



HAL
open science

Assemblage, bourgeonnement et maturation du VIH1

Nathalie Chazal

► **To cite this version:**

Nathalie Chazal. Assemblage, bourgeonnement et maturation du VIH1. *Virologie*, 2005, 9 (3), pp.215-227. hal-02147292

HAL Id: hal-02147292

<https://hal.science/hal-02147292>

Submitted on 7 Jun 2019

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.

Assemblage, bourgeonnement et maturation du VIH1

N. Chazal

Laboratoire d'immuno-virologie, EA 3038,
Université Paul Sabatier, 118, route de
Narbonne, 31062 Toulouse
<chazal@cict.fr>

Résumé. La phase tardive du cycle de réplication des virus en général, et en particulier du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1), correspond à une des étapes clés de la dissémination du virus. Elle correspond à une étape où l'ensemble des composants viraux s'accumule au niveau de la membrane plasmique pour donner naissance à de nouvelles particules virales susceptibles d'infecter d'autres cellules cibles. Trois étapes majeures y sont réalisées parmi lesquelles l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation. Celles-ci sont obtenues après une série d'événements dont les détails sont encore peu connus à ce jour. En conséquence, une compréhension plus détaillée, d'un point de vue à la fois structural et mécanistique, des étapes conduisant à la formation de la particule virale infectieuse permettrait probablement d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le développement de nouveaux inhibiteurs, que ce soit au niveau du transport des composants viraux, de leur assemblage, du bourgeonnement ou de la maturation. Dans cette revue, nous résumerons les connaissances acquises à ce jour permettant de comprendre la formation d'une particule virale infectieuse.

Mots clés : VIH1, Pr55^{Gag}, Pr160^{GagPol}, Env, assemblage, bourgeonnement, maturation

Abstract. The late phase of HIV-1 life cycle is one of the key steps in the replication process, the one which leads to the release of new infectious particles. This required three major steps : assembly, budding and maturation. Unfortunately, very little is known about cellular mechanisms involved in these steps. It will be particularly interesting to learn about molecular structures of the viral components within the particle and to have detailed understanding of these steps. All these data may potentially lead to the discovery of new anti-viral drugs that will inhibit Gag transport, Gag multimerization, the assembly and the budding of the HIV-1 particle. In this article, we will summarize some of the advances in this area.

Key words: Pr55^{Gag}, Pr160^{GagPol}, Env, assembly, budding, maturation

Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH1 contient des gènes *gag*, *pol* et *env* codant pour des protéines impliquées directement dans l'assemblage et la maturation de la particule virale [1]. Toutefois, contrairement aux rétrovirus dits « simples », le VIH1 possède un génome avec un ordonnancement plus complexe où les informations génétiques sont extrêmement condensées. En effet, en plus des gènes

gag, *pol* et *env*, six gènes supplémentaires (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*) et de nombreux éléments régulateurs sont retrouvés (figure 1). Grâce à cette organisation génétique complexe, le VIH1, par ses propriétés intrinsèques de parasite intracellulaire, va pouvoir assurer son cycle de réplication qui se décompose en deux phases :

– une phase précoce, se caractérisant par les étapes d'entrée du virus, de transcription inverse permettant la synthèse d'ADN double brin, d'import nucléaire du complexe de

Tirés à part : N. Chazal

sous forme de trimères) [4, 5]. La glycoprotéine de surface gp120 est responsable du tropisme du virus en interagissant spécifiquement avec la molécule CD4 et les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 présents à la surface des cellules cibles. Elle contient une alternance de domaines conservés (C1 à C5) et de domaines variables (V1 à V5). La glycoprotéine transmembranaire gp41, qui interagit avec la gp120, contient le peptide de fusion permettant la fusion des membranes virales et cellulaires.

Localisée sous la bicouche lipidique, la protéine de matrice M_{Ap}17 forme une structure globulaire. Elle est liée à la membrane interne grâce, entre autres, à la présence de l'acide myristique. Elle participe à l'incorporation des complexes gp120/gp41 au cours de la morphogénèse virale.

Situé au centre de la particule virale, le *core* est formé de protéines de capsid C_{Ap}24. À l'intérieur de cette capsid, existe un complexe ribonucléoprotéique contenant notamment la machinerie nécessaire à la synthèse de l'ADN proviral : deux copies identiques d'ARN génomique recouvertes par des molécules de nucléocapsid NCp7, deux molécules d'ARN^{HLys3} empruntées à la cellule permettant d'amorcer la synthèse de l'ADN, des molécules de transcriptase inverse (RT) possédant une activité ADN polymérase ARN/ADN dépendante et une activité RNase-H. Sont également retrouvées plusieurs molécules d'intégrase (IN), enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte qui possède à la fois une activité endonucléase et une activité ligase, des molécules de protéase (PR) nécessaires à la maturation de la particule et, enfin, des protéines dites « accessoires ou auxiliaires » comme les protéines Vpr, Vif et Nef.

Au cours de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales, étapes qui se déroulent lors de la phase tardive du cycle de réplication du VIH1 [6], tous les composants viraux, et plus particulièrement le Pr55^{Gag}, sont impliqués en une cascade d'événements dont l'ordre précis reste encore à définir. Ces étapes correspondent au transport, au regroupement sous la membrane plasmique et à l'assemblage des composants viraux, tels que les complexes de précurseurs Pr55^{Gag}, la liaison des pré-complexes de Pr55^{Gag} avec l'ARN génomique viral, la formation de complexes Pr55^{Gag}/Pr160^{GagPol} et l'incorporation des protéines virales et cellulaires. Une fois tous ces événements achevés, les particules virales matures sont libérées dans le milieu extracellulaire.

Pr55^{Gag} : clé de voûte de la particule virale

L'assemblage des particules virales dépend principalement du précurseur polyprotéique Pr55^{Gag}. Plusieurs modèles

d'études d'assemblage ont, en effet, démontré que seule l'expression du gène *gag* est suffisante pour permettre la production de pseudo-particules virales en l'absence des glycoprotéines d'enveloppe, de RT, de protéase, et d'ARN génomique [7]. Le précurseur Pr55^{Gag} contient donc, en dehors de tout autre composant viral, toute l'information morphopoïétique nécessaire à la formation des particules virales. Il constitue ainsi la véritable clé de voûte de la particule virale [8] permettant l'incorporation de tous les constituants indispensables participant à l'élaboration de particules virales infectieuses : les glycoprotéines d'enveloppe par une interaction avec la partie matrice (MA) du Pr55^{Gag}, les précurseurs Pr160^{GagPol}, possédant les domaines MA, CA et NC identiques à ceux des précurseurs Pr55^{Gag} (*figure 2*), grâce à des interactions précurseurs-précurseurs, l'ARN génomique, par l'intermédiaire d'une interaction avec la partie nucléocapsid (NC) du Pr55^{Gag}, les protéines auxiliaires Vpr, Vif et Nef, les molécules de cyclophylène A (cypA) par interaction avec la capsid (C_{Ap}24), les molécules d'Hsp70.

