

Université de Montréal

**Étude du rôle de la protéine Staufen1 dans le
cycle de réplication du virus d'immunodéficience
humaine de type 1**

par

Laurent Chatel-Chaix

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

Septembre 2006

© Laurent Chatel-Chaix, 2006



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

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle de la protéine Staufen1 dans le cycle de réplication du
virus d'immunodéficience humaine de type 1

présentée par :

Laurent Chatel-Chaix

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Léa Brakier-Gingras, présidente-rapporteuse
Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Andrew J. Mouland, co-directeur
Nikolaus Heveker, membre du jury
Michel J. Tremblay, examinateur externe
Guy Boileau, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

En tant que parasite intracellulaire obligatoire, le virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) recrute certaines machineries de l'hôte qui sont cruciales pour l'assemblage et la relâche extracellulaire de virus infectieux. Staufen1 (Stau1) est sélectivement incorporé dans le VIH-1 via un processus qui est intimement lié à l'encapsidation de l'ARN génomique du VIH-1 (ARNg).

Afin d'élucider les fonctions de Stau1 lors de la réplication du VIH-1, nous avons caractérisé ses interactions avec pr55^{Gag}, le médiateur principal de l'assemblage viral et de l'encapsidation de l'ARNg. Des expériences de co-immunoprécipitations, de fractionnements cellulaires et de transfert d'énergie bio-luminescente par résonance (BRET) dans des cellules vivantes, ont mis en évidence l'interaction directe et spécifique entre Stau1 et le domaine nucléocapside (NC) de pr55^{Gag}. Cette interaction requiert plusieurs déterminants au sein de Stau1 et de pr55^{Gag} que nous avons identifiés. Par ailleurs, nous montrons que l'ARNg (mais pas les ARN viraux épissés) est présent dans les complexes contenant Stau1. Des essais d'infectivité virale effectués suite à la déplétion de Stau1 dans les cellules productrices démontrent que les niveaux cellulaires de Stau1 influencent l'infectivité des virus néosynthésés. Ces données supportent que Stau1 influence l'infectivité virale lors de processus contrôlés par NC tels que l'assemblage et l'encapsidation de l'ARNg.

Nous avons donc par la suite étudié l'influence potentielle de Stau1 sur l'assemblage du VIH-1 en tirant avantage d'un nouvel essai d'oligomérisation de pr55^{Gag} basé sur le BRET et effectué dans les cellules vivantes ou suite à des fractionnements cytoplasmiques. Nos résultats montrent qu'aussi bien la surexpression que la déplétion de Stau1 provoquent une augmentation des niveaux de BRET pr55^{Gag}-pr55^{Gag}. Ceci suggère que Stau1 joue un rôle dans la multimérisation de pr55^{Gag} lors de l'assemblage. Cet effet n'a été observé qu'au sein de compartiments membranaires dans lesquels la majeure partie

de l'assemblage s'effectue. Par ailleurs, nous montrons que la séquence MRGGAYPPRYFY, située dans l'extrémité N-terminale de Stau1, est cruciale pour son activité lors de l'assemblage (mais pas pour son association à pr55^{Gag}).

Toutes ces données indiquent que Stau1 influence l'assemblage et l'infectivité du VIH-1 vraisemblablement via son association avec pr55^{Gag} et l'ARNg au sein du même complexe.

Mots-clés : Stau1, pr55^{Gag}, NC, assemblage viral, encapsidation d'ARN génomique, interactions virus/hôte, BRET.

ABSTRACT

As an obligate parasite, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) takes advantage of the activities of several host cell machineries that are critical to the completion of virus assembly and the release of fully infectious virus particles from cells. Stau1 (Staufen1) is a host protein that is selectively incorporated into HIV-1 particles in a poorly defined process that involves the selection of HIV-1 genomic RNA (gRNA) for encapsidation.

To better understand Stau1 function in HIV-1 replication, we have characterized its interactions with the viral pr55^{Gag}, the principal mediator of gRNA encapsidation and HIV-1 assembly. Co-immunoprecipitation, cell fractionation and live cell bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays demonstrated a specific and direct interaction between Stau1 and the nucleocapsid (NC) domain of pr55^{Gag}. We also identified several determinants within NC and Stau1 that are required for this interaction. Moreover, we show that gRNA (but not HIV-1 spliced RNA) is detected within Stau1-containing complexes. Knockdown of Stau1 expression in HIV-1-expressing cells demonstrates that this cellular protein is important for the generation of fully infectious virus. These results support a role for Stau1 in processes that influence viral infectivity and that depend on the NC domain of pr55^{Gag} such as viral assembly and gRNA packaging.

