

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle de la protéine cellulaire
Staufen au niveau du cycle de réplication du virus
d'immunodéficience de type 1**

par
Jean-François Clément

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
ès Science (M.sc)

Août, 2004

© Jean-François Clément, 2004



W

4

U58

2005

v. 070

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Caractérisation du rôle de la protéine cellulaire Staufen au
niveau du cycle de réplication du virus d'immunodéficience de
type 1**

Présenté par :
Jean-François Clément

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Ali Ahmad (président rapporteur)

Dr Andrew J Mouland (superviseur)

Dr Anne Gatignol (membre du jury)

RÉSUMÉ

Staufen est une protéine cellulaire appartenant à la famille des protéines liant l'ARN double brin. Des études antérieures ont démontré que cette protéine est impliquée au niveau des étapes d'assemblage et d'encapsidation du cycle de réplication du VIH-1. En utilisant la technique d'interférence par l'ARN (ARNi), nous avons réussi à diminuer l'expression intracellulaire de Staufen d'environ 70 à 80% dans les cellules 293T. L'impact de cette diminution sur la réplication du VIH-1 fût ensuite analysé. Des analyses par RT-PCR et par Western Blot ont révélé une baisse des niveaux intracellulaires d'ARN génomique et de pr55^{Gag} d'environ 50% et 35% respectivement. La production virale, mesurée par ELISA p24, fût diminuée d'environ 40%, alors que l'infectivité des virus fût aussi diminuée de 50% lorsque celle-ci fût mesurée à l'aide de cellules indicatrices CEM-GFP. Nos études sur l'encapsidation du génome viral dévoilent toutefois une augmentation de l'ordre de trois à quatre fois de l'ARN génomique à l'intérieur de chaque particule. Ce résultat est corrélé à une augmentation du nombre de molécules de Staufen (isoforme de 63 kDa) incorporées, qui est aussi évaluée à environ 3 fois. Ces études apportent plus de détails quant à la fonction de Staufen dans la réplication du VIH-1.

Mots clés : VIH-1, Staufen, facteurs cellulaires, interactions virus-hôte, assemblage, encapsidation, ARN génomique, pr55^{Gag}

ABSTRACT

Staufen is a cellular protein that belongs to the family of the double-stranded RNA Binding Proteins. Previous research in our laboratory suggested that this protein might play key roles in HIV-1 virion assembly and genomic RNA encapsidation. In order to directly assess the requirement for this protein in the HIV-1 life cycle, we used RNA interference to knock down Staufen expression in HIV-1-infected cells. We now show that a 70 to 80% reduction of cellular Staufen levels resulted in a 50% reduction of HIV-1 genomic RNA steady-state levels and a 35% reduction in pr55Gag production, as seen by RT-PCR and Western Blot analyses, respectively. Virus production, as measured by p24 ELISA, was diminished by 40% and viral infectivity was also decreased by 50% when measured by a single cycle infectivity assay. However, analysis of RNA packaging levels revealed a three to four fold increase in the amount of genomic RNA encapsidated per virion. This increase in genomic RNA correlated with a three-fold enhancement of the 63 kDa Staufen isoform and not the 55 kDa isoform, incorporated into the virion. Taken together, these studies confirm the requirement for Staufen during the HIV-1 replication, and provide further insights into the specific role played by this cellular factor in the viral life cycle.

Key words: HIV-1, Staufen, cellular factors, virus-host interactions, assembly, encapsidation, genomic RNA, pr55^{Gag}

TABLES DES MATIERES

Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Liste des figures et tableaux	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xv
Publications obtenues à partir de ces travaux	xvi
Chapitre 1 – INTRODUCTION	1
1.1 SIDA et VIH-1	1
1.2 LA STRUCTURE DU VIH-1	3
1.2.1 Le génome et les protéines du VIH-1	3
1.2.2 Le virion mature	7
1.3 LE CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1	10
1.3.1 Les étapes précoces	13
1.3.1.1 Entrée du virus	13
1.3.1.2 Décapsidation	13
1.3.1.3 Transcription inverse et importation nucléaire	15
1.3.1.4 Intégration	17
1.3.2 Les étapes tardives	18
1.3.1.5 Transcription du génome	18
1.3.1.6 Exportation des ARNs viraux	19
1.3.1.7 Assemblage du VIH-1	21
1.3.1.8 Encapsidation	23
1.3.1.9 Bourgeoisement, relâche et maturation	24
1.4 PROTÉINES CELLULAIRES IMPLIQUÉES AU NIVEAU CYCLE DE RÉPLICATION	25
1.4.1. Protéines cellulaires à la surface du virion	26
1.4.2. Protéines cellulaires incorporées à l'intérieur du virion	30
1.4.3. Protéines cellulaires impliquées, mais non incorporées	32
1.5 LA PROTÉINE CELLULAIRE STAUFEN	34
1.5.1 Staufen chez la drosophile	34
1.5.2 Staufen chez les mammifères	35
1.5.3 Staufen dans le contexte du VIH-1	38

1.6	INTERFÉRENCE PAR L'ARN	39
1.7	OBJECTIFS	42
Chapitre 2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES		44
2.1	Culture cellulaire	44
2.2	Clones proviraux	44
2.3	Anticorps	45
2.4	Small interfering RNA (siRNA)	45
2.5	Transfection des siRNA	46
2.6	Western blots et immunoblots	47
2.7	RT-PCR	47
2.8	Purification des particules virales	48
2.9	Quantification des particules virales	48
2.10	Essai de protection à la ribonucléase (RPA)	49
2.11	Test d'infectivité à un seul cycle de réplication	51
2.12	Analyse du cycle cellulaire	51
2.13	Essai Luciférase	52
2.14	Analyses statistiques	52
Chapitre 3 – RÉSULTATS		
3.1	ARN INTERFÉRENCE SUR STAUFEN	53
3.1.1	Sélection des séquences cibles	53
3.1.2	Approches expérimentales développées	53
3.1.3	Analyse de la réponse interféron	60
3.1.4	Analyse du cycle cellulaire	63

3.2	EFFETS DE LA DIMINUTION DE STAUFEN SUR LA RÉPLICATION DU VIH-1	66
3.2.1	Profils d'expression de pr55 ^{Gag}	66
3.2.2	Niveaux intracellulaires de l'ARN génomique	69
3.2.3	Production virale	69
3.2.4	Infectivité des virus	74
3.2.5	Encapsidation de l'ARN génomique	77
3.2.6	Incorporation de Staufen dans le virion	80
Chapitre 4 – DISCUSSION ET CONCLUSION		84
4.1	Importance de Staufen dans la réplication du VIH-1	84
4.2	Modèle proposé et implications	91
4.3	Directions futures et conclusions	95
Liste des références		99

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Le génome du VIH-1	4
Figure 1.2	Le virion mature	8
Figure 1.3	Le cycle de réplication du VIH-1	11
Tableau 1.1	Protéines cellulaire incorporées à la surface du virion et fonction cellulaire associée	28
Tableau 1.2	Protéines cellulaires incorporées à l'intérieur du virion, fonction cellulaire associée et partenaire viral requis	29
Figure 1.4	La protéine Staufen	36
Figure 1.5	Mécanisme de l'interférence par l'ARN (ARNi)	40
Figure 3.1	Illustration schématique des endroits ciblés par les différents duplexes siRNA dirigés contre Staufen	54
Figure 3.2	Diminution de l'expression intracellulaire de la protéine Staufen médiée par différentes techniques d'ARN interférence	56
Figure 3.3	Les siRNA 3084 n'activent pas la réponse interféron	61
Figure 3.4	Les siRNA 3084 n'affecte pas le cycle cellulaire des 293T	64
Figure 3.5	La diminution de Staufen affecte les niveaux intracellulaires des protéines structurales du VIH-1	67
Figure 3.6	La baisse d'expression de Staufen affecte les niveaux d'ARN génomique 9 kb (ARNg) intracellulaire du VIH-1	70
Figure 3.7	La diminution intracellulaire de Staufen provoque une baisse de la production virale	72
Figure 3.8	La diminution d'expression de Staufen affecte l'infectivité des virions néo-synthétisés	75
Figure 3.9	La baisse intracellulaire de Staufen cause une augmentation drastique de l'ARN génomique encapsidé	78

Figure 3.10	La diminution intracellulaire de Staufen provoque une augmentation de son incorporation dans le virion	81
Figure 4.1	Modèle proposé quant à l'implication de Staufen dans les étapes post-transcriptionnelles du cycle de réplication du VIH-1	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALV	virus de la leucémie aviaire
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNg	ARN génomique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ASB	protéine albumique de sérum bovin
ASLV	virus du sarcome et de la leucémie aviaire
A2RE	élément de réponse à hnRNP A2
BMH	branched structure with multiple hairpins
CA	capside du VIH-1
CCL	changement de cadre de lecture ribosomal
CDK 9	cycline dépendante de la kinase 9
CTD	domaine C-terminal
cypA	cyclophiline A
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DIS	site d'initiation de la dimérisation
D.O.	densité optique

dsRBD	domaine de liaison à l'ARN double brin
dsRBP	protéine liant l'ARN double brin
ECL	essai de chemiluminescence à base de luminol
EF-1 α	facteur d'élongation-1 alpha
eIF-5 α	eucaryotic initiation factor-5 alpha
EJC	complexe de jonction exon-exon
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESTs	expressed sequenced tags
Env	glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 ; gp160
FACS	cytofulorométrie en flux
Fv-1	friend virus susceptibility factor-1
GFP	protéine fluorescente verte
HAART	highly active anti-retroviral therapy
hnRNP A2	heterogenous ribonucleoprotein A2
hRIP	human Rev-interacting protein
hSNF5	human sucrose non-fermenting 5
IN	intégrase du VIH-1; p32
INI1	integrase interactor 1
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LDI	long distance interaction
LFA-1	leucocyte function associated molecule-1
LTR	long terminal repeat
MA	Matrice, p17

MVB	corps multivésiculaire
μg	microgramme
μL	microlitre
μM	micromolaire
mM	millimolaire
mL	millilitre
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NC	nucléocapside du VIH-1 ; p7
Nef	régulateur négatif du VIH-1; p27
NES	signal d'exportation nucléaire
NLS	signal de localisation nucléaire
NMD	non-sens mediated decay
nt	nucléotides
OMS	organisation mondiale de la santé
ORF	cadre de lecture ouvert
pb	paire de base
PBS	tampon saline-phosphate
PBS	site de liaison de l'amorce
PIC	complexe de pré-intégration
PR	protéase du VIH-1 ; p10
pr55 ^{gag}	précurseur polyprotéique de Gag ; 55 kDa
pr160 ^{gag-pol}	précurseur polyprotéique Gag-Pol ; 160 kDa

<i>psi</i>	signal d'encapsidation de l'ARNg ; ψ
REBP	kinesin-like Rev/Rex effector binding protein
Rev	régulateur d'expression protéique du VIH-1; p19
RHA	ARN hélicase A
RISC	RNA induced silencing complex
RNAPII	ARN polymérase II
RNP	complexe ribonucléoprotéique
RPA	essai de protection à la ribonucléase
RRE	élément de réponse à Rev
RSV	virus du sarcome de Rous
RT	transcriptase inverse du VIH-1; p51/p66
RTC	complexe de réverse transcription
SIDA	syndrome d'immunodéficience humaine acquise
siRNA	small interfering RNA/petit ARN interférence
shRNA	short hairpin RNA/petit ARN en tige-boucle
snRNA	small nuclear RNA
SU	unité de surface de la glycoprotéine d'enveloppe, gp120
TAR	élément de réponse à la transactivation
Tat	Transactivateur transcriptionnel du VIH-1; p14
TBD	Domaine de liaison à la tubuline
TBP	TATA binding protein
TBS	Solution saline-tris
TM	unité trans-membranaire de la glycoprotéine d'enveloppe, gp41

TRBP	TAR-RNA binding protein
TRIM5 α	tripartite interaction motif 5 α
TSG 101	tumor susceptibility gene 101
TYMV	virus de la mosaïque du chou jaune
UEV	ubiquitin conjugating E2 enzyme variant protein
UTR	région non traduite
U3	région unique en 3'
U5	région unique en 5'
VAN	virion-associated matrix interacting protein
Vif	facteur d'infectivité virale du VIH-1 ; p23
VLP	virus like particle
Vpr	protéine virale R du VIH-1; p25
Vpu	protéine virale U du VIH-1 ; p16
3TC	2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine
3'-UTR	région non traduite en 3'
5'UTR	région non traduite en 5'

REMERCIEMENTS

Tout au long de ma maîtrise, plusieurs personnes m'ont aidé sur le plan scientifique et je leur en suis grandement reconnaissant. Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Andrew J Mouland, pour son support moral et scientifique. Grâce à sa supervision, j'ai pu développer de nombreuses aptitudes et mieux comprendre le domaine de la recherche scientifique. Je veux aussi remercier spécialement ceux avec qui tout a commencé, Laurent et Véronique, qui m'ont aidé dès mon arrivée dans le laboratoire et supporté mes nombreuses questions. Un grand merci aussi au Dr Levon Abrahamyan pour sa collaboration dans ce projet, ainsi qu'à Kimberly et Kathy pour leur aide technique et leur présence d'esprit. Je veux également remercier Kristi Bangs pour l'identification des séquences utilisées lors des techniques d'ARN interférence. Un merci spécialement accordé à Rodney Russell et James Whitney pour leur grande patience et leur dévouement. Sans eux, je n'aurais jamais autant appris et ris en même temps. Je remercie aussi le Dr Anne Gatignol et les membres de son laboratoire pour les judicieux conseils quant aux directions à adopter avec mon projet. Je suis aussi très reconnaissant aux Drs Mark Wainberg, Chen Liang, Eric Cohen, John Hiscott, Nathalie Grandvaux, Michel Tremblay, Lawrence Kleiman, Luc DesGroseillers, Michel Bouvier et Léa Brakier-Gingras pour le support matériel et les précieux conseils obtenus lors des conférences. Un grand merci aux personnes travaillant au LDI pour leur gentillesse, leur aide et dans certains cas, leur amitié accordée. Merci aussi au NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (NIH AIDS RRRP) pour tous les réactifs fournis tout au long de ma maîtrise. Évidemment, je ne peux qu'être reconnaissant à la Fondation Georges Phénix, les Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), le CIHR et le Dr Andrew J Mouland de m'avoir accordé un soutien salarial.

Finalement, j'aimerais dire le plus gros des mercis à mes parents, ma sœur et mes amis pour leur constant support moral et leurs encouragements. Sans vous, ma maîtrise n'aurait jamais été ce qu'elle fût. Un dernier remerciement très spécialement accordé à l'attention d'Andréanne pour son éternel support dans tous les aspects de mon quotidien. Ce support est une des raisons qui me fait autant aimer ce que je fais présentement.

PUBLICATIONS OBTENUES SUITE À CES TRAVAUX

1. Manuscrit en préparation basé sur les résultats de ce mémoire (**Jean-Francois Clément**). *RNAi knockdown of the double-stranded RNA binding protei, Staufen, influences HIV-1 replication.*
2. Véronique Bériault, **Jean-Francois Clément**, Kathy Levesque, Catherine LeBel, Xiao Yong, Benoit Chabot, Eric A Cohen, Alan W Cochrane, William FC Rigby and Andrew J Mouland. *A Late Role for the Association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response Element in Genomic RNA, Gag and Vpr localization.* Journal of Biological Chemistry, 2004 Oct 15; 279 (42): 44141-44153.

Pour cet article, j'ai vérifié les effets des séquences A2REs sur la traduction à l'aide de différentes méthodes de traduction *in vitro*. À l'aide d'un système d'expression transitoire, j'ai aussi étudié l'effet de ces séquences sur le changement de cadre de lecture ribosomique programmé du VIH-1. Les résultats obtenus suites à ces différentes expériences ne sont cependant pas mentionnés à l'intérieur de ce mémoire.

3. Laurent Chatel-Chaix, **Jean-Francois Clément**, Catherine Martel, Veronique Bériault, Anne Gatignol, Luc DesGroseillers and Andrew J Mouland. *Identification of Staufen in the Human Immunodeficiency Virus type 1 Gag Ribonucleoprotein Complex and a Role in Generating infectious Particles.* Molecular and Cellular Biology, 2004 Apr; 24 (7): 2637-48.

Pour cet article, les résultats démontrant l'efficacité des siRNA dirigés contre Staufen et les résultats d'infectivité virale sont tirés de ce mémoire.

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1 SIDA et VIH-1

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est présentement l'un des problèmes majeurs de notre société. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 40 millions le nombre de personnes qui vivent présentement avec cette maladie. En 2003 seulement, il y aurait eu 5 millions de nouveaux cas, alors que 3 millions de personnes en seraient décédées ¹⁹⁸.

C'est en 1981 que des médecins de New York auraient noté la première apparition de la maladie en observant un patient mourant d'une infection à *Pneumocystis carinii* qu'un système immunitaire normal aurait habituellement éliminée. Deux années d'intense recherche furent nécessaires afin de découvrir enfin la cause de cette immunodéficience. L'agent infectieux en question fût alors identifié comme étant le virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), un lentivirus appartenant à la famille des Rétroviridae ¹⁶⁹.

Le VIH-1 peut être transmis via les contacts sexuels, le sang et de façon verticale, c'est-à-dire de la mère à l'enfant. Quelques jours après l'infection, le virus est produit en grande quantité par les lymphocytes activés présents dans les ganglions lymphatiques. Généralement, la virémie est maîtrisée à l'intérieur de quelques semaines par la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le nombre de cellules T CD4⁺ chute durant cette

phase aiguë de l'infection, mais retourne à un niveau normal très rapidement. Ensuite, l'infection entre en phase asymptomatique. Durant une période indéfinie, la virémie est très faible. Toutefois, le nombre de cellules T CD4⁺ diminue peu à peu. La dernière phase de la maladie est caractérisée par un compte cellulaire de CD4⁺ en dessous de 200/ml et une quantité augmentée de virus. Avec un système immunitaire affaibli, le patient commence à devenir susceptible aux infections secondaires opportunistes fongiques (*Candida albican*, *Cryptococcus neoformans*, etc.), bactériennes (*Mycobacterium avium*, *Treponema pallidum*, etc.) et protozoaires (*Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, etc.) qui provoqueront graduellement son décès ⁶⁶.

Aujourd'hui, l'utilisation de différents composés antiviraux dans la thérapie HAART (« *highly active anti-retroviral therapy* ») permet de ralentir la progression de la maladie vers la phase SIDA. Toutefois, le VIH-1 devient de plus en plus résistant à ces divers composés qui sont habituellement des inhibiteurs de la transcriptase inverse, des inhibiteurs de la protéase et des inhibiteurs de la fusion membranaire. Ce phénomène de résistance résulte de certaines mutations présentes chez le virus. En effet, l'enzyme responsable de la réplication virale possède un faible niveau de fidélité et par conséquent, plusieurs substitutions d'acides aminés sont régulièrement notées. Bien que ces changements soient souvent néfastes à la réplication virale, la présence d'une pression sélective de la part d'un composé antiviral particulier peut potentiellement engendrer la dispersion et l'amplification de ce virus résistant à travers la population. Un bon exemple de ce phénomène est l'apparition de la mutation M184V qui confère une résistance au 3TC, un inhibiteur de la transcription inverse (pour une revue de littérature, voir ⁵²). De nouvelles mutations résistantes continuent d'apparaître de jour en jour face

aux différents composés antiviraux développés. Ceci force donc les scientifiques à développer de nouvelles thérapies. Parmi celles-ci, le développement de composés antiviraux ciblant les interactions du virus avec les protéines cellulaires de l'hôte est grandement envisagé. La caractérisation de ces multiples interactions virus-hôte devient donc essentielle et prioritaire pour le développement de cette avenue thérapeutique. Ces interactions virus-hôte feront d'ailleurs l'objet de ce mémoire.

1.2 STRUCTURE DU VIH-1

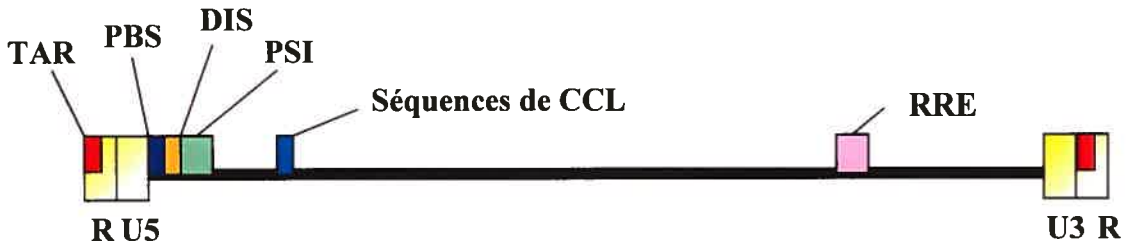
1.2.1 Le génome et les protéines du VIH-1

Comme tous les rétrovirus, le VIH-1 est un virus enveloppé qui possède un génome ARN. Ce génome possède une longueur approximative de 9 kb et contient différentes séquences agissant en *cis*, telles que l'élément de réponse à la transactivation (TAR), le site de liaison de l'amorce (PBS), le site d'initiation de la dimérisation (DIS), le signal d'encapsidation *psi* (ψ) et l'élément de réponse à Rev (RRE) (Figure 1.1A). Chacun de ces éléments joue un rôle important et spécifique à différentes étapes du cycle de réplication virale^{36, 43}. La régulation post-transcriptionnelle de l'ARN est aussi assurée par plusieurs autres éléments de l'ARN, tels que ceux d'instabilité et ceux « silencer » ou « enhancer » de l'épissage¹³⁷.

Au cours du cycle de réplication, le génome ARN est transcrit en ADN par transcription inverse et s'intègre à l'intérieur du génome de l'hôte. Cette forme intégrée du génome viral porte le nom de provirus (Figure 1.1B). Ce génome proviral est flanqué

FIGURE 1.1 Le génome du VIH-1 A) Représentation schématique de l'ARN génomique viral. Les éléments *cis* de l'ARNg sont importants pour différentes étapes du cycle de réplication. B) Forme provirale du génome et protéines encodées. Une fois transcrit en ADN par la RT, le VIH-1 s'intègre dans le génome de l'hôte sous forme d'ADN proviral. Ce génome de 9 kb contient différents cadres de lectures qui codent pour un total de 15 protéines. Les gènes structuraux *gag*, *pol* et *env* sont synthétisés sous forme de précurseurs protéiques respectivement nommés pr55^{Gag}, pr160^{Gag-Pol} et gp160. Les précurseurs pr55^{Gag} et pr160^{Gag-Pol} sont clivés par la protéase virale afin générer 9 protéines matures: protéase (PR), transcriptase inverse (RT), intégrase (IN), matrice (MA), capsid (CA), p2, nucléocapsid (NC), p1 et p6. Le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe, gp160, est clivé par des protéases cellulaires et génère ainsi la protéine de surface (gp120, SU) et la protéine transmembranaire (gp41, TM). Adapté de Peterlin et al ¹⁶⁰

A) ARN génomique du VIH-1



B) Provirus et protéines encodées

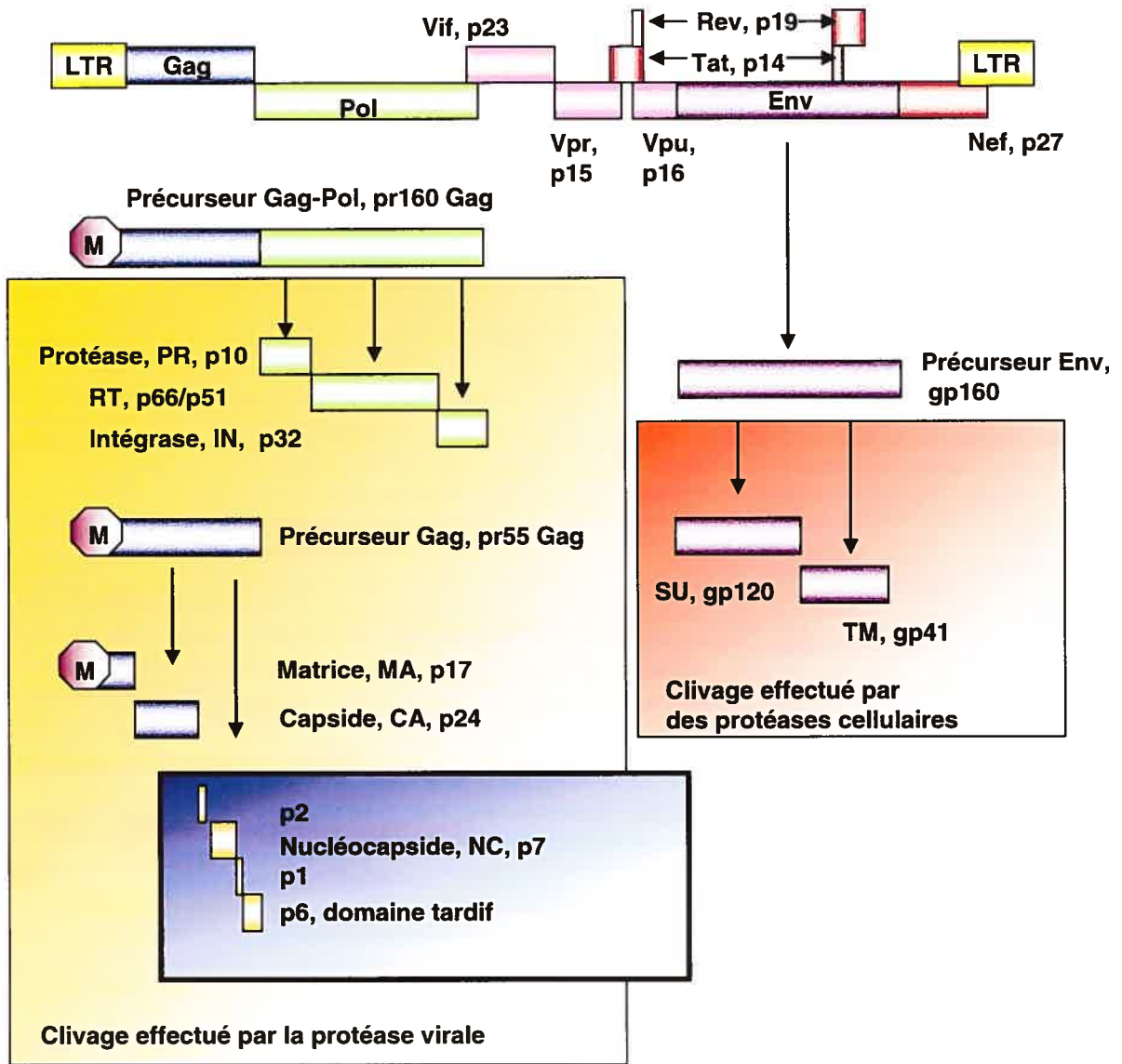


Figure 1.1

par deux LTRs et possède 9 cadres de lectures (ORF) qui encodent un total de 15 protéines virales. Parmi ces ORFs, trois de ceux-ci codent pour les protéines structurales communes à tous les rétrovirus, soit Gag (« *group specific antigen* »), Pol (« *polymerase* ») et Env (« *envelope* »)⁷².