Cette capacité d'assemblage du Pr55^{Gag} est donc liée aux propriétés intrinsèques du précurseur, et donc aux propriétés des différents domaines le composant. Il est vraisemblable que l'utilisation d'un précurseur sous la forme non clivée dans le cytoplasme permet d'optimiser au maximum le regroupement des partenaires protéiques au niveau du site d'assemblage et que l'alignement conservé des régions MA-CA-NC reflète à la fois la chronologie d'intervention des diverses parties et leur répartition de l'extérieur vers l'intérieur au cœur de la particule virale mature (*figure 1*). Mais, au-delà des régions MA, CA et NC, trois domaines fonctionnels ont été délimités [1] :

- le domaine M (*membrane binding domain*), contenant les 32 premiers acides aminés et correspondant à la zone MA, permet l'adressage sous la membrane des précurseurs Pr55^{Gag} ;
- le domaine I (*interaction domain*), compris dans NC qui interagit avec l'ARN viral et catalyse la réaction d'assemblage ;
- le domaine L (*late domain*) contenu dans la région p6, est impliqué dans la taille des particules virales mais aussi et surtout dans le processus de détachement de la particule virale bourgeonnante de la membrane plasmique en recrutant notamment la protéine cellulaire Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*).

Mécanismes d'assemblage

Les domaines M, I et L du Pr55^{Gag} agissent en synergie pour permettre l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale (*figure 2*).

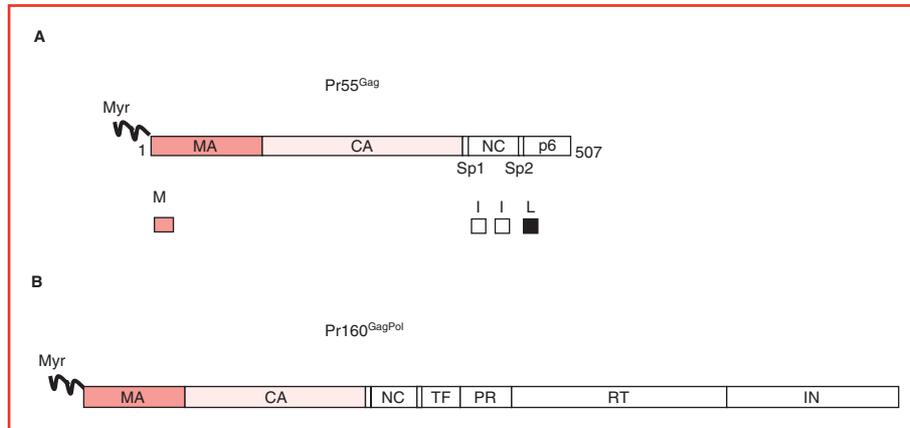


Figure 2. A) Organisation du précurseurs Pr55^{Gag}. Le précurseur Pr55^{Gag} est composé des régions : matrice (MA), capsid (CA), nucléocapside (NC), p6 et des peptides d'espace (Sp1 et Sp2). Les domaines impliqués dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus sont représentés de manière schématique : le domaine M (domaine de liaison à la membrane), les domaines I (domaines d'interaction), le domaine L (domaine tardif impliqué dans le bourgeonnement du virus). La structure représentée en N terminal des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} correspond au radical N-myristyl. **B)** Organisation du précurseur Pr160^{GagPol}, la séquence protéique, résultant du changement de cadre de lecture, localisée entre Gag et Pol, est nommée *transframe* (TF). Le Pr160^{GagPol} contient l'équipement enzymatique du virus, à savoir : la protéase virale (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN).

Implication du domaine M dans le transport et le regroupement des précurseurs

Malgré une étude extensive des phénomènes d'assemblage de la particule virale du VIH1 et d'autres rétrovirus, le mécanisme exact du transport des précurseurs sur le lieu d'assemblage membranaire reste incompris et soumis à de nombreuses controverses. Pour le précurseur Pr55^{Gag}, le domaine essentiel impliqué dans le transport a été localisé au niveau du « domaine M » [7, 9]. Le transport des précurseurs nécessite au moins deux signaux inclus dans ce domaine, qui contient toutes les informations nécessaires à l'adressage vers la membrane plasmique :

- Le radical N-myristyl : cet acide gras en C14 est indispensable, mais non suffisant, pour assurer le transport des précurseurs Pr55^{Gag}. Récemment, il a été montré que, bien que la matrice MAp17 et le Pr55^{Gag} soient tous deux myristylés, leurs capacités de liaison à la membrane plasmique sont très différentes : le Pr55^{Gag} se lie de manière efficace à la membrane plasmique alors que la matrice MAp17 possède une faible capacité de liaison. Pour expliquer ce phénomène, il a été proposé et démontré que le radical myristyl est régulé par un mécanisme de changement de conformation qui lui permet d'être exposé dans le contexte du Pr55^{Gag} et séquestré dans le contexte de la matrice MAp17 [10]. Ainsi, grâce à la présence de leurs radicaux N-myristyl exposés, les molécules de Pr55^{Gag} pourraient se regrouper sous la membrane plasmique. Cela engendrerait avec le concours, d'une part de la liaison des Pr55^{Gag}-ARN viral, et d'autre part, de l'association des molécules de Pr55^{Gag} aux microdomaines membranaires, la réaction de multimérisation et d'assemblage de particules virales (figure 3). Lors de l'infection d'une nouvelle

cellule, le contenu des particules virales dilué dans le cytosol de la cellule provoquerait le changement de conformation du radical N-myristyl d'une conformation exposée à une conformation séquestrée et ainsi la libération de la matrice MAp17 de la membrane dans le cytosol [10].

- La région basique située entre les résidus 22 et 32 de MA [7] interagit avec les acides phospholipidiques de la membrane cytoplasmique, conférant une certaine stabilité à l'interaction.

En dehors de ce rôle dans le transport, la région MA du Pr55^{Gag} intervient, soit pendant, soit après, le transport, lors de l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe.

Interaction des précurseurs Pr55^{Gag} avec les glycoprotéines d'enveloppe

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH1 sont synthétisées initialement sous la forme d'un précurseur p90 transporté à la surface membranaire. Tout au long de ce transport, le précurseur p90 subit des modifications importantes telles que des glycosylations, on parle alors de gp160, mais également, une maturation, au niveau de l'appareil de Golgi ou en amont dans le réseau post-golgien, par une ou plusieurs endoprotéases cellulaires, conduisant à l'obtention des glycoprotéines matures de l'enveloppe virale qui sont [11] : la glycoprotéine de surface SUGp120 et la glycoprotéine transmembranaire TMgp41. Cette activation protéolytique des précurseurs des glycoprotéines d'enveloppe virale par les protéases cellulaires constitue une étape capitale pour l'acquisition du pouvoir infectieux des virus. En effet, toute mutation altérant le site de clivage des précurseurs des glycoprotéines d'enveloppe du VIH1 entraîne la formation