Hence, we tested whether Stau1 modulates HIV-1 assembly using a new pr55^{Gag} oligomerization assay based on BRET in both live cells and extracts after cytoplasmic fractionation. Our results show that both the over-expression and knockdown of Stau1 increase the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET levels, suggesting a role for Stau1 in modulating pr55^{Gag} oligomerization during assembly. This effect was only observed in membranes, a cellular compartment in which pr55^{Gag} assembly primarily occurs. Moreover, we show that the 12 amino acids sequence MRGGAYPPRYFY, located within Stau1 N-terminus, is critical for its influence in HIV-1 assembly but not for its association with pr55^{Gag}.

Altogether, our results indicate that Stau1, pr55^{Gag} and genomic RNA are part of the same intracellular complex and that Stau1 influences, likely through these interactions, HIV-1 assembly and infectivity.

Keywords : Stau1, pr55^{Gag}, NC, viral assembly, genomic RNA encapsidation, virus/host interactions, BRET.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xix
REMERCIEMENTS.....	xxiv
INTRODUCTION.....	1
AVANT-PROPOS.....	1
CHAPITRE 1 : Le VIH-1	3
1 Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus.....	3
2 Les protéines du VIH-1	3
3 Survol du cycle de réplication du VIH-1	4
4 Stratégies antivirales	7
4.1 La situation actuelle	7
4.2 Le défi des années futures.....	8
5 Le cycle de réplication du VIH-1	10
5.1 Structure du VIH-1.....	10
5.2 Les étapes précoces du cycle viral	12
5.2.1 Entrée virale	12
5.2.2 La décapsidation virale	14
5.2.3 La rétrotranscription.....	16
5.2.3.1 Principe	16
5.2.3.2 La formation des LTR.....	19

5.2.3.3 Les différentes étapes de la rétrotranscription	19
5.2.3.4 Le « DNA flap ».....	21
5.2.3.5 L'implication de facteurs cellulaires	21
5.2.4 Importation du complexe de préintégration	22
5.2.4.1 Le PIC	22
5.2.4.2 La régulation de l'import nucléaire du PIC.....	22
5.2.5 Intégration du provirus	24
5.2.5.1 La réaction catalysée par IN.....	24
5.2.5.2 Les co-facteurs d'intégration.....	25
5.3 Expression des gènes viraux	27
5.3.1 Structure du provirus.....	27
5.3.2 Régulation de la transcription virale	27
5.3.3 Épissage des ARN viraux.....	30
5.3.4 Régulation de l'export nucléaire des ARNs viraux.....	31
5.3.5 Régulation de la traduction des protéines virales.....	32
5.4 L'assemblage du VIH-1	37
5.4.1 pr55 ^{Gag}	37
5.4.1.1 pr55 ^{Gag} est le « LEGO » de l'assemblage viral	37
5.4.1.2 Les domaines fonctionnels de pr55 ^{Gag}	38
5.4.2 L'assemblage est un processus actif et dynamique.....	42
5.4.3 Le contrôle spatio-temporel de l'assemblage.....	45
5.4.4 Les premiers intermédiaires d'assemblage détectés	46
5.4.5 Le domaine I et la régulation de la multimérisation de pr55 ^{Gag}	49
5.4.5.1 La participation présumée de NC dans les premiers contacts pr55 ^{Gag} - pr55 ^{Gag}	49
5.4.5.2 Le rôle de CA dans l'assemblage.....	51
5.4.5.2.1 Les observations à partir d'études in vitro	51
5.4.5.2.2 Les observations à partir d'études in vivo.....	52