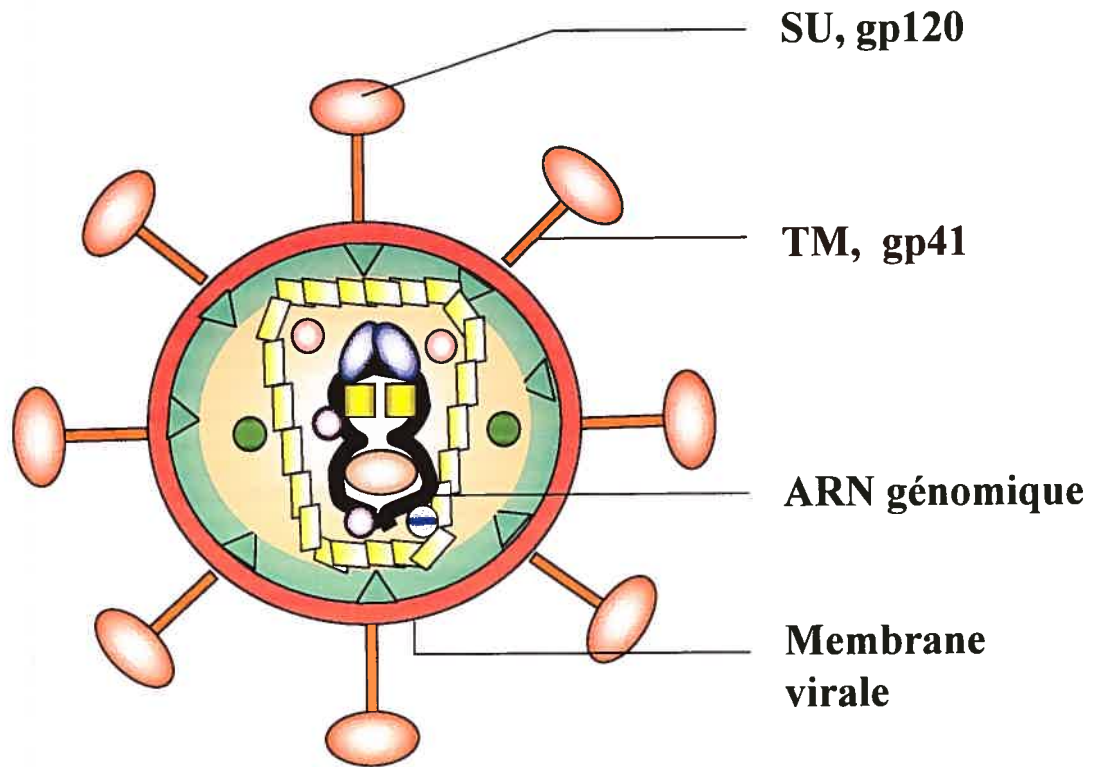
Le gène *gag* code pour un précurseur polyprotéique de 55 kDa nommé pr55^{Gag}. Ce dernier est clivé par la protéase virale afin de générer les protéines matures de Gag, soit la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24), la nucléocapside (NC, p7) et p6. Deux peptides espaceurs, p2 et p1, sont aussi générés lors du clivage enzymatique de pr55^{Gag} (Figure 1.1B). Le gène *pol* code pour les enzymes du virus. Ces enzymes sont aussi synthétisés à partir d'un grand précurseur polyprotéique nommé pr160^{Gag-Pol}. Ce dernier résulte d'un événement de changement de cadre de lecture (CCL) du ribosome lors de la synthèse de pr55^{Gag}. Ce CCL permet au ribosome d'éviter le codon stop de Gag pour ainsi continuer la synthèse protéique dans un cadre de lecture qui permet la génération des enzymes. Cet événement de CCL est régulé par des séquences spécifiques et ne survient que dans environ 5% des cas. Par conséquent, le ratio intracellulaire Gag/Gag-Pol est estimé à 20:1 pendant la réplication du virus. Pr160^{Gag-Pol} est aussi clivé par la protéase virale afin de générer la protéase (PR, p10), la transcriptase inverse (RT, p51/66) et l'intégrase (IN, p32) (Figure 1.1B). La glycoprotéine d'enveloppe (Env) est aussi synthétisée sous forme de précurseur protéique (gp160). Contrairement à pr55^{Gag} et pr160^{Gag-Pol}, gp160 est clivé par des protéases cellulaires du Golgi lors de son transport vers la membrane cellulaire. Ce clivage enzymatique permet de générer la glycoprotéine de surface (SU, gp120) et de la glycoprotéine transmembranaire (TM, gp41) (Figure 1.1B).

Contrairement aux rétrovirus simplex tels que le virus du sarcome de Rous (RSV) et le virus de la leucémie aviaire (ALV), les lentivirus codent aussi pour des protéines auxiliaires. Bien qu'elles ne soient pas essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire *in vitro*, les protéines auxiliaires accessoires assurent une réplication efficace du virus *in vivo* et jouent un rôle très important au niveau de la progression de la maladie vers la phase SIDA⁴³. Les protéines appartenant à ce groupe sont nommées Vpr, Vpu (« *Viral protein R et U* » respectivement), Vif (« *Virion infectivity factor* ») et Nef (« *Negative factor* »). Le virus code aussi pour deux protéines régulatrices qui assurent une bonne régulation de l'expression des gènes viraux. Ces deux protéines sont Tat (« *Trans-activator* ») et Rev (« *Regulator of expression of virion protein* ») (Figure 1.1B). Ces deux protéines ainsi que Nef sont codées par des ARNs multi-épissés d'environ 2 kb, alors que les autres protéines accessoires sont générées à partir d'un transcrite mono-épissé de 4 kb et que les protéines structurales sont synthétisées à partir de l'ARN non-épissé de 9 kb, à l'exception de Env qui est codé par un ARN mono-épissé^{36, 44, 72, 160}.

1.2.2 Le virion mature

À la surface de sa bicouche lipidique d'origine membranaire, le virus possède plusieurs glycoprotéines d'enveloppe (Env) associées entre elles sous forme de trimères. Cette glycoprotéine Env est divisée en deux sous-unités : la protéine de surface (gp120) et la protéine transmembranaire (gp41). Sur le plan structural, le virus mature est majoritairement composé de la protéine matrice (MA) qui entoure la capsid du virus

FIGURE 1.2 Le virion mature Représentation schématique du VIH-1 mature. Les positions des protéines virales retrouvées à la surface de la membrane virale ainsi qu'à l'intérieur du virion sont indiquées. Figure adaptée de Peterlin et al ¹⁶⁰.












- | | | | |
|---|-------------------------------|---|-----------------------------------|
|  | Capside (p24, CA) |  | Intégrase p32, IN) |
|  | Matrice (p17, MA) |  | Protéase (p11, PR) |
|  | Nucléocapside (p7, NC) |  | Transcriptase inverse (RT) |
|  | Vif (p23) | | |
|  | Vpr (p15) | | |
|  | Nef (p27) | | |

Figure 1.2

(CA). À l'intérieur de sa capsid, le virus possède deux copies d'ARN génomique (ARNg) qui sont associées de façon non covalente pour former un dimère. Ces deux copies sont protégées et stabilisées par la nucléocapside (NC). Les enzymes viraux (protéase, transcriptase inverse, intégrase) ainsi que des protéines accessoires telles que Vpr, Vif et Nef sont également incorporées à l'intérieur du virion (Figure 1.2). Plusieurs protéines cellulaires sont aussi retrouvées à la surface comme à l'intérieur du virus. Ces dernières seront toutefois détaillées plus tard au cours de ce chapitre.

1.3 CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1

Le VIH-1 entre à l'intérieur du corps humain grâce à l'échange de fluides corporels qu'une personne saine entretient avec une personne infectée. Une fois à l'intérieur, le virus peut infecter différents types cellulaires de notre système immunitaire afin de s'y répliquer. En effet, même s'il infecte principalement les lymphocytes T auxiliaires CD4 et les macrophages, le virus peut aussi s'attaquer aux cellules microgliales et aux cellules dendritiques. Le processus de réplication du virus comporte plusieurs étapes qui peuvent être divisées en deux grands groupes : les étapes précoces qui mènent à l'intégration du génome viral dans celui de l'hôte et les étapes tardives qui mènent à la libération du virus hors de la cellule.

FIGURE 1.3 Le cycle de réplication du VIH-1 Représentation schématique du cycle de vie du VIH-1. La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 interagit avec la molécule CD4 et un récepteur des chimiokines (CXCR4 ou CCR5) à la surface cellulaire afin de permettre la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule. Par la suite, la décapsidation du virus permet la libération du complexe de pré-intégration. La transcription inverse du génome génère une molécule d'ADN double brin complémentaire et grâce aux protéines IN, MA, et Vpr, ce dernier est ensuite transporté vers le noyau et s'intègre à l'intérieur du génome de l'hôte. La transcription débute au LTR situé en 5' grâce à Tat qui augmente la processivité de l'ARN polymérase cellulaire. La protéine Rev permet ensuite la sortie du noyau des transcrits non-épissés et mono-épissés. Les protéines structurales et enzymatiques sont alors synthétisées et localisées à la membrane plasmique durant le processus d'assemblage. Les quatre protéines accessoires (Vpr, Vpu, Vif et Nef) et les deux protéines régulatrices (Rev et Tat) sont représentées par des cercles de couleurs. Grâce au domaine tardif p6 de pr55^{Gag} qui permet le recrutement de certains composants cellulaires des corps multivésiculaires au site de bourgeonnement, le virion est relâché de la cellule infectée. Voir le texte pour de plus amples détails. Figure adaptée de Peterlin et al ¹⁶⁰.

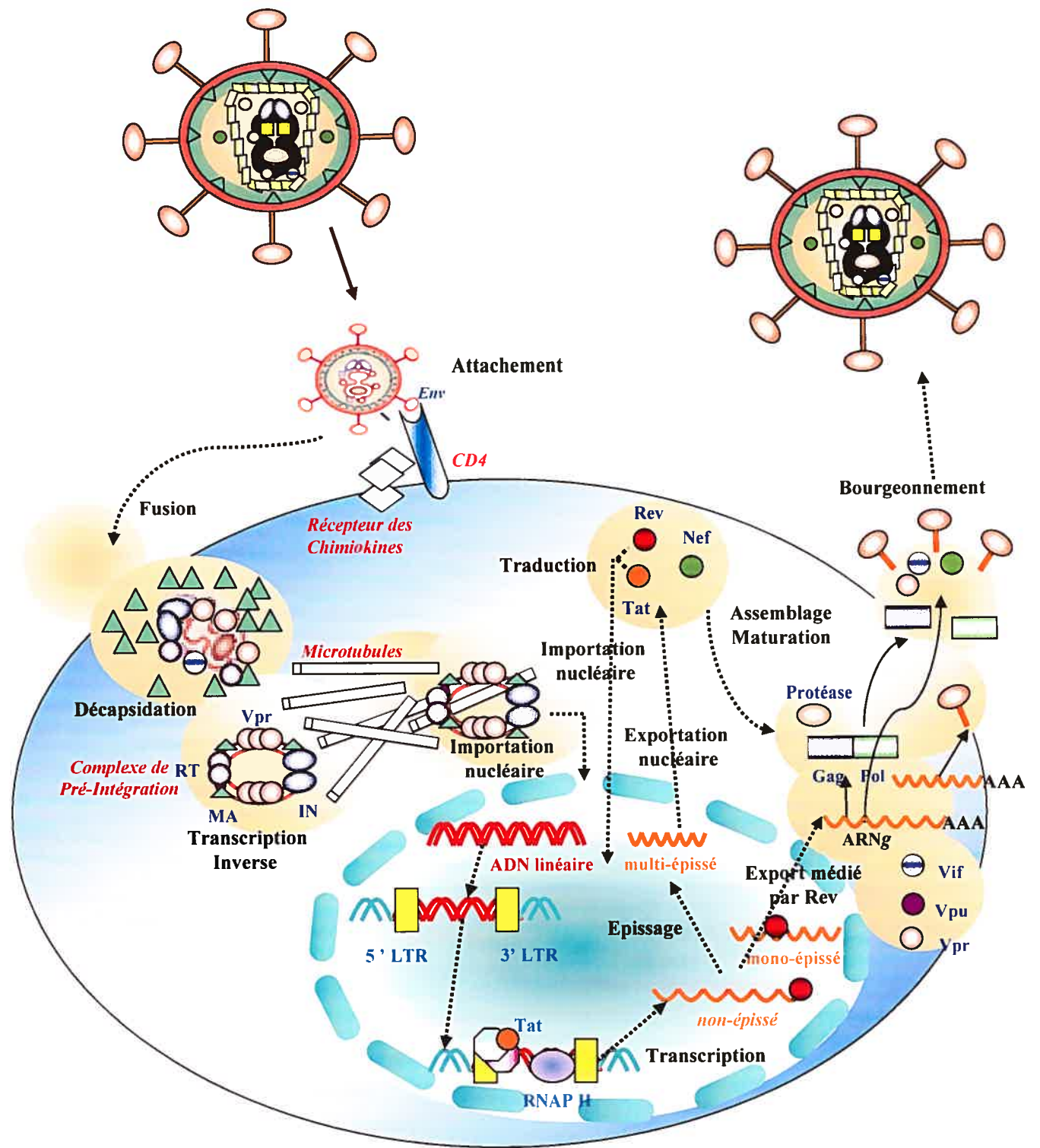


Figure 1.3

1.3.1 Étapes précoces

1.3.1.1 Entrée du virus

L'entrée du VIH-1 à l'intérieur de la cellule est médiée par un mécanisme de fusion membranaire. La glycoprotéine d'enveloppe gp120 se lie d'abord à son récepteur, la molécule de surface CD4. Cette interaction avec le récepteur provoque ensuite un changement de conformation qui permet à gp120 de lier un co-récepteur, le récepteur des chimiokines CXCR4 dans le cas d'un lymphocyte T auxiliaire et le récepteur CCR5 dans le cas d'un macrophage ou d'une cellule dendritique. Cette nouvelle interaction provoque un second changement de conformation qui permet la libération du peptide de fusion de la sous unité transmembranaire gp41³⁴ et la fusion de la membrane cytoplasmique avec celle du virus peut ainsi s'accomplir pour permettre la libération de la capsid à l'intérieur de la cellule.

1.3.1.2 Décapsidation

Une fois relâchée dans le cytoplasme, la capsid est rapidement dégradée. Ce processus de décapsidation est très peu caractérisé à l'heure actuelle. Outre le fait que la capsid du virus se doit d'être d'une stabilité optimale pour assurer une infectivité maximale au virus⁶⁷, la phosphorylation de la protéine MA³¹, la présence de la protéine cellulaire cyclophiline A⁷⁰, ainsi que les protéines virales Nef¹⁷⁴ et Vif¹⁴⁶ semblent être des facteurs importants pour assurer l'efficacité de ce processus menant à la libération du génome viral.

Les connaissances associées à cette étape précoce du cycle viral sont très peu avancées pour le moment en raison du fait qu'aucun système n'est encore bien développé pour spécifiquement permettre son étude. Cependant, quelques groupes ont fait des progrès considérables dans ce domaine. Par exemple, Kotov et collaborateurs ont trouvé le moyen de purifier les capsides virales et parviennent ainsi à effectuer plusieurs essais *in vitro* de décapsidation ¹¹³, alors que Young et son groupe ont récemment développé un « cell-free system » qui leur permet de cibler cette étape ¹¹⁸. Ce dernier implique toutefois le pseudotypage du VIH-1 à l'aide de la glycoprotéine d'enveloppe d'un autre rétrovirus, le ASLV (virus du sarcome et de la leucémie aviaire). L'utilisation de ce système aurait révélé que l'hydrolyse d'ATP ainsi que la présence de plusieurs facteurs cellulaires serait requise afin stimuler la décapsidation du virus ¹⁴¹.

À l'opposé de ceux qui stimulent la décapsidation, certains facteurs cellulaires agissent en tant que facteurs de restriction qui ciblent la capsid virale nouvellement libérée ^{17, 82}. Cette classe de facteurs est nommée Fv-1 (« *Friend virus susceptibility factor-1* ») en raison de la découverte du premier facteur lors d'une étude avec le virus Friend ¹⁸⁹. Le mécanisme d'action de Fv-1 est encore inconnu, mais l'infection est bloquée à une étape située entre la transcription inverse et l'intégration ^{102, 166}. Le déterminant de la restriction réside toutefois à l'intérieur de la capsid ⁵¹.

Il était connu depuis longtemps que le VIH-1 pouvait entrer efficacement dans les cellules de singe rhesus (« Old World Monkeys cells »), mais que sa réplication était bloquée avant l'étape de transcription inverse. Grâce à une banque d'ADNc de cellules

de singe rhésus, le facteur TRIM5 α (« *tripartite interaction motif 5 α* ») fût récemment identifié comme un facteur conférant une résistance au VIH-1 ¹⁹⁰. Sa capacité d'inhibition du VIH-1 est supérieure à la forme humaine de TRIM5 α . Par conséquent, ce facteur de restriction est grandement considéré pour le développement d'une nouvelle approche thérapeutique.

1.3.1.3 Transcription inverse et importation nucléaire

Grâce à la RT du virus, enzyme caractéristique et distinctif de la famille des rétrovirus, le génome ARN est ensuite transcrit en ADN complémentaire avant d'être pris en charge par un complexe de pré-intégration (PIC). Le PIC est composé du génome ADN, de la RT, de l'IN, de Vpr et de la protéine MA. Ce complexe est nécessaire à l'importation du génome ADN au noyau. En effet, Vpr, MA et IN possèdent tous des signaux de localisation nucléaire (NLS) qui peuvent interagir avec des importines nucléaires et ainsi permettre la translocation du génome à l'intérieur du noyau sans que la membrane ne subisse aucun changement conformationnel majeur. Un autre composant du PIC, nommé « central DNA flap », semble aussi être important pour le processus d'importation au noyau ^{4, 217}. Toutefois, cette théorie reste aujourd'hui controversée ⁵⁷.

123

Les NLS retrouvés dans les protéines MA, Vpr et IN ainsi que la présence du « DNA flap » semblent donc être les principaux éléments qui expliqueraient pourquoi le VIH-1 peut intégrer le génome de cellules quiescentes par rapport à son homologue

murin (MLV) qui doit attendre la mitose pour pouvoir accéder au génome. Toutefois, deux problèmes se posent avec ce modèle, qui pour l'instant reste le plus plausible et le mieux accepté au sein de la communauté scientifique. Premièrement, le VIH-1 peut s'intégrer même si les NLS de Vpr, MA et IN sont supprimés au niveau du provirus. Deuxièmement, l'introduction de ces trois protéines du VIH-1 dans un vecteur proviral MLV chimérique ne permet pas à ce dernier de s'intégrer dans le génome des cellules quiescentes. Face à cette problématique et sachant que la conformation de la capsid e du MLV tend vers une forme sphérique alors que celle du VIH-1 est plutôt conique, Emerman et collaborateurs ont voulu vérifier si la capsid e en elle-même pouvait jouer un rôle dans ce processus ¹⁸². Ils ont alors construit un virus chimérique où la capsid e du VIH-1 (p24 CA) a été remplacée par celle du MLV (p30 CA). Les différentes expériences effectuées à partir des virus chimériques, démontrent que la capacité d'intégration dans les cellules quiescentes est soudainement perdue. Par conséquent, ils en concluent que la capsid e est un déterminant majeur dans le processus d'intégration de cellules quiescentes et proposent un modèle où la capsid e du MLV pourrait masquer la présence des NLS et empêcher le processus qui permet l'internalisation du PIC dans le noyau. La possibilité que des facteurs cellulaires tels que BAF (« *barrier to auto-integration factors* »), HMG (« *high mobility group* ») et Ku soient impliqués dans ce processus est aussi envisagée ²¹².

1.3.1.4 Intégration

Une fois à l'intérieur du noyau, l'IN catalyse l'insertion de l'ADN double brin linéaire viral dans le génome de la cellule hôte. L'intégration des rétrovirus au niveau du génome de la cellule hôte est requise afin d'obtenir une infection virale productive. Par conséquent, le site que choisit le virus pour procéder à l'intégration de son génome devient critique afin de perpétuer son existence. Plusieurs évidences indiquent maintenant que ce processus d'intégration n'est pas un phénomène issu du hasard. Les mécanismes qui déterminent la sélection des sites ne sont toutefois pas encore éclaircis³³.

En ce qui concerne le MLV et le VIH-1, des études récentes ont démontré que l'intégration du génome se faisait à proximité de gènes cellulaires affichant une activité transcriptionnelle plus élevée que la moyenne^{176, 209}. Les gènes transcriptionnellement actifs semblent donc être favorisés pour l'insertion du génome viral. Toutefois, contrairement au MLV qui semble favoriser des sites d'intégration entourant la région promotrice (environ ± 5 kb à partir du site d'initiation de la transcription), le VIH-1 est retrouvé un peu partout à l'intérieur de la région transcrite et ne semble pas posséder de site d'intégration préférentiel²⁰⁹.

Le génome ADN intégré est appelé « provirus ». Ce dernier se comporte comme un gène cellulaire et son expression donne naissance à différents transcrits qui seront nécessaires au virus afin d'effectuer les étapes tardives de son cycle de réplication.

1.3.2 Étapes tardives

1.3.2.1 Transcription du génome

Les LTRs du VIH-1 servent de sites d'initiation de la transcription. Ces derniers se comportent comme des promoteurs eucaryotiques, car ils possèdent des séquences agissant en *cis* qui favorisent la synthèse d'ARN par l'ARN polymérase II. Ces LTRs sont divisés en trois régions distinctes nommées U3 (région unique en 3'), R (région répétée) et U5 (région unique en 5'). La région U3 contient majoritairement des séquences consensus auxquelles se fixent des facteurs de transcription cellulaire tels que NF-kB, SP1, NFAT et TBP (« TATA *binding protein* »). La présence de ces facteurs de transcription assure à la fois un recrutement efficace et une position adéquate de l'ARN polymérase II au niveau du site d'initiation de la transcription lors de l'assemblage du complexe de pré-initiation. La synthèse d'ARN est initiée au niveau de la région R. Cette région contient un des éléments les plus importants pour la transcription du génome, soit l'élément de réponse à la transactivation (TAR)¹⁰⁴.

L'activité transcriptionnelle du LTR est relativement faible. En effet, en absence de la protéine virale Tat, la transcription débute, mais l'élongation de la polymérase au niveau du génome viral est déficiente. Cependant, lorsque Tat est produit, l'activité transcriptionnelle est dramatiquement augmentée d'au moins deux logs. Grâce à son association avec la cycline T1, Tat recrute la kinase cellulaire cycline dépendante 9 (cdk9) et permet ainsi la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de la polymérase ARN. Cette modification au niveau du CTD de la polymérase augmente de

façon exceptionnelle l'activité d'élongation de l'enzyme, ce qui a comme effet de stimuler l'activité transcriptionnelle. Des données fonctionnelles sur l'activité de Tat indiquent que les interactions protéine-ADN au niveau du LTR^{12, 103, 183, 184}, protéine-ARN TAR^{75, 205, 210} ainsi que le contexte cellulaire^{89, 142} contribuent tous de façon importante à l'obtention d'une trans-activation optimale. Des interactions entre Vpr et le complexe coactivateur p300/CBP sont aussi importantes pour l'induction des LTRs viraux¹⁰⁹. Il semblerait que les protéines Vpr encapsidées dans le virion puissent stimuler la réplication virale en augmentant l'expression génique des LTRs tout juste après avoir provoqué l'arrêt en G2 du cycle cellulaire. Cette activation des LTRs par Vpr serait requise afin d'obtenir une transactivation optimale médiée par Tat⁹⁴. En se liant à l'ARN, Tat peut potentiellement influencer l'initiation et l'élongation de la transcription (pour une revue, voir^{76, 100, 108, 213}).

1.3.2.2. Exportation des ARNs viraux

L'initiation de la transcription à partir du LTR du VIH-1 donne naissance à plus d'une trentaine d'ARNs viraux différents¹⁶⁷. Comme mentionné précédemment, ces transcrits peuvent cependant être regroupés en trois groupes majeurs : les ARNs non-épissés de 9 kb qui codent pour les protéines structurales à l'exception de Env et qui sont également les ARNs encapsidés dans les nouveaux virions; les ARNs mono-épissés de 4 kb qui codent pour les protéines accessoires Vif, Vpu et Vpr et la glycoprotéine Env ; les ARNs multi-épissés de 2 kb qui codent pour les protéines Rev, Tat et Nef.

Au niveau de la cellule, les ARNs cellulaires sont généralement épissés complètement avant d'être exportés du noyau. La présence des ARNs de 9 kb et de 4 kb est donc quelque peu problématique pour le VIH-1, car ces deux classes d'ARNs viraux ne peuvent théoriquement pas sortir du noyau à l'aide de la machinerie cellulaire habituelle. Toutefois, le virus a évolué pour remédier à cette situation et utilise un mécanisme alternatif dont les principaux acteurs sont la protéine Rev et un élément *cis* de l'ARN nommé RRE (élément de réponse à Rev)^{44, 161}. En effet, lorsque des mutations qui inactivent Rev sont introduites ou que la structure du RRE est abolie, la synthèse des gènes structuraux est soudainement inhibée, alors que les protéines Tat, Nef et Rev sont toujours exprimées à des niveaux cellulaires raisonnables^{59, 128, 129, 182}.

Le RRE est une structure ARN hautement organisée et conservée d'environ 250 nucléotides. Cet élément est présent dans tous les ARNs de 9 kb et 4 kb au niveau de la partie codante du gène *env*. Après avoir été synthétisée dans le cytoplasme, Rev revient dans le noyau grâce à son NLS. Un monomère de Rev lie initialement une des boucles de la structure du RRE et par la suite, grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-ARNs, Rev se multimérise sur le RRE. Comme Rev contient un signal d'export nucléaire riche en leucine (NES), cette dernière peut interagir avec le complexe CRM1/exportin-1 et ainsi permettre la translocation des ARNs non-épissés et mono-épissés vers le cytoplasme⁴⁵.

1.3.2.3. Assemblage du VIH-1

Une fois les ARNs exportés, les protéines virales sont traduites afin d'amorcer le processus d'assemblage. Le principal médiateur de ce processus est le précurseur pr55^{Gag}⁷¹. En effet, l'expression de pr55^{Gag} par elle-même est suffisante à la formation et la relâche de VLPs (« *virus like particle* »)^{50, 78, 106}. Cette protéine contient donc tous les déterminants nécessaires afin de cibler la membrane plasmique, de lier la membrane plasmique, de promouvoir les interactions pr55^{Gag}-pr55^{Gag}, de permettre l'encapsidation du génome viral et de stimuler la relâche virale³⁶.

L'assemblage des rétrovirus s'effectue principalement à la membrane des cellules infectées^{71, 92, 147, 151, 201}. En effet, après leur synthèse, les molécules de pr55^{Gag} se dirigent vers la membrane plasmique en seulement quelques minutes pour ensuite s'y lier par un processus très spécifique¹⁹⁷. Ce ciblage de pr55^{Gag} vers la membrane est médié par son domaine MA, c'est-à-dire les 31 premiers acides aminés de la polyprotéine²¹⁸. Ce domaine contient un signal de myristylation en N-terminal et il est bien établi que cette modification covalente de pr55^{Gag} est essentielle à la liaison du précurseur à la membrane^{71, 147, 218}. La présence d'une série d'acides aminés hautement basiques (acides aminés 17 à 31 de pr55^{Gag}) est aussi un autre élément important pour la liaison de pr55^{Gag} aux membranes. Des études structurales effectuées sur MA^{91, 105} ont suggéré que les acides aminés basiques de cette région formaient une surface chargée positivement qui faciliterait la liaison de pr55^{Gag} avec la membrane grâce à la création d'une interaction électrostatique avec les acides phospholipidiques de la membrane^{134, 218}. Des études récentes ont aussi démontré que la liaison de pr55^{Gag} aux membranes se

ferait dans des domaines membranaires particuliers nommés « lipids rafts »^{61, 90, 143}. Les mécanismes responsables de cette association spécifique restent encore inconnus, toutefois plusieurs études laissent suggérer que la sélection de ce site spécifique d'assemblage est un événement complexe qui semble être non seulement influencé par le domaine MA, mais aussi par d'autres domaines de pr55^{Gag} et la présence de facteurs cellulaires spécifiques^{124, 130, 131, 150}.