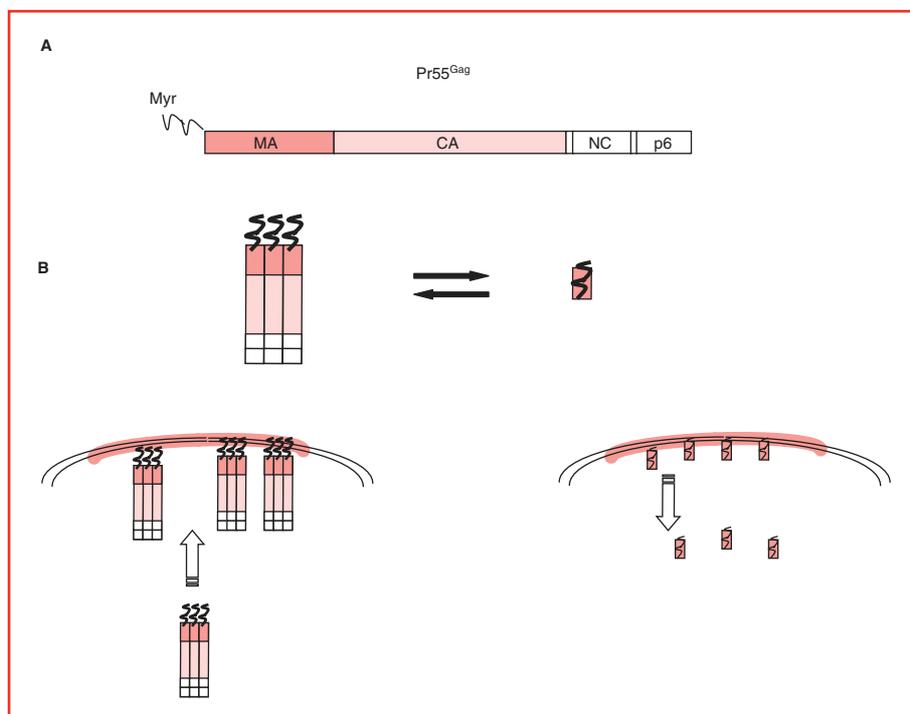


Figure 3. A) Structure schématique du Pr55^{Gag}. **B)** Conformation exposée du radical N-myristyl du Pr55^{Gag}, conformation séquestrée du radical N-myristyl de la région matrice MA.

de virus ayant perdu leur pouvoir infectieux et leur capacité à induire la formation de cellules géantes multinucléées.

Au cours de l'assemblage de la particule virale du VIH1, des contacts entre les protéines précurseurs et les glycoprotéines d'enveloppe, et plus précisément avec la TMgp41, interviennent. Des preuves indirectes d'une telle association précurseurs-glycoprotéines ont, été apportées d'une part par les observations en microscopie électronique des particules virales du VIH1 [12] et d'autre part grâce à une série d'expériences réalisées dans les cellules épithéliales polarisées. Celles-ci ont montré que, lors de la co-expression de la gp160 et du Pr55^{Gag}, les particules virales sont exclusivement libérées au pôle basal, alors qu'en l'absence de gp160, le précurseur Pr55^{Gag} bourgeonne aussi bien au pôle apical qu'au pôle basal [13]. Enfin, grâce à des approches biochimiques, il a été démontré que la TMgp41 (via sa région cytoplasmique) interagit avec le Pr55^{Gag} [14]. L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe semble donc être un mécanisme relativement sélectif faisant intervenir des interactions spécifiques entre la TMgp41 et le domaine MA [1]. Toutefois, l'interaction des glycoprotéines du VIH1 ne semble pas répondre à un mécanisme d'une spécificité stricte. En effet, outre l'existence de protéines cellulaires co-incorporées dans la particule virale du VIH1, il est possible d'incorporer des glycoprotéines d'enveloppe hétérologues, comme celle du MuLV, indépendamment de

la présence de glycoprotéines d'enveloppe spécifiques du VIH1 [14, 15]. Cependant, malgré cette spécificité relative d'interaction Pr55^{Gag}-glycoprotéines d'enveloppe du VIH1, le domaine MA peut se lier de façon non covalente à la TMgp41, permettant l'incorporation au sein de la particule virale des éléments responsables du tropisme cellulaire. Cette incorporation des glycoprotéines se réalise au niveau de la membrane plasmique simultanément avec la réaction d'oligomérisation des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}, conduisant à l'assemblage et au bourgeonnement de la particule virale.

Rôle du domaine I dans l'assemblage et la polymérisation des précurseurs Gag

C'est grâce aux polyprotéines Pr55^{Gag} synthétisées et transportées à la membrane plasmique que s'amorce une réaction en chaîne d'oligomérisations [16] conduisant à l'assemblage. Cette polymérisation dépend étroitement de la position et des contacts inter-moléculaires des précurseurs Pr55^{Gag}, notamment dans deux régions, une localisée dans la CA et une dans la NC, nommée domaines d'interaction. Dans la région localisée au niveau C-terminal du domaine CA [17], une zone très conservée, appelée *major homology region* (MHR), est impliquée dans la liaison du précurseur Pr55^{Gag} et la formation des particules virales [18].

Dans le « domaine d'interaction » localisé au niveau de NC, deux régions sont distinguées : l'une formée de motifs conservés Cys-His et l'autre d'acides aminés basiques conservés impliqués dans l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN. Ces propriétés de liaison à l'ARN semblent d'ailleurs amorcer et favoriser les contacts précurseur-précurseur. Cependant, malgré la mise en évidence de ce domaine, de nombreuses questions subsistent autour de la localisation dans le cytoplasme de ces interactions et de la sélection des molécules d'ARN viral. De la même manière, le lieu et l'existence même des premières interactions inter-précurseurs restent à ce jour inconnus. Il semble qu'une protéine cellulaire HP68 [19] pourrait intervenir au moment de la conversion des intermédiaires d'assemblage en particules immatures complètes en induisant un changement de conformation.

Le précurseur Pr55^{Gag} constitue donc la base de l'architecture virale. Mais cela ne suffit pas pour apporter à la particule virale les caractéristiques liées à l'infectiosité.

Interaction avec les précurseurs Pr160^{GagPol}

Le second précurseur, Pr160^{GagPol}, obtenu grâce à un mécanisme de changement de cadre de lecture, est synthétisé à un niveau inférieur à celui du Pr55^{Gag} (approximativement 5 à 10 % de l'ensemble des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}). Cependant, son incorporation dans la particule virale est indispensable pour l'ensemble de l'activité enzymatique du VIH1 puisqu'elle permet l'activation de la protéase, responsable du clivage des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}, de la RT et de l'IN indispensables à la réplication virale. Bien que le précurseur Pr160^{GagPol} contienne les informations nécessaires à son transport et à son accumulation à la membrane plasmique, sa capacité morphogénétique apparaît très limitée, puisque sa seule expression dans différents systèmes d'expression ne permet pas en effet la formation de particules virales.

L'incorporation du précurseur Pr160^{GagPol} au sein des particules virales dépend donc exclusivement de la présence de molécules de précurseurs Pr55^{Gag}. Elle fait obligatoirement intervenir des interactions entre les deux types de précurseurs. Ces interactions sont indépendantes de la présence du signal de N-myristylation du précurseur Pr160^{GagPol}, mais sont totalement dépendantes de la N-myristylation du précurseur Pr55^{Gag}. Au niveau des interactions protéine-protéine entre Pr55^{Gag}/Pr160^{GagPol}, il semble que la région CA en soit le siège principal [7]. Cependant, la participation indirecte de plusieurs régions ne peut être exclue. Toutefois, ces données ne suffisent pas à comprendre les contacts existant entre les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}.

Incorporation de l'ARN génomique

Lors de l'assemblage, le précurseur Pr55^{Gag} se lie à l'ARN viral et permet son encapsidation dans le virion. Cette étape

semble être le véritable « catalyseur » de la morphogénèse de la particule virale. Elle nécessite une interaction des protéines virales avec l'ARN génomique et met donc en jeu des régions spécifiques du précurseur et des séquences de sélection localisées sur l'ARN génomique [20].

Au niveau du précurseur Pr55^{Gag}, de nombreuses études réalisées ont montré que la région impliquée dans la reconnaissance de l'ARN génomique, dans sa dimérisation et dans son encapsidation est localisée au niveau de la NC du VIH1 [20]. Cependant, l'existence d'autres séquences discrètes nécessaires à l'encapsidation ne peut être écartée. En effet, la mutation de séquences basiques en amont de NC montre que ces séquences participent aussi à la sélection et à l'encapsidation de l'ARN génomique.

