à une cellule cible. Historiquement, le concept de la SV a émergé par analogie avec SI, et l'on sait aujourd'hui

que si ces deux structures partagent des points communs, elles présentent également des différences.

La SI est initiée par la reconnaissance d'un complexe peptide/CMH par le T cell receptor (TCR). Des complexes comprenant le TCR, CD3 qui lui est associé, ainsi que des molécules de signalisation vont alors se former au niveau de la synapse, formant un cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster). Celui-ci est entouré d'un pSMAC (peripherical Supramolecular Activation Complex), principalement formé par l'interaction entre les molécules LFA-1 et ICAM-1, qui a pour rôle de stabiliser la structure de la SI et permettre ainsi la bonne transmission du signal au niveau du cSMAC.

La SV est quand a elle initiée par la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 avec CD4 sur la cellule cible. Le TCR et les complexes peptide/CMH n'interviennent pas dans la SV. Des études semblent évoquer cependant une organisation supramoléculaire similaire. En effet, il a été montré dans un modèle in vitro de la SV que des amas microscopiques de gp120 coalescent pour former une structure similaire au cSMAC de la SI (Vasiliver-Shamis et al., 2008), et l'on peut observer en microscopie la formation d'un « bouton » de Gag lui aussi évocateur du cSMAC (Hubner et al., 2009). De plus, une répartition des molécules d'adhésion et de leurs ligands en pSMAC similaire à l'IS mature a également été décrite (Vasiliver-Shamis et al., 2008). Bien qu'il ait été montré qu'ICAM-1 et LFA-1 sont enrichies à la SV et favorisent le transfert cellule-a-cellule du virus (Jolly et al., 2007a), l'organisation en pSMAC n'a pas été confirmée dans un système purement cellulaire. De plus, si ces protéines jouent un rôle essentiel dans la SI, elles ne semblent pas nécessaire dans la SV. Le blocage de l'interaction entre ICAM-1 et LFA-1 à l'aide d'un anticorps n'a montré qu'un effet très modeste sur la transmission virale (Jolly et al., 2007a).

La SI est un contact cellulaire d'une grande stabilité et peut durer de très nombreuses heures. Cette longue durée est essentielle pour obtenir une activation complète du LT. La durée de la SV a été estimée à 60 minutes en moyenne, avec un transfert viral complété entièrement au bout de 3 heures (Chen et al., 2007; Jolly et al., 2004; Martin et al., 2010). La SV semble donc être une structure plus labile que la SI, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'un temps court est suffisant pour transmettre le virus, contrairement au temps nécessaire pour une activation complète du LT dans la SI. De plus, si une courte durée de la SV est suffisante, un rapide désassemblage de celle-ci permet de libérer la cellule effectrice, de transmettre le VIH-1 à d'autres cellules et augmenter ainsi la vitesse de propagation du virus.

La kinase ZAP70 (Zeta-chain Associated Protein Kinase of 70kDa), essentielle pour la formation de la SI et l'activation des LT, intervient aussi dans la SV. Dans le cas de la SI,

après activation du complexe TCR-CD3, la kinase Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) est activée et induit le recrutement de ZAP70 au niveau du TCR ainsi que sa phosphorylation. ZAP70 va alors à son tour phosphoryler et recruter différents substrats, ce qui va conduire à une mobilisation du calcium intracellulaire, une réorganisation du cytosquelette et la polarisation du MTOC à la SI. Dans le cadre de la SV, il a été montré que la propagation du VIH-1 est fortement altérée dans des LT déficients en ZAP70 ou exprimant un mutant inactif de la kinase à cause d'une modification dans la localisation intracellulaire de la protéine Gag (Sol-Foulon et al., 2007). En particulier, les cellules infectées en contact avec une cellule saine ne présentent plus de polarisation de la protéine Gag au niveau de la SV, tandis que la localisation des protéines d'enveloppe n'est pas affectée. ZAP70 est donc requise dans la cellule donneuse pour la formation de la SV et donc pour le transfert efficace du virus à la cellule cible, même si le mécanisme à l'origine de son activation est inconnu. ZAP70 est donc un autre acteur commun de la SV et la SI.

En conclusion, le VIH-1 usurpe certains composants de la SI pour assurer sa transmission par contact cellulaire.

2. Autres modes de transmission de cellule-à-cellule du VIH-1 : filopodes et nanotubes

Il existe d'autres moyens de transmission cellule-à-cellule autres que la SV utilisés par le VIH-1 pour se propager. L'un de ces moyens consiste à détourner à son avantage les filopodes, protrusions normalement impliquées dans la motilité cellulaire, pour infecter des cellules cibles. Par des techniques d'imagerie, il a été observé que le VIH-1 est transporté le long de la surface externe de ces prolongements cellulaires qui émergent de la cellule non infectée vers la cellule infectée (Sherer et al., 2007). Les filopodes ont été observés dans des cellules T, mais leur formation spontanée est plutôt rare dans ce type cellulaire. A l'opposé, dans d'autres cellules immunitaires telles les cellules dendritiques ou les macrophages, ces structures sont courantes.