La multimérisation de pr55^{Gag} à la membrane est à la base de la structure du virion et semble une propriété intrinsèque de ce précurseur polyprotéique puisque des molécules de pr55^{Gag} purifiées peuvent former des VLPs (« virus like particles ») *in vitro*^{125, 135, 172}. Plusieurs domaines sont impliqués dans ce processus. En effet, le domaine MA semble favoriser la trimérisation de pr55^{Gag}²⁵. Cependant, le rôle de cette étape dans l'assemblage viral n'est pas encore complètement défini. Le domaine CA est aussi important à la multimérisation puisque l'introduction de certaines mutations dans la région N-terminale de CA affecte la morphologie des virions alors que l'insertion de mutations en C-terminal provoque des problèmes d'assemblage⁵³. Toutefois, la contribution majeure des interactions pr55^{Gag}-pr55^{Gag} provient du domaine NC et par conséquent, ce domaine est souvent défini comme étant le domaine I de pr55^{Gag}¹⁰. En effet, la suppression de NC diminue fortement les interactions pr55^{Gag}-pr55^{Gag} *in vivo* et *in vitro* et provoque des problèmes d'assemblage et de production virale^{48, 78}. NC est aussi le déterminant majeur de pr55^{Gag} qui lie l'ARN. Dans l'assemblage du VIH-1, les interactions protéine-protéine ainsi que les interactions protéine-ARN médiées par NC semblent importantes au processus^{38, 175}. Il est donc possible d'imaginer qu'en liant

l'ARN, le domaine NC concentre les molécules de pr55^{Gag} sur une ou plusieurs molécules d'ARN d'une façon qui rappelle un processus de nucléation ³⁶.

1.3.2.4 Encapsidation

Comme mentionné précédemment, chaque particule encapside deux copies du génome viral. Ce mécanisme d'encapsidation est principalement médié par l'interaction du domaine NC de pr55^{Gag} avec la séquence psi (ψ) présente uniquement sur l'ARN viral non-épissé de 9 kb (ARNg) ^{15, 72}.

Bien que les interactions biochimiques entre pr55^{Gag} et l'ARNg soient bien caractérisées, plusieurs aspects du processus de sélection des ARNs sont encore mal connus. Par exemple, le mécanisme précis permettant la sélection de ces ARNs viraux parmi l'énorme « pool » d'ARNm cellulaires n'est pas encore éclairci. Certains croient donc qu'il existe un lien fonctionnel entre la traduction et l'encapsidation en affirmant que le VIH-1 préfère encapsider l'ARN de 9 kb qui est traduit par les ribosomes ^{122, 162}. Cependant, d'autres groupes préfèrent penser qu'il existe deux pools d'ARNg différents, c'est-à-dire un servant à la traduction et l'autre à l'encapsidation ²⁶. Un autre problème se pose aussi en ce qui concerne la question du moment précis où débute l'étape d'encapsidation. Une des premières hypothèses considérées fût celle où l'ARNg est introduit dans la particule virale seulement lors de la formation du virion à la membrane plasmique. Par contre, plusieurs groupes affirment que les interactions de pr55^{Gag} avec l'ARN sont importantes pour le processus de multimérisation lors de l'assemblage du

virus et qu'il soit alors possible que l'encapsidation puisse débuter dans le cytoplasme ⁷⁴,
120

1.3.2.5 Bourgeoisement, relâche et maturation

Une forte corrélation fût observée entre la liaison de pr55^{Gag} à la membrane et le bourgeoisement des particules virales ^{148, 150}. Il fût donc logique de penser que pr55^{Gag} possédait une ou des séquences pouvant promouvoir la relâche des virions. Ces séquences furent par la suite trouvées dans la région p6 de pr55^{Gag} et p6 fût alors identifiée comme étant le domaine tardif de pr55^{Gag} (domaine L) ^{83, 95}. Ce domaine L interagit spécifiquement avec les machineries cellulaires d'ubiquitination et de « sorting » endosomal. En effet, il fût récemment découvert que la liaison de la protéine cellulaire Tsg 101 au motif PTAP localisé en C-terminal de p6 est essentielle au bourgeoisement ⁶³. Cette interaction permettrait le recrutement de plusieurs autres protéines cellulaires, telles que Vsp28 et Vsp4, qui sont impliquées dans le mécanisme de formation des corps multivésiculaires (MVB) ^{74, 133, 164}. Bien des aspects de cette théorie émergente restent toutefois à confirmer. En effet, bien que la présence de virions fût notée dans les MVBs des macrophages, aucun résultat de la sorte n'a encore été observé chez les cellules T auxiliaires ^{145, 149}.

Les particules virales nouvellement relâchées sont immatures et par conséquent, très peu infectieuses. Le processus de maturation consiste en un réarrangement structural des composants internes du virion. D'apparence radiale, les molécules de pr55^{Gag} sont réorganisées de façon très spécifique permettant ainsi la formation de la capsid virale

située au centre de la particule^{24, 73}. Ce réarrangement est la conséquence du clivage des molécules de pr55^{Gag} par la protéase virale activée durant ou après le processus de bourgeonnement (voir figure 1.1B). Comme cet enzyme viral n'est qu'actif sous forme de dimère, il est tentant de croire que l'activation de la protéase serait due à l'association de deux molécules pr160^{Gag-Pol}. La dimérisation de ces deux précurseurs engendrerait un clivage auto-protéolytique qui libérerait ensuite une protéase mature responsable des prochaines étapes de la maturation¹⁹⁴. Tout ce réarrangement conformationnel est crucial au virus afin d'assurer son infectivité et sa propagation vers d'autres cellules saines^{71, 73, 85, 179}.

1.4 PROTEINES CELLULAIRES IMPLIQUÉES AU NIVEAU DU CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1

On a longtemps pensé que les protéines virales codées par le VIH-1 étaient suffisantes pour assurer la réplication du virus. Cependant, après la découverte de certaines protéines cellulaires à la surface ainsi qu'à l'intérieur du virion, plusieurs groupes scientifiques ont commencé à se questionner sur l'importance des protéines de l'hôte au niveau de l'efficacité du cycle de réplication virale. Puisque ce virus utilise la protéine cellulaire CD4 dès le début de sa réplication, pourquoi n'utiliserait-il pas quelques-unes des multiples protéines qui lui sont offertes par le milieu cellulaire ? Plusieurs de ces facteurs cellulaires ont été caractérisés, mais dans la majorité des cas, la raison expliquant leur présence reste encore obscure. La découverte de ces protéines cellulaires en association avec différents composants du VIH-1 fournit toujours de bons indices qui aident à la compréhension et à la caractérisation des différents processus du

cycle viral. Ces informations sont très importantes et pourront servir au développement de nouvelles thérapies anti-rétrovirales. En effet, les différentes résistances que développe le virus obligent les scientifiques à envisager de nouvelles avenues thérapeutiques et les facteurs cellulaires représentent en ce sens une cible de choix. En effet, il est théoriquement plus difficile pour le virus de développer une résistance à une thérapie qui interfère avec une interaction de type virus-hôte que de développer une résistance aux thérapies actuelles qui ciblent directement une fonction virale telle que la transcription inverse ou le clivage enzymatique de la protéase ¹⁵³.

1.4.1 Les protéines cellulaires à la surface du virion

Le VIH-1 acquiert son enveloppe lipidique et ses glycoprotéines d'enveloppe lors du bourgeonnement du virus. Ceci a évidemment comme conséquence d'incorporer à la surface du virus plusieurs protéines présentes à la surface cellulaire. Il est alors permis de se questionner quant à l'importance de ces nouvelles acquisitions à la surface du virus. Est-ce que ces protéines sont incorporées parce qu'elles sont simplement présentes au site d'assemblage ou bien y sont-elles parce que le virus en tire avantage pour accomplir une certaine fonction précise ? Bien qu'aucune protéine cellulaire à la surface du virion ne semble indispensable à la réplication du virus dans les systèmes de culture cellulaire, il est envisageable que ces protéines puissent avoir un rôle important *in vivo* où le moindre avantage accordé au virus peut provoquer un effet significatif sur sa réplication ^{42, 153, 196}.

Les protéines de HLA Classe II sont les protéines les plus fréquemment détectées à la surface du virus et parmi celles-ci, HLA-DR semble la plus souvent incorporée^{153, 163}. La présence de ces molécules de HLA-II double l'infectivité des virus *in vitro*^{27, 28} et semblent moduler la réponse immunitaire⁵. En effet, si le virus interagit avec une cellule T, la présence d'un peptide antigénique niché dans cette molécule peut potentiellement déclencher une signalisation cellulaire qui engendrera l'anergie de la cellule ou même son apoptose^{84, 153}. En utilisant un système d'expression qui augmente la quantité de molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) à la surface du virus, Fortin et collaborateurs ont réussi à démontrer que la présence de cette protéine cellulaire augmentait l'infectivité virale⁶⁸. Cette molécule possède une haute affinité pour la molécule LFA-1 (« *Leucocyte Function Associated molecule-1* ») présente à la surface de la cellule. La présence de ICAM-1 à la surface de la membrane virale favoriserait donc l'adhésion du virus à la cellule et la cinétique d'entrée pour ainsi augmenter la vitesse de réplication virale^{20, 68, 192}. Il existe évidemment plusieurs autres protéines cellulaires incorporées à la surface du virus. Quelques-unes de ces dernières, accompagnées de leurs fonctions potentielles respectives, sont résumées dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1 Protéines cellulaires incorporées à la surface du virion et fonction cellulaire associée

Protéines cellulaires ^(référence)	Fonction cellulaire
HLA Classe II ²⁸	Restriction du CMH II, signalisation cellulaire
HLA Classe I ⁹³	Restriction du CMH I, signalisation cellulaire
CD2/LFA-2 ⁶⁹	Adhésion cellulaire, activation des cellules T
CD3 ⁶⁹	Sous-unité du récepteur des cellules T et signalisation
CD4 ⁶⁹	Liaison au CMH II, signalisation des cellules T
CD5 ⁶⁹	Liaison à CD72, signalisation (cellules T)
CD6 ⁶⁹	Activation des cellules T
CD8 ¹⁵²	Liaison au CMH I, signalisation (cellules T)
CD11/LFA-1 ⁹³	Liaison à ICAM, adhésion cellulaire
CD14 ¹	Récepteur des LPS
CD18 ⁶⁹	Liaison au fibrinogène et ICAM, adhésion cellulaire
CD19 ⁹³	Activation des cellules B
CD21/CR 2 ⁹³	Récepteur du complément, signalisation (cellules B)
CD28 ⁸⁰	Signalisation cellulaire
CD31/PECAM ⁶²	Adhésion cellulaire
CD43 ⁶⁹	ICAM-1, signalisation cellulaire
CD48 ⁶⁹	Régulation lymphocytaire
CD54/ICAM-1 ⁶⁸	Liaison à LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire
CD55 ¹⁷¹	Inhibition de la lyse par le complément
CD58/LFA-3 ⁸	Adhésion cellulaire, activation des cellules T
CD59 ¹⁷¹	Inhibition de la lyse par le complément
CD62/LAM-1 ⁸	Adhésion cellulaire
CD63 ¹⁵²	Inhibiteur de l'adhésion cellulaire
CD71 ⁶⁹	Récepteur de la transferrine, transport du fer
CD80 ⁷⁹	Signalisation cellulaire
CD86b ⁷⁹	Activation des cellules T
ICAM-2 ⁶²	Liaison à LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire
ICAM-3 ⁶²	Liaison à LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire

Tableau adapté de ¹⁵³.

Tableau 1.2 Protéines cellulaires incorporées à l'intérieur du virion, fonction cellulaire associée et partenaire viral requis

Protéines cellulaires ^(référence)	Fonction cellulaire	Partenaire viral
Actine ¹⁵⁵	Cytosquelette	NC
Cofilin ¹⁵⁵	Déstabilisateur des filaments d'actine	
Cyclophiline A ²²	Peptidylprolyl <i>cis-trans</i> isomérase	CA
EF-1 α ³⁷	Facteur de traduction, chaperonne, ubiquitine hydrolase	MA, NC
GAPDH ¹⁵⁶	Glycolyse, liaison des ARNt	
HSP70 ⁸⁸	Chaperonne de repliement protéique	
INI-1 ²¹⁶	Non déterminée	IN
Lck ¹⁵⁵	Tyrosine kinase, signalisation cellulaire	
Moesine ¹⁵⁵	Ancrage des protéines à la membrane plasmique via le réseau d'actine	
Staufen ¹³⁸	Transport de l'ARN	ARN, NC
Thioltransférase ⁴⁷	Transfère le glutathione des cystéines	
tRNA synthétase-HO3 ¹¹⁵	Protéine histidyl-tRNA-like	MA
tRNA syntétase-Lysl ³²	Lysyl-tRNA synthétase	Pol
Tsg 101 ⁷⁴	Transport protéique, régulateur de l'ubiquitination	p6 ^{Gag}
Ubiquitine ¹⁵⁴	Turnover des protéines, endocytose,	p6 ^{Gag}
Uracil DNA glycosylase ²⁰⁸	Réparation de l'ADN	IN
VAN ⁸⁷	Non déterminée	MA

Tableau adapté de ¹⁵³.

1.4.2 Les protéines cellulaires incorporées à l'intérieur du virion

Bien que la présence d'une protéine cellulaire à l'intérieur du virion suggère fortement que le virus l'utilise afin d'accomplir efficacement son cycle de réplication, il n'est pas toujours facile d'en déterminer le rôle exact et pour un grand nombre de ces protéines, la signification de leur incorporation demeure encore inconnue. Certaines de ces protéines sont listées dans le tableau 1.2 et quelques-unes de celles-ci sont discutées plus en détails ci-dessous.

Une des premières protéines découvertes à l'intérieur du virion fût la cyclophiline A (CypA). Cette protéine est une peptidyl-propyl *cis-trans* isomérase qui est incorporée grâce à son interaction avec une boucle riche en proline du domaine CA de pr55^{Gag}. Bien que CypA interagisse avec pr55^{Gag} durant l'assemblage, son effet sur la réplication du VIH-1 se manifeste seulement lors d'une infection subséquente du virus, où sa présence est essentielle pour assurer la transcription inverse complète et efficace du virus ^{21, 195}. Towers et collaborateurs ont récemment démontré que CypA modulait la sensibilité du VIH-1 aux facteurs de restrictions de l'hôte suggérant ainsi que le virus utiliserait cette protéine cellulaire pour contrecarrer l'action des facteurs de restriction exprimés dans les cellules humaines ¹⁹⁵.

La présence d'actine et des protéines associées à l'actine (cofilin, ezrin, moesin) à l'intérieur du virion suggère que l'incorporation de ces protéines se font via le complexe du cytosquelette ¹⁵⁵. La démonstration que pr55^{Gag} interagit avec le réseau

cellulaire d'actine suggère un rôle important du cytosquelette dans les étapes d'assemblage du virus.

Le facteur d'élongation EF-1 α est quant à lui spécifiquement incorporé à l'intérieur du virus grâce à une interaction avec des résidus basiques du domaine MA ou NC de pr55^{Gag} et de l'ARN³⁷. Comme cette protéine possède différentes fonctions cellulaires telles que le transport d'aminoacyl-ARNt pour la traduction, « actin bundling protein » qui pourrait réguler la traduction, chaperonne potentielle et une ubiquitine hydrolase¹¹⁰, il est difficile de spéculer un rôle précis de ce facteur cellulaire au niveau du VIH-1. Cependant, comme cette protéine est capable d'inhiber la traduction *in vitro*, l'association de pr55^{Gag} avec le complexe EF-1 α /ARNt pourrait inhiber la traduction et libérer l'ARN viral des ribosomes pour lui permettre d'être encapsidé³⁷.

Une autre protéine importante pour la réplication du VIH-1 est la protéine Tsg 101 (« *Tumor susceptibility gene 101* »). Cette dernière interagit avec pr55^{Gag} via le motif PTAP du domaine p6 et son recrutement assure au virus un bourgeonnement efficace⁷⁴. Tsg 101 est une « *ubiquitin conjugating E₂ enzyme variant protein* » (UEV), c'est-à-dire qu'elle possède la structure d'un enzyme E₂, mais qu'elle est déficiente pour la cystéine au niveau du site actif responsable de la génération du lien transitoire avec l'ubiquitine. Dans une cellule non infectée, cette protéine joue un rôle dans la biogenèse des corps multivésiculaires (MVB)¹⁰⁷. Par conséquent, cette interaction entre le virus et l'hôte soulève la possibilité que le VIH-1 s'associe à Tsg 101 dans le but d'accéder à la machinerie qui catalyse le bourgeonnement des MVBs²⁰².

En utilisant un système de double-hybride, Gupta et collaborateurs ont découvert que la protéine cellulaire VAN interagissait avec la protéine MA et qu'elle était encapsidée dans le virion. Comme cette protéine possède un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NES), VAN pourrait servir de navette à la protéine MA pour les déplacements entre le noyau et le cytoplasme ⁸⁷.

INI1 (« *integrase interactor 1* »), aussi nommé hSNF5 (« *human sucrose non-fermenting 5* »), est une protéine qui interagit avec l'intégrase du VIH-1 et qui est aussi encapsidée dans le virion ²¹⁶. Cette protéine fait partie de la famille des « *Tumor suppressors* » et elle est une composante importante des complexes SWI/SNF impliqués dans le remodelage de la chromatine ^{204, 216}. Lorsque les niveaux cellulaires de cette protéine sont diminués, la production virale et l'infectivité des virus sont compromises. De plus, lorsque qu'une partie spécifique de cette protéine est surexprimée (acides aminés 183 à 294), l'assemblage, la production virale et la réplication sont hautement affectés d'une manière trans-dominante ²¹⁶. INI1 serait donc une protéine cellulaire importante pour les étapes précoces de la réplication.

1.4.3 Protéines cellulaires impliquées, mais non incorporées

L'incorporation d'une protéine n'est pas nécessairement le critère qui détermine son importance pour l'accomplissement du cycle de réplication viral. En effet, plusieurs protéines cellulaires interagissent avec des composants viraux à un moment précis du cycle de réplication et ne sont pas pour autant encapsidés. Généralement, ces protéines

cellulaires semblent être importantes pour le début des étapes tardives du cycle de réplication (pour une revue de littérature, voir ¹³⁷). Quelques-unes de ces protéines sont discutées ci-dessous.

La protéine hnRNP A2 (« *heterogenous ribonucleoprotein A2* ») interagit spécifiquement avec des séquences A2REs (élément de réponse à hnRNP A2) localisées dans certains ARNs du VIH-1. Ces interactions sont importantes pour le transport de ces ARNs viraux et influencent même la localisation de pr55^{Gag} et de Vpr ¹¹. La protéine cellulaire hRIP (« *human Rev-interacting protein* ») n'y échappe pas non plus. Cette dernière est un cofacteur important pour la protéine Rev et promouvoit la relâche des ARNs du VIH-1 à l'extérieur de la région périnucléaire ¹⁷³. Plusieurs autres protéines cellulaires, telles que CRM1, REBP (« *kinesin-like Rev/Rex effector binding protein* ») et eIF-5α (« *eucaryotic initiation factor-5 alpha* ») ^{16, 49, 111, 199, 206}, interagissent aussi directement ou indirectement avec Rev. De plus, KIF-4, une protéine motrice cellulaire appartenant à la superfamille des kinésines, s'associe à pr55^{Gag} dans la cellule. Comme KIF-4 est un moteur cellulaire pouvant potentiellement transporter les protéines cellulaires cytoplasmiques et les vésicules jusqu'à la membrane cellulaire, il pourrait être impliqué au niveau du transport de pr55^{Gag} dans les cellules infectées via le réseau de microtubule formant le cytosquelette ¹⁹¹. La protéine TRBP (« *TAR RNA-binding protein* »), se lie à l'élément TAR de tous les ARNs viraux et permet une activation de l'expression des gènes viraux dans un contexte PKR dépendant ou PKR indépendant ^{46, 54}. Finalement, la protéine HP68, un inhibiteur cellulaire de la Rnase L, s'associe à pr55^{Gag} tout juste après sa traduction afin de jouer le rôle de chaperonne moléculaire. En

effet, son association avec pr55^{Gag} semble promouvoir un changement conformationnel qui est essentiel à l'assemblage des capsides immatures ²¹⁹.

1.5 LA PROTÉINE CELLULAIRE STAUFEN

1.5.1 Staufen chez la drosophile

Staufen appartient la famille de protéines liant l'ARN double brin (dsRBP). Elle fût d'abord identifiée en 1991 chez la drosophile par St-Johnston et collaborateurs ¹⁸⁵. Chez la drosophile, Staufen (dStaufen) joue un rôle essentiel dans la formation de l'axe antérieur-postérieur et représente le premier facteur cellulaire à être identifié comme étant critique à la localisation de l'ARNm ¹⁸⁶. dStaufen possède cinq domaines de liaison à l'ARN (dsRBD), mais seul les dsRBD 1, 3 et 4 semblent interagir fortement avec l'ARN ¹⁸⁷. Durant l'oogenèse, dStaufen s'associe à l'ARNm *oskar* afin que ce dernier puisse être transporté au pôle postérieur de l'oocyte ^{60, 185}. Cette association de dStaufen et *oskar* semble aussi avoir un rôle important à jouer dans la formation de la mémoire à long terme de la drosophile ⁵⁶. Plus tard dans l'oogenèse, dStaufen s'accumule au pôle antérieur de l'œuf afin d'y ancrer l'ARNm *bicoid* ^{63, 187}. Cette protéine joue aussi un rôle au niveau de la localisation d'ARN dans les cellules somatiques. En effet, elle s'associe avec l'ARNm *prospero* durant la division asymétrique des neuroblastes embryonnaires et médie la ségrégation de cet ARNm vers les cellules filles générées lors de la division ^{23, 177}. Le signal de localisation de ces trois ARNm est situé dans la région 3' non traduite (3'-UTR) ¹²⁷ et dStaufen s'associe *in vivo* au 3'-UTR de *bicoid* et *prospero* afin de médier la formation d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP) ^{63, 177}.

1.5.2 Staufen chez les mammifères

Un utilisant des ESTs (« *Expressed Sequenced Tags* ») humains en combinaison avec des séquences similaires à dStaufen comme oligonucléotides pour sonder une banque d'ADNc, le gène humain de Staufen a ensuite été isolé et caractérisé. La protéine humaine possède trente-huit pourcent (38 %) d'homologie avec dStaufen et la majorité de celle-ci est retrouvée au niveau des dsRBDs. Comparativement à son homologue de la drosophile, Staufen ne possède pas de dsRBD1, contient un domaine de liaison à la tubuline (TBD) et possède deux isoformes, une protéine de 55 kDa et une autre de 63 kDa, qui diffèrent au niveau de leur séquence N-terminale ²⁰⁷. Bien qu'elle possède plusieurs dsRBDs, seul le dsRBD3 semble posséder une implication majeure dans le processus de liaison à l'ARN puisque le dsRBD4 ne possède qu'une faible affinité pour celui-ci et que les dsRBD2 et 5, n'étant pas très bien conservés, ne sont pas impliqués ¹²⁶. ²⁰⁷. Exprimée de façon ubiquitaire, Staufen co-localise avec le réticulum endoplasmique rugueux, les microtubules et les polysomes. De plus, Staufen fait partie intégrante des granules d'ARNs qui migrent vers les dendrites des cellules neuronales ¹¹². Staufen est aussi exprimée au niveau des jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques. Elle

FIGURE 1.4 La protéine Staufén Comparaison schématique des différents domaines de la protéine Staufén chez la drosophile et l'humain. Les différents domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) sont représentés par des rectangles de couleur. Une même couleur est conservée pour chaque domaine homologue. TBD signifie domaine de liaison à la tubuline.

Staufen de la Drosophile (dStaufen)

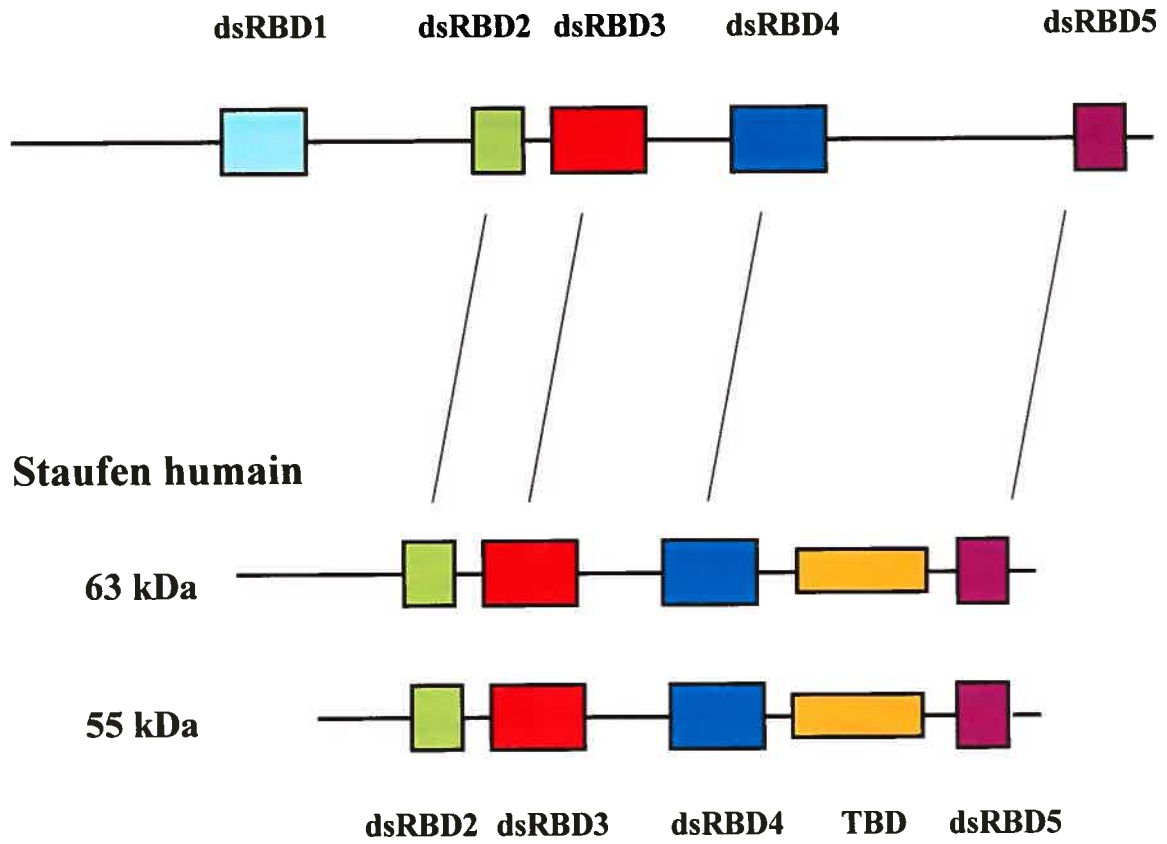


Figure 1.4

serait une composante de l'appareil post-synaptique et contribuerait à la maturation et la plasticité des jonctions neuromusculaires⁹. Comme chez la drosophile, Staufen semble donc impliquée dans le transport des ARNs messagers afin de leur permettre une traduction localisée dans le cytoplasme^{9, 132, 207}.