Sur l'ARN génomique, la séquence d'encapsidation Psi est localisée entre le site donneur d'épissage et le codon d'initiation du gène *gag*. Cette séquence n'est donc pas présente sur les ARNm épissés. Toutefois, il est probable que d'autres signaux secondaires sont nécessaires à l'encapsidation [21, 22].

Il faut souligner à ce stade que, même si cette étape de dimérisation-encapsidation joue un rôle majeur dans la formation du « cœur protéine-ARN » à l'origine de la réaction d'assemblage et de maturation de la particule virale, l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique n'est pas suffisante pour assurer la formation d'une particule virale infectieuse. En effet, il est probable que la structure même et le positionnement de l'ARN au sein de la particule virale soient importants. Aujourd'hui, il existe peu d'informations à ce sujet, si ce n'est le rôle de protéine « chaperon » joué par la NC [23], mais il est possible que certaines « protéines accessoires » en assurent en partie la fonction.

Encapsidation de l'ARNT^{Lys3}

L'encapsidation sélective de l'ARNT^{Lys3} [24] dans les particules virales du VIH1 est également une étape indispensable à la formation de virions. L'ARNT^{Lys3} sert d'amorce à la transcriptase inverse et s'hybride au niveau du *primer binding site* (PBS). Cette hybridation et cette incorporation semblent être dirigées par la NC et la région RT contenue dans le précurseur Pr160^{GagPol} [24].

Incorporation de protéines virales et cellulaires, partenaires cellulaires

Les protéines virales

Bien que la réaction d'assemblage, au sens strict, de la particule virale du VIH1 soit indépendante de la présence de protéines virales non structurales ou de protéines cellulaires, la formation de particules virales infectieuses dépend étroitement de la présence de ces protéines. Ainsi, au cours des différentes étapes de la réaction d'assemblage, de multiples partenaires viraux et cellulaires ont été identifiés (figure 4) :

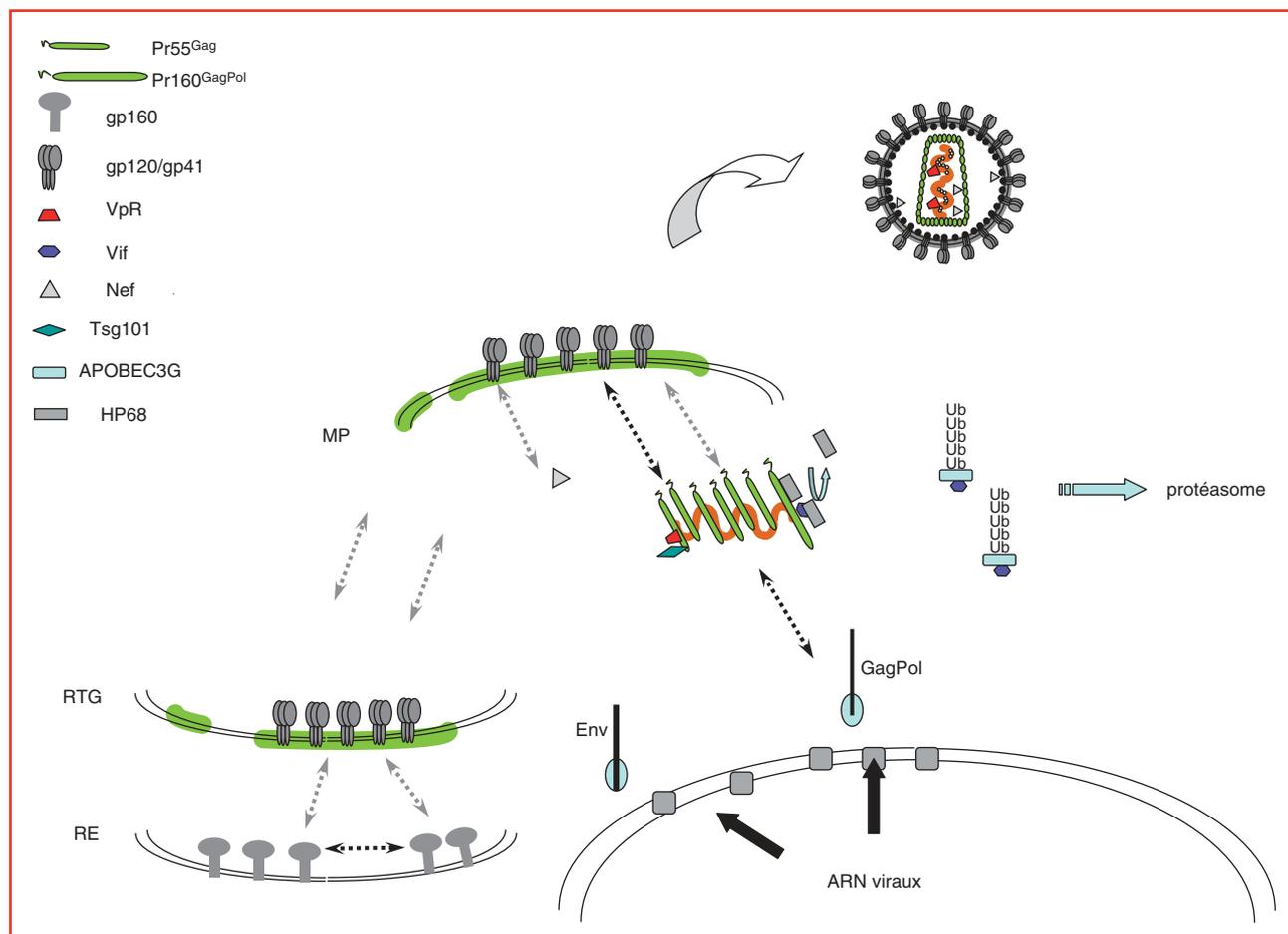


Figure 4. Modèle d'assemblage des composés viraux et cellulaires et du bourgeonnement de nouvelles particules virales. RE : reticulum endoplasmique ; RTG : réseau trans-golgien ; MP : membrane plasmique.

– La protéine Vpr (275 molécules/particule virale) est incorporée, *via* l'interaction de son domaine C-terminal [25] avec la partie N-terminale du domaine p6 du précurseur Pr55^{Gag}. Elle semble jouer un rôle majeur dans l'infection virale [26]. En effet, il est généralement admis que la protéine Vpr, associée à la protéine de matrice et à l'intégrase, est impliquée dans le transport du complexe de pré-intégration (PIC) vers le noyau des macrophages [27].
 – La protéine Vif (10 à 100 molécules/particule virale) est retrouvée au sein des particules virales. Toutefois, le ou les mécanismes conduisant à cette incorporation restent confus. En effet, il semble que les molécules Vif s'associent à la fois à l'ARN génomique, aux précurseurs Pr55^{Gag} ou bien encore à la membrane plasmique [28]. La protéine Vif joue un rôle important au niveau de la stabilité du *core* [29] et au niveau de l'infectiosité des particules virales en intervenant au niveau de l'étape de transcription inverse [30]. De plus, de récentes investigations ont permis de mettre en évidence que la protéine Vif, en diminuant drastiquement

l'incorporation d'une protéine cellulaire nommée APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*, famille des cytidine déaminases) limiterait son activité inhibitrice lors de la transcription inverse. En effet, cette protéine cellulaire exerce son activité antivirale lors de l'étape de transcription inverse en provoquant, par de nombreuses mutations de dC en dU sur le brin positif naissant, des substitutions de G en A sur le brin positif final [31]. Le VIH1 résisterait donc à l'activité antivirale induite par APOBEC3G en exprimant la protéine Vif qui induirait la poly-ubiquitinylation d'APOBEC3G, conduisant à sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation nécessiterait une interaction Vif-APOBEC3G et le recrutement par la protéine Vif d'un complexe multiprotéique E3 ligase. Dans cette condition, aucune encapsidation d'APOBEC3G n'est possible et la transcription inverse est assurée. Une autre protéine cellulaire partenaire de la protéine Vif et intervenant dans l'assemblage a été identifiée. Il s'agit de la protéine HP68, une protéine inhibitrice des

RNases L qui, en agissant au niveau post-traductionnel, permettrait de faciliter la conversion des intermédiaires d'assemblage en particules virales immatures. La mise en évidence de l'association de la protéine HP68 avec les protéines Pr55^{Gag}, Pr160^{GagPol} et Vif semble renforcer cette hypothèse [19] et laisse entrevoir une possible incorporation de protéines HP68 au sein des particules virales. Toutefois, de récentes expériences réalisées en utilisant des pseudo-particules virales semblent indiquer que les protéines HP68 ne sont pas incorporées [32].