Suite à la découverte du rôle des filopodes dans la transmission cellule-à-cellule du VIH-1, d'autres protrusions spécifiques des LT CD4+ ont été observées : les nanotubes (Sowinski et al., 2008). Hors contexte viral, les nanotubes se forment lorsque deux LT, après avoir été en contact rapproché, se séparent l'un de l'autre et prennent des directions opposées. La longueur de ces structures dépasse celle des filopodes (22 µm en moyenne pour les nanotubes contre 5 µm pour les filopodes). Les deux cellules interagissent et contribuent à la formation du nanotube sans pour autant qu'il n'y ait échange de cytoplasme. Au vu du contact cellulaire qui précède la formation du nanotube, on pourrait

penser que ces protrusions cellulaires seraient en fait une extension de la SV après que les cellules impliquées se soient éloignées en gardant le contact (Sowinski et al., 2008).

Quantitativement, les filopodes et les nanotubes sont moins fréquents que la SV qui reste le mode de transmission le plus couramment utilisé par le virus pour se propager (Rudnicka et al., 2009). De plus, il est difficile de dire si les filopodes et les nanotubes sont des modes de transfert indépendants de la SV et il reste à prouver que ces deux types de structures entraînent une infection productive de la cellule cible.

IV- Un partenaire cellulaire du VIH-1 : la protéine Dlg1

Au cours de notre étude, nous avons étudié le rôle de la protéine Dlg1, membre de la famille des MAGUKs (pour Membrane Associated Guanylate Kinase), dans les deux modes transmission du virus : par particules libres et de cellule-à-cellule. Dlg1, aussi appelée SAP97 (synapse-associated protein 97) est l'homologue humain du gène suppresseur de tumeur Dlg chez la drosophile. C'est une protéine cytosolique de 100kDa recrutée sous la membrane plasmique au niveau des contacts cellulaires où elle a une fonction d'échafaudage de complexes multiprotéiques.

1. Les MAGUKs

Dlg1 appartient à la famille des MAGUKs, une famille composée de protéines qui jouent un rôle essentiel dans l'organisation des sites d'adhésion intercellulaire comme la synapse neuromusculaire ou les jonctions serrées pour les cellules épithéliales (Funke et al., 2005). Différentes sous-familles de MAGUKs ont été décrites, regroupant les protéines en fonction de l'organisation structurale et la taille de leurs domaines. Parmi celles-ci, on retrouve le sous-groupe Dlg-like composé de Dlg1, mais aussi d'autres protéines comme PSD95. Les MAGUKs sont définies par une organisation similaire en différents domaines d'interactions (Funke et al., 2005). Elles sont toutes composées d'un ou plusieurs domaines PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1), d'un domaine SH3 (Src Homology domain type 3) et d'un domaine GUK (Guanylate kinase).

Les domaines PDZ sont des modules d'interactions protéine-protéine, permettant la liaison à des motifs consensus généralement présents à l'extrémité C terminale d'un certain nombre de protéines de surface, induisant ainsi leur regroupement et leur stabilisation à la membrane plasmique (Harris and Lim, 2001). Les domaines SH3 et GUK sont aussi des motifs d'interactions protéine-protéine qui permettent l'interaction avec des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (Hanada et al., 1997) et avec des protéines

associées au cytosquelette (Funke et al., 2005). De plus, les domaines GUK des MAGUKs se lient au domaine SH3 de manière intramoléculaire. Le domaine GUK possède 40% d'homologie avec la protéine Guanylate kinase 1 chez Saccharomyces cerevisae, une enzyme qui catalyse la phosphorylation de GMP en GTP en utilisant l'ATP comme donneur de phosphate (Li et al., 1996). S'il tient son nom de cette homologie, le domaine GUK des MAGUKs est cependant catalytiquement inactif.

Ces domaines participent à une multitude d'interactions protéiques conférant aux MAGUKs un rôle de protéine d'échafaudage, permettant le regroupement et la stabilisation de complexes protéiques variés au niveau de la membrane plasmique. La protéine PSD95 par exemple est enrichie au niveau postsynaptique dans les neurones, où elle regroupe des récepteurs au glutamate et des canaux ioniques avec des protéines de signalisation (Funke et al., 2005).

2. Structure et localisation de Dlg1

La protéine Dlg1 est composée d'un domaine L27, trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK à l'extrémité C terminale. Le domaine L27 de Dlg1, qui n'est pas commun à toutes les MAGUKs, permet une hétéro-multimérisation de la protéine, soit avec d'autres MAGUKs, soit avec d'autres partenaires, aboutissant à la formation de grands complexes protéiques. Il a aussi été montré que ce domaine contrôle l'homo-multimérisation de Dlg1 en dimères ou tétramères (Marfatia et al., 2000).