Une étude protéomique récente de Staufen dans les cellules 293T vient appuyer plusieurs hypothèses mentionnées au cours des études précédentes²⁰⁰. En effet, après avoir purifié les complexes contenant Staufen, Villacé et collaborateurs ont découvert la présence de protéines ribosomales, de protéines du cytosquelette, de protéines motrices, de protéines régulatrices ainsi que de protéines nucléaires liant l'ARN²⁰⁰. La composition de ces complexes est donc consistante avec la possibilité que Staufen puisse jouer un rôle dans la régulation du transport et de la traduction de certains ARNm^{132, 200, 207}. De plus, une étude récente chez la grenouille (*Xenopus*) vient aussi donner beaucoup de poids à ces hypothèses. Yoon et collaborateurs ont démontré que Staufen était essentielle à la localisation de certains transcrits maternels lors du développement des oocytes et que son association avec des kinésines motrices suggérait encore une fois le déplacement de ces RNPs par la voie du cytosquelette²¹⁵.

1.5.3 Staufen dans le contexte du VIH-1

Chez le VIH-1, Staufen est incorporée dans les particules virales. En effet, des expériences d'immunoprécipitation suivies de RT-PCR ont démontré que Staufen était associée à l'ARN viral dans la cellule et dans la capsid du virus via son domaine majeur de liaison à l'ARN, le dsRBD3. Ce système semble conservé parmi les rétrovirus, car

Staufen est aussi retrouvée à l'intérieur du VIH-2 et du MLV¹³⁸. En surexprimant Staufen dans la cellule, on observe une augmentation de l'ARNg encapsidé¹³⁸. De plus, nos données récentes démontrent que la liaison de Staufen à l'ARN implique l'ARNg et non ceux épissés, ce qui indique une interaction spécifique dans le contexte du VIH-1. Nos résultats démontrent également que Staufen interagit avec pr55^{Gag} via son domaine NC³⁵ et que sa surexpression provoque des défauts d'assemblage, de relâche et d'infectivité des nouveaux virions^{138, 139}. Toutes ces données nous suggèrent donc fortement que Staufen possède un rôle important associé aux étapes d'assemblage et d'encapsidation de l'ARN du cycle de réplication du VIH-1.

1.6 INTERFÉRENCE PAR L'ARN (ARNi)

L'ARNi est un mécanisme conservé à travers l'évolution de « *silencing* » de gènes spécifiques. Ce phénomène a d'abord été observé chez *C. elegans* où les longs ARNs double brin (ARNdb) produisent un « *silencing* » séquence spécifique des gènes⁶⁵. Ces longs ARNdb sont généralement clivés par un enzyme nommé DICER en petits fragments de 21-23 pb que l'on appelle siRNA (« *small interfering RNA* »). Ces siRNA sont ensuite recrutés par un complexe ribonucléoprotéique nommé RISC (« *RNA induced silencing complex* »). Ce dernier est principalement composé d'une hélicase et d'une endonucléase. Dans ce complexe RISC, le siRNA est déroulé et le brin antisens sert ensuite de guide afin de bien cibler l'ARNm homologue vers la dégradation¹⁸⁸ (voir Figure 1.5).

FIGURE 1.5 Mécanisme de l'interférence par l'ARN (ARNi) Les longs ARNs double brin (ARNdb) sont clivés par la DICER en fragment de 21-23 pb contenant 2 nucléotides non pairés à l'extrémité 3' de chaque brin. Cette réaction a été documentée principalement chez les eucaryotes inférieurs. Chez les eucaryotes supérieurs, l'ARNdb active la réponse à l'interféron et une inhibition non spécifique des gènes est engendrée. Les siRNA synthétiques sont convertis en siRNA fonctionnels grâce des kinases cellulaires qui leur ajoutent des groupements phosphates sur l'extrémité 5' des brins. Les siRNA sont ensuite recrutés par le complexe RISC. Ce dernier contient une hélicase permettant de transformer le duplex d'ARN en ARN simple brin et une endonucléase responsable de l'activité de clivage de l'ARNm ciblé. Le brin antisens de l'ARN sert de guide au complexe RISC pour cibler l'ARNm homologue. L'ARNm est par la suite clivé et dégradé. Figure adapté de ¹⁸⁸.

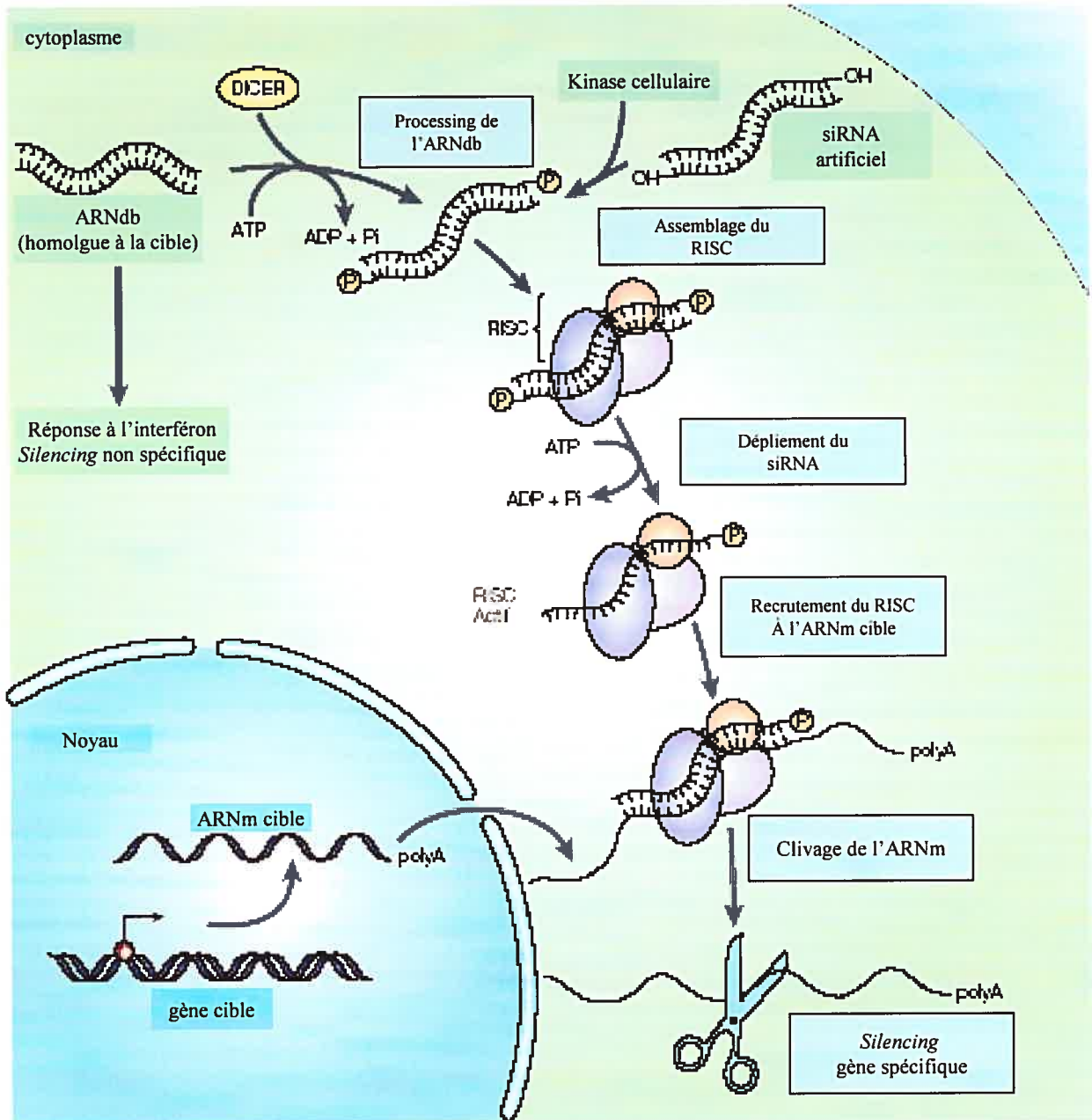


Figure 1.5

Dans les cellules de mammifères, la réponse à l'interféron est induite par les longs ARNdb suite à l'activation de PKR¹¹⁴. Toutefois, les siRNA de 21-23 pb ne semblent pas activer PKR et la réponse à l'interféron^{29, 58}. Des siRNA artificiels peuvent donc être introduits à l'intérieur de la cellule et être recrutés par le complexe RISC afin de dégrader un ARNm spécifique⁵⁸. Jusqu'à présent, l'utilisation des siRNA dans les systèmes de culture cellulaire s'est montrée efficace pour inhiber la réplication virale ou bloquer l'expression génique de plusieurs virus tels que le poliovirus, le virus de l'hépatite C, le virus de l'hépatite B, le virus du papillome et le VIH-1^{19, 30, 40, 81, 99, 101, 119, 144}. Les résultats d'une étude ont cependant démontré une régulation à la hausse des gènes stimulés par l'interféron suite à l'introduction de siRNA dans les cellules¹⁸¹. Bien que la réponse interféron n'affectait pas la spécificité de l'ARNi, les effets décrits dans cette étude servent toutefois d'avertissement pour ceux qui considèrent l'utilisation *in vivo* des siRNA.

1.7 OBJECTIFS

Suite aux phénotypes obtenus à l'aide des études effectuées précédemment en condition de surexpression de Staufen^{35, 136, 138}, nous avons tenté de déterminer le rôle et l'importance de cette protéine dans le cycle de réplication du VIH-1. Nous avons donc étudié la réplication virale en diminuant l'expression de Staufen au niveau de la cellule. Afin d'y parvenir, nous avons pris avantage de la technique d'ARNi médiée par les siRNA^{58, 119, 144, 158}. L'objectif de mon projet de maîtrise était d'abord de développer cette technique d'ARNi dirigée contre la protéine cellulaire Staufen et ainsi obtenir une

diminution à la fois spécifique et significative de son expression. Une fois les conditions d'ARNi établies, nous avons pu co-transfecter un vecteur proviral dans le but d'étudier les conséquences de la baisse d'expression de Staufen sur la réplication du virus. Les expériences effectuées avaient donc pour objectifs de déterminer le rôle moléculaire de cette protéine au niveau du cycle viral et de mieux caractériser les interactions du virus avec l'hôte.

Dans le chapitre 3, je présenterai les résultats de nos différentes expériences : (1) Description des différentes techniques d'ARN interférence développées, (2) Caractérisation des effets intracellulaires de la diminution de Staufen sur le VIH-1, tels que la traduction des protéines virales et la stabilité de l'ARNg, (3) Analyse des effets de la diminution de Staufen sur le virus au niveau de sa production, de son infectivité et de son contenu en ARN génomique y seront présentés. L'analyse et la discussion qui résument l'ensemble des résultats présentés dans cet ouvrage seront présentées dans le chapitre 4.

Chapitre 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, je décrirai le matériel utilisé ainsi que toutes les méthodes appliquées pour atteindre les objectifs du projet.

2.1 Culture cellulaire

Les cellules 293T et les cellules Hela sont cultivées à 37°C dans du DMEM (« Dulbecco's modified Eagles Medium ») contenant 8% de sérum foetal bovin et des antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine). Les cellules lymphocytaires CEM-GFP, une lignée de cellules T stables contenant un plasmide codant pour une GFP étant sous le contrôle d'un promoteur LTR du VIH-1, sont cultivées dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum foetal bovin et du G418 (500 ug/ml). Cette lignée de cellules indicatrices CEM-GFP est un outil simple, rapide et direct afin de mesurer l'infectivité du VIH-1⁷⁷. Les cellules H9 sont cultivées dans du RPMI contenant 20% de sérum foetal bovin

2.2 Clones proviraux

La majorité des expériences sont réalisées à l'aide du clone proviral HxBru (*Vif+*, *vpr+*, *vpu-*, *nef-*) telle que décrit précédemment ²¹⁴. Toutefois, pour les expériences de microscopie électronique, nous avons utilisé le clone proviral complet pNL4.3 (*Vif+*, *vpr+*, *vpu+*, *nef+*) pour nous assurer de la représentativité morphologique des virions bourgeonnants. Toujours pour cette expérience, le vecteur HxB2c-p6(neg) est utilisé comme contrôle. Ce dernier est un clone proviral complet dans lequel la

séquence codant pour la leucine en N-terminal de p6 est mutée pour introduire un codon d'arrêt⁸³. Le phénotype résultant est donc une relâche virale déficiente.

2.3 Anticorps

Le Dr Luc DesGroseillers (U. de Montréal) a gracieusement fourni les anticorps monoclonaux de souris anti-Staufen 9E9 et 11C6. Le Dr John Hiscott (U. McGill) et le Dr Lawrence Kleimann (U. McGill) ont respectivement fourni l'anticorps monoclonal de souris anti-Stat1 et le monoclonal de souris anti-Actine. L'anti-gp120 polyclonal de lapin et l'anticorps monoclonal anti-MA de souris proviennent respectivement du laboratoire du Dr Eric Cohen (U. de Montréal) et du laboratoire du Dr Paul Spearman (gracieuseté du NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Nous avons acheté l'anticorps polyclonal anti-p24 de lapin chez Trinity Biotech (Carlsbad, CA), le monoclonal de souris anti-L7 chez Novus Biologicals (Littleton, CO) et le monoclonal anti-GAPDH de souris chez Reasearch Diagnostic Inc (Flanders, NJ).

2.4 Small interfering RNA (siRNA)

Afin de réussir à diminuer les niveaux d'expression de Staufen, nous avons choisi et testé quant à leur efficacité 4 différents siRNA. Suite à ces expériences préliminaires, nous avons déterminé que le siRNA 3084 (5'-AAA TAG CAC AGT TTG GAA ACT-3') était celui pouvant produire la meilleure diminution intracellulaire de Staufen. Il fût donc choisi pour effectuer toutes les expériences subséquentes. Les siRNA 3084 ont été générés à l'aide du Silencer siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, Texas) ou

synthétisés chimiquement (Qiagen-Xeragon, Germantown, MD). Le siRNA contrôle (siRNA Ctrl) provient de la librairie de Qiagen (cat. no.1022076 ; 5'-AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT-3'). Afin d'essayer une autre méthode d'ARN interférence, nous avons aussi introduit la séquence 3084 dans le vecteur pAVU6+27 (gracieuseté du Dr David R Engelke) telle que décrit précédemment ¹⁵⁹ afin de générer pAVU6+3084. Ce vecteur permet la génération de shRNA grâce à un promoteur reconnu par l'ARN polymérase 3 (promoteur du snRNA U6) et une séquence poly(U) de terminaison de la transcription.

2.5 Transfection des siRNA

Des cellules 293T sont mises en culture dans des plaques de 6 puits jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 60% pour ensuite être transfectées avec le siRNA Ctrl ou le siRNA 3084 (10 ou 20 nM) en utilisant la LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) aux conditions suggérées par le manufacturier. 16 à 20h post-transfection, les cellules sont transfectées une deuxième fois dans les mêmes conditions que la journée précédente, mais en ajoutant 1 μ g de vecteur HxBru au pool de transfection. 48h après la seconde transfection, les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X pour ensuite être lysées à l'aide d'une solution NP-40 1X (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, pH 7.3), incubées sur glace pendant 40 minutes et centrifugées à 13 000 rpm pour 30 minutes à 4°C. Les extraits cytosoliques sont ensuite divisés en deux parties égales afin de faire l'analyse du contenu protéique par Western Blot et du contenu en ARN par RT-PCR.

2.6 Western blot et immunoblots

Afin d'en déterminer la concentration protéique, les extraits cytosoliques sont quantifiés par la méthode de micro-Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme courbe de référence et une longueur d'onde de 595 nm pour mesurer la densité optique. Entre 20 et 40 µg de protéines sont mises sur gel de polyacrylamide 12% avec SDS. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 4°C pour 2 heures (200 mA). La membrane est bloquée avec du TBS (20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4)-10% lait-0,05% Tween 20 et ensuite incubée avec l'anticorps primaire (voir la section 2.3 ci-dessus pour déterminer la provenance et le type des différents anticorps) pour environ 75 minutes. La membrane est par la suite lavée 3 fois avec du TBS-0,05% tween 20 et incubée pour 30 minutes avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris ou de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La membrane est ensuite lavée 4 fois pendant 15 minutes et la présence des anticorps est révélée par ECL (« *enhanced chemiluminescence* ») telle que décrit précédemment²¹¹.

2.7 RT-PCR

Les extraits cytosoliques sont traités à l'aide d'un tampon urée et de phénol-chloroforme-alcool isoamylique pour extraire l'ARN cellulaire. L'ARN est ensuite précipité à l'aide de 2,5 volumes d'éthanol 95% et 0,1 volume de NaOAc 3M, pH 5,5. Les culots sont resuspendus dans de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) et la concentration en ARN est ensuite déterminée par densité optique. Une quantité

équivalente à 1 ug d'ARN totale est ensuite utilisée pour l'étape de RT-PCR (Superscript One-Step RT-PCR with platinum Taq, Invitrogen). Les ARNm sont spécifiquement amplifiés à partir des oligonucléotides suivants : *staußen* (produit PCR de 337 pb), sens 5'-aatctagaCAA CTC AGA CAG CAA CTT TAA GAT GC-3' et antisens 5'-aatctagaTTT ACC AGG GCA GCT CCG AA-3' ; *ARNg 9 kb* du VIH-1 (produit PCR de 430 pb), sens 5'-CTG AGC CTG GGA GCT CTC TGG C-3' et antisens 5'-TCC AGT GAT TTT TTT CTC CAT GCT TGC CCA TAC TAT ATG TTT-3' ; *gapdh* (produit PCR de 250 pb), sens 5'-GCT GAT GCC CCC ATG TTC GT-3' et antisens 5'-CAA AGG TGG AGG AGT GGG TGT-3'.

2.8 Purification des particules virales

Les virus produits à partir des cellules 293T transfectées sont d'abord clarifiés par centrifugation à basse vitesse (Centrifugeuse Beckman GR-6S, 3000 rpm, 30 min, 4°C) et ensuite culottés par ultracentrifugation à travers un coussin de sucrose 20% (Beckman XL-80, rotor SW41, 35000 rpm, 1h à 4°C). Le culot viral est par la suite resuspendu avec du tampon TN (50 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7.5) comme décrit précédemment ¹⁷⁰.

2.9 Quantification des particules virales par ELISA p24

Les virus sont quantifiés à l'aide d'un essai enzymatique dirigé contre les protéines de la capsid virale (p24) tel que décrit précédemment ²⁰. Des plaques de 96 puits à fond plats furent initialement recouvertes avec un anticorps monoclonal anti-p24

(183 H12-5C ; gracieuseté du NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Après que les puits soient lavés et bloqués à l'aide d'une solution PBST contenant 2% de protéines albuminiques de sérum bovin (ASB), différentes concentrations connues de protéine p24 (p24 recombinant purifié, Research Diagnostics Inc.) servant à établir une courbe de référence ainsi que différentes dilutions de lysats viraux sont ajoutées aux puits. Après 60 minutes d'incubation à 37°C, les puits sont lavés et un anticorps monoclonal anti-p24 biotinylé (31-90-25 ; gracieuseté du Dr Michel Tremblay) est ajouté pour une période de 60 minutes à 37°C. Les puits sont encore une fois lavés et un conjugué Streptavidine-Peroxydase est ensuite ajouté (Streptavidin-HRP-40 ; Research Diagnostics Inc.) pour environ 30 minutes. Cette étape est suivie par l'addition du substrat TMB-S (Research Diagnostics Inc.) et la réaction enzymatique est arrêtée après 15-20 minutes d'incubation en ajoutant du H₃PO₄ 1M. Finalement, les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 450 nm et les quantités de p24 sont calculées en fonction de la courbe standard de p24 recombinants dans une gamme linéaire de 31,25 à 2,000 pg/ml.

2.10 Essai de protection à la ribonucléase (RPA)

Une sonde ARN chevauchant le site majeur d'épissage (SD) est choisie afin de permettre l'identification des ARNs non-épissés, épissés et totaux (comme décrit précédemment ³⁹). La sonde est générée en sous-clonant le fragment PCR *Apal-ClaI* (nt 297-831) amplifié à partir de l'ADN de HxBru dans le vecteur pBluescript/KS+ (Stratagen, La Jolla, Californie). La sonde ARN radioactive est ensuite générée par transcription *in vitro* à l'aide de la polymérase T7, d'UTP (α -³²P) et du plasmide

linéarisé avec *BspEI* (nt 309). L'ADN du vecteur est digéré à l'aide d'un traitement à la DNase1 (Invitrogen) et la sonde est purifiée par électrophorèse sur gel 5% polyacrylamide-urée 8M. La sonde est par la suite éluée pendant 16 heures à température pièce et précipitée à l'éthanol.

48 h après la transfection des vecteurs proviraux dans les cellules 293T, l'ARN est extrait des cellules et des virus purifiés sur gradient de sucrose à l'aide de leur tampon de lyse respectif comme décrit précédemment³⁹. Les ARNs sont digérés à la DNase1 pendant 30 minutes à 37°C pour éliminer l'ADN et sont ensuite traités à la protéinase K pendant 20 minutes à 37°C, suivie de deux extractions au phénol:chloroforme, d'une extraction au chloroforme et d'une précipitation à l'éthanol. Les essais sont effectués à l'aide du kit RPA II en accord avec le protocole du manufacturier (Ambion). Les virus sont quantifiés comme mentionné ci-dessus et une quantité d'ARN viral équivalente à 50 ng de p24 est ensuite hybridée à 10⁵ cpm de la sonde antisens marquée au ³²P pendant 18 heures à 42°C. En ce qui concerne l'ARN cellulaire, une quantité équivalente à 5 ug d'ARN (déterminé par densité optique) est utilisée pour l'hybridation. Les fragments protégés suite à la digestion à la RNase (30 minutes, 37°C) et à la précipitation à l'éthanol sont séparés par électrophorèse sur gel 5% polyacrylamide-urée 8M et révélés par autoradiographie.

2.11 Test d'infectivité à un seul cycle de réplication

Les virus présents dans le surnageant des cellules 293T transfectées avec le vecteur HxBru et le siRNA contrôle ou le siRNA 3084 sont quantifiés par ELISA p24 comme décrit ci-dessus. Une quantité équivalente de virus (25 ng de p24) est ensuite utilisée pour infecter 8×10^5 cellules CEM-GFP⁷⁷ dans un volume final de 200 μ l en présence de 10 μ g/ml de Polybrene (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), un polymère chargé positivement qui permet de neutraliser la surface chargée négativement des cellules. 3 heures post-infection, les cellules furent resuspendues dans 10 ml de milieu de culture frais. Après 48 h d'incubation, les cellules sont culottées, lavées deux fois avec du PBS et fixées avec 1% formaldéhyde dans du PBS. La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur Fusion-Alpha (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde de 525 nm pour l'émission. Les données sont exprimées en fonction de leur infectivité relative où l'infectivité des virus HxBru traités avec un siRNA contrôle fût arbitrairement attribuée de la valeur 1.

2.12 Analyse du cycle cellulaire

Les cellules 293T sont transfectées avec les siRNA dans les conditions mentionnées précédemment dans cet ouvrage et ensuite analysées quant à leur contenu en ADN grâce à la méthode de cytofluorométrie en flux (FACS). Brièvement, les cellules sont lavées une fois à l'aide de PBS 1X et resuspendu dans l'éthanol 80% pour 30 minutes à 4°C. Après un lavage supplémentaire au PBS 1X, les cellules sont traitées

avec 180U/ml de RNase A. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont traitées à l'Iodure de propidium (30 ug/ml de PBS) et ensuite analysées quant à leur contenu en ADN par FACS.

2.13 Essai Luciférase

Les essais luciférase sont effectués à l'aide du « Luciferase Assay Kit » (Promega Mississauga, Canada), du vecteur pLTR-Luc⁵⁵ (gracieusement offert par le Dr A. Gatignol) et du vecteur pCMV-Tat¹¹. Brièvement, les cellules sont transfectées de la même façon que décrit précédemment dans cet ouvrage, à l'exception du fait que 1 ug de vecteur pLTR-Luc et 1 ug de vecteur pCMV-Tat soient ajoutés au pool de transfection au lieu du vecteur HxBru. 48 h après la transfection de ces vecteurs, les cellules sont lysées en accord avec le protocole du manufacturier et analysées quant à l'expression de la luciférase. Les données, en unité relative de lumière (URL), sont recueillies à l'aide d'un luminomètre Lumat Berthold et sont normalisées quant à la quantité totale de protéines cellulaires déterminée par micro-Bradford.

2.14 Analyses statistiques

Les données sont représentées par la moyenne \pm erreur standard (SE) où SE = écart type/ \sqrt{n} (n = le nombre de d'échantillon). Les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide d'un test t et du programme informatique PRISM. Les valeurs où $P < 0,05$ ont été considérées comme étant significatives.

Chapitre 3. RÉSULTATS

3.1 INTERFERENCE PAR L'ARN DIRIGÉE CONTRE STAUFEN

Afin d'étudier la fonction de Staufen au niveau du cycle de réplication du VIH-1, il nous a premièrement fallu mettre au point la technique de l'ARNi en ciblant cette protéine cellulaire.

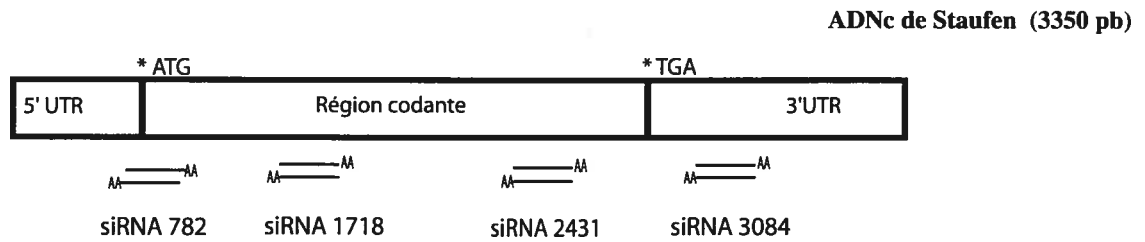
3.1.1 Sélection des séquences cibles pour l'ARNi

Nous avons analysé l'ADNc de Staufen afin de trouver des séquences pouvant potentiellement servir de cible. Nos critères de sélections ont été ceux qui sont aujourd'hui à la base des algorithmes qui permettent la sélection de ces séquences^{168, 178}, c'est-à-dire une séquence de 21 nucléotides, commençant par deux adénosines consécutives, ayant un pourcentage de G/C riche d'environ 30-50% et qui est unique à l'ARNm de Staufen³. Au total, quatre séquences ont été sélectionnées (Figure 3.1).

3.1.2 Approches expérimentales développées

Après la sélection des séquences cibles, nous avons voulu évaluer leur efficacité. Nous avons donc procédé à des essais préliminaires en utilisant la technique proposée par la compagnie Ambion. Cette méthode permet la génération de siRNA duplex grâce à la technique de transcription *in vitro* médiée par la polymérase T7. Par la suite, nous avons transfecté les quatre différents siRNA en accord avec le protocole

FIGURE 3.1 Illustration schématique des endroits ciblés par les différents siRNA dirigés contre Staufen. ADN complémentaire de la protéine Staufen. Les positions des quatre séquences y sont représentées de façon schématique et approximative. Les positions des codons de départ (ATG) et d'arrêt (TGA) sont indiquées par un astérisque.