– La protéine Nef (5 à 70 molécules/particule virale), tout comme la protéine Vif, est retrouvée au niveau du *core* de la particule virale, suggérant donc une possible interaction avec un de ces composants. Cette incorporation apparaît nécessaire pour assurer certaines fonctions de la protéine Nef, comme la régulation de l'activation de la cellule infectée [33], mais surtout de l'infectiosité de la particule virale [34]. En effet, la protéine Nef augmente d'un facteur de 5 à 10 l'infectiosité des particules virales produites à partir de différents types cellulaires (cellules T, cellules de rein de singe COS). Au moins trois hypothèses sont avancées pour expliquer cet effet. La première suggère que la protéine Nef permettrait d'obtenir des particules virales plus infectieuses en favorisant le bourgeonnement des particules virales au niveau des microdomaines membranaires ou *rafts*, et donc en modifiant la composition de l'enveloppe virale [35]. Il a ainsi été montré qu'elle agirait directement sur la biosynthèse du cholestérol et sur son transport sur le site d'assemblage des particules virales [36]. La deuxième hypothèse implique la protéine Nef directement au niveau de l'étape de transcription inverse [37]. La troisième met en jeu l'interaction de la protéine Nef avec une kinase cellulaire qui pourrait modifier notamment certaines molécules de matrice M_{AP}17 qui, ainsi modifiées, participeraient au transport du complexe de pré-intégration [38].

Les protéines cellulaires

La plupart des protéines cellulaires incorporées au sein des particules virales correspondent à des potentiels partenaires du Pr55^{Gag} et ont été identifiées notamment grâce à l'utilisation de la méthode du double hybride. Parmi les partenaires les plus étudiés, se trouvent la cyclophiline A (CypA), enzyme à activité d'isomérase et la protéine Hsp70 mais aussi les protéines AIP1 et Tsg101 (cf. § *Mécanismes de bourgeonnement*).

– La cyclophiline A. Cette protéine ubiquitaire, localisée dans le cytoplasme, est incorporée spécifiquement dans la particule virale naissante grâce à l'interaction avec le domaine riche en proline de la région CA du Pr55^{Gag} [39]. Elle est associée à l'infectiosité des particules virales qui pourraient faire intervenir sa propriété intrinsèque de peptidyl-propyl-cis-trans-isomérase, ce qui lui permettrait de jouer le rôle de facteur de « déshabillage » en déstabilisant les contacts CA-CA lors de l'entrée de la particule

virale dans la cellule cible [40] ; son interaction avec les héparanes permettrait la fixation de la particule virale sur la membrane plasmique de la cellule cible. Dans ce cas, la CypA serait non seulement incorporée au sein de la particule virale, mais également exposée à sa surface pour favoriser les premiers contacts virus-cellules.

– La protéine Hsp70. Il semble que la présence du Pr55^{Gag} soit nécessaire et suffisante à l'incorporation de ce chaperon [41]. On estime qu'il existe au sein de la particule virale une molécule d'Hsp70 pour 25 molécules de Gag, ce qui est similaire au rapport entre le nombre de molécules de Pr55^{Gag} et de Pr160^{GagPol}. Cette protéine pourrait intervenir au niveau de la phase de « déshabillage » du virus, lors de l'entrée, mais également au niveau de la synthèse de l'ADN proviral.

Mécanismes de bourgeonnement de la particule virale

Rôle du domaine L

Lorsque l'ensemble des éléments nécessaires à la constitution de la particule virale infectieuse est réuni et que la réaction d'assemblage est amorcée, l'étape terminale du bourgeonnement débute. Cette étape correspond au moment précis où la particule virale complètement formée va se détacher de la cellule. Cette dernière étape reste encore peu connue ; toutefois, récemment, de nombreuses avancées ont été réalisées. Ainsi, il a été clairement mis en évidence que la séparation du virus de la cellule requiert le domaine L (motif PTAP) localisé dans la région p6 du Pr55^{Gag} [42]. En effet, par des études de mutagenèse, il a été établi que la délétion de la région p6 ou des mutations dans le motif PTAP de la région p6 entraînait un défaut dans la production des particules virales, particulièrement au niveau du bourgeonnement.

Recrutement de partenaires cellulaires et utilisation de la machinerie cellulaire

Le mécanisme par lequel le domaine L de la région p6 du Pr55^{Gag} permet la libération de la particule virale dans le milieu extracellulaire n'est pas encore parfaitement connu. Deux mécanismes comprenant à la fois la machinerie impliquée dans le trafic des protéines membranaires et dans la dégradation *via* les protéasomes (cf. ubiquitination), semblent intervenir et dépendre de l'interaction de protéines cellulaires avec le domaine L. Certaines de ces protéines sont d'ores et déjà caractérisées. C'est le cas de Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) qui interagit physiquement, *via* sa partie N-terminale, avec le domaine PTAP de la région p6 du Pr55^{Gag} [43, 44]. La protéine Tsg101 est apparentée à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 (UEV pour *Ub-conjugating E2 enzyme variant*) et possède

un site inactif pour la conjugaison et le transfert de l'ubiquitine (Ub). Elle est impliquée dans le trafic des protéines membranaires [45, 46] mis en œuvre par la voie de dégradation des endosomes ou Vps (*vacuolar protein sorting*). Une dépendance du mécanisme de bourgeonnement du VIH1 a d'ailleurs été également démontrée pour une protéine appartenant à cette famille (Vps4, une ATPase) [43]. De ce fait, la protéine Tsg101 est impliquée dans la biogenèse des corps multivésiculaires (MVB) résultant du bourgeonnement des endosomes tardifs, *via* de petites vésicules de 50 à 100 nm de diamètre, dans la lumière de ces organites en formation. Cela permet de suggérer que le virus, en se liant à cette protéine, pourrait gagner l'accès à la machinerie qui catalyse le bourgeonnement des vésicules MVB et ainsi permettre le bourgeonnement des particules virales [47]. Il est toutefois vraisemblable, cette voie étant encore mal définie chez les mammifères, qu'un véritable réseau de partenaires cellulaires participe au bourgeonnement des particules virales. D'ailleurs, récemment, un nouveau partenaire cellulaire, nommé AIP1, interagissant avec la partie C terminale conservée du domaine p6 mais également avec la protéine Tsg101 *via* son propre motif PTAP [48], a été identifié. Tout comme la protéine Tsg101, cette protéine appartient à la classe des protéines E impliquées dans la formation des MVB.