On dénombre 7 isoformes connues de Dlg1. En effet, il y a deux sites d'épissage alternatif qui sont à l'origine de l'insertion ou non de cinq exons appelés I1 à I5.

On retrouve Dlg1 dans les cellules épithéliales, dans les neurones, mais aussi dans les cellules du thymus, de la moelle osseuse, du rein et dans les LT. Les différentes isoformes ne sont pas exprimées de la même manière dans tous les tissus. Par exemple, celles qui contiennent l'insert I1 sont prédominantes dans le muscle squelettique, et l'insert I4 est retrouvé uniquement dans le cerveau et le foie.

Dlg1 est majoritairement localisée à la membrane plasmique, en particulier au niveau des jonctions cellule-cellule (Lue et al., 1994). La mutation des domaines SH3 ou GUK entraîne une relocalisation de Dlg1 dans le noyau (Kohu et al., 2002) démontrant le rôle de ces domaines dans la localisation membranaire de la protéine.

3. Fonctions de Dlg1

Chez la drosophile, des mutations de dlg entraînent la formation d'une tumeur (croissance excessive des « disques imaginaux »), démontrant un rôle négatif de Dlg1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ces mutations de dlg entraînent aussi la perte des jonctions septate (analogue des jonctions serrées chez les mammifères) et la rupture des épithlia (Woods et al., 1996).

Des études sur la souris ont montré que Dlg1 est requise pour le développement. En effet, c'est une protéine essentielle pour la morphogenèse normale de l'appareil urogénital ainsi que pour le développement du squelette et la structure des épithélia chez l'embryon. Chez les souris dont le gène Dlg1 est invalidé, on observe une mort périnatale, due à de nombreuses malformations.

Dans les cellules épithéliales, Dlg1 régule la formation des jonctions adhérentes, la polarité et la prolifération (Woods et al., 1996). Dans la synapse neuromusculaire, Dlg1 est impliqué dans la localisation du récepteur au glutamate et des canaux potassiques (Hanada et al., 1997). Dans les LT, Dlg1 est recrutée au niveau de la SI après engagement du TCR, avant d'être relocalisée au pôle distal de l'uropode (Xavier and Seed, 2005).

Les propriétés de Dlg1 sont donc mises en jeu pour des nombreuses fonctions, en particulier dans la formation de sites d'adhésion cellulaires comme la synapse neuro-musculaire et la synapse immune, ainsi que dans la connexion des complexes protéiques avec des protéines de signalisation et/ou des protéines associées au cytosquelette (Funke et al., 2005). Dans notre cas, c'est le rôle de Dlg1 dans la SI qui nous intéresse particulièrement.

4. Dlg1 et synapse immunologique

Dlg1 ainsi que d'autres protéines comme Scribble, fait partie des protéines à domaine PDZ qui régulent la polarité, la migration et le remodelage cellulaire induit par la présentation de l'antigène dans les LT. En effet, Dlg1 est recrutée à la SI de façon transitoire suite à la présentation de l'antigène et forme alors des complexes avec des acteurs précoces de l'activation du LT, dont la chaîne _ du TCR (Xavier et al., 2004). En réponse à la stimulation du TCR, la protéine Dlg1 est donc polarisée au contact synaptique où elle colocalise avec l'actine corticale (Xavier et al., 2004) et avec les radeaux lipidiques (Round et al., 2005). Cette polarisation est gouvernée par son interaction avec le domaine SH3 de la kinase Lck. Une fois polarisée, Dlg1 forme des complexes protéiques contenant Lck, ZAP70 et WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein), dont les interactions sont facilitées par Dlg1

(Round et al., 2005). On retrouve donc la fonction d'échafaudage, de formation de complexes protéiques de Dlg1 au niveau de la SI.

Dlg1 est aussi impliquée dans les voies de transduction en aval de l'activation du TCR. Les tyrosines kinases couplées au TCR sont à l'origine de différentes cascades d'évènements de signalisation étant chacune capable d'induire une activation distincte. Parmi celles-ci, on retrouve la kinase p38 qui peut être activée de deux manières après la stimulation du TCR : une voie classique et une voie alterne. Ce sont les protéines Lck et ZAP70 qui sont à l'origine de l'activation de la voie alterne de la p38 par la phosphorylation de sa tyrosine 323 (Salvador et al., 2005). Une étude a démontré que Dlg1 est directement liée à la voie de signalisation alterne de la p38, en interagissant avec cette kinase via ses domaines PDZ-1 et PDZ-2 (Sabio et al., 2005), et la connectant ainsi avec Lck et ZAP70 qui interagissent aussi toutes deux avec Dlg1 dans la SI (Round et al., 2007).