5.4.5.3 La participation potentielle de MA dans la multimérisation de pr55 ^{Gag} ..	53
5.4.6 L'assemblage au sein de compartiments membranaires : La controverse.	54
5.4.6.1 Le mode d'assemblage du VIH-1 semble dépendant du type cellulaire..	54
5.4.6.2 Les différents modèles du trafic intracellulaire de pr55 ^{Gag}	54
5.4.6.3 La régulation de l'association aux membranes par le domaine M.....	59
5.4.6.3.1 Qu'est-ce-que le domaine M du VIH-1 ?.....	59
5.4.6.3.2 L'interrupteur myristylique (« myristoyl switch »).....	59
5.4.6.3.3 Le ciblage de pr55 ^{Gag} vers les MVB	63
5.4.6.3.4 Membrane versus MVB : Les arguments	64
5.4.7 Rôles potentiels des modifications post-traductionnelles de pr55 ^{Gag}	66
5.4.8 La participation de pr160 ^{Gag-Pol} lors de l'assemblage.....	67
5.4.8.1 L'importance du ratio pr55 ^{Gag} /pr160 ^{Gag-Pol}	67
5.4.8.2 Mode d'action de pr160 ^{Gag-Pol} sur l'assemblage.....	67
5.4.9 Les enjeux dans le domaine de l'assemblage du VIH-1	68
5.5 Bourgeonnement et relâche du VIH-1	68
5.5.1 Le domaine L du VIH-1 p6.....	68
5.5.2 La participation des ESCRT.....	69
5.6 Le destin cytoplasmique de l'ARN génomique du VIH-1	72
5.6.1 La région « 5' leader »	73
5.6.2 Transport de l'ARNg.....	76
5.6.2.1 Les éléments de localisation A2RE.....	76
5.6.2.2 Le transport de l'ARNg et les endosomes.....	76
5.6.3 Dimérisation de l'ARN génomique	77
5.6.4 Régulation de l'encapsidation de l'ARN génomique.....	78
5.6.4.1 Le signal d'encapsidation de l'ARNg	79
5.6.4.2 pr55 ^{Gag} et l'encapsidation de l'ARNg	80
5.6.4.2.1 La participation de NC	80
5.6.4.2.2 Les contributions des autres domaines de pr55 ^{Gag}	81

5.6.4.2.3 Multimérisation de pr55 ^{Gag} et sélection d'ARN.....	82
5.6.4.3 Implication de structures tertiaires	83
5.6.4.3.1 Le lien entre la dimérisation et l'encapsidation	83
5.6.4.3.2 L'interaction tertiaire polyA/MA	84
5.6.4.3.3 BMH versus LDI.....	84
5.6.4.4 Le locus cellulaire de la sélection de l'ARNg par le virus.....	86
5.7 Maturation du VIH-1.....	88
5.7.1 Principe	88
5.7.2 Le clivage de pr55 ^{Gag} par PR peut lui conférer de nouvelles propriétés	88
5.8 Les facteurs de l'hôte et le VIH-1 : Récapitulons !.....	94
CHAPITRE 2 : La protéine Staufen1 humaine	98
1 La famille des protéines liant l'ARN double-brin.....	98
2 Staufen chez la drosophile (dStau) : la genèse.....	98
3 Les protéines Staufen chez les mammifères : Staufen1 et Staufen2.....	102
3.1 Organisation de Staufen1	102
3.2 Organisation de Staufen2	103
3.3 Les différences d'affectation fonctionnelle de Stau1 et Stau2.....	103
3.4 Les fonctions cellulaires de Staufen1	104
3.4.1 L'activité de liaison à l'ARN de Stau1	104
3.4.2 Stau1 transporte des ARN messagers	106
3.4.3 Stau1 et la traduction.....	109
3.4.4 La dégradation d'ARNm médiée par Stau1	110
4 Staufen dans les autres organismes.....	111
CHAPITRE 3 : Staufen1 et VIH-1 : Les débuts.....	112
1 L'encapsidation de Stau1 dans le VIH-1 et ses déterminants	112
2 Les rôles potentiels de Stau1 dans le cycle viral.....	115
2 Les rôles potentiels de Stau1 dans le cycle viral.....	116
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	117

RÉSULTATS	118
ARTICLE 1 : Identification of Staufen in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ribonucleoprotein Complex and a Role in Generating Infectious Viral Particles	118
Mise en contexte.....	118
Abstract	121
Introduction.....	122
Results.....	124
Expression of Staufen from HIV-1 chimeric proviruses.....	124
Staufen and HIV-1 pr55 ^{Gag} cofractionate on sucrose gradients	124
Staufen interacts with HIV-1 pr55 ^{Gag} in an RNA-independent manner	130
Staufen/pr55 ^{Gag} interaction requires the HIV-1 NC domain.....	134
Staufen and HIV-1 NC domain of pr55 ^{Gag} directly interact in live cells	137
HIV-1 genomic RNA is found in the Staufen immune complex	140
Staufen knockdown by RNA interference generates HIV-1 with compromised infectivity	143
Discussion	145
Acknowledgements.....	152
Materials and methods	153
Cell culture and transfection	153
Construction of chimeric proviruses	153
Construction of Gag expressors	153
Cell fractionation on sucrose gradients	155
Immunoprecipitation and RT-PCR	155
Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) analysis	157
siRNA Knock-down: Transfections, Western Blot and RT-PCR Analysis.....	158
HIV-1 Infectivity Assay.....	159