Mais, en plus de l'intervention de la machinerie responsable du trafic des protéines membranaires dans le bourgeonnement du VIH1, de nombreux travaux indiquent que la machinerie de dégradation des protéines par le protéasome *via* l'ubiquitine (Ub) est aussi impliquée dans ce mécanisme. Il a ainsi été montré que la région p6 du Pr55^{Gag} est mono-ubiquitinilée [48-50] et que cette modification joue un rôle dans le relargage des particules virales [42]. Cependant, il apparaît que le mécanisme exact reste encore à définir puisque la mutation au niveau des deux lysines de la région p6 cibles pour la fixation d'ubiquitine n'affecte pas la libération des particules virales [49], alors que la diminution du niveau d'ubiquitine intracellulaire libre entraîne un défaut d'ubiquitination de la région p6 ainsi que du bourgeonnement des particules virales [51]. L'hypothèse émise à ce jour [52] suggère que le domaine L de la région p6 engagerait la machinerie de ligature de l'ubiquitine de façon directe ou indirecte grâce à une protéine adaptatrice et que ce procédé d'ubiquitination faciliterait le bourgeonnement. Toutefois, on ne peut écarter une autre hypothèse, faisant intervenir le processus d'ubiquitination du précurseur Pr55^{Gag} indirectement dans l'étape de bourgeonnement. En effet, un certain nombre de protéines synthétisées dans la cellule adopte une mauvaise conformation et est donc rapidement dégradé par le protéasome. En accord avec ces observations, un ciblage vers le protéasome des précurseurs Pr55^{Gag} non fonctionnels permettrait de favoriser un bourgeonnement viral de qualité [51]. Toutefois, il

est maintenant admis que le mécanisme d'ubiquitination des protéines joue un rôle important dans leur devenir. En effet, la liaison d'une chaîne de polyubiquitine correspond généralement à un signal qui conduira la protéine vers les voies de dégradation du protéasome. La mono-ubiquitination, elle, correspond généralement à un signal permettant à la protéine de passer des voies de biosynthèse ou d'endocytose à celle des MVB puis des lysosomes. Il apparaît donc que les mécanismes d'ubiquitination et de transport des protéines sont deux mécanismes intimement liés et impliqués dans le bourgeonnement du VIH1.

Un ensemble de données sur les molécules impliquées dans le bourgeonnement viral est maintenant disponible. Néanmoins, cette vision reste encore incomplète. En effet, récemment, il a été observé que le site de bourgeonnement des particules virales est modifié au cours de la progression de l'infection, tout comme le tropisme du virus, qui évolue d'un tropisme spécifique aux macrophages (bourgeonnement intracellulaire) vers un tropisme spécifique aux cellules T (bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique). De récents travaux de microscopie électronique ont mis en évidence que le compartiment dans lequel le bourgeonnement était réalisé dans les macrophages contenait des molécules de CD63, marqueurs des MVB. Contrairement aux hypothèses formulées précédemment, il a clairement été démontré que la localisation de Pr55^{Gag} dans les compartiments CD63-positifs était indépendante de la présence du domaine p6 et donc de l'interaction avec les protéines Tsg101 et AIP1 mais influencée par le domaine MA du Pr55^{Gag}. Ces données suggèrent donc que l'interaction p6-Tsg101 n'est pas nécessaire pour le recrutement de Pr55^{Gag} au niveau des MVB et que le domaine MA du Pr55^{Gag} assure ou dirige (*via* l'interaction avec des partenaires cellulaires) la localisation de Pr55^{Gag} au niveau des MVB et implique l'existence de deux partenaires cellulaires (récepteurs pour Pr55^{Gag}) différents :

- un à la membrane plasmique (cellules T),
- un autre permettant de recruter les constituants de la particule virale, notamment le Pr55^{Gag} dans les MVB (macrophages) [53, 54].

Bien entendu, la nature de ces récepteurs reste à définir et toutes les possibilités doivent être étudiées. En effet, ces récepteurs peuvent être de nature protéique ou lipidique. Deux arguments semblent soutenir cette dernière hypothèse : le Pr55^{Gag} est localisé préférentiellement au niveau des radeaux membranaires (*rafts*) [55], de nombreuses protéines sont transportées à la membrane plasmique ou au niveau de la membrane des endosomes, grâce à une interaction spécifique avec des phospho-inositides. Ces deux observations permettent donc de postuler sur le rôle des lipides retrouvés dans les radeaux membranaires dans l'adressage sous la membrane des molécules de Pr55^{Gag} [56]. Cette étape pourrait donc nécessiter une véritable

réorganisation de la membrane plasmique, et particulièrement des lipides de la même manière que lors du processus de fusion entre la membrane virale et la membrane de la cellule cible.

Assemblage et radeaux membranaires

Jusqu'à présent, l'assemblage a été analysé comme un enchaînement d'événements impliquant uniquement des composés viraux. Nous avons vu précédemment, que de nombreux travaux indiquent également une participation des protéines cellulaires au mécanisme d'assemblage. Aujourd'hui, de nombreuses données dévoilent un nouvel aspect de l'assemblage des virus. Celui-ci met en jeu certaines portions de la membrane plasmique, lieu de l'adressage des protéines Gag en particulier. Comment cet adressage spécifique est-il réalisé dans le cas du VIH1 ? De nombreux travaux réalisés sur différents virus ont permis d'appréhender cette question. Ainsi, dans le cas du virus influenza, une localisation préférentielle de ces deux glycoprotéines d'enveloppe dans des compartiments membranaires spécifiques appelés « radeaux membranaires » a été observée. L'analyse de son enveloppe a conduit à proposer un rôle des radeaux membranaires dans le bourgeonnement de ce virus [57]. De même, les radeaux membranaires ont été décrits comme un lieu d'assemblage entre la particule et l'enveloppe du virus de la rougeole [57]. Le concept de radeaux membranaires est né de l'observation de leur résistance à la solubilisation à froid par des détergents non ioniques comme le Triton X100 [58]. En effet, des études menées sur des membranes artificielles et validées sur les membranes plasmiques de cellules indiquent que certains lipides, comme les (glyco)sphingolipides et le cholestérol, tendent à former des microdomaines lipidiques ayant une phase liquide ordonnée *Lo*, intermédiaire entre la phase liquide cristal *Lc* et la phase gel cristal *Gc*. La phase *Lo* confère aux lipides leur résistance à la solubilisation par le Triton X100 et, en son sein, les mobilités des lipides et des protéines sont aussi importantes que dans la phase *Lc*, mais ces constituants y sont relativement confinés. Ces microdomaines peuvent être observés en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique à l'aide de marqueurs appropriés. Biochimiquement, les radeaux membranaires peuvent être purifiés après solubilisation à froid par du Triton X100 et flottation sur gradient de sucrose, sous forme de vésicules issues de leur coalescence. Ils représentent environ 13 % de la membrane plasmique [59]. Moins de 5 % des protéines cellulaires leur sont associées, telles que les protéines à ancrage glypié, certaines protéines transmembranaires comme les protéines d'enveloppe des virus influenza, rougeole et VIH1 [60-62] et des protéines cytosoliques acylées comme les src-kinases. Des observations dans la littérature suggèrent qu'à l'instar du virus de la rougeole, le VIH1 mettrait en jeu les radeaux membranaires