Nom séquences ciblées par les siRNA

782	AAATGCACTGTGCATGAAACT
1718	AAGACACCCATAAAGAAACCA
2431	AAAATACTGAAACTGCTTTGA
3084	AAATAGCACAGTTTGGAAACT

Figure 3.1

FIGURE 3.2 Diminution de l'expression intracellulaire de la protéine Staufén médiée par différentes techniques d'ARNi. Analyse par Western Blot des niveaux d'expression de Staufén 48h après la transfection des cellules 293T. A) Les cellules sont transfectées à l'aide de 100 nM de siRNA Ctrl ou de siRNA 3084 générés grâce au Silencer siRNA construction kit de Ambion. B) Les cellules sont transfectées avec 0, 2, 4 et 6 ug de vecteur pAVU6+3084. C) Les cellules sont transfectées avec 10 nM de siRNA Ctrl ou 3084 synthétisés chimiquement par Qiagen. D) Les cellules sont transfectées dans les mêmes conditions que C) à l'exception du fait que les siRNA ont été préalablement marqués à la rhodamine. La présence de GAPDH est révélée afin de démontrer la spécificité de la technique et de pouvoir contrôler la quantité totale de protéines cellulaires mise sur gel. Mock (M) signifie qu'aucun siRNA n'a été transfecté, alors que Ctrl et 3084 désignent respectivement le siRNA Contrôle et le siRNA 3084.

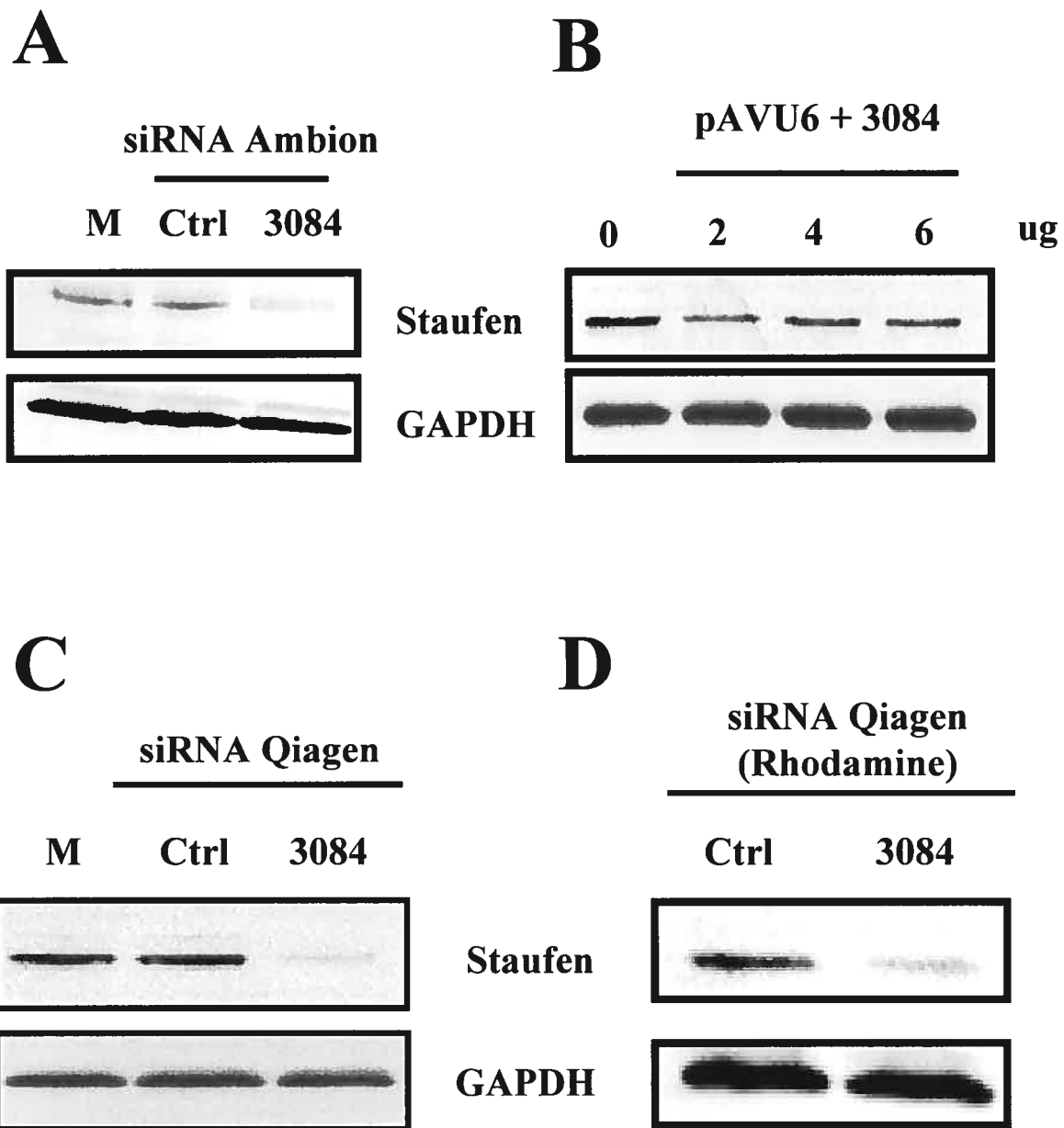


Figure 3.2

mentionné dans les matériels et méthodes et ce, dans le but de trouver des conditions optimales d'utilisation pour les cellules 293T. Après différentes expériences, nous en sommes venus à la conclusion que seule la séquence 3084 possédait un effet potentiel (résultats non présentés dans cet ouvrage). L'accessibilité réduite par la présence de structures secondaires dans l'ARNm aux endroits ciblés par les siRNA 782, 1718 et 2431 est probablement la raison expliquant l'inefficacité de ces derniers. Nous avons donc concentré nos efforts sur la séquence 3084 pour finalement obtenir une baisse d'expression significative de Staufen en utilisant 100 nM de siRNA 3084 dans les conditions de transfection. Les niveaux d'expression intracellulaire de Staufen furent analysés par Western Blot et les résultats sont présentés dans la Figure 3.2A. L'absence de diminution de GAPDH démontre que la diminution d'expression est spécifique à la protéine Staufen.

Dans le but d'élargir et de perfectionner nos techniques de travail, nous avons ensuite cloné cette séquence 3084 dans le vecteur pAVU6+27¹⁵⁸ afin d'obtenir le vecteur pAVU6+3084 (voir matériels et méthodes). Cette technique, utilisant un vecteur générant des shRNA (pour de plus amples détails, voir référence¹⁵⁹) a été choisi en raison de sa facilité d'utilisation et de son succès obtenus avec la protéine cellulaire Lamine A/C. Nous avons transfecté différentes quantités du vecteur pAVU6+3084 (0, 2, 4, et 6 ug) pour ensuite lyser les cellules 48 h post-transfection et analyser l'expression de Staufen par Western Blot. Une diminution d'expression d'environ 50% est observée lors de la transfection de 2 ug de vecteur (figure 3.2B).

Dans le but d'obtenir des siRNA 3084 d'une plus grande pureté pour améliorer l'efficacité de transfection, nous les avons fait synthétiser chimiquement (Qiagen, Purification HPP). Par co-transfection comme précédemment, nous avons obtenu la meilleure baisse d'expression de Staufen. En utilisant seulement 10 nM de siRNA 3084, nous avons obtenu une diminution de la quantité intracellulaire de Staufen d'environ 80% en comparaison avec celle observée en utilisant le siRNA Ctrl (Figure 3.2C).

Encore une fois dans le but d'améliorer ce pourcentage, nous avons fait modifier ces siRNA 3084 en leur faisant ajouter une modification chimique fluorescente (rhodamine) sur l'extrémité 3' du brin sens (Qiagen, Purification HPLC). Après la première transfection, les cellules 293T furent triées par cytofluorométrie en flux en fonction de leur positivité pour la rhodamine et seules les cellules exprimant la rhodamine ont été transfectées une seconde fois. 48h après cette deuxième transfection, les cellules sont lysées et analysées par Western Blot. La diminution intracellulaire de Staufen est significative par cette méthode (Figure 3.2D), mais n'est cependant pas améliorée par rapport à celle obtenue avec la technique précédente (Figure 3.2C).

En raison de leur efficacité, leur accessibilité et leur facilité d'utilisation, nous avons donc décidé d'utiliser les siRNA 3084 générés par la compagnie Qiagen (Figure 3.2C) afin d'effectuer toutes les autres expériences qui sont présentées dans ce mémoire.

3.1.3 Analyse de la réponse à l'interféron

Suite à une étude de Sledz et collaborateurs démontrant que la transfection de siRNA peut potentiellement engendrer l'activation de la réponse à l'interféron médiée par voie de signalisation Jak/Stat¹⁸¹, nous avons voulu vérifier cette possibilité afin d'éviter tout problème d'interprétation de résultats quant à la traduction. Nous avons par conséquent adopté les mêmes approches expérimentales et vérifié les niveaux d'expression de Stat1 dans les cellules 293T suite à la transfection de différentes concentrations de siRNA Ctrl ou 3084 (10 et 50 nM). Les cellules furent lysées 48 h post-transfection et analysées par Western Blot. Les résultats démontrent clairement que les niveaux d'expression de Stat1 sont tous similaires à celui observé dans les cellules non transfectées (Mock) (Figure 3.3). Les niveaux d'expression de Staufen sont analysés afin de démontrer l'efficacité des duplexes siRNA 3084. Les niveaux constants d'actine et de GAPDH démontrent encore une fois la spécificité de nos siRNA et servent de contrôle quant à la quantité totale de protéines mise sur gel. Afin de s'assurer que Stat1 est un marqueur de la réponse interféron activée dans les cellules 293T tout comme dans les cellules lymphocytaires (H9), nous avons traité ces deux types cellulaires en présence d'interféron pendant 24 h (1000 unités d'interféron alpha par ml de milieu de culture). L'expression de Stat1 est augmentée dans les deux types cellulaires traités avec l'interféron (Figure 3.3). Ceci démontre donc la validité de Stat1 comme marqueur de la réponse interféron activée pour les cellules 293T. Afin d'approfondir l'étude, il serait aussi important de vérifier si la transfection des siRNA active indirectement PKR. Pour le prouver, il suffirait simplement de démontrer par Western Blot que la phosphorylation

FIGURE 3.3 Le siRNA 3084 n'active pas la réponse à l'interféron. A) Analyse des niveaux d'expression des protéines Staufen et Stat1 suite à la transfection de 10 ou 50 nM de siRNA Ctrl ou 3084. Actine et GAPDH sont révélées afin de contrôler la quantité totale de protéines mise sur gel. B) Les cellules 293T et H9 sont incubées 24h en absence ou présence d'interféron alpha (1000 U/ml) afin de démontrer que Stat1 est un indicateur de la réponse interféron activée pour ces deux lignées cellulaires. Mock signifie qu'aucun siRNA n'a été transfecté, alors que Ctrl et 3084 désignent respectivement le siRNA Contrôle et le siRNA 3084. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois.

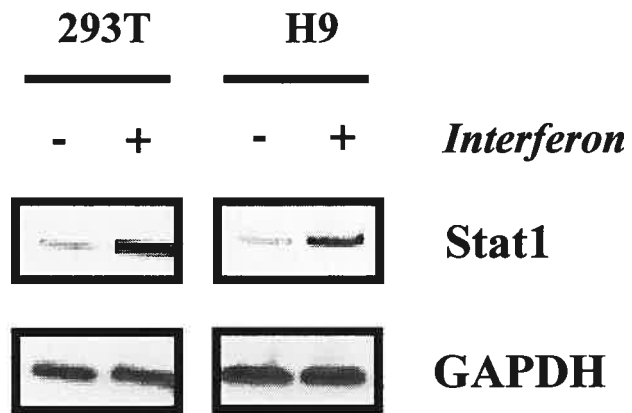
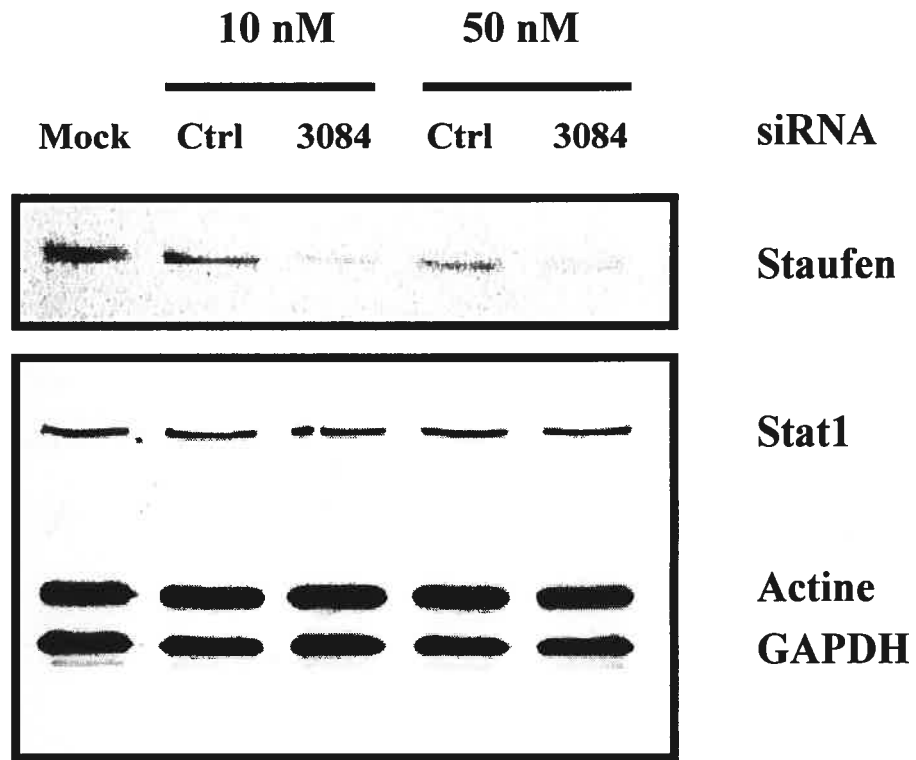


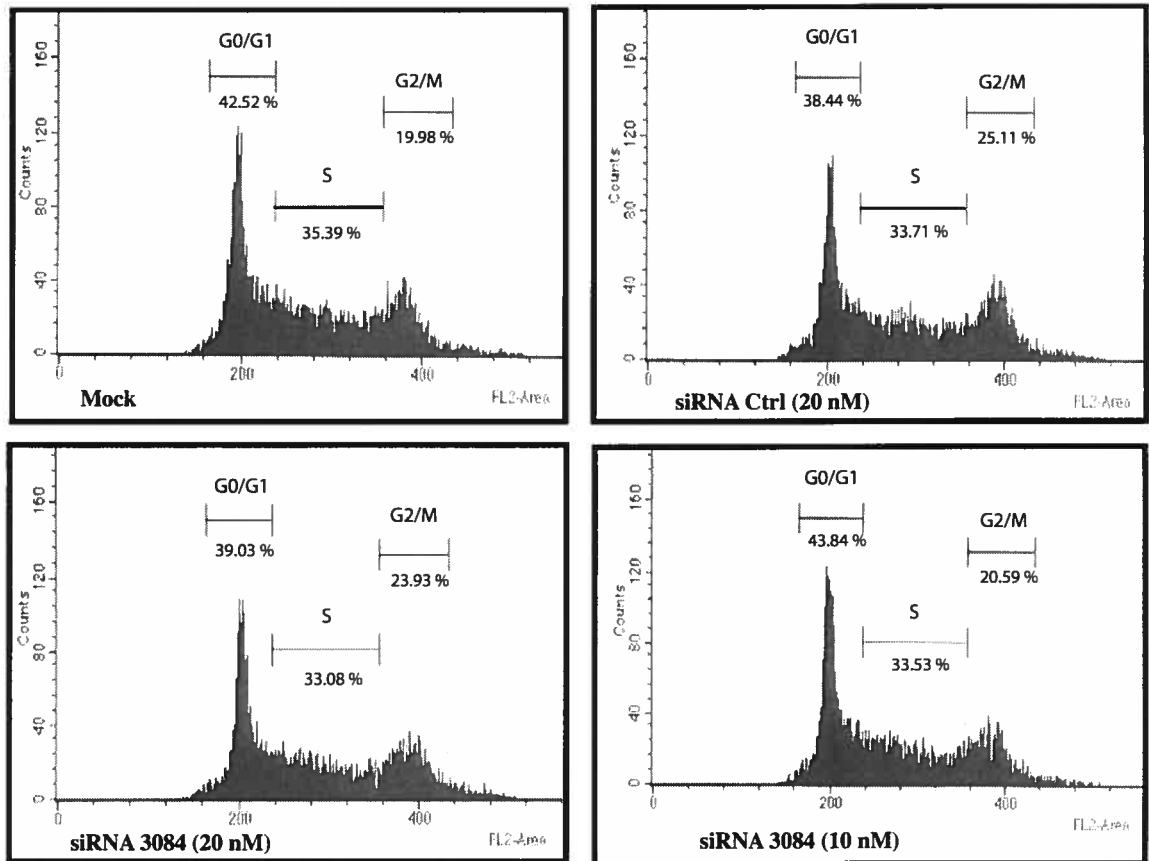
Figure 3.3

de eIF2 α , un substrat de PKR, n'est pas augmentée suite à la transfection des siRNA¹⁸¹.

3.1.4 Analyse du cycle cellulaire

Afin de pouvoir adéquatement interpréter les futurs résultats impliquant la réplication du VIH-1 dans les 293T, nous avons vérifié l'effet de la diminution de Staufen sur les différentes étapes du cycle cellulaire (Figure 3.4). Les cellules sont donc transfectées avec de l'eau (mock), 20 nM de siRNA Ctrl et 10 ou 20 nM de siRNA 3084. 48 h post-transfection, les cellules sont traitées à l'iodure de propidium et analysées quant à leur contenu en ADN par cytofluorométrie en flux (FACS). Pour chacune des conditions de transfection, aucun effet majeur, en comparaison avec la condition mock, n'est observé quant aux phases G₀/G₁ (environ 40%), S (environ 33%) et G₂/M (environ 20-25%). Il nous reste cependant à effectuer un contrôle positif afin de compléter cette figure. En effet, l'analyse du cycle cellulaire des cellules 293T traitées au Nocodazole nous permettrait de valider la technique (contrôle positif). Il est à noter que cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois.

FIGURE 3.4 Les siRNA 3084 n'affectent pas le cycle cellulaire des 293T. Les cellules 293T sont transfectées avec de l'eau (Mock), 20 nM de siRNA Ctrl et 10 ou 20 nM de siRNA 3084. 48 h post-transfection, les cellules sont traitées à l'iodure de propidium et analysées par cytofluorométrie en flux (FACS) tel que mentionné dans les matériels et méthodes. Les différentes étapes du cycle cellulaire ainsi que leur pourcentage associé y sont identifiés. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.



	Phase du cycle cellulaire		
	G0/G1	S	G2/M
Mock	42.52%	35.39%	19.98%
siRNA Ctrl (20 nM)	38.44%	33.71%	25.11%
siRNA 3084 (20 nM)	39.03%	33.08%	23.93%
siRNA 3084 (10 nM)	43.84%	33.53%	20.59%

Figure 3.4

3.2 EFFETS DE LA DIMINUTION D'EXPRESSION DE STAUFEN SUR LE CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1

Une fois le système d'ARNi optimisé pour inhiber la protéine Staufen, nous avons voulu vérifier les effets de cette diminution sur la réplication du VIH-1.

3.2.1 Profils d'expression de pr55^{Gag}

Nous avons évalué les profils d'expression intracellulaire de différentes protéines du VIH-1. Les cellules sont transfectées avec de l'eau (mock), 20 nM de siRNA Ctrl et 10 ou 20 nM de siRNA 3084 (voir matériels et méthodes) et analysées 48h après la transfection du vecteur proviral HxBru. Ces études démontrent que les niveaux d'expression de pr55^{Gag} sont diminués 30-35% lorsque les niveaux d'expression de Staufen sont abaissés d'environ 65-70% par les siRNA (Figure 3.5B). Les formes matures de pr55^{Gag} telles que p24 CA et p17 MA (résultat non présenté) sont aussi diminuées alors que les niveaux d'actine restent constants. Afin de vérifier si la diminution de Staufen influence l'expression du LTR nous avons transfecté le vecteur pLTR-luc⁵⁵ en utilisant les mêmes conditions mentionnées ci-dessus pour HxBru, à l'exception de l'ajout du vecteur pCMV-Tat afin stimuler l'expression du gène rapporteur. Comme le démontre la figure

FIGURE 3.5 La diminution de Staufen affecte les niveaux intracellulaires de pr55^{Gag}. A) Analyse des niveaux d'expression de Staufen et des protéines structurales du VIH-1 48h après la transfection du clone proviral HxBru dans les cellules 293T. Les cellules sont co-transfectées avec le plasmide HxBru et 20 nM de siRNA Ctrl (rangée 2) ou 20 et 10 nM de siRNA 3084 (rangées 3 et 4). La présence de Staufen, pr55^{Gag}, p24 CA, actine et GAPDH pour chaque condition y est dévoilée. B) Histogramme représentant l'abondance intracellulaire relative de Staufen, pr55^{Gag}, p24 CA et d'actine pour 4 expériences indépendantes telles que mentionnées en A. Le groupe HxBru + siRNA Ctrl représente la quantification effectuée pour les conditions de transfection avec 20 nM de siRNA Ctrl, alors que le groupe HxBru + siRNA 3084 représente la quantification effectuée pour des conditions de 20 nM ou 10 nM de siRNA 3084. Les barres d'erreur standard (SE) y sont représentées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t. *P < 0,05 versus le groupe contrôle HxBru + siRNA Ctrl. C) Co-transfection des cellules 293T avec le siRNA Ctrl (10 nM) ou le siRNA 3084 (10 nM) et de 1 ug du plasmide LTR-Luciférase et 1 ug de pCMV-Tat. 48h post-transfection, les cellules sont lysées et analysées quant à l'expression de la luciférase à l'aide d'un luminomètre. Les données sont normalisées à une même concentration en protéine déterminée par micro-Bradford et sont exprimées en unité relative de lumière par ug de protéine (URL/ug).

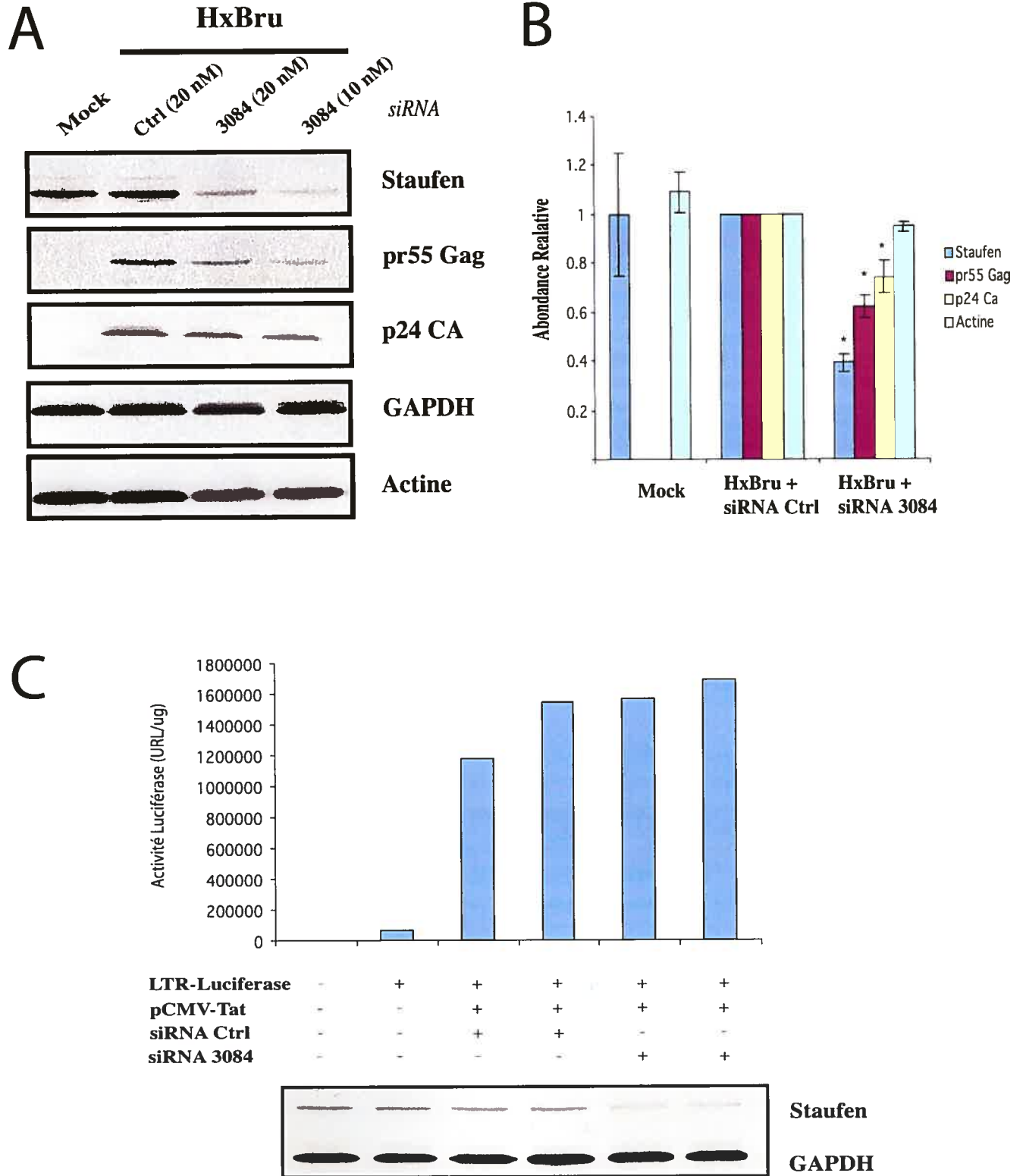


Figure 3.5

3.5C, l'expression de la luciférase n'est pas affectée par la présence de l'un ou l'autre des siRNA. Ceci nous indique par conséquent que la baisse d'expression observée pour pr55^{Gag} (Figure 3.5A) n'est pas due à une expression réduite du LTR lorsque Staufen est diminuée par ARNi.

3.2.2 Niveaux intracellulaires de l'ARN génomique

Comme Staufen se retrouve dans les mêmes complexes RNPs que l'ARNg du VIH-1, nous avons voulu vérifier l'effet de sa diminution sur cet ARN viral. Les cellules furent transfectées dans les mêmes conditions mentionnées que dans la figure 3.5 et analysées par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques pour l'ARNm de Staufen, l'ARNg et l'ARNm de GAPDH afin de contrôler la quantité totale d'ARN. Les résultats démontrent que les niveaux d'ARNg sont diminués d'environ 50% en présence des siRNA dirigés contre Staufen (Figure 3.6A). Afin de confirmer ce résultat, l'analyse de l'ARNg est aussi effectuée par la méthode de RPA. Des résultats similaires furent observés (Figure 3.6B).

3.2.3 Production virale

Suite aux observations précédentes, nous avons voulu quantifier le nombre de particules virales relâchées dans le surnageant lorsque l'expression de Staufen est diminuée. Les cellules 293T transfectées avec le siRNA Ctrl (10 nM) ou le siRNA 3084 (10 nM) et co-transfectées une seconde fois avec le plasmide HxBru. 48 h après la transfection du clone proviral, les surnageants sont récoltés et quantifiés par ELISA p24.