Dlg1 a un impact sur la voie NFAT (Facteur Nucléaire des cellules T Activées) et la production de cytokines déclenchée par la stimulation du LTR. Cependant, l'effet de Dlg1 sur l'activation des LT est sujet à débat car différentes études ont montré des effets contradictoires de Dlg1. Il est alors important de comparer les différents modèles utilisés. Dans une étude réalisée sur des LT CD8+ transgéniques primaires (OT-1) de souris, il a été montré que la surexpression d'une faible quantité de Dlg1 permet d'augmenter l'activité NFAT et la production de cytokines, tandis qu'une trop forte quantité de Dlg1 n'a plus d'effet (Round et al., 2005). Les auteurs ont ensuite montré que l'extinction de l'expression de Dlg1 entraîne le blocage de l'activation de p38 induite par la TCR et du facteur de transcription NFAT (Round et al., 2007). De plus, un mutant de Dlg1 n'étant plus capable de lier p38 ne peut plus activer la voie NFAT. Ces résultats établissent donc que Dlg1 facilité l'activation de la voie NFAT en interagissant avec la p38, permettant sa phosphorylation par ZAP70 et ainsi son activation. D'autre part, une étude réalisée dans les cellules Jurkat, une lignée humaine de LT CD4+, a montré que la surexpression de Dlg1 diminuait légèrement la voie NFAT, tandis que la déplétion de Dlg1 était à l'origine d'une plus forte activation de la voie NFAT suite à la stimulation du TCR (Xavier et al., 2004). Une autre étude réalisée à l'aide de souris transgéniques dont les LT sont déficients en Dlg1 a permis de montrer que Dlg1 agissait comme un régulateur négatif de la prolifération des LT. En effet, si le développement thymique est totalement normal, les LT CD8+ déficients en Dlg1 deviennent hyper-prolifératifs suite à la stimulation du TCR (Stephenson et al., 2007). Enfin, une dernière étude a montré que Dlg1 coopère avec l'Ezrine pour contrôler l'architecture de l'IS, et plus particulièrement la repolarisation du MTOC à l'interface synaptique, et l'activation des LT (Lasserre et al., 2010). De plus, ces deux protéines agissent de concert

pour l'activation du facteur NFAT par le biais de la kinase p38. Les auteurs concluent que l'Ezrine n'affecte pas la phase précoce de l'activation du lymphocyte mais fait plutôt partie d'une boucle de régulation négative qui contrôle rapidement l'étendue de la signalisation du TCR. Si cette signalisation ne s'arrête pas, le lymphocyte hyperactivé meurt par apoptose. Dlg1 participant aux fonctions de l'Ezrine, on pourrait étendre cette conclusion à Dlg1.

Le rôle de Dlg1 dans les LT et dans la SI est donc assez complexe à aborder, et des études plus uniformes au niveau du modèle cellulaire et de la méthode de stimulation utilisée seraient intéressantes pour avoir une meilleure compréhension globale de ce rôle.

D'autres MAGUK interviennent dans la SI et lient spécifiquement le TCR à certaines kinases. Par exemple, la protéine CARMA-1 régule les voies Jun kinase et NF-_B (facteur nucléaire _B), mais pas les voies p38 ou NFAT (Wang et al., 2004). Les membres de la famille des MAGUKs semblent donc agir comme des médiateurs de la spécificité du signal transmis après activation du TCR.

5. Dlg1 et les virus

En plus de ses interactions avec de nombreuses protéines cellulaires, Dlg1 est connue pour interagir avec différentes oncoprotéines virales, dont la protéine E6 des Papillomavirus et la protéine Tax d'HTLV-1. Dlg1 a initialement été décrite comme une protéine suppresseur de tumeur, et c'est cette fonction qui est directement ciblée par les virus HTLV-1 et Papillomavirus, tous deux oncogènes. Il a aussi été montré que Dlg1 interagit avec la protéine d'enveloppe d'HTLV-1, jouant ici un rôle dans la transmission cellule-à-cellule du virus.

a) E6 des Papillomavirus

Le Papillomavirus humain (HPV) est un virus à ADN qui est à l'origine de cancers cervicaux. Le génome de ce virus code plusieurs protéines, parmi lesquelles on trouve E6 et E7 qui coopèrent pour promouvoir l'amplification virale grâce à une prolifération incontrôlée des cellules infectées. Elles représentent donc les déterminants majeurs de risque oncogénique du HPV. La forme phosphorylée de Dlg1 a été identifiée comme interagissant avec l'extrémité C-terminale de la protéine E6 via ses domaine PDZ1 et PDZ2 (Lee et al., 1997). E6 est à l'origine de l'inactivation fonctionnelle de Dlg1 car cette interaction entraîne la dégradation de Dlg1 par le protéasome (Gardiol et al., 1999). En effet, de nombreuses protéines interagissant avec E6 sont dégradées car cette protéine virale recrute le complexe cellulaire ubiquitine ligase E6AP. Parmi les autres protéines dégradées par E6, on retrouve la protéine Scribble, qui intervient dans la même voie de signalisation de

polarité cellulaire que Dlg1 (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Il a été montré que l'expression de Dlg1 et Scribble est réduite voire complètement absente dans les cancers cervicaux, suggérant que leur dégradation par E6 contribue à la carcinogenèse induite par le HPV (Watson et al., 2002).