References	160
ARTICLE 2 : The host protein Stau1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55 ^{Gag} multimerization.....	164
Mise en contexte.....	164
Abstract	166
Introduction.....	167
Experimental procedures.....	170
Cell culture and reagents.....	170
Plasmid construction	170
BRET analyses.....	171
Membrane flotation assays and S100/P100 fractionation.....	172
Immunoprecipitation	173
Results.....	174
Stau1 over-expression modulates NC-mediated pr55 ^{Gag} -pr55 ^{Gag} interaction in live cells	174
Stau1 depletion increases pr55 ^{Gag} -pr55 ^{Gag} interaction in live cells.....	175
Stau1 does not influence HIV-1 pr55 ^{Gag} membrane association	176
Stau1 interacts with pr55 ^{Gag} within membrane and cytosolic complexes.....	177
Stau1 modulates pr55 ^{Gag} multimerization within membrane-associated complexes.	179
Stau1 increases the density of pr55 ^{Gag} -containing complexes.....	181
Targeting Stau1 to membranes further increases pr55 ^{Gag} multimerization.....	183
Discussion	184
Stau1 levels influence pr55 ^{Gag} assembly.....	184
Both Stau1 depletion by RNAi and overexpression increase pr55 ^{Gag} multimerization	186
Role of Stau1 during HIV-1 assembly.....	187
Acknowledgments.....	189
References	189

Figure legends	194
ARTICLE 3 : Characterization of Stau1-mediated effect in human immunodeficiency virus type 1 assembly	206
Mise en contexte.....	206
Abstract	208
Introduction	209
Materials and methods	212
Cell culture and reagents	212
Plasmid construction	212
Membrane flotation assays and S100-P100 fractionation.....	213
BRET assays	214
Co-immunoprecipitation assays	215
Results	216
Both NC zinc fingers mediate Stau1/pr55 ^{Gag} interaction	216
The N-terminal domain of Stau1 is required for pr55 ^{Gag} multimerization enhancement	218
Stau1 ^{ΔN188} -HA does not affect the assembly of membrane-associated pr55 ^{Gag} complexes.....	219
Stau1 ^{ΔN188} still interacts with HIV-1 Gag.....	221
The region encompassing amino acids 26 to 37 of Stau1 ⁵⁵ is important for its function in pr55 ^{Gag} multimerization	221
Discussion	223
Aknowledgements.....	227
References	227
Figure legends	233

DISCUSSION	244
1 Les niveaux de Stau1 influencent l'infectivité du VIH-1 néosynthétisé.....	244
2 Par quoi se traduit l'influence de Stau1 sur la multimérisation de pr55 ^{Gag} ?	245
3 Par quels moyens Stau1 influence-t-il la multimérisation de pr55 ^{Gag} ?	246
4 Les effets paradoxaux des variations des niveaux de Stau1 sur l'assemblage du VIH-1	251
5 Le mode de liaison de Stau1 à l'ARN génomique	255
6 Y a-t-il un lien entre l'effet de Stau1 sur l'assemblage et celui sur l'encapsidation de l'ARNg ?	257
7 Pourquoi Stau1 est-il encapsidé dans le VIH-1?.....	258
8 Un lien entre Stau1 et l'immunité innée?.....	261
9 L'utilisation d'essais BRET pr55 ^{Gag} -pr55 ^{Gag} dans l'identification d'inhibiteurs de l'assemblage du VIH-1.	262
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	264
BIBLIOGRAPHIE.....	265
ANNEXES	I
Annexe I : Liste des contributions à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse	I
Annexe II : Accord des coauteurs	II

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau I : Exemples de facteurs cellulaires impliqués dans diverses étapes du cycle de réplication du VIH-1.....	97
---	----

Résultats

Article 1

Table I: Primer combinations used in PCR amplifications for Gag constructs based on HIV-1 HxB2 pr55 ^{Gag}	154
--	-----