FIGURE 3.6 La baisse d'expression de Staufen affecte les niveaux d'ARN génomique 9 kb (ARNg) intracellulaire du VIH-1. A) Analyse par RT-PCR des niveaux intracellulaires de l'ARNm de Staufen et de l'ARN génomique de 9 kb du VIH-1, 48 h après la co-transfection du clone proviral HxBru avec 20 nM de siRNA Ctrl (rangée 2) ou de 20 nM (rangée 3) et 10 nM (rangée 4) de siRNA 3084. L'ARN de chaque condition est reverse transcrit à l'aide d'oligonucléotides spécifiques pour Staufen, l'ARNg et GAPDH afin de contrôler la quantité totale d'ARN cellulaire. B) Analyse par RPA de l'ARNg cellulaire du VIH-1 pour les mêmes conditions que mentionnées en A). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

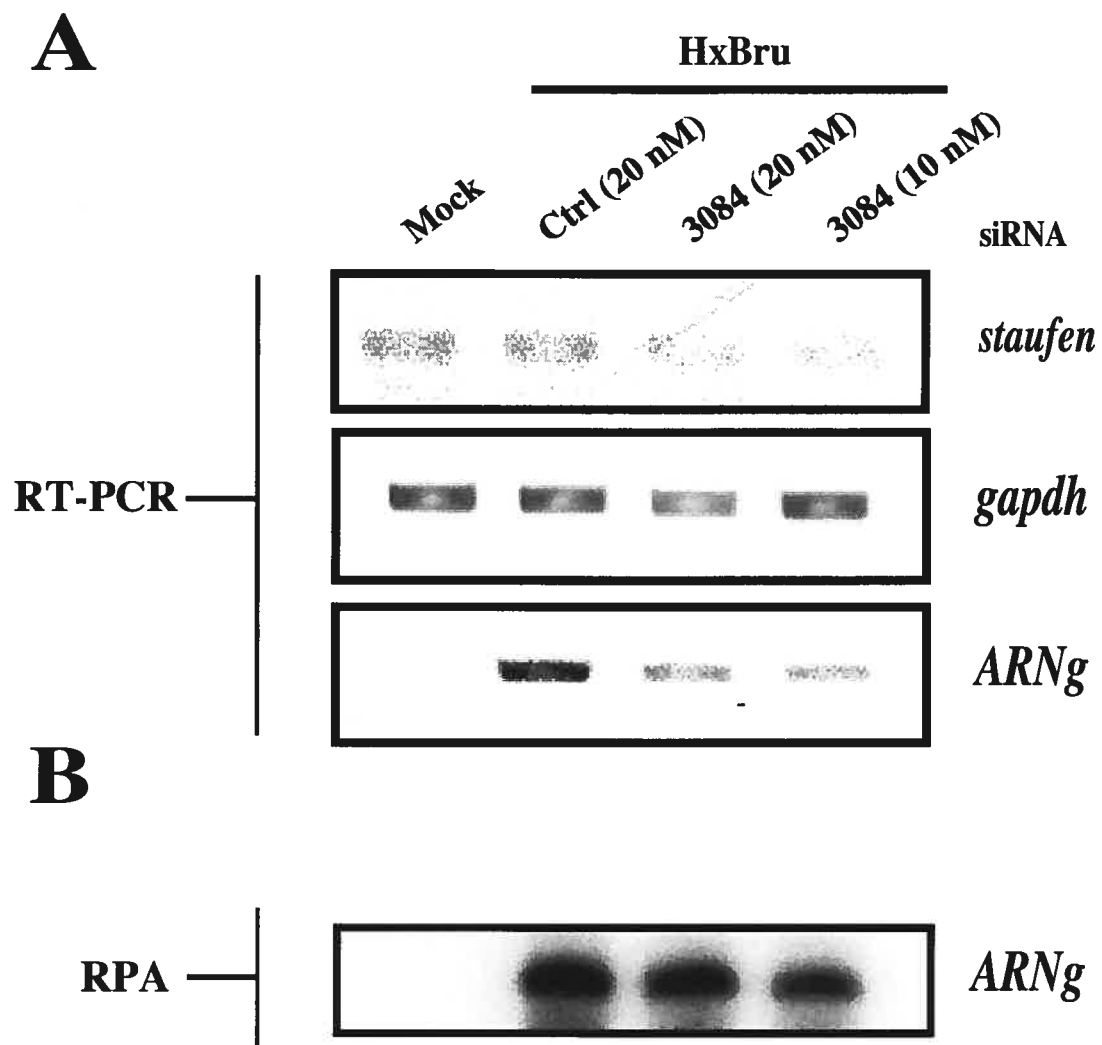
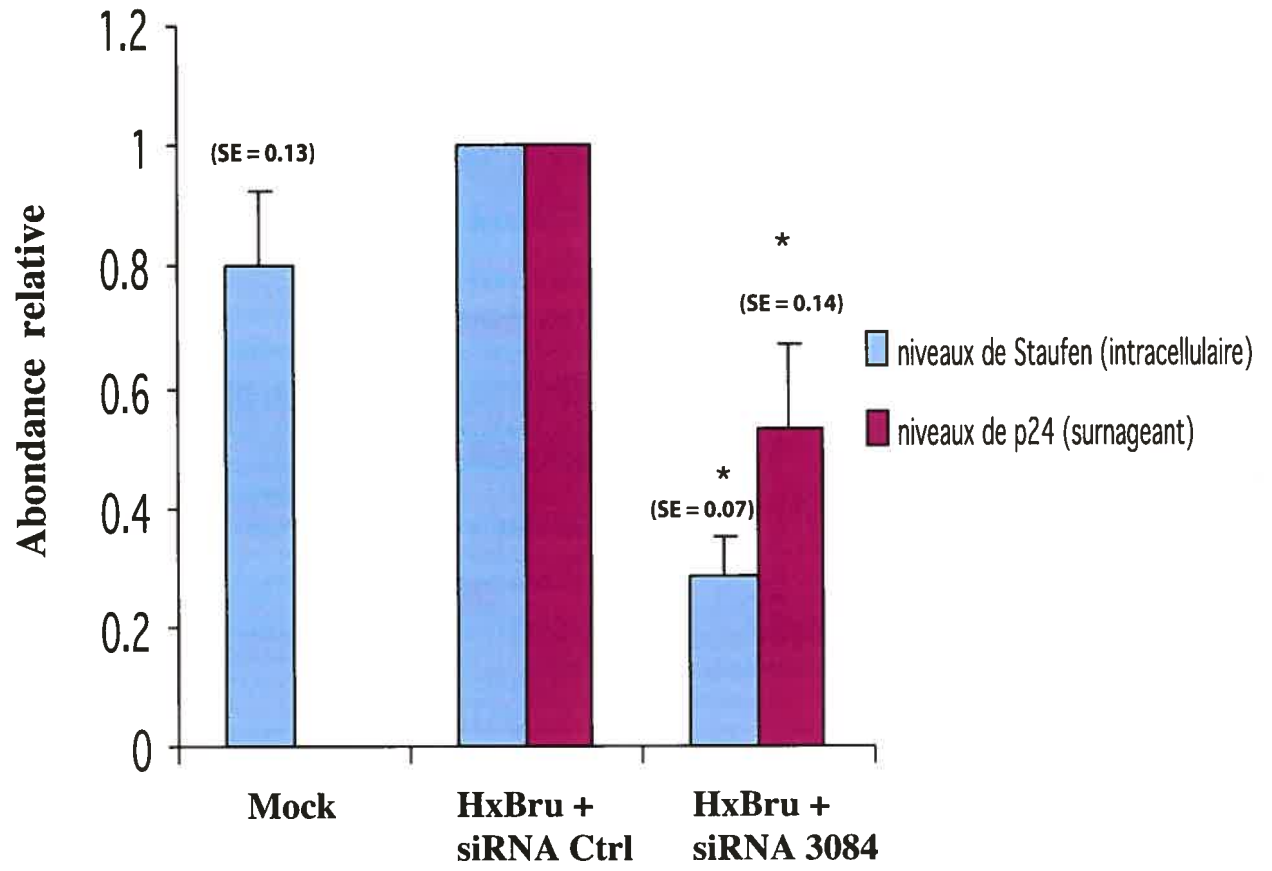


Figure 3.6

FIGURE 3.7 La diminution intracellulaire de Staufen provoque une baisse de la production virale. Les cellules 293T préalablement transfectées avec les siRNA Ctrl (10 nM) et siRNA 3084 (10 nM) sont co-transfectées une seconde fois avec le clone proviral HxBru. 48h après la transfection du plasmide proviral, les virus relâchés dans le surnageant sont quantifiés par ELISA p24. Les résultats sont normalisés en fonction de la quantité de protéines totales des lysats cellulaires de chaque condition de transfection. Les cellules sont lysées et analysées par Western Blot afin de quantifier les niveaux d'expression intracellulaire de Staufen à l'aide du système de quantification Canberra Packard Alpha-Imager. Les données sont exprimées à l'aide d'un ratio relatif où les niveaux de p24 (rouge) et de Staufen (bleu) pour les conditions de transfection de HxBru avec le siRNA Ctrl sont arbitrairement attribués de la valeur 1. L'erreur standard (SE), calculée à partir de 5 expériences indépendantes, est représentée par les barres d'erreur. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t. *P < 0,05 versus le groupe contrôle HxBru + siRNA Ctrl.

**Figure 3.7**

Les cellules furent lysées et analysées par Western Blot afin de s'assurer de la diminution de Staufen. Les résultats de la figure 3.7 démontrent une production virale diminuée lorsque la protéine Staufen est diminuée. En effet, une baisse d'expression de cette protéine cellulaire d'environ 70% résulte en une réduction d'environ 40-45% du nombre de particules virales produites. Ces résultats quant à la production virale sont consistants avec ceux démontrant la diminution de pr55^{Gag} (Figure 3.5) et d'ARNg (Figure 3.6).

3.2.4 Infectivité des virus

Comme nos données antérieures concernant la surexpression de Staufen démontrent une baisse significative de l'infectivité des virus ¹³⁸, nous avons examiné cette propriété virale en condition de sous-expression. Les virus sont produits à partir de cellules 293T transfectées avec les siRNA Ctrl (10 nM) ou les siRNA 3084 (10 nM) et sont ensuite quantifiés tels que décrit précédemment dans cet ouvrage. Une quantité équivalente de virus est ensuite utilisée afin d'infecter les cellules indicatrices CEM-GFP. Les virus issus des cellules 293T déficientes pour la protéine Staufen sont compromis dans leur infectivité. En effet, les résultats de 5 expériences indépendantes démontrent que ces virus possèdent une infectivité deux fois plus faible que ceux provenant des cellules traitées avec le siRNA Ctrl (Figure 3.8). En combinant ces résultats avec ceux obtenus précédemment en surexpression, ces données démontrent qu'un niveau intracellulaire optimal de Staufen semble requis afin de générer des particules virales complètement infectieuses.

FIGURE 3.8 La diminution d'expression de Staufen affecte l'infectivité des virions néo-synthétisés. Les virions sont produits dans les cellules 293T transfectées avec les siRNA Ctrl (10 nM) ou 3084 (10 nM) et quantifiés par ELISA p24. L'infectivité des différentes préparations virales est ensuite déterminée à l'aide des cellules indicatrices CEM-GFP tel que décrit dans les matériels et méthodes. Les données sont exprimées en fonction de leur infectivité relative où l'infectivité des virus HxBru traités avec le siRNA Ctrl fût arbitrairement attribuée de la valeur 1. L'erreur standard (SE) calculée à partir de 5 expériences indépendantes est représentée par les barres d'erreur. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t. *P < 0,05 versus le groupe contrôle HxBru + siRNA Ctrl.

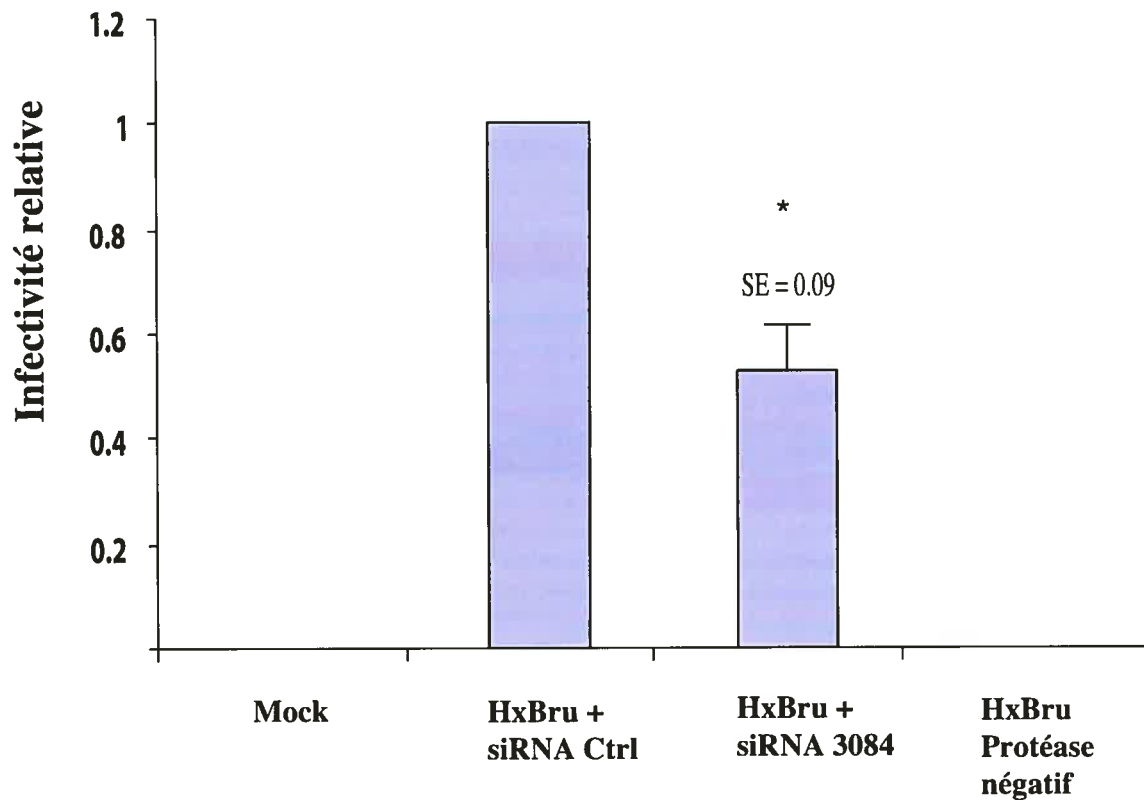


Figure 3.8

3.2.5 Encapsidation de l'ARN génomique

Les données obtenues en surexpression avaient mis en évidence une fonction potentielle de Staufen au niveau du processus d'encapsidation du génome viral. Par conséquent, les virus issus des cellules 293T transfectées avec le siRNA Ctrl (20 nM) et le siRNA 3084 (20 et 10 nM) ont été analysés quant à leur contenu en ARN génomique. L'ARN d'une quantité équivalente de virus purifiés est isolé et analysé par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques à l'ARNg du VIH-1 (Figure 3.9A). Le contenu en ARNg est augmenté de plusieurs fois dans les virus générés à partir des 293T traitées avec les duplexes siRNA 3084 (10 et 20 nM). Afin de confirmer ce résultat, nous avons procédé à des expériences de RPA sur l'ARN isolé à partir d'une quantité égale de virus équivalente à 50 ng de p24. Les résultats obtenus à l'aide de cette technique plus quantitative, nous ont permis encore une fois de démontrer une augmentation de l'ARNg encapsidé dans ces virions (Figure 3.9B). En comparaison avec le signal obtenu pour les virus issus des cellules traitées avec le siRNA Ctrl, la diminution d'expression de Staufen provoque une augmentation de matériel génétique encapsidé qui est jusqu'à quatre fois plus élevé chez les virus issus des transfections avec 10 nM de siRNA 3084. Dans le but de s'assurer de la présence d'un nombre bien égal de particules virales, une quantité équivalente à 35 ng de p24 a été mise sur gel et analysée par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre RT, p24 CA et p17 MA (Figure 3.9C). Les résultats démontrent clairement que la même quantité de virus est utilisée pour effectuer les expériences présentées en A) et en B). Bien que ces résultats d'encapsidation sont surprenants en raison du fait que la surexpression de Staufen provoque le même

FIGURE 3.9 La baisse intracellulaire de Staufen cause une augmentation drastique de l'ARN génomique encapsidé. A) L'ARN génomique provenant d'une quantité égale de particules virales pour chacune des conditions de transfection (mock, siRNA Ctrl 20 nM, siRNA 3084 20 nM et siRNA 3084 10 nM) est purifiés et reverse transcrit en utilisant des amorces spécifiques à l'ARNg du VIH-1. Les résultats d'une expérience représentative sont présentés. B) Analyse par RPA de l'ARNg des virus provenant des mêmes conditions de transfection que A). Une quantité d'ARNg équivalente à 50 ng de p24 est hybridée à 10^5 cpm d'une sonde ARN radioactive et digérée avec de la RNase A/T1. Les fragments protégés sont séparés par électrophorèse sur gel. C) Analyse par Western Blot des virus utilisés en A) et B). Une quantité égale de virus équivalente à 35 ng de p24 est mise sur gel SDS-PAGE 12% et transférée sur membrane de nitrocellulose. La présence de p24 CA, p17 MA et RT est révélée dans le but de servir de contrôle quant à la quantité totale de virus mise sur gel.

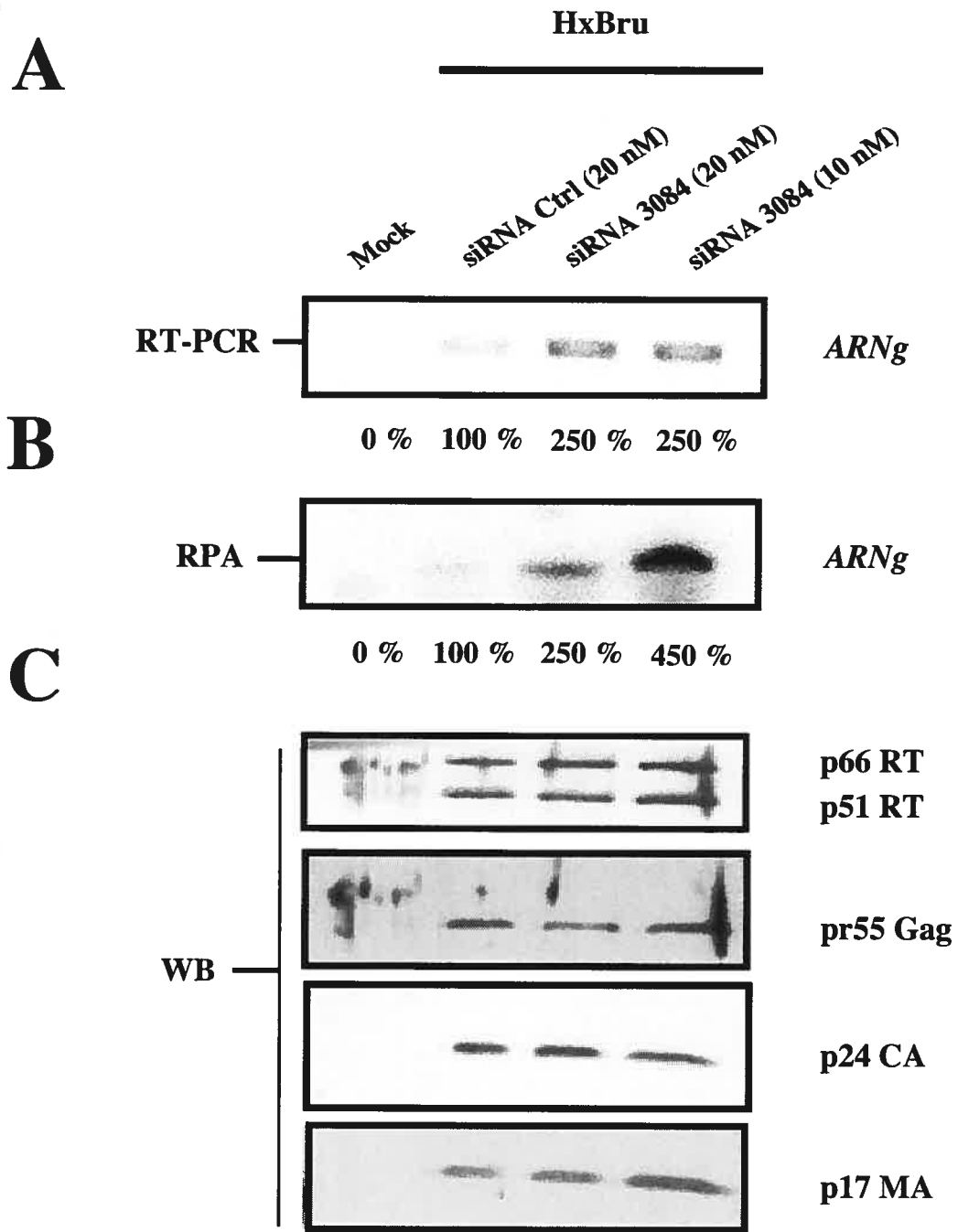


Figure 3.9

phénotype, il devient plus en plus évident que Staufen serait être impliquée à une étape critique de ce processus d'encapsidation hautement régulé à deux copies par virion.

3.2.6. Incorporation de Staufen dans le virion

Staufen est une protéine qui est incorporée à l'intérieur du virus et son encapsidation est dépendante de la présence d'ARNg et de l'intégrité de son dsRBD3¹³⁸. Nous avons donc analysé son incorporation lorsque son expression est diminuée par les siRNA. Les virus sont produits dans les cellules 293T transfectées avec le siRNA Ctrl (10 nM) ou le siRNA 3084 (10 nM), pour être ensuite purifiés et quantifiés. Les cellules sont lysées et 40 ug de protéines sont analysées par Western Blot afin de vérifier la diminution intracellulaire de Staufen. Une quantité égale de virus pour chaque condition est aussi déposée sur gel et analysée par Western Blot. Une quantité de virus représentant 850 ng de p24 a été utilisée afin de détecter la présence de Staufen dans les particules, alors qu'une dilution 1/200 de cette quantité a été nécessaire afin de révéler la présence des protéines virales servant au contrôle de la quantité de virus mise sur gel (Figure 3.10A). Les résultats démontrent une augmentation du nombre de molécules de Staufen incorporées dans les virus issus des cellules transfectées avec le siRNA 3084. Dans les cellules, les niveaux d'expression des deux isoformes, Staufen-55 et Staufen-63, sont diminués respectivement de 80% et 75% (Figure 3.10A-B). Toutefois l'analyse des virus révèle que l'incorporation de Staufen-63, chez les virus issus des cellules transfectées avec le siRNA 3084, est augmentée d'environ 3,5 fois par rapport au nombre de molécules habituellement incorporées lorsque les niveaux intracellulaires de Staufen ne sont pas

FIGURE 3.10 La diminution intracellulaire de Staufen provoque une augmentation de son incorporation dans le virion. A) Analyse par Western Blot des cellules co-transfectées avec le vecteur proviral HxBru et le siRNA Ctrl (10 nM) ou le siRNA 3084 (10 nM) ainsi que des virus issus de ces transfections. Une quantité équivalente à 40 ug de protéines cellulaires est mise sur gel et analysé afin de déterminer l'efficacité des siRNA. Une quantité de virus équivalente à 850 ng de p24 est aussi déposée sur gel afin de pouvoir analyser la présence de Staufen, alors qu'une dilution 1/200 de ce volume est utilisée pour révéler la présence des protéines virales p17 MA, p24 CA et RT servant au contrôle de la quantité totale de virus. B) Abondance relative en pourcentage des différents isoformes, Staufen-55 et Staufen-63, présents dans les cellules et les virus de chacune des conditions de siRNA (Ctrl ou 3084). Cette expérience est représentative de deux expériences indépendantes.

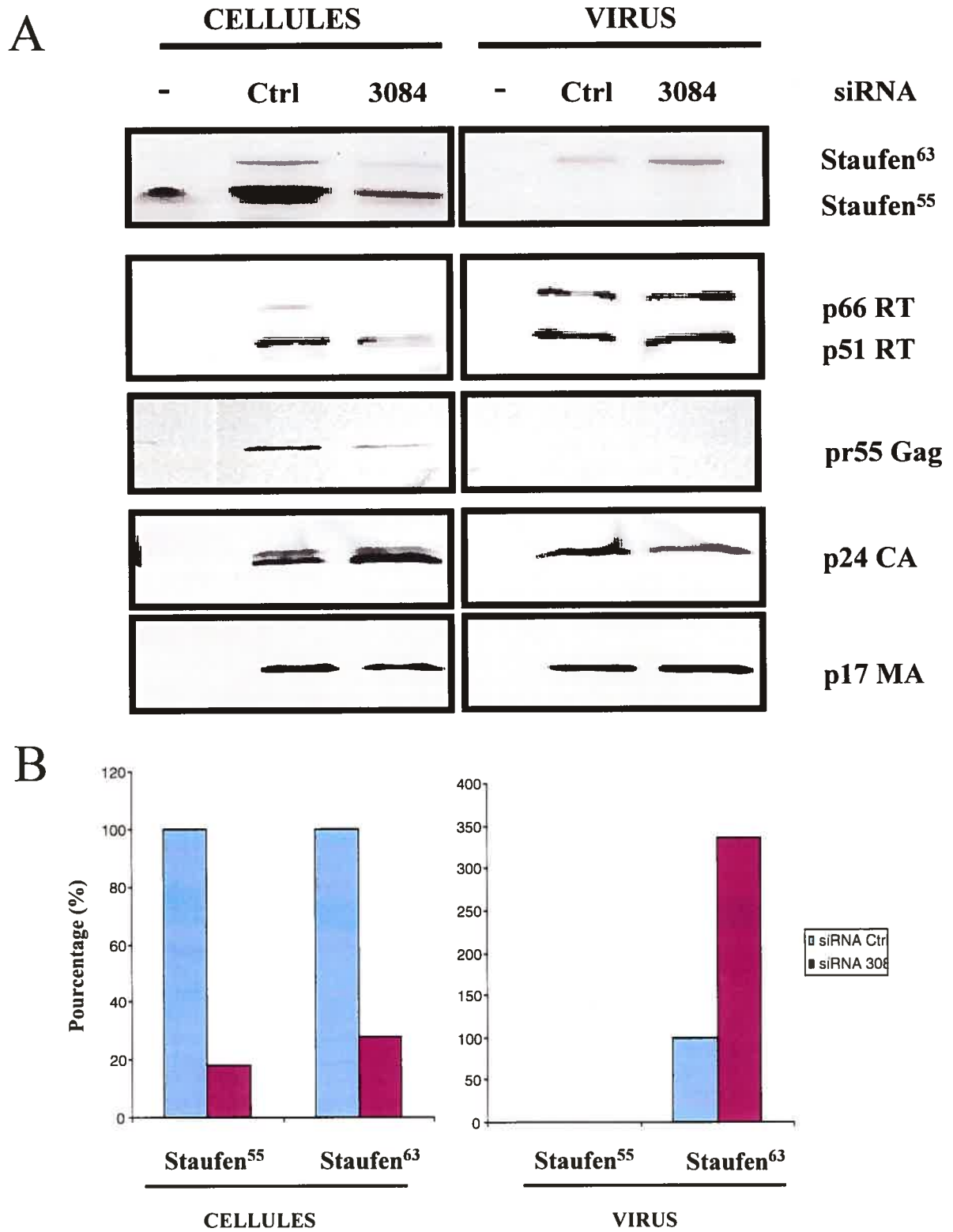


Figure 3.10

affectés (siRNA Ctrl). La présence majoritaire de l'isoforme de 63 kDa dans les virions fût aussi notée dans les travaux antérieurs du laboratoire impliquant les cellules 293T¹³⁸. Cette augmentation de Staufen dans les particules est consistante avec l'augmentation d'ARNg encapsidé observée (Figure 3.9A-B) et vient appuyer le fait que la quantité de Staufen incorporée par particule virale semble corrélérer avec la quantité d'ARNg encapsidé. En effet, cette corrélation avait aussi été observée avec les études de surexpression¹³⁸.