b) Tax d'HTLV-1

Le virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1) est le premier rétrovirus infectant l'Homme à avoir été isolé. Il se réplique dans les LT CD4+, et est responsable de leucémies et de lymphomes. Il code entre autres pour la protéine Tax, déterminant majeur de l'oncogénicité d'HTLV-1, qui est un fort activateur transcriptionnel. Dans sa région C-terminale, Tax possède un motif de liaison aux domaines PDZ (Lee et al., 1997) qui joue un rôle crucial dans la transformation cellulaire induite par Tax (Grassmann et al., 2005). Il a été montré que ce motif interagit avec les domaines PDZ de Dlg1. Par cette interaction, Tax séquestre Dlg1 dans des complexes insolubles aux détergents (Hirata et al., 2004). Dlg1 est alors incapable de lier le suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli protein) et ne peux plus réaliser sa fonction anti-prolifération. La protéine Scribble interagit avec le même domaine de Tax que Dlg1 et est elle aussi séquestrée dans des complexes insolubles. La liaison de Tax avec Dlg1 et Scribble contribue à la stimulation par Tax de la prolifération cellulaire et favorise ainsi la transformation cellulaire induite par le HTLV-1.

c) Env d'HTLV-1

A l'aide d'un crible double hybride, Dlg1 a été identifié au sein de notre laboratoire comme étant un partenaire de la glycoprotéine d'enveloppe du virus HTLV-1. En effet, il a été montré que Dlg1 interagit avec un motif de liaison aux domaines PDZ présent à l'extrémité C-terminale du domaine cytoplasmique de la protéine d'enveloppe d'HTLV-1 (Blot et al., 2004). L'utilisation d'un virus dont la protéine d'enveloppe mutée ne peut plus lier Dlg1 montre une diminution de la capacité des cellules produisant les protéines d'enveloppe à fusionner avec des cellules cibles. Dlg1 pourrait donc être un acteur important de la synapse virologique induite par le HTLV-1 (Blot et al., 2004).

V- Contexte de l'étude : Dlg1 et le VIH-1

Suite à l'identification de l'interaction de Dlg1 avec la protéine d'enveloppe d'HTVL-1, c'est toujours au sein de notre laboratoire qu'a été mis en évidence que Dlg1 endogène interagit avec la polyprotéine Gag du VIH-1 dans des LT infectés par le virus. Il a été identifié que c'est une région de la NC-p7 de la protéine Gag qui interagit avec une séquence chevauchant les domaines SH3 et I3 de Dlg1. Une approche d'extinction de l'expression de

Dlg1 en utilisant des techniques d'ARN interférence a permis de montrer que l'absence de Dlg1 dans des cellules transfectées avec un provirus du VIH-1 n'affecte ni la maturation et la production de Gag, ni le relargage de virus mais que les particules virales produites par ces cellules sont plus infectieuses. Cette augmentation d'infectiosité des particules virales produites en absence de Dlg1 est corrélée dans ce système expérimental à une accumulation de la protéine d'enveloppe à la fois dans les cellules productrices et dans les virions. La surexpression de Dlg1 permet quant à elle de réduire l'infectiosité des virions d'environ 80%. Cette étude identifiait donc Dlg1 comme un régulateur négatif de l'infectiosité du VIH-1 (Perugi et al., 2009).

De plus, il a été montré qu'en absence de Dlg1, les protéines Gag et Env apparaissent relocalisées à la membrane plasmique vers un compartiment interne. L'hypothèse était alors que Dlg1 modifierait le trafic intracellulaire et donc la rencontre des protéines Gag et Env, régulant ainsi la composition et l'infectiosité des particules virales produites.

Comme nous l'avons vu précédemment, Dlg1 est une protéine spécialisée dans l'architecture et le fonctionnement des contacts cellulaires, et plus particulièrement des synapses. Ses multiples domaines lui permettent de recruter différents acteurs des complexes moléculaires engagés dans les interactions intercellulaires. Au niveau de la synapse immunologique, Dlg1 permet le regroupement de plusieurs acteurs de la transduction du signal via la voie NFAT, comme le recrutement kinase ZAP70 à proximité du TCR. ZAP70 est également impliquée dans la SV du VIH-1 : en son absence dans les cellules donneuses infectées, la propagation virale est fortement altérée (Sol-Foulon et al., 2007). Dlg1 pourrait alors être à l'origine du recrutement de ZAP70 au niveau de la SV induite par le VIH-1 et moduler la transmission du virus de la cellule donneuse à la cellule cible. Par ailleurs, l'interaction de Dlg1 avec la protéine d'enveloppe d'HTLV-1 permettant de faciliter la transmission de ce virus suggérait que Dlg1 participe à la formation de la SV induite par HTLV-1. D'après l'ensemble de ces données, nous nous sommes posé les questions suivantes : Dlg1 intervient-elle dans la transmission cellule-à-cellule du VIH-1 ? Dlg1 joue-t-elle un rôle dans la formation de la SV ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi d'utiliser uniquement des LT comme modèle d'étude afin de se rapprocher des conditions physiologiques d'infection. Nous avons donc établi des lignées lymphocytaires dans lesquelles l'expression de Dlg1 est diminuée de manière stable, que nous avons ensuite infectées avec du virus. Ce système permet d'étudier l'effet de Dlg1 sur une véritable propagation virale.