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Le cycle de réplication du VIH-1.....	5
Figure 2 : La structure du VIH-1.....	11
Figure 3 : Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1.....	15
Figure 4 : La rétrotranscription.....	17
Figure 5 : Le provirus du VIH-1, ses gènes et la régulation de l'épissage alternatifs de l'ARN viral.....	28
Figure 6 : La régulation de la traduction des protéines virales.....	33
Figure 7 : La multimérisation de pr55 ^{Gag} génère de nouvelles capsides.....	38
Figure 8: pr55 ^{Gag} et ses domaines fonctionnels.....	40
Figure 9 : La densité des complexes d'assemblage du VIH-1 augmente au cours du temps.....	43
Figure 10 : Le suivi temporel du destin intracellulaire de complexes d'assemblage.....	47
Figure 11 : Représentation schématique de la séquence protéique du domaine NC de pr55 ^{Gag}	50
Figure 12 : Les différents modes d'assemblage du VIH-1.....	55
Figure 13 : L'interrupteur myristylique et son contrôle.....	60
Figure 14 : Le domaine L et son implication dans la relâche virale.....	70
Figure 15 : La région « 5' leader » de l'ARNg du VIH-1 et sa dimérisation.....	74
Figure 16 : Les conformations BMH et LDI de la région « 5' leader » de l'ARNg.....	85
Figure 17 : La maturation de pr55 ^{Gag} par PR.....	89
Figure 18 : La maturation du VIH-1 confère de nouvelles propriétés à ses protéines de structure.	92
Figure 19 : La protéine Staufén.....	99
Figure 20 : dStau est impliqué dans le transport de l'ARN.....	101

Figure 21 : Image stéréo de la structure tridimensionnelle à basse énergie du dsRBD3 de dStau interagissant avec de l'ARN double-brin.....	105
Figure 22 : Les fonctions cellulaires de Stau1	107
Figure 23 : Stau1 et le VIH-1.....	114

Résultats

Article 1

Figure 1: Construction and characterization of Staufen-expressing HIV-1 chimeric proviruses.....	125
Figure 2: Staufen and pr55 ^{Gag} cofractionate on sucrose gradients.....	128
Figure 3: Treatment of the Staufen Gag complexes does not affect their interaction.....	131
Figure 4: Staufen binds pr55 ^{Gag} via the NC domain.....	135
Figure 5: Staufen directly binds the HIV-1 NC domain of pr55 ^{Gag} in living cells.....	139
Figure 6: Selective association of HIV-1 genomic RNA with Staufen-containing complexes.....	141
Figure 7: siRNA-mediated knock-down of Staufen expression results in decreased HIV-1 infectivity.....	145
Figure 8: Proposed model for Staufen involvement in the post-transcriptional steps of HIV-1 lifecycle.....	149

Article 2

Figure 1: Stau1 enhances pr55 ^{Gag} assembly in live cells.....	198
Figure 2: Stau1 depletion by RNAi promotes pr55 ^{Gag} multimerization.....	199
Figure 3: Stau1 over-expression or depletion by RNAi does not change pr55 ^{Gag} association with membranes.....	200
Figure 4: A subset of Stau1 is membrane-associated.....	201
Figure 5: Stau1 associates with pr55 ^{Gag} in the cytosol and in membranes.....	202

Figure 6: Stau1 over-expression or depletion by RNAi increases pr55 ^{Gag} assembly in membranes but not in the cytosol.....	203
Figure 7: Stau1 over-expression or depletion by RNAi induce the formation of detergent-resistant pr55 ^{Gag} complexes.....	204
Figure 8: Enrichment of Stau1 on membranes increases pr55 ^{Gag} multimerization.....	205

Article 3

Figure 1: Design and expression of NC mutants used for the fine mapping of Stau1/NC interaction.....	237
Figure 2: NC zinc fingers mediate Stau1/pr55 ^{Gag} interaction.....	238
Figure 3: Schematic representation of HA-tagged Stau1 ⁵⁵ expressors.....	239
Figure 4: The N-terminus of Stau1 is required for the modulation of pr55 ^{Gag} multimerization in live cells.....	240
Figure 5: Stau1 ^{ΔN188} -HA does not affect the multimerization of membrane-associated pr55 ^{Gag}	241
Figure 6: Stau1 ^{ΔN188} interacts with HIV-1 Gag in live cells.....	242
Figure 7: Identification of the region encompassing amino acids 26 to 37 within Stau1 ⁵⁵ as a regulatory sequence of HIV-1 assembly.....	243

Discussion

Figure 1 : Un modèle hypothétique de la régulation spatio-temporelle de l'assemblage du VIH-1.....	249
Figure 2 : Une approche expérimentale possible pour identifier de nouveaux cofacteurs d'assemblage.....	252