au cours de son cycle (figure 5). Premièrement, la liaison à la membrane des protéines Gag du VIH1 est indépendante de la présence de la glycoprotéine d'enveloppe gp160, seule la myristoylation de la glycine N-terminale de la sous-unité MA, est strictement requise. Or, la myristoylation peut constituer un signal d'adressage de protéine cytosolique vers les radeaux. Ensuite, l'enveloppe du VIH1 est deux fois plus riche en cholestérol que la membrane plasmique [3] et l'inhibition de la synthèse du cholestérol dans des cellules infectées entraîne une chute de la production virale. De plus, il a été montré que les particules du VIH1 acquièrent au cours du bourgeonnement les molécules CD55 et CD59 connues pour, d'une part, être concentrées au niveau des radeaux membranaires et, d'autre part, être impliquées dans l'inhibition des voies d'activation du complément, ce qui représente vraisemblablement un avantage pour le virus. Des données récentes suggèrent que le bourgeonnement des particules virales du VIH1 se réalise à partir de radeaux membranaires [57]. Ces données préliminaires indiquent que la gp41 et la protéine MA sont co-localisées avec des marqueurs des radeaux à la surface de cellules infectées et que les particules VIH1 bourgeonnent au travers des radeaux membranaires et acquièrent des composants spécifiques des microdomaines (cholestérol, sphingolipides, des protéines à ancrage glypié : Thy1, CD59 etc.). Enfin, il a récemment été montré que la protéine Nef interviendrait sur l'infectiosité des particules virales en modifiant la composition lipidique de l'enveloppe virale [35, 36]. Ces données récentes posent de nouvelles questions : Quel est le rôle et à quelle étape exacte les microdomaines interviennent-ils dans l'assemblage et/ou le bourgeonnement ? Quels avantages le virus acquiert-il en incorporant des protéines spécifiques des radeaux membranaires ? Enfin, quelles sont les conséquences au niveau de l'infection virale et de la pathogénicité ? La mise en évidence du rôle des radeaux membranaires dans l'assemblage et le bourgeonnement du VIH1 ouvre de très nombreuses nouvelles voies d'investigation qui devraient permettre dans un futur proche une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces étapes clés du cycle viral.

Maturation de la particule virale

Au moment d'être libéré de la cellule infectée, le virus naissant amorce une modification architecturale, passant d'un état immature à un état mature. Cela constitue la dernière étape de la formation des particules infectieuses. Chronologiquement, la maturation et donc le clivage correspondent à un processus protéolytique séquentiel et contrôlé qui intervient immédiatement après ou de façon concomitante avec le bourgeonnement des particules virales. En effet, en l'absence d'activité protéase, les particules virales obtenues présentent une morphologie anormale et

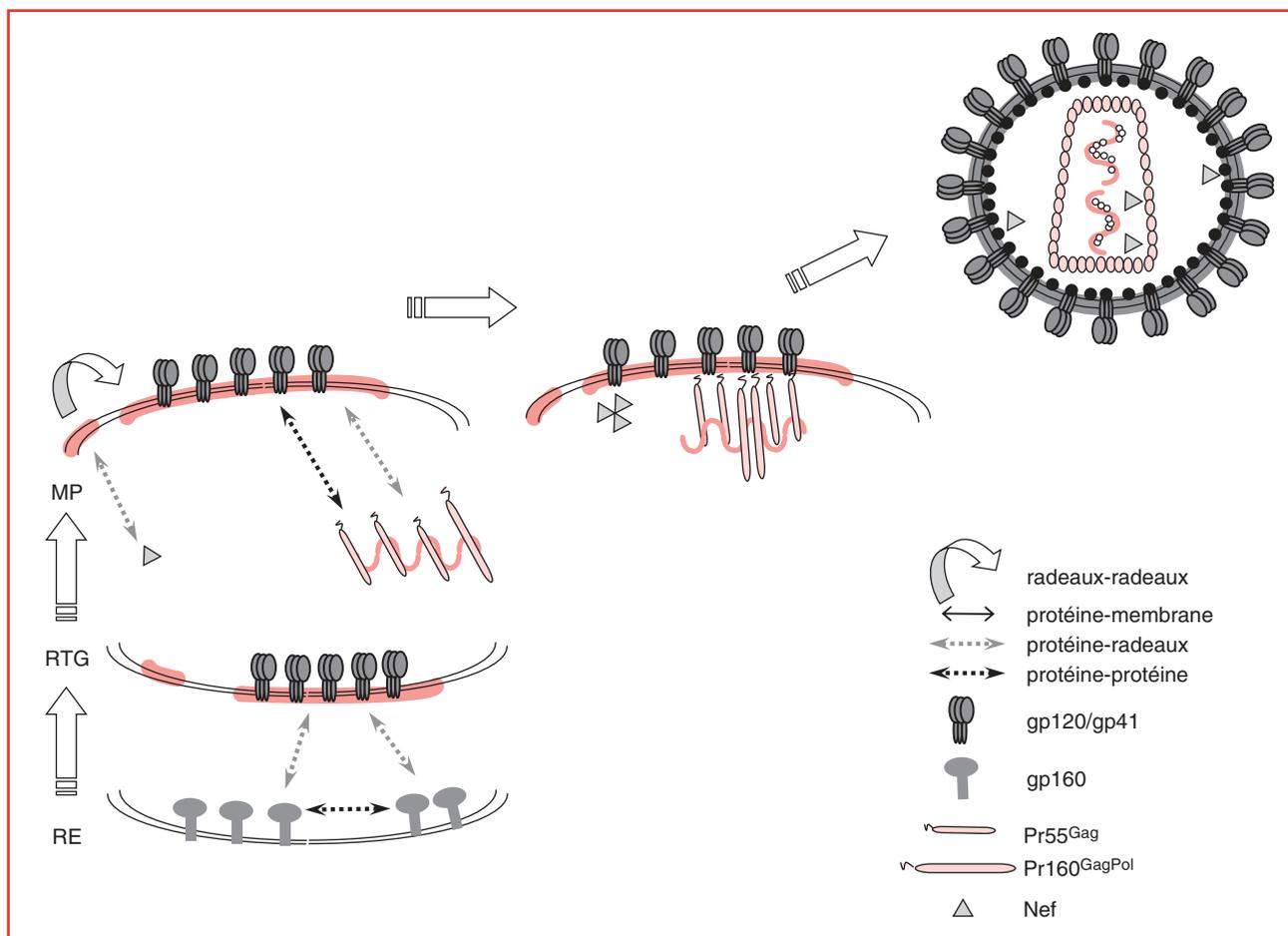


Figure 5. Modèle (modifié de [5]) de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales du VIH1 au niveau des radeaux membranaires dans le contexte d'un lymphocyte T. D'après Chazal *et al.* [57].

une absence totale d'infectiosité [63]. L'analyse et la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéase du VIH1 ont permis de montrer que l'activité de la protéase dépend de la dimérisation de ces molécules [63]. Or, seul l'assemblage permet d'obtenir une concentration suffisante des précurseurs Pr160^{GagPol} non clivés au niveau de la membrane plasmique pour permettre l'activation de la protéase. Cette dimérisation constitue donc un des niveaux de régulation de l'activité de la protéase. Suite à cette activation, le clivage initial est réalisé entre le peptide d'espacement Sp2 et la région NC dans le précurseur Pr160^{GagPol}, puis entre les régions MA et CA et, enfin, entre CA et Sp2. Il faut souligner ici que le clivage entre Sp2 et NC dans le contexte du Pr55^{Gag} est essentiel pour la formation de dimères d'ARN viraux et pour leur encapsidation. Ainsi, le clivage protéolytique et la dimérisation de l'ARN viral sont deux événements reliés et le clivage du côté N terminal de la NC est nécessaire à la fois à la formation de la particule virale et à l'obtention de dimères d'ARN stables.