Pour commencer notre étude, nous avons étudié le rôle de Dlg1 dans le cycle global du VIH-1 en suivant les cinétiques d'infection dans les cellules stablement éteintes en Dlg1.

Ensuite, pour différencier l'impact de Dlg1 sur la transmission cellule-à-cellule et la transmission par particules libres du VIH-1, nous avons utilisé basé sur la culture de cellules infectées soit en agitation continue afin d'empêcher la formation de contacts stables, soit en condition statique, ce qui permet les contacts. Dans la culture avec agitation, seule la transmission par particules libres est efficace, tandis qu'en condition statique, les deux modes de transmission ont lieu. La différence de propagation du virus entre les deux conditions permet alors de mesurer la transmission cellule-à-cellule du virus. Enfin, nous avons également étudié la formation de la synapse virologique en présence ou en absence de Dlg1.

En parallèle, l'étude du rôle de Dlg1 dans la transmission par particules libres est l'autre thème de recherche que nous avons abordé. Comment Dlg1 régule l'infectiosité des particules virales produites ? La composition en protéine et en lipides des particules produites en présence ou en absence de Dlg1 est-elle modifiée ?

Mon travail de recherche a donc consisté à déterminer le rôle éventuel de Dlg1 dans la transmission cellule-à-cellule du VIH-1 dans les LT, mais aussi à approfondir les connaissances sur la manière dont Dlg1 intervient dans la transmission par virus libres.

BIBLIOGRAPHIE

Aguilar-Cordova E, Chinen J, Donehower L, Lewis DE, Belmont JW (1994). A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. AIDS Res Hum Retroviruses **10:** *295-301.*

Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B (2008). Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. Curr HIV Res **6:** *388-400.*

Aloia RC, Tian H, Jensen FC (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. Proc Natl Acad Sci U S A **90:** *5181-5.*

Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA (1999). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. J Biol Chem **274:** *9083-91.*

Balasubramaniam M, Freed EO (2010). New insights into HIV assembly and trafficking. Physiology (Bethesda) **26:** *236-51.*

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science **220:** *868-71.*

Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH (2003). Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. J Virol **77:** *9542-52.*

Berkhout B, Silverman RH, Jeang KT (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. Cell **59:** *273-82.*

Bieniasz PD (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. Cell Host Microbe **5:** *550-8.*

Blot V, Delamarre L, Perugi F, Pham D, Benichou S, Benarous R et al (2004). Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes. J Cell Sci **117:** *3983-93.*

Brugger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Krausslich HG (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. Proc Natl Acad Sci U S A **103:** *2641-6.*

Bukrinsky M (2004). A hard way to the nucleus. Mol Med **10:** *1-5.*

Campbell SM, Crowe SM, Mak J (2002). Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. Aids **16:** *2253-61.*

Carlton JG, Martin-Serrano J (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. Science **316:** *1908-12.*

Cavrois M, De Noronha C, Greene WC (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. Nat Biotechnol **20:** *1151-4.*

Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W et al (2008). Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. J Virol **82:** *11228-38.*

Checkley MA, Luttge BG, Freed EO (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. J Mol Biol **410:** *582-608.*

Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. J Virol **81:** *12582-95.*

Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature **324:** *691-5.*

Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmisse P, Delarue S, Ayouba A, Lewis J et al (2000). env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. J Virol **74:** *529-34.*

Dahl V, Josefsson L, Palmer S (2009). HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. Antiviral Res **85:** *286-94.*

Dale BM, McNerney GP, Thompson DL, Hubner W, de Los Reyes K, Chuang FY et al (2011). Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. Cell Host Microbe **10:** *551-62.*

Del Portillo A, Tripodi J, Najfeld V, Wodarz D, Levy DN, Chen BK (2011). Multiploid inheritance of HIV-1 during cell-to-cell infection. J Virol **85:** *7169-76.*

Del Real G, Jimenez-Baranda S, Lacalle RA, Mira E, Lucas P, Gomez-Mouton C et al (2002). Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. J Exp Med **196:** *293-301.*

Demirov DG, Orenstein JM, Freed EO (2002). The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. J Virol **76:** *105-17.*

Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, 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:** *329-41.*