Chapitre 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Implication de Staufen durant la réplication du VIH-1

Il est bien établi aujourd'hui que certaines protéines cellulaires sont essentielles à la réplication du VIH-1. Plusieurs de ces protéines sont associées avec divers composants viraux, mais leur fonction dans le cycle de vie du VIH-1 est peu caractérisée (voir Tableau 1.1 et 1.2). La technique de l'ARNi est un outil récent et très puissant qui permet d'étudier la fonction d'une protéine. Dans le cas du VIH-1, cette technique a permis la caractérisation de protéines telles que Tsg 101, lysyl-tRNA synthétase et hRIP^{74, 86, 173}. Grâce au développement de cette technique dirigée contre Staufen, nous avons pu démontrer à notre tour l'importance de cette protéine pour la réplication virale. En diminuant, l'expression de Staufen, des répercussions sont notées sur les niveaux d'expression intracellulaire de pr55^{Gag} et de l'ARNg, la production virale, l'infectivité des virus et l'encapsidation du génome.

Des études antérieures avaient démontré que Staufen, pr55^{Gag} et l'ARN 9 kb se trouvaient dans les mêmes complexes RNPs. Ces complexes résistants à la solubilisation des membranes par les détergents et sensibles à la trypsine suggéraient un rôle de Staufen dans les étapes d'assemblage et d'encapsidation du virus³⁵. Les résultats d'ARNi présentés dans cet ouvrage supportent le rôle de cette protéine cellulaire au niveau de l'assemblage viral et l'impliquent dans la génération de particules complètement infectieuses. Lorsque l'expression de Staufen est abaissée à l'aide du siRNA 3084, la production virale est diminuée de façon proportionnelle aux niveaux

d'expression de pr55^{Gag} et de l'ARN 9kb (Figure 3.5 à 3.7). Sledz et collaborateurs ont récemment démontré que la transfection de siRNA pouvait potentiellement diminuer la traduction cellulaire en activant la réponse interféron¹⁸¹. Toutefois, la possibilité que nos observations soient l'objet de ce phénomène a été éliminée en montrant des niveaux d'expression constants de Stat1, en présence comme en absence de nos siRNA (Figure 3.3). De plus, comme la transfection de nos siRNA n'a démontré aucun effet significatif sur les différentes étapes du cycle cellulaire des 293T (Figure 3.4), la possibilité que la baisse de production virale puisse être engendrée pour cette raison a aussi été éliminée. Grâce à la figure 3.5C, nous savons que la baisse de pr55^{Gag} n'est pas une conséquence de la diminution de l'expression du LTR lorsque les niveaux de Staufen sont diminués. La présence d'un niveau d'expression adéquat de Staufen semble donc requise pour assurer la stabilité de ces complexes RNPs et l'efficacité de l'assemblage.

Les complexes RNPs contenant Staufen ont récemment été étudiés dans les cellules 293T par Villacé et collaborateurs et leurs résultats favorisent l'hypothèse que Staufen soit impliquée dans le transport de certains ARNm spécifiques pour leur permettre une traduction cytoplasmique localisée²⁰⁰. En effet, l'analyse protéomique de ces complexes a révélé la présence de protéines ribosomales, de protéines du cytosquelette, de protéines motrices, de protéines régulatrices ainsi que d'autres protéines liant l'ARN normalement localisé dans le noyau. Certaines de ces protéines, telles que l'actine, la tubuline, les kinésines, la nucléoline et RHA sont aussi impliquées dans la réplication rétrovirale^{6 121 156 155 191}. Dans certains cas, la modulation de leur expression intracellulaire provoque des phénotypes similaires à ceux observés en modulant Staufen. Par exemple, les résultats avec des siRNA dirigés contre RHA

démontrent une baisse significative de la production virale (propos recueilli du Dr K. Boris-Lawrie, Keystone Symposia, Whistler, C-B, avril 2004). En ce qui concerne la nucléoline, Bacharach et collaborateurs ont démontré une interaction entre le fragment C-terminal de cette protéine et le domaine NC de pr55^{Gag} ⁶, tout comme nous avec Staufen ³⁵. De plus la surexpression de ce fragment de nucléoline entraînait une diminution marquée de la relâche virale ⁶. Toutes ces données suggèrent donc que les niveaux d'expression des protéines cellulaires impliquées dans ces complexes RNPs doivent être optimaux afin d'assurer la stabilité des complexes d'assemblage et une bonne réplication virale. Le cas de la protéine Staufen ne serait pas différent et la diminution de cette molécule à l'intérieur de ces complexes pourrait donc potentiellement affecter l'équilibre qu'il existe entre les protéines cellulaires et le domaine NC de pr55^{Gag}, le domaine qui médie l'assemblage ⁴¹.

Des travaux récents supportent la notion que Staufen soit active dans le processus d'assemblage puisque des images en microscopie électronique ont dévoilé des défauts de morphogénèse des virions. En effet, en modifiant les niveaux d'expression intracellulaire de Staufen par la surexpression ou par l'ARNi, les virions tendent à former des agrégats viraux membranaires lors du bourgeonnement, phénotype similaire observé chez les virus déficients pour le domaine p6 de pr55^{Gag} (résultats non publiés). Ce problème de relâche suite à un assemblage moins efficace des virus pourrait être la raison de nos faibles taux d'antigènes p24 présents dans le surnageant (Figure 3.7).

Chez la drosophile, des travaux récents proposent qu'un homologue des hnRNPs, Hrp48, pourrait se lier à l'ARNm *osk* en compagnie d'autres protéines associées à la

formation du complexe EJC (complexe de jonction exon-exon) afin de recruter des facteurs essentiels de localisation cytoplasmique tels que Staufen. L'assemblage d'un complexe fonctionnel de localisation de l'ARNm requiert le recrutement graduel de multiples protéines nucléaires et cytoplasmiques qui sont toutes essentielles à la localisation postérieure de cet ARNm⁹⁸. Les niveaux d'expression plus faible de pr55^{Gag} observés peuvent potentiellement être expliqués par ce modèle, car nous savons maintenant que hnRNP A2 lie l'ARNg du VIH-1 et que cette interaction influence la localisation de l'ARNg au noyau et la localisation de pr55^{Gag} dans le cytoplasme^{11, 140}. En considérant que Staufen puisse jouer le rôle de facteur de localisation cytoplasmique, le fait de diminuer son expression pourrait affecter le complexe nécessaire à la prise en charge de l'ARNg. Ceci aurait pour effet de provoquer une dégradation plus rapide de l'ARNg par différents mécanismes tels que le décoiffement⁷ et la déadénylation des ARNm¹⁹³. En effet, la modulation du niveau de dégradation des ARNm est un moyen rapide et efficace de contrôle de l'expression génique. Les protéines présentes dans les EJCs ont aussi un rôle bien défini au niveau de la stabilité des ARNs qui sont ciblés par le système du NMD^{116, 117}. Bien qu'aucune étude ne l'ait démontrée jusqu'à présent, cette hypothèse implique évidemment que l'ARNg du VIH-1 soit aussi sujette à cette machinerie cellulaire. Toutefois, comme ce phénomène est présent chez un autre rétrovirus, le RSV, rien n'empêche de penser qu'il pourrait en être le cas chez le VIH-1¹¹⁸.

Bien que les niveaux intracellulaires d'ARNg soient diminués en condition d'ARNi, ceux de l'ARNg dans les virions sont augmentés (Figure 3.9). Il devient alors tentant de spéculer que la stabilité de l'ARNg puisse être intimement liée au

phénomène d'encapsidation du génome viral. Théoriquement chaque molécule de pr55^{Gag} qui formera le nouveau virion est capable de lier un ARNg et pourtant, un mécanisme encore non défini permet la sélection de seulement deux copies par virions. Aucune autre étude jusqu'à maintenant ne semble avoir soulevé ce point concernant le VIH-1. Cependant, une étude chez un autre virus ARN, le virus de la mosaïque du chou jaune (TYMV), démontre que la déstabilisation d'une structure secondaire de l'ARN viral maximise la traduction au détriment de l'encapsidation, alors que la stabilisation de cette structure favorise l'encapsidation et diminue la traduction de l'ARN viral ¹⁸. Staufen est une protéine qui lie ce genre de structure secondaire en tige-boucle. Sa diminution d'expression intracellulaire pourrait donc affecter la formation de ces structures et provoquer une certaine déstabilisation de l'ARNg qui favoriserait l'encapsidation (Figure 3.9) au détriment de la traduction de pr55^{Gag} (Figure 3.5). Concernant le VIH-1, il a déjà été démontré que l'ARNg n'avait pas besoin d'être traduit par les ribosomes avant d'être encapsidé ²⁶. Des expériences de complémentation protéique à l'aide d'un vecteur exprimant une protéine Staufen-HA recombinante ont été effectuées pour essayer de restituer les phénotypes reliés à la baisse de traduction et de stabilité de l'ARNg, mais ces dernières restent pour l'instant sans succès (résultats non présentés).

Les études de surexpression de Staufen avaient aussi dévoilé une augmentation d'ARNg dans les virions qui corrélait avec l'augmentation du nombre de molécules de Staufen incorporées, suggérant ainsi un rôle de cette protéine au niveau de l'étape d'encapsidation du génome. Par conséquent, nous avons voulu démontrer que sa baisse d'expression pouvait logiquement provoquer des effets inverses. Toutefois, en étudiant

l'encapsulation de l'ARNg, nous avons été surpris d'observer une augmentation du nombre de copies virales incorporées dans les particules (Figure 3.9) et ce, à l'aide de deux techniques différentes. L'ampleur de cette augmentation est de plus d'un ordre similaire à celle observée en surexpression, soit d'environ 3-4 fois. L'incorporation de Staufen est aussi augmentée bien que les niveaux intracellulaires soient diminués d'environ 80% (Figure 3.10 A et B). La corrélation entre la quantité de Staufen et le nombre de copies virales encapsidées tient donc toujours. En effet, le pourcentage relatif calculé de cette augmentation de Staufen à l'intérieur des particules est estimé à 350%, soit de même ampleur que celle observée pour l'ARNg (250% à 450%). Bien que l'isoforme de 63 kDa (Staufen-63) soit moins prédominante au niveau cytoplasmique que l'isoforme de 55 kDa (Staufen-55), elle est majoritairement incorporée dans le virion pour ce qui concerne le type cellulaire 293T. Les études antérieures du laboratoire ¹³⁸ avaient démontré cette relation préférentielle des rétrovirus quant à l'encapsulation des isoformes de Staufen dépendante du type cellulaire où les virus sont produits. Les VIH-1, VIH-2 et MLV produits dans les cellules 293T possédaient tous majoritairement Staufen-63, alors que le VIH-1 provenant de cellules lymphocytaires contenait majoritairement Staufen-55.

Nos données d'encapsulation sont consistantes avec l'infectivité compromise des virus lorsque les niveaux d'expression intracellulaire de Staufen sont modifiés (Figure 3.8) et reflètent encore les résultats antérieurs de surexpression ¹³⁸. Ceci nous indique une fois de plus que les niveaux d'expression de Staufen doivent être optimaux afin d'assurer une infectivité maximale des virus. La quantité augmentée d'ARNg encapsidé pourrait être responsable des défauts d'infectivité observé, mais la raison précise reste à

analyser. Shin et collaborateurs ont précédemment démontré une infectivité compromise du MLV suite à l'encapsidation d'un ARN d'environ 20 kb, soit plus de deux fois la taille habituelle¹⁸⁰. Ces données mettaient en évidence le fait que la longueur de l'ARNg encapsidé pouvait provoquer des défauts de réplication à différentes étapes du cycle viral. Toutefois, dans notre cas, c'est la quantité de copies et non la longueur qui est augmentée. La possibilité que les étapes précoces du cycle de réplication de ces virions, telles que la décapsidation, la transcription inverse et l'intégration, soient affectées par cette augmentation d'ARNg et/ou de molécules de Staufen reste donc à vérifier.

Le fait que la diminution intracellulaire des niveaux d'expression de Staufen provoque une augmentation de son incorporation ainsi que celle de l'ARNg reste à nos yeux un phénomène surprenant et inattendu. Cependant, le processus qui régule l'encapsidation du génome viral est de loin celui qui est le moins bien compris jusqu'à maintenant parmi tous ceux impliqués dans la réplication du VIH-1. Nous savons que le précurseur pr55^{Gag} est le principal médiateur des étapes d'assemblage et d'encapsidation du virus et que ses interactions avec les différentes protéines cellulaires au cours de ces étapes sont hautement régulées comme le témoigne les études effectuées sur HP68²¹⁹. Il est alors possible que la modification du nombre de particules de Staufen affecte la composition de ces complexes d'assemblage en provoquant une augmentation et/ou une baisse de certains facteurs cellulaires et/ou viraux qui sont impliqués dans la régulation des processus de sélection de l'ARNg et d'encapsidation. Bien qu'étant diminués dans ces complexes par rapport à une situation normale, Staufen et l'ARNg pourraient ainsi échapper aux contrôles habituels qui régulent leur encapsidation et par conséquent, être d'un nombre augmenté dans la particule virale.

De plus, de récentes études ont indiqué que le 5'UTR de l'ARNg du VIH-1^{2, 13, 14, 96, 97} pouvait former des structures secondaires alternatives dans lesquelles des éléments pouvaient être accessibles ou réprimés. Un « *switch* » de conformation entre ces deux structures pourrait permettre une régulation temporelle de la régulation des fonctions associées au 5'UTR. Ces deux structures de l'ARNg sont nommées la structure LDI (« *long distance interaction* ») et la structure BMH (« *branched structure with multiple hairpins* »). Par sa conformation, la structure LDI permettrait la traduction protéique de l'ARNg, alors que la structure BMH serait favorable à sa dimérisation et son encapsidation. Puisqu'il est spéculé que la protéine virale NC soit la responsable de ce « *switch* » de conformation *in vivo*⁹⁷ et que Staufen interagit directement avec NC et lie l'ARNg^{35, 138}, il est alors possible de penser que la modulation des niveaux intracellulaires de Staufen puisse affecter l'équilibre de ces deux structures. Ainsi, lorsque Staufen est diminuée dans la cellule, la structure BMH serait favorisée au détriment de la structure LDI. Cette hypothèse pourrait expliquer la baisse de traduction de pr55^{Gag} en présence des siRNA 3084 (Figure 3.5) et l'augmentation d'ARNg encapsidé observée (Figure 3.9).

4.2 Modèle proposé et implications

En analysant les données obtenues durant ma maîtrise et en les corrélant avec les données antérieures de surexpression, nous pouvons proposer un modèle qui implique la présence de Staufen dans certaines étapes du cycle de réplication du VIH-1 (Figure 4.1). Staufen serait impliqué très hâtivement dans le processus d'assemblage en servant de facteur de localisation cytoplasmique de l'ARNg. Lors de l'exportation nucléaire de

l'ARNg, Staufen serait recrutée par un complexe composé de plusieurs protéines nucléaires⁹⁸. L'acquisition de Staufen ferait en sorte de stabiliser l'ARNg pour ensuite permettre son transport et sa traduction. Un fois que pr55^{Gag} serait synthétisé, les protéines Staufen associées avec les polyribosomes pourraient être recrutées via le domaine NC de pr55^{Gag}. Staufen pourrait ainsi contribuer à l'oligomérisation de pr55^{Gag} en recrutant l'ARN, un composant démontré comme un cofacteur essentiel pour cette étape^{25, 37} ou pourrait aussi promouvoir l'association de l'ARNg avec pr55^{Gag} tel que suggéré précédemment³⁵. Parce que Staufen est une protéine associée au cytosquelette et qu'elle est impliquée dans le transport des RNPs¹¹², Staufen pourrait ensuite médier le transport de ce complexe d'assemblage intermédiaire vers la membrane cytoplasmique où un complexe d'assemblage ternaire de Staufen, pr55^{Gag} et de l'ARNg serait maintenu dans le but de mener à l'encapsidation du génome viral. L'incorporation de Staufen serait alors médiée par son interaction avec l'ARNg puisqu'une corrélation semble être établie quant aux augmentations observées d'ARNg encapsidés et de protéines Staufen incorporées suite aux études de surexpression et d'ARNi. La diminution de l'expression de Staufen par ARNi semble toutefois réduire l'efficacité de formation des complexes d'assemblage. En effet, cette diminution de Staufen dans les complexes affecterait la stabilité de l'ARNg de façon à augmenter le processus habituel d'encapsidation. Ces problèmes associés à l'encapsidation sont reflétés par la faible infectivité des virus néo-synthétisés. Un niveau intracellulaire équilibré de molécules de Staufen favoriserait donc la stabilité de l'ARNg et assurerait par conséquent une bonne dynamique de traduction et d'encapsidation, alors que la modulation de ses niveaux d'expression (surexpression ou ARNi) provoquerait une instabilité de l'ARNg qui favoriserait la voie de l'encapsidation au détriment de la synthèse protéique et de l'assemblage.

FIGURE 4.1 Modèle proposé quant à l'implication de Staufen dans les étapes post-transcriptionnelles du cycle de réplication du VIH-1. Staufen prendrait en charge l'ARNg dès sa sortie du noyau et servirait de facteur de localisation cytoplasmique pour la traduction de pr55^{Gag}. Le recrutement de Staufen assurerait une stabilité de l'ARNg et favoriserait par conséquent la traduction. Suivant sa synthèse au niveau des polysomes, pr55^{Gag} interagirait avec Staufen et le complexe Staufen/pr55^{Gag}/ARNg migrerait par la suite vers les complexes d'assemblage. Le complexe ternaire Staufen/pr55^{Gag}/ARNg est assemblé en particules virales à la membrane plasmique. Toutefois, la modulation de l'expression intracellulaire de Staufen provoquerait l'instabilité de l'ARNg et favoriserait ainsi l'encapsidation de l'ARNg au détriment de la traduction de pr55^{Gag}. La stabilité de l'ARNg serait donc reliée à la régulation de l'encapsidation du génome viral. Des caractères plus gras sont utilisés pour indiquer la voie favorisée dans les contextes de siRNA Ctrl et de siRNA 3084.

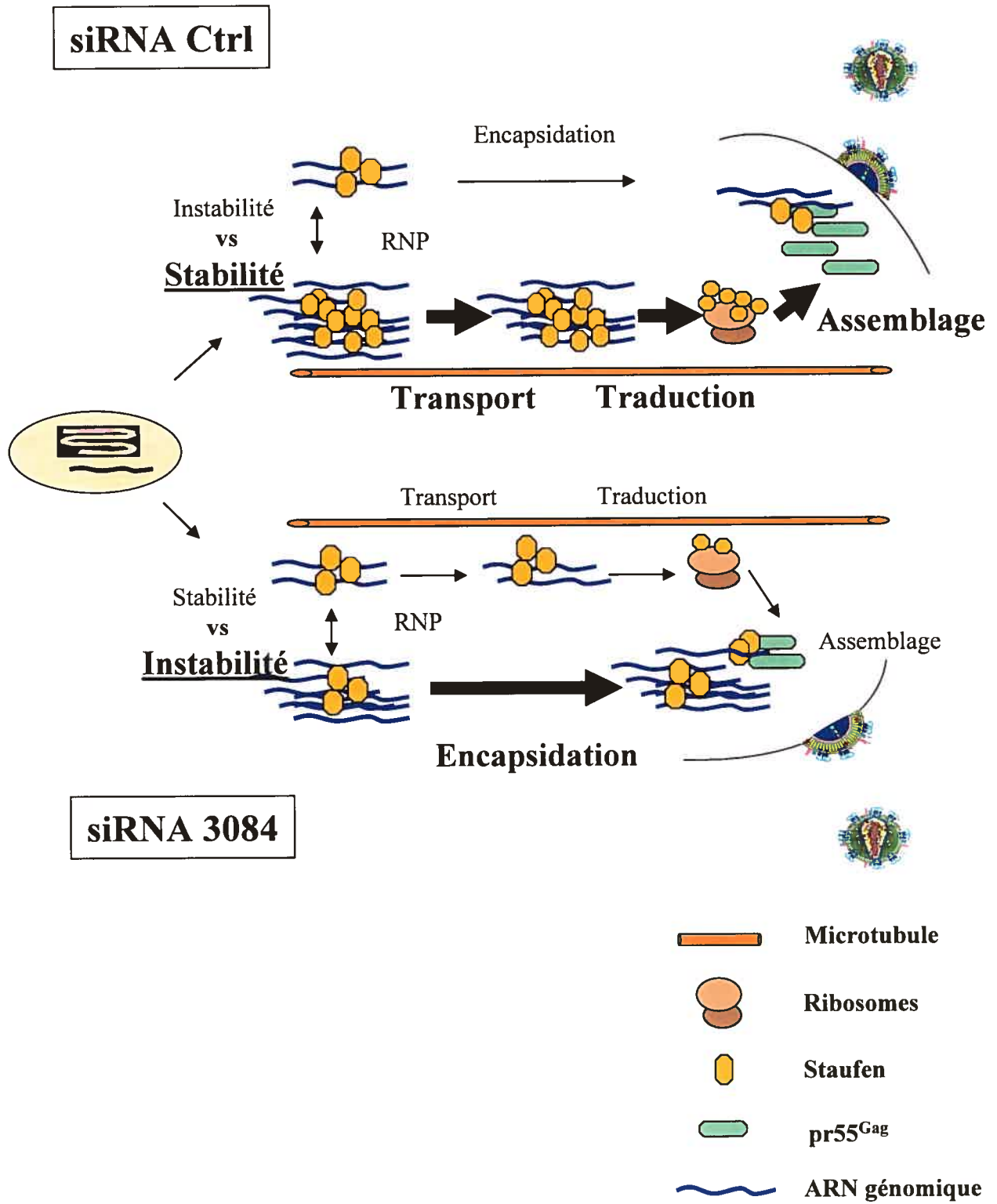


Figure 4.1

4.3 Directions futures et conclusions

Dans le but de mieux comprendre le rôle exact de cette protéine dans le cycle de réplication du VIH-1, plusieurs autres expériences doivent être effectuées. Premièrement, des études sont en cours afin de mesurer la stabilité de l'ARNg lorsque l'expression de Staufen est diminuée. La transcription cellulaire est inhibée avec de l'Actinomycine D et les ARNs cellulaires sont ensuite isolés à différents temps pour analyser les niveaux d'ARNg présents. Cette expérience nous aidera à mieux comprendre pourquoi nous observons une baisse des niveaux intracellulaires d'ARNg et par conséquent, nous aidera à confirmer le rôle de Staufen dans le processus de stabilité de l'ARNg.

Des expériences d'immunofluorescence combinées à de l'hybridation *in situ* sont aussi à prévoir afin de vérifier la localisation de l'ARNg au niveau de la cellule lorsque celle-ci est traitée avec le siRNA 3084. L'observation d'une relocalisation ou d'une localisation erronée de l'ARNg à l'intérieur de la cellule nous aiderait beaucoup à prouver que Staufen est un facteur de localisation cytoplasmique de l'ARNg comme il a été suggéré chez la drosophile ⁹⁸. Des problèmes expérimentaux mineurs se présentent toutefois dans ce projet. Tout d'abord, il faudrait adapter nos conditions d'ARNi à un différent type cellulaire, tel que les cellules Hela, puisque la morphologie des cellules 293T n'est pas idéale pour l'interprétation de ce type d'expérience. Deuxièmement, il est impossible de détecter la présence de Staufen endogène par immunofluorescence en raison de la caractéristique des anticorps utilisés. Ceci nous causerait donc des

problèmes au niveau de l'identification des cellules possédant des niveaux réduits d'expression. Toutefois, il serait possible de contourner ce problème en utilisant le siRNA 3084 marqué à la rhodamine tel qu'effectué par Poupon et collaborateurs¹⁶⁵. Comme nous avons prouvé précédemment que l'ajout de ce fluorophore n'affectait pas l'efficacité du siRNA 3084 (Figure 3.2), nous pourrions identifier les cellules positives pour la baisse d'expression en regardant la présence de rhodamine et ensuite regarder la localisation de l'ARNg marqué au Alexa Fluor (vert).

L'effet de la diminution intracellulaire de Staufén sur la dimérisation de l'ARNg est aussi un autre aspect du cycle viral que nous devons étudier. Chez la drosophile, la dimérisation de l'ARNm *bicoid* est requise pour que Staufén puisse s'y associer^{64, 203}. Bien que l'interaction directe de Staufén avec l'ARNg soit difficile à démontrer expérimentalement, il est tentant de spéculer que Staufén puisse posséder un rôle dans le processus de dimérisation du génome. De plus, des études utilisant des virus déficients pour la dimérisation de l'ARNg démontrent aussi des effets sur la production virale, l'encapsidation et l'infectivité des virus¹⁵⁷.

Le développement d'un autre bon système qui permet l'étude de la fonction de Staufén est aussi à envisager. Durant ma maîtrise, j'ai aussi débuté un projet dans le but de générer une lignée cellulaire lymphocytaire knock-out pour la protéine Staufén selon la procédure de Braaten et collaborateurs utilisée pour étudier la fonction de Cyclophiline A au niveau de la réplication du VIH-1²². La génération d'une telle lignée cellulaire nous permettrait d'étudier plus facilement la fonction de Staufén au niveau du cycle viral que par ARNi et ce, dans un système de culture encore plus près de la réalité.

À l'aide de ces cellules, nous pourrions vérifier la cinétique de réplication du virus en absence de Staufen ainsi qu'étudier différentes étapes précoces du cycle de réplication.

Les étapes précoces de la réplication du VIH-1 peuvent aussi être étudiées à l'aide des virus que nous générons suite au traitement des cellules avec le siRNA 3084. En effet, nous savons que ces virus possèdent une infectivité compromise, mais nous n'en connaissons pas encore toutes les raisons. Toutefois, nous savons qu'ils possèdent une quantité supérieure d'ARNg et de molécule de Staufen par rapport aux virus de type sauvage (Figure 3.9 et 3.10). Afin de mieux comprendre ces problèmes d'infectivité virale, il serait alors intéressant de vérifier l'effet de ces augmentations sur les différentes étapes précoces telles que la décapsidation, la transcription inverse, l'importation nucléaire du PIC et l'intégration.

En conclusion, les études présentées dans ce mémoire permettent non seulement de démontrer l'existence d'une protéine cellulaire impliquée au niveau de l'assemblage du VIH-1, mais aussi de prouver que Staufen joue un rôle important dans le processus d'encapsidation de l'ARNg. À notre connaissance, Staufen est jusqu'à présent la seule protéine cellulaire ayant une implication directe dans ce processus de sélection de l'ARNg. Nous proposons donc un modèle dans lequel les interactions de Staufen avec l'ARNg et pr55^{Gag} sont essentielles afin d'assurer une bonne production virale, une encapsidation régulée et une infectivité adéquate des virus. Les conséquences associées à la diminution intracellulaire de Staufen peuvent potentiellement être reflétées dans la pathogenèse du VIH-1. Il devient alors important de bien caractériser ces interactions

virus-hôte afin de pouvoir considérer le développement futur de nouvelles thérapies anti-rétrovirales.