Conclusion

Bien que de nombreuses phases de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales soient aujourd'hui élucidées et que de nombreux partenaires cellulaires intervenant dans ces ultimes étapes aient été identifiés, de nombreuses questions subsistent parmi lesquelles le mécanisme impliqué dans l'adressage des Pr55^{Gag} à la membrane, la détermination de complexes de pré-assemblage, le rôle précis des radeaux membranaires dans l'assemblage et le bourgeonnement, le mécanisme de sélection des ARN viraux encapsidés, la régulation de l'activité de la protéase, le mécanisme de conversion d'une particule virale immature en particule virale mature, le mécanisme de bourgeonnement. Toutes ces nouvelles informations devraient contribuer au développement de nouvelles stratégies antivirales dirigées contre les étapes de multimérisation des molécules de Pr55^{Gag}, de liaison à la membrane, de maturation et de

libération des particules virales, mais également à l'amélioration et à l'optimisation des vecteurs lentiviraux.

Remerciements. L'auteur remercie D. Gerlier pour ses suggestions et la relecture du manuscrit, ainsi que G. Devauchelle pour ses encouragements, l'ANRS et Sidaction pour leur soutien.

Références

1. Garnier L, Bowzard JB, Wills JW. Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *Aids* 1998 ; 12(Suppl A) : S5-S16.
2. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987 ; 156 : 171-6.
3. Aloia RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 5181-5.
4. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984 ; 312 : 767-8.
5. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 1995 ; 2 : 1075-82.
6. Gottlinger HG. The HIV-1 assembly machine. *AIDS* 2001 ; 15(Suppl 5) : S13-S20.
7. Boulanger P, Jones I. Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996 ; 214 : 237-60.
8. Wills JW, Craven RC. Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS* 1991 ; 5 : 639-54.
9. Krausslich HG, Welker R. Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996 ; 214 : 25-63.
10. Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 517-22.
11. Moulard M, Decroly E. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1469 : 121-32.
12. Gelderblom HR, Ozel M, Pauli G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol* 1989 ; 106 : 1-13.
13. Lodge R, Gottlinger H, Gabuzda D, Cohen EA, Lemay G. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* 1994 ; 68 : 4857-61.
14. Freed EO, Martin MA. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 1996 ; 70 : 341-51.
15. Chazal N, Singer G, Aiken C, Hammarskjöld ML, Rekosh D. Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* 2001 ; 75 : 4014-8.
16. Craven RC, Parent LJ. Dynamic interactions of the Gag polyprotein. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996 ; 214 : 65-94.
17. Dorfman T, Bukovsky A, Ohagen A, Hoglund S, Gottlinger HG. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994 ; 68 : 8180-7.
18. Provitera P, Goff A, Harenberg A, Bouamr F, Carter C, Scarlata S. Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* 2001 ; 18 : 5565-72.
19. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, et al. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 2002 ; 415 : 88-92.
20. Cimarelli A, Darlix J. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* 2002 ; 59 : 1166-84.

21. Lever A. HIV RNA packaging and lentivirus-based vectors. *Adv Pharmacol* 2000 ; 48 : 1-28.
22. Russel R, Liang C, Wainberg M. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* 2004 ; 1 : 23.
23. Darlix JL, Lapadat-Tapolsky M, de Rocquigny H, Roques BP. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* 1995 ; 254 : 523-37.
24. Kleiman L. tRNA (Lys3) : the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* 2002 ; 53 : 107-14.
25. Lu Y, Bennett R, Wills J, Gorelick R, Ratner L. A leucine triplet repeat sequence (LXX) 4 in p6gag is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 1995 ; 69 : 6873-9.
26. Steffens CM, Hope TJ. Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *AIDS* 2001 ; 15(Suppl 5) : S21-S26.
27. Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 1999 ; 52 : 275-99.
28. Lake J, Carr J, Feng F, Mundy L, Burrell C, Li P. The role of Vif during HIV-1 infection : interaction with novel host cellular factors. *J Clin Virol* 2003 ; 26 : 143-52.
29. Ohagen A, Gabuzda D. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 2000 ; 74 : 11055-66.
30. Dettenhofer M, Cen S, Carlson B, Kleiman L, Yu X. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* 2000 ; 74 : 8938-45.
31. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003 ; 424 : 99-103.
32. Doohar J, Lingappa J. Conservation of a stepwise, energy-sensitive pathway involving HP68 for assembly of primate lentivirus capsids in cells. *J Virol* 2004 ; 78 : 1645-56.
33. Arora VK, Fredericksen BL, Garcia JV. Nef : agent of cell subversion. *Microbes Infect* 2002 ; 4 : 189-99.
34. Fackler O, Baur A. Live and let die : Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* 2002 ; 16 : 493-7.
35. Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T, Fackler OT, Peterlin BM. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol* 2001 ; 11 : 875-9.
36. Zheng YH, Plemenitas A, Fielding CJ, Peterlin BM. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 8460-5.
37. Schwartz O, Marechal V, Danos O, Heard JM. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* 1995 ; 69 : 4053-9.
38. Swingler S, Gallay P, Camaur D, Song J, Abo A, Trono D. The Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances serine phosphorylation of the viral matrix. *J Virol* 1997 ; 71 : 4372-7.
39. Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 1993 ; 73 : 1067-78.
40. Saphire AC, Bobardt MD, Gallay PA. Cyclophilin A plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation. *J Virol* 2002 ; 76 : 4671-7.
41. Gurer C, Cimarelli A, Luban J. Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions. *J Virol* 2002 ; 76 : 4666-70.
42. Freed EO. Viral late domains. *J Virol* 2002 ; 76 : 4679-87.
43. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001 ; 107 : 55-65.
44. VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, et al. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55 (Gag). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 7724-9.

45. Babst M, Odorizzi G, Estepa E, Emr S. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 2000 ; 1 : 248-58.
46. Lemmon S, Traub L. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 2000 ; 12 : 457-66.
47. Perez O, Nolan G. Resistance is futile : assimilation of cellular machinery by HIV-1. *Immunity* 2001 ; 15 : 687-90.
48. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 2003 ; 114 : 689-99.
49. Ott D, Coren L, Chertova E, Gagliardi T, Schubert U. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 2000 ; 278 : 111-21.
50. Ott D, Coren L, Copeland T, et al. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* 1998 ; 72 : 2962-8.
51. Schubert U, Ott D, Chertova E, et al. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 13057-62.
52. Vogt V. Ubiquitin in retrovirus assembly : actor or bystander? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 12945-7.
53. Raposo G, Moore M, Innes D, et al. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 2002 ; 3 : 718-29.
54. Verani A, Gras G, Pancino G. Macrophages and HIV-1 : dangerous liaisons. *Mol Immunol* 2004 ; 42 : 195-212.
55. Holm K, Weclawicz K, Hewson R, Suomalainen M. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts : Pr55 (gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* 2003 ; 77 : 4805-17.
56. Ono A, Freed EO. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 2004 ; 78 : 1552-63.
57. Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003 ; 67 : 226-37.
58. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 ; 387 : 569-72.
59. Schutz GJ, Kada V G, Pastushenko P, Schindler H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* 2000 ; 19 : 892-901.
60. Manie SN, Debreyne S, Vincent S, Gerlier D. Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains : a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* 2000 ; 74 : 305-11.
61. Nguyen DH, Hildreth JE. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 2000 ; 74 : 3264-72.
63. Scarlata S, Carter C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* 2003 ; 1614 : 62-72.
62. Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 2038-44.