Deng L, de la Fuente C, Fu P, Wang L, Donnelly R, Wade JD et al (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. Virology **277:** *278-95.*

Fitzgerald ML, Okuhira K, Short GF, 3rd, Manning JJ, Bell SA, Freeman MW (2004). ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFVNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. J Biol Chem **279:** *48477-85.*

Foster JL, Denial SJ, Temple BR, Garcia JV (2011). Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. J Neuroimmune Pharmacol **6:** *230-46.*

Fujii K, Hurley JH, Freed EO (2007). Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. Nat Rev Microbiol **5:** *912-6.*

Funke L, Dakoji S, Bredt DS (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. Annu Rev Biochem **74:** *219-45.*

Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. Oncogene **18:** *5487-96.*

Geretti AM (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. Curr Opin Infect Dis **19:** *1-7.*

Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D et al (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. Cell **59:** *103-12.*

Gorry PR, Ancuta P (2011). Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. Curr HIV/AIDS Rep **8:** *45-53.*

Grassmann R, Aboud M, Jeang KT (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. Oncogene **24:** *5976-85.*

Gruenberg J, Stenmark H (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol **5:** *317-23.*

Guyader M, Kiyokawa E, Abrami L, Turelli P, Trono D (2002). Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization. J Virol **76:** *10356-64.*

Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X et al (2004). Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. J Virol **78:** *6122-33.*

Hanada T, Lin L, Chandy KG, Oh SS, Chishti AH (1997). Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes. J Biol Chem **272:** *26899-904.*

Harris BZ, Lim WA (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J Cell Sci **114:** *3219-31.*

Hirata A, Higuchi M, Niinuma A, Ohashi M, Fukushi M, Oie M et al (2004). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. Virology **318:** *327-36.*

Hubner W, McNerney GP, Chen P, Dale BM, Gordon RE, Chuang FY et al (2009). Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. Science **323:** *1743-7.*

Jolly C (2010). T cell polarization at the virological synapse. Viruses **2:** *1261-78.*

Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ (2004). HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. J Exp Med **199:** *283-93.*

Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ (2007a). Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. J Virol ***81:*** *13916-21.*

Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ (2007b). Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. J Virol ***81:*** *5547-60.*

Jolly C, Sattentau QJ (2005). Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. J Virol ***79:*** *12088-94.*

Jolly C, Welsch S, Michor S, Sattentau QJ (2011). The regulated secretory pathway in CD4(+) T cells contributes to human immunodeficiency virus type-1 cell-to-cell spread at the virological synapse. PLoS Pathog ***7:*** *e1002226.*

Keler T, Li H, Cloyd MW, Vitale LA, Deo YM (1996). Development of T-cell lines expressing functional HIV-1 envelope glycoproteins for evaluation of immune responses in HIV-infected individuals. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol ***13:*** *117-26.*

Kohu K, Ogawa F, Akiyama T (2002). The SH3, HOOK and guanylate kinase-like domains of hDLG are important for its cytoplasmic localization. Genes Cells ***7:*** *707-15.*

Kozak SL, Heard JM, Kabat D (2002). Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. J Virol ***76:*** *1802-15.*

Lasserre R, Charrin S, Cuche C, Danckaert A, Thoulouze MI, de Chaumont F et al (2010). Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. Embo J ***29:*** *2301-14.*

Le Rouzic E, Benichou S (2005). The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology ***2:*** *11.*

Lee SS, Weiss RS, Javier RT (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A ***94:*** *6670-5.*

Li Y, Zhang Y, Yan H (1996). Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. J Biol Chem ***271:*** *28038-44.*

Liao Z, Cimakasky LM, Hampton R, Nguyen DH, Hildreth JE (2001). Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. AIDS Res Hum Retroviruses ***17:*** *1009-19.*

Lopez-Verges S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, 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:*** *14947-52.*

Lue RA, Marfatia SM, Branton D, Chishti AH (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. Proc Natl Acad Sci U S A ***91:*** *9818-22.*

Manes S, del Real G, Lacalle RA, Lucas P, Gomez-Mouton C, Sanchez-Palomino S et al (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. EMBO Rep **1:** *190-6.*

Marfatia SM, Byron O, Campbell G, Liu SC, Chishti AH (2000). Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein forms an oligomer in solution. Identification of the self-association site. J Biol Chem **275:** *13759-70.*

Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. Nat Med **7:** *1313-9.*

Martin N, Welsch S, Jolly C, Briggs JA, Vaux D, Sattentau QJ (2010). Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. J Virol **84:** *3516-27.*

Maudet C, Bertrand M, Le Rouzic E, Lahouassa H, Ayinde D, Nisole S et al (2011). Molecular insight into how HIV-1 Vpr protein impairs cell growth through two genetically distinct pathways. J Biol Chem **286:** *23742-52.*

Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, Pushkarsky T, Dubrovsky L, Mukhamedova N et al (2006). Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. PLoS Biol **4:** *e365.*

Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y (2004). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. J Virol **78:** *1026-31.*

Nakagawa S, Huibregtse JM (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. Mol Cell Biol **20:** *8244-53.*

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature **451:** *425-30.*

Ono A (2010). Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. Biol Cell **102:** *335-50.*

Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO (2004). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A **101:** *14889-94.*

Ono A, Freed EO (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. Proc Natl Acad Sci U S A **98:** *13925-30.*

Ono A, Freed EO (2004). Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. J Virol **78:** *1552-63.*

Ono A, Waheed AA, Freed EO (2007). Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. Virology **360:** *27-35.*

Ott DE (2008). Cellular proteins detected in HIV-1. Rev Med Virol **18:** *159-75.*

Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. J Cell Biol **162:** *443-55.*

Perugi F, Muriaux D, Ramirez BC, Chabani S, Decroly E, Darlix JL et al (2009). Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. Mol Biol Cell **20:** *498-508.*

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res **29:** *e45.*

Piguet V, Steinman RM (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. Trends Immunol **28:** *503-10.*

Popik W, Alce TM, Au WC (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. J Virol **76:** *4709-22.*

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science **224:** *497-500.*

Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. J Cell Biol **148:** *997-1008.*

Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M (2008). Implications of recombination for HIV diversity. Virus Res **134:** *64-73.*

Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. J Gen Virol **91:** *1-12.*

Round JL, Humphries LA, Tomassian T, Mittelstadt P, Zhang M, Miceli MC (2007). Scaffold protein Dlgh1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors. Nat Immunol **8:** *154-61.*

Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP, Miceli MC (2005). Dlgh1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. J Exp Med **201:** *419-30.*

Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, Wietgrefe S, Guadagnini S, Prevost MC et al (2009). Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. J Virol **83:** *6234-46.*

Sabio G, Arthur JS, Kuma Y, Peggie M, Carr J, Murray-Tait V et al (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. Embo J **24:** *1134-45.*

Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E et al (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. Nat Immunol **6:** *390-5.*

Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356:** *867-76.*

Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Horensavitz C, Pypaert M, Mothes W (2007). Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. Nat Cell Biol **9:** *310-5.*

Sol-Foulon N, Sourisseau M, Porrot F, Thoulouze MI, Trouillet C, Nobile C et al (2007). ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. Embo J **26:** *516-26.*

Sourisseau M, Sol-Foulon N, Porrot F, Blanchet F, Schwartz O (2007). Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. J Virol **81:** *1000-12.*

Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Kohler K et al (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. Nat Cell Biol **10:** *211-9.*

Stephenson LM, Sammut B, Graham DB, Chan-Wang J, Brim KL, Huett AS et al (2007). DLGH1 is a negative regulator of T-lymphocyte proliferation. Mol Cell Biol **27:** *7574-81.*

Suhasini M, Reddy TR (2009). Cellular proteins and HIV-1 Rev function. Curr HIV Res **7:** *91-100.*

Vasiliver-Shamis G, Tuen M, Wu TW, Starr T, Cameron TO, Thomson R et al (2008). Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 induces a stop signal and virological synapse formation in noninfected CD4+ T cells. J Virol **82:** *9445-57.*

Waheed AA, Freed EO (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. Virus Res **143:** *162-76.*

Wang D, Matsumoto R, You Y, Che T, Lin XY, Gaffen SL et al (2004). CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. Mol Cell Biol **24:** *164-71.*

Watson RA, Rollason TP, Reynolds GM, Murray PG, Banks L, Roberts S (2002). Changes in expression of the human homologue of the Drosophila discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. Carcinogenesis **23:** *1791-6.*

Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Krausslich HG (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. PLoS Pathog **3:** *e36.*

Woods DF, Hough C, Peel D, Callaini G, Bryant PJ (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in Drosophila epithelia. J Cell Biol **134:** *1469-82.*

Wyma DJ, Jiang J, Shi J, Zhou J, Lineberger JE, Miller MD et al (2004). Coupling of human immunodeficiency virus type 1 fusion to virion maturation: a novel role of the gp41 cytoplasmic tail. J Virol **78:** *3429-35.*

Wyss S, Berlioz-Torrent C, Boge M, Blot G, Honing S, Benarous R et al (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:** *2982-92.*

Xavier R, Rabizadeh S, Ishiguro K, Andre N, Ortiz JB, Wachtel H et al (2004). Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. J Cell Biol **166:** *173-8.*

Xavier R, Seed B (2005). PDZ domains and the politics of polarity in lymphocytes. Immunity **22:** *655-6.*

Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P et al (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. Science **302:** *1056-60.*

Yuste E, Reeves JD, Doms RW, Desrosiers RC (2004). Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. J Virol **78:** *6775-85.*

Zhu P, Chertova E, Bess J, Jr., Lifson JD, Arthur LO, Liu J et al (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. Proc Natl Acad Sci U S A **100:** *15812-7.*

Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA et al (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. Science **261:** *1179-81.*