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABOBEC : Polypeptide catalytique de l'enzyme éditant l'ARNm de l'apolipoprotéine B

ADN: Acide désoxyribonucléique

AP-3 : Protéine adaptatrice-3

ARN : Acide ribonucléique

ARNg : ARN génomique du VIH-1

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

ATM : « Ataxia-telangiectasia-mutated »

ATP : Adénosine triphosphate

ATR : « ATM- and Rad3-related »

BAF : Facteur de barrière à l'autointégration

BMH : Épingles à cheveux multiples ramifiées

BRET : Transfert d'énergie biolumineuse par résonance

CA : Capside

CaMK-II : Kinase dépendante de Ca^{2+} /calmoduline II

CDI : Interface de dimérisation de CA

CTD : Domaine C-terminal de CA

CypA : Cyclophiline A

DDX : Protéine « dead box »

DIS : Site d'initiation de la dimérisation

dsRBD : Domaine de liaison à l'ARN double-brin

dStau : Protéine Staufen de drosophile

eIF4G : Facteur de l'initiation de la traduction eucaryotique 4G

ESCRT : Complexe du tri endosomique requis pour le transport

FRET : Transfert d'énergie fluorescente par résonance

GFP : Protéine fluorescente verte

hnRNP : Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire
HTLV-1 : Virus de la leucémie humaine des cellules T de type 1
IN : Intégrase
INI1 : « Intégrase interactor 1 »
IRES : Site d'entrée interne du ribosome
IOP7 : Importine 7
kDa : Kilodalton
KLC : « Kissing loop complex »
LEDGF/p75 : Facteur de croissance dérivé de l'épithélium de lentille
LDI : Interaction longue distance
LTR : Longues répétitions terminales
MA : Matrice
MHR : Région d'homologie majeure de CA
MLV : Virus de la leucémie murine
M-PMV : Virus de singe de Mason-Pfizer
MTOC : Centre organisateur des microtubules
MVB : Corps multivésiculaire
NC : Nucléocapside
NES : Signal d'export nucléaire
NLS : Signal de localisation nucléaire
NMD : Dégradation médiée par le non-sens
NTD : Domaine N-terminal de CA
PABP : Protéine de liaison au poly-A
PBS : Site de liaison de l'amorce
PIC : Complexe de préintégration
PI(4, 5)P2 : Phosphatidyl-inositol (4, 5) bis-phosphate
PKR : Protéine kinase dépendante de l'ARN double brin
PPT : « polypurine tract »

PR : Protéase
RHA : ARN hélicase A
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RNP : Ribonucléoparticule
RRE : Élément de réponse à Rev
RSV : Virus du sarcome de Rous
RT : Transcriptase inverse
RTC : Complexe de rétrotranscription
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA : petits ARN interférants
shRNA : petits ARN en épingle à cheveux
SBS : Site de liaison de Stau1
SMD : Dégradation médiée par Staufen
Stau1 : Staufen1
Stau2 : Staufen2
TAR : Élément de réponse de *trans*-activation
TBD : Domaine de liaison à la tubuline
TGN : Réseau *trans* de l'appareil de Golgi
TRBP : Protéine liant l'ARN TAR
TRIM5 α : Motifs tripartites 5 α
Tsg101 : Gène de susceptibilité aux tumeurs 101
UNG : Glycosidase de l'uracile dans l'ADN
UTR : Région non traduite
VIH-1 : Virus d'immunodéficience humaine de type 1
VLP : « Virus-like particles »

*À mes Parents,
À ma Belle,
À mes Grand-Mères,
Ainsi qu'à ma Troisième,
À Mémé*

*« Laboratoire.
Même quand on ne trouve rien,
on renifle l'odeur de la vérité qui se cache. »
Jean Rostand*

*« Le travail, c'est la santé...
Rien faire, c'est la conserver. »
Henri Salvador*

REMERCIEMENTS

Et voilà.....C'est le moment tant attendu. Les premiers mots de ma thèse seront les derniers écrits. Ces quelques pages sont là pour remercier les personnes qui ont permis l'aboutissement de mon doctorat et donc l'écriture de cette section. Maintenant que la fin arrive, je suis conscient que je ne serais pas là où je suis sans ces personnes qui m'ont entouré pendant ces six années durant lesquelles j'ai vécu ce que j'appelle une relation amour/haine avec Staufen.

Tout d'abord, je remercie infiniment mes deux directeurs de thèse, les Docteurs Luc DesGroseillers et Andrew Mouland qui m'ont enseigné et transmis l