LISTE DES REFERENCES

1. **Abbate, I., M. R. Capobianchi, S. Fais, C. Castilletti, F. Mercuri, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani.** 1995. Host cell antigenic profile acquired by HIV-1 is a marker of its cellular origin. *Arch Virol* **140**:1849-54.
2. **Abbink, T. E., and B. Berkhout.** 2003. A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon. *J Biol Chem* **278**:11601-11.
3. **Agrawal, N., P. V. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee.** 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:657-85.
4. **Ao, Z., X. Yao, and E. A. Cohen.** 2004. Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *J Virol* **78**:3170-7.
5. **Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. Sowder, 2nd, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**:1935-8.
6. **Bacharach, E., J. Gonsky, K. Alin, M. Orlova, and S. P. Goff.** 2000. The carboxy-terminal fragment of nucleolin interacts with the nucleocapsid domain of retroviral gag proteins and inhibits virion assembly. *J Virol* **74**:11027-39.
7. **Badis, G., C. Saveanu, M. Fromont-Racine, and A. Jacquier.** 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell* **15**:5-15.
8. **Bastiani, L., S. Laal, M. Kim, and S. Zolla-Pazner.** 1997. Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **71**:3444-50.
9. **Belanger, G., M. A. Stocksley, M. Vandromme, L. Schaeffer, L. Furic, L. DesGroseillers, and B. J. Jasmin.** 2003. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of Neurochemistry* **86**:669-77.
10. **Bennett, R. P., T. D. Nelle, and J. W. Wills.** 1993. Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus gag proteins. *J Virol* **67**:6487-98.
11. **Beriault, V., J.-F. Clement, K. Levesque, C. LeBel, X. Yong, B. Chabot, E. A. Cohen, A. W. Cochrane, W. F. Rigby, and A. J. Mouland.** 2004. A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag and Vpr localization. *J Biol Chem*.
12. **Berkhout, B., A. Gatignol, A. B. Rabson, and K. T. Jeang.** 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* **62**:757-67.
13. **Berkhout, B., M. Ooms, N. Beerens, H. Huthoff, E. Southern, and K. Verhoef.** 2002. In vitro evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes. *J Biol Chem* **277**:19967-75.

14. **Berkhout, B., and J. L. van Wamel.** 2000. The leader of the HIV-1 RNA genome forms a compactly folded tertiary structure. *Rna* **6**:282-95.
15. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.
16. **Bevec, D., H. Jaksche, M. Oft, T. Wohl, M. Himmelspach, A. Pacher, M. Schebesta, K. Koettnitz, M. Dobrovnik, R. Csonga, F. Lottspeich, and J. Hauber.** 1996. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **271**:1858-60.
17. **Bieniasz, P. D.** 2003. Restriction factors: a defense against retroviral infection. *Trends Microbiol* **11**:286-91.
18. **Bink, H. H., J. Schirawski, A. L. Haenni, and C. W. Pleij.** 2003. The 5'-proximal hairpin of turnip yellow mosaic virus RNA: its role in translation and encapsidation. *J Virol* **77**:7452-8.
19. **Boden, D., O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, and B. Ramratnam.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* **77**:11531-5.
20. **Bounou, S., J. E. Leclerc, and M. J. Tremblay.** 2002. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* **76**:1004-14.
21. **Braaten, D., E. K. Franke, and J. Luban.** 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**:3551-60.
22. **Braaten, D., and J. Luban.** 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *Embo J* **20**:1300-9.
23. **Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe.** 1998. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**:792-5.
24. **Bukrinskaya, A. G.** 2004. HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* **149**:1067-82.
25. **Burniston, M. T., A. Cimarelli, J. Colgan, S. P. Curtis, and J. Luban.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* **73**:8527-40.
26. **Butsch, M., and K. Boris-Lawrie.** 2000. Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol* **74**:11531-7.
27. **Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay.** 1997. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* **90**:1091-100.
28. **Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay.** 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* **71**:1922-30.
29. **Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R. A. Morgan.** 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9742-7.

30. **Capodici, J., K. Kariko, and D. Weissman.** 2002. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* **169**:5196-201.
31. **Cartier, C., P. Sivard, C. Tranchat, D. Decimo, C. Desgranges, and V. Boyer.** 1999. Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem* **274**:19434-40.
32. **Cen, S., A. Khorchid, H. Javanbakht, J. Gabor, T. Stello, K. Shiba, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2001. Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:5043-8.
33. **Cereseto, A., and M. Giacca.** 2004. Integration Site Selection by Retroviruses. *AIDS Review* **6**:13-21.
34. **Chan, D. C., and P. S. Kim.** 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**:681-4.
35. **Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland.** 2004. Identification of Staufens in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* **24**:2637-48.
36. **Cimarelli, A., and J.-L. Darlix.** 2002. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell.Mol.Life.Sci.* **59**:1166-1184.
37. **Cimarelli, A., and J. Luban.** 1999. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* **73**:5388-401.
38. **Cimarelli, A., S. Sandin, S. Hoglund, and J. Luban.** 2000. Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* **74**:3046-57.
39. **Clever, J. L., M. L. Wong, and T. G. Parslow.** 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**:5902-8.
40. **Coburn, G. A., and B. R. Cullen.** 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* **76**:9225-31.
41. **Coffin, J., S. Hughes, and H. Varmus.** 1997. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
42. **Coffin, J. M.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-9.
43. **Cullen, B. R.** 1998. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**:685-92.
44. **Cullen, B. R.** 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**:419-24.
45. **Cullen, B. R.** 1998. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**:203-10.
46. **Daher, A., M. Longuet, D. Dorin, F. Bois, E. Segeral, S. Bannwarth, P. L. Battisti, D. F. Purcell, R. Benarous, C. Vaquero, E. F. Meurs, and A. Gatignol.** 2001. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* **276**:33899-905.
47. **Davis, D. A., F. M. Newcomb, D. W. Starke, D. E. Ott, J. J. Mieyal, and R. Yarchoan.** 1997. Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and

- can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro. *J Biol Chem* **272**:25935-40.
48. **Dawson, L., and X. F. Yu.** 1998. The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology* **251**:141-57.
 49. **Dayton, A. I.** 1996. The Rev Axis of HIV-1 and Its Associated Host Cofactors: A Viral Window onto the Workings of Eukaryotic Posttranscriptional RNA Processing. *J Biomed Sci* **3**:69-77.
 50. **Delchambre, M., D. Gheysen, D. Thines, C. Thiriart, E. Jacobs, E. Verdin, M. Horth, A. Burny, and F. Bex.** 1989. The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *Embo J* **8**:2653-60.
 51. **DesGroseillers, L., and P. Jolicoeur.** 1983. Physical mapping of the Fv-1 tropism host range determinant of BALB/c murine leukemia viruses. *J Virol* **48**:685-96.
 52. **Diallo, K., M. Gotte, and M. A. Wainberg.** 2003. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3377-83.
 53. **Dorfman, T., A. Bukovsky, A. Ohagen, S. Høglund, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:8180-7.
 54. **Dorin, D., M. C. Bonnet, S. Bannwarth, A. Gatignol, E. F. Meurs, and C. Vaquero.** 2003. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* **278**:4440-8.
 55. **Duarte, M., K. Graham, A. Daher, P. L. Battisti, S. Bannwarth, E. Seeger, K. T. Jeang, and A. Gatignol.** 2000. Characterization of TRBP1 and TRBP2. Stable stem-loop structure at the 5' end of TRBP2 mRNA resembles HIV-1 TAR and is not found in its processed pseudogene. *J Biomed Sci* **7**:494-506.
 56. **Dubnau, J., A. S. Chiang, L. Grady, J. Barditch, S. Gossweiler, J. McNeil, P. Smith, F. Buldoc, R. Scott, U. Certa, C. Broger, and T. Tully.** 2003. The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* **13**:286-96.
 57. **Dvorin, J. D., P. Bell, G. G. Maul, M. Yamashita, M. Emerman, and M. H. Malim.** 2002. Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* **76**:12087-96.
 58. **Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl.** 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-8.
 59. **Emerman, M., R. Vazeux, and K. Peden.** 1989. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* **57**:1155-65.
 60. **Ephrussi, A., L. K. Dickinson, and R. Lehmann.** 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**:37-50.
 61. **Esser, M. T., D. R. Graham, L. V. Coren, C. M. Trubey, J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur, D. E. Ott, and J. D. Lifson.** 2001. Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and

- microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol* **75**:6173-82.
62. **Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani.** 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *Aids* **9**:329-35.
 63. **Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nusslein-Volhard, and D. St Johnston.** 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**:1221-32.
 64. **Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof, and C. Nusslein-Volhard.** 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUEN ribonucleoprotein particles. *Embo J* **16**:1751-8.
 65. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-11.
 66. **Flint, S., L. Enquist, R. Krug, V. Racaniello, and A. Skalka.** 2000. Principles of Virology, Washington, DC.
 67. **Forshey, B. M., U. von Schwedler, W. I. Sundquist, and C. Aiken.** 2002. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* **76**:5667-77.
 68. **Fortin, J. F., R. Cantin, G. Lamontagne, and M. Tremblay.** 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**:3588-96.
 69. **Frank, I., H. Stoiber, S. Godar, H. Stockinger, F. Steindl, H. W. Katinger, and M. P. Dierich.** 1996. Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1. *Aids* **10**:1611-20.
 70. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-62.
 71. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1-15.
 72. **Freed, E. O.** 2001. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **26**:13.
 73. **Garoff, H., R. Hewson, and D. J. Opstelten.** 1998. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1171-90.
 74. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
 75. **Gatignol, A., A. Buckler-White, B. Berkhout, and K. T. Jeang.** 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* **251**:1597-600.
 76. **Gatignol, A., and K. T. Jeang.** 2000. Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1. *Adv Pharmacol* **48**:209-27.
 77. **Gervaix, A., D. West, L. M. Leoni, D. D. Richman, F. Wong-Staal, and J. Corbeil.** 1997. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:4653-8.

78. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-12.
79. **Giguere, J. F., S. Bounou, J. S. Paquette, J. Madrenas, and M. J. Tremblay.** 2004. Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle. *J Virol* **78**:6222-32.
80. **Giguere, J. F., J. S. Paquette, S. Bounou, R. Cantin, and M. J. Tremblay.** 2002. New insights into the functionality of a virion-anchored host cell membrane protein: CD28 versus HIV type 1. *J Immunol* **169**:2762-71.
81. **Gitlin, L., S. Karelsky, and R. Andino.** 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**:430-4.
82. **Goff, S. P.** 1996. Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the Fv1 gene. *Cell* **86**:691-3.
83. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3195-9.
84. **Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, and V. K. Kuchroo.** 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* **18**:389-418.
85. **Gross, I., H. Hohenberg, T. Wilk, K. Wiegers, M. Grattinger, B. Muller, S. Fuller, and H. G. Krausslich.** 2000. A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *Embo J* **19**:103-13.
86. **Guo, F., S. Cen, M. Niu, H. Javanbakht, and L. Kleiman.** 2003. Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNA(Lys) incorporation, tRNA(3)(Lys) annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:9817-22.
87. **Gupta, K., D. Ott, T. J. Hope, R. F. Siliciano, and J. D. Boeke.** 2000. A human nuclear shuttling protein that interacts with human immunodeficiency virus type 1 matrix is packaged into virions. *J Virol* **74**:11811-24.
88. **Gurer, C., A. Cimarelli, and J. Luban.** 2002. Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions. *J Virol* **76**:4666-70.
89. **Hart, C. E., C. Y. Ou, J. C. Galphin, J. Moore, L. T. Bachelier, J. J. Wasmuth, S. R. Petteway, Jr., and G. Schochetman.** 1989. Human chromosome 12 is required for elevated HIV-1 expression in human-hamster hybrid cells. *Science* **246**:488-91.
90. **Hermida-Matsumoto, L., and M. D. Resh.** 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* **74**:8670-9.
91. **Hill, C. P., D. Worthyake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3099-104.
92. **Holm, K., K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates

- with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* **77**:4805-17.
93. **Hoxie, J. A., T. P. Fitzharris, P. R. Youngbar, D. M. Matthews, J. L. Rackowski, and S. F. Radka.** 1987. Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Hum Immunol* **18**:39-52.
 94. **Hrimech, M., X. J. Yao, F. Bachand, N. Rougeau, and E. A. Cohen.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* **73**:4101-9.
 95. **Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed.** 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**:6810-8.
 96. **Huthoff, H., and B. Berkhout.** 2001. Mutations in the TAR hairpin affect the equilibrium between alternative conformations of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acids Res* **29**:2594-600.
 97. **Huthoff, H., and B. Berkhout.** 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *Rna* **7**:143-57.
 98. **Huynh, J. R., T. P. Munro, K. Smith-Litiere, J. A. Lepesant, and D. S. Johnston.** 2004. The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev Cell* **6**:625-35.
 99. **Jacque, J. M., K. Triques, and M. Stevenson.** 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**:435-8.
 100. **Jeang, K. T.** 1998. Tat, Tat-associated kinase, and transcription. *J Biomed Sci* **5**:24-7.
 101. **Jiang, M., and J. Milner.** 2002. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* **21**:6041-8.
 102. **Jolicoeur, P., and D. Baltimore.** 1976. Effect of Fv-1 gene product on proviral DNA formation and integration in cells infected with murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:2236-40.
 103. **Kamine, J., T. Subramanian, and G. Chinnadurai.** 1993. Activation of a heterologous promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires Sp1 and is distinct from the mode of activation by acidic transcriptional activators. *J Virol* **67**:6828-34.
 104. **Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin.** 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by *tat* gene product. *Nature* **330**:489-93.
 105. **Kaplan, A. H., M. Manchester, and R. Swanstrom.** 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol* **68**:6782-6.
 106. **Karacostas, V., K. Nagashima, M. A. Gonda, and B. Moss.** 1989. Human immunodeficiency virus-like particles produced by a vaccinia virus expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8964-7.
 107. **Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr.** 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:893-905.
 108. **Kingsman, S. M., and A. J. Kingsman.** 1996. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* **240**:491-507.

109. **Kino, T., A. Gragerov, O. Slobodskaya, M. Tsopanomichalou, G. P. Chrousos, and G. N. Pavlakis.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* **76**:9724-34.
110. **Kinzy T, E. G.** 2000. Nontranslational functions of components of the translational apparatus. Cold Spring Harbor Laboratory Press:973-997.
111. **Kjems, J., and P. Askjaer.** 2000. Rev protein and its cellular partners. *Adv Pharmacol* **48**:251-98.
112. **Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler.** 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**:2945-53.
113. **Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken.** 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **73**:8824-30.
114. **Kumar, M., and G. G. Carmichael.** 1998. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1415-34.
115. **Lama, J., and D. Trono.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 matrix protein interacts with cellular protein HO3. *J Virol* **72**:1671-6.
116. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* **19**:6860-9.
117. **Le Hir, H., M. J. Moore, and L. E. Maquat.** 2000. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* **14**:1098-108.
118. **LeBlanc, J. J., and K. L. Beemon.** 2004. Unspliced Rous sarcoma virus genomic RNAs are translated and subjected to nonsense-mediated mRNA decay before packaging. *J Virol* **78**:5139-46.
119. **Lee, N. S., T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, and J. Rossi.** 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**:500-5.
120. **Lee, Y. M., and X. F. Yu.** 1998. Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD4+ T cells. *Virology* **243**:78-93.
121. **Li, J., H. Tang, T. M. Mullen, C. Westberg, T. R. Reddy, D. W. Rose, and F. Wong-Staal.** 1999. A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:709-14.
122. **Liang, C., J. Hu, R. S. Russell, and M. A. Wainberg.** 2002. Translation of Pr55(gag) augments packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA in a cis-acting manner. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:1117-26.
123. **Limon, A., N. Nakajima, R. Lu, H. Z. Ghory, and A. Engelman.** 2002. Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J Virol* **76**:12078-86.
124. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**:7913-24.

125. **Lingappa, J. R., R. L. Hill, M. L. Wong, and R. S. Hegde.** 1997. A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system. *J Cell Biol* **136**:567-81.
126. **Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers.** 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochemical Journal* **365**:817-24.
127. **Macdonald, P. M., and K. Kerr.** 1997. Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization. *Rna* **3**:1413-20.
128. **Malim, M. H., and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **13**:6180-9.
129. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
130. **Mariani, R., B. A. Rasala, G. Rutter, K. Wieggers, S. M. Brandt, H. G. Krausslich, and N. R. Landau.** 2001. Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **75**:3141-51.
131. **Mariani, R., G. Rutter, M. E. Harris, T. J. Hope, H. G. Krausslich, and N. R. Landau.** 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J Virol* **74**:3859-70.
132. **Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin.** 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2212-9.
133. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 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.
134. **Massiah, M. A., M. R. Starich, C. Paschall, M. F. Summers, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* **244**:198-223.
135. **Morikawa, Y., T. Goto, and K. Sano.** 1999. In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* **274**:27997-8002.
136. **Mouland AJ, Sylvia Francis-Zalzal, Laurent Chate-Chaix, Antonio Nanci, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2004. The Double-Stranded RNA-binding protein, Staufen, influences Human Immunodeficiency Virus Type 1, Morphogenesis, Budding and Maturation. manuscript in preparation.
137. **Mouland, A. J., E. A. Cohen, and L. DesGroseillers.** 2003. Trafficking of HIV-1 RNA: Recent Progress Involving Host Cell RNA-Binding Proteins. *Current Genomics* **4**:237-251.
138. **Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2000. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *Journal of Virology* **74**:5441-51.
139. **Mouland, A. J., Sylvia Francis-Zalzal, Laurent Chate-Chaix, Antonio Nanci, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2004. The Double-Stranded RNA-binding protein, Staufen, influences Human Immunodeficiency Virus Type 1, Morphogenesis, Budding and Maturation. manuscript in preparation.

140. **Mouland, A. J., H. Xu, H. Cui, W. Krueger, T. P. Munro, M. Prasol, J. Mercier, D. Rekosh, R. Smith, E. Barbarese, E. A. Cohen, and J. H. Carson.** 2001. RNA trafficking signals in human immunodeficiency virus type 1. *Molecular & Cellular Biology* **21**:2133-43.
141. **Narayan, S., and J. A. Young.** 2004. Reconstitution of retroviral fusion and uncoating in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7721-6.
142. **Newstein, M., E. J. Stanbridge, G. Casey, and P. R. Shank.** 1990. Human chromosome 12 encodes a species-specific factor which increases human immunodeficiency virus type 1 tat-mediated trans activation in rodent cells. *J Virol* **64**:4565-7.
143. **Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-72.
144. **Novina, C. D., M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, P. J. Beresford, J. Riess, S. K. Lee, R. G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, and P. A. Sharp.** 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* **8**:681-6.
145. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902-10.
146. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**:11055-66.
147. **Ono, A., D. Demirov, and E. O. Freed.** 2000. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J Virol* **74**:5142-50.
148. **Ono, A., and E. O. Freed.** 1999. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J Virol* **73**:4136-44.
149. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* **78**:1552-63.
150. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-30.
151. **Ono, A., J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **74**:2855-66.
152. **Orentas, R. J., and J. E. Hildreth.** 1993. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:1157-65.
153. **Ott, D. E.** 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev Med Virol* **12**:359-74.
154. **Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1998. 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* **72**:2962-8.
155. **Ott, D. E., L. V. Coren, D. G. Johnson, B. P. Kane, R. C. Sowder, 2nd, Y. D. Kim, R. J. Fisher, X. Z. Zhou, K. P. Lu, and L. E. Henderson.** 2000. Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **266**:42-51.

156. **Ott, D. E., L. V. Coren, B. P. Kane, L. K. Busch, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, E. N. Chertova, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1996. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **70**:7734-43.
157. **Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-72.
158. **Paul, C. P., P. D. Good, S. X. Li, A. Kleihauer, J. J. Rossi, and D. R. Engelke.** 2003. Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol Ther* **7**:237-47.
159. **Paul, C. P., P. D. Good, I. Winer, and D. R. Engelke.** 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* **20**:505-8.
160. **Peterlin, B. M., and D. Trono.** 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature Reviews. Immunology* **3**:97-107.
161. **Pollar VW, M. M.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**:491-532.
162. **Poon, D. T., E. N. Chertova, and D. E. Ott.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 preferentially encapsidates genomic RNAs that encode Pr55(Gag): functional linkage between translation and RNA packaging. *Virology* **293**:368-78.
163. **Poon, D. T., L. V. Coren, and D. E. Ott.** 2000. Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging. *J Virol* **74**:3918-23.
164. **Pornillos, O., S. L. Alam, R. L. Rich, D. G. Myszka, D. R. Davis, and W. I. Sundquist.** 2002. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo J* **21**:2397-406.
165. **Poupon, V., A. Stewart, S. R. Gray, R. C. Piper, and J. P. Luzio.** 2003. The role of mVps18p in clustering, fusion, and intracellular localization of late endocytic organelles. *Mol Biol Cell* **14**:4015-27.
166. **Pryciak, P. M., and H. E. Varmus.** 1992. Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* **66**:5959-66.
167. **Purcell, D. F., and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**:6365-78.
168. **Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, and A. Khvorova.** 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**:326-30.
169. **Rowland-Jones, S. L.** 2003. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* **3**:343-8.
170. **Russell, R. S., A. Roldan, M. Detorio, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* **77**:12986-95.
171. **Saifuddin, M., C. J. Parker, M. E. Peebles, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, M. Ghassemi, I. A. Rooney, J. P. Atkinson, and G. T. Spear.** 1995. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59

- in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med* **182**:501-9.
172. **Sakalian, M., S. D. Parker, R. A. Weldon, Jr., and E. Hunter.** 1996. Synthesis and assembly of retrovirus Gag precursors into immature capsids in vitro. *J Virol* **70**:3706-15.
173. **Sanchez-Velar, N., E. B. Udofia, Z. Yu, and M. L. Zapp.** 2004. hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev* **18**:23-34.
174. **Schaeffer, E., R. Geleziunas, and W. C. Greene.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol* **75**:2993-3000.
175. **Schmalzbauer, E., B. Strack, J. Dannull, S. Guehmann, and K. Moelling.** 1996. Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J Virol* **70**:771-7.
176. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
177. **Schuldt, A. J., J. H. Adams, C. M. Davidson, D. R. Micklem, J. Haseloff, D. St Johnston, and A. H. Brand.** 1998. Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* **12**:1847-57.
178. **Sharp, P. A.** 2001. RNA interference--2001. *Genes Dev* **15**:485-90.
179. **Shehu-Xhilaga, M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* **75**:1834-41.
180. **Shin, N. H., D. Hartigan-O'Connor, J. K. Pfeiffer, and A. Telesnitsky.** 2000. Replication of lengthened Moloney murine leukemia virus genomes is impaired at multiple stages. *J Virol* **74**:2694-702.
181. **Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**:834-9.
182. **Sodroski, J., W. C. Goh, C. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, and W. Haseltine.** 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* **321**:412-7.
183. **Southgate, C., M. L. Zapp, and M. R. Green.** 1990. Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein. *Nature* **345**:640-2.
184. **Southgate, C. D., and M. R. Green.** 1995. Delineating minimal protein domains and promoter elements for transcriptional activation by lentivirus Tat proteins. *J Virol* **69**:2605-10.
185. **St Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nusslein-Volhard.** 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**:51-63.
186. **St Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall, and M. Jantsch.** 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10979-83.
187. **St Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Richstein, and C. Nusslein-Volhard.** 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* **107 Suppl**:13-9.

188. **Stevenson, M.** 2003. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol* **3**:851-8.
189. **Stoye, J. P.** 1998. Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev Sci Tech* **17**:269-77.
190. **Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski.** 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**:848-53.
191. **Tang, Y., U. Winkler, E. O. Freed, T. A. Torrey, W. Kim, H. Li, S. P. Goff, and H. C. Morse, 3rd.** 1999. Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J Virol* **73**:10508-13.
192. **Tardif, M. R., and M. J. Tremblay.** 2003. Presence of host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 virions increases productive infection of CD4+ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material. *J Virol* **77**:12299-309.
193. **Temme, C., S. Zaessinger, S. Meyer, M. Simonelig, and E. Wahle.** 2004. A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *Embo J* **23**:2862-71.
194. **Tessmer, U., and H. G. Krausslich.** 1998. Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. *J Virol* **72**:3459-63.
195. **Towers, G. J., T. Hatzioannou, S. Cowan, S. P. Goff, J. Luban, and P. D. Bieniasz.** 2003. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* **9**:1138-43.
196. **Tremblay, M. J., J. F. Fortin, and R. Cantin.** 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* **19**:346-51.
197. **Tritel, M., and M. D. Resh.** 2000. Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* **74**:5845-55.
198. **UNAIDS.** 2004. www.unaids.org.
199. **Venkatesh, L. K., T. Gettemeier, and G. Chinnadurai.** 2003. A nuclear kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *J Virol* **77**:7236-43.
200. **Villace, P., R. M. Marion, and J. Ortin.** 2004. The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**:2411-20.
201. **von Schwedler, U. K., K. M. Stray, J. E. Garrus, and W. I. Sundquist.** 2003. Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol* **77**:5439-50.
202. **von Schwedler, U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H. E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimbora, A. Scott, H. G. Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* **114**:701-13.
203. **Wagner, C., I. Palacios, L. Jaeger, D. St Johnston, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and C. Brunel.** 2001. Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J Mol Biol* **313**:511-24.

204. **Wang, W., J. Cote, Y. Xue, S. Zhou, P. A. Khavari, S. R. Biggar, C. Muchardt, G. V. Kalpana, S. P. Goff, M. Yaniv, J. L. Workman, and G. R. Crabtree.** 1996. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* **15**:5370-82.
205. **Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones.** 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-62.
206. **Weis, K.** 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* **14**:328-35.
207. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian stauferin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular & Cellular Biology* **19**:2220-30.
208. **Willetts, K. E., F. Rey, I. Agostini, J. M. Navarro, Y. Baudat, R. Vigne, and J. Sire.** 1999. DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase is specifically incorporated into human immunodeficiency virus type 1 viral particles through a Vpr-independent mechanism. *J Virol* **73**:1682-8.
209. **Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S. M. Burgess.** 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**:1749-51.
210. **Wu-Baer, F., W. S. Lane, and R. B. Gaynor.** 1995. The cellular factor TRP-185 regulates RNA polymerase II binding to HIV-1 TAR RNA. *Embo J* **14**:5995-6009.
211. **Yakunin, A. F., and P. C. Hallenbeck.** 1998. A luminol/iodophenol chemiluminescent detection system for western immunoblots. *Anal Biochem* **258**:146-9.
212. **Yamashita, M., and M. Emerman.** 2004. Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *J Virol* **78**:5670-8.
213. **Yankulov, K., and D. Bentley.** 1998. Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Curr Biol* **8**:R447-9.
214. **Yao, X. J., A. J. Mouland, R. A. Subbramanian, J. Forget, N. Rougeau, D. Bergeron, and E. A. Cohen.** 1998. Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. *Journal of Virology* **72**:4686-93.
215. **Yoon, Y. J., and K. L. Mowry.** 2004. Xenopus Staufin is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development* **131**:3035-45.
216. **Yung, E., M. Sorin, A. Pal, E. Craig, A. Morozov, O. Delattre, J. Kappes, D. Ott, and G. V. Kalpana.** 2001. Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat Med* **7**:920-6.
217. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
218. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**:2556-69.

219. **Zimmerman, C., K. C. Klein, P. K. Kiser, A. R. Singh, B. L. Firestein, S. C. Riba, and J. R. Lingappa.** 2002. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* **415**:88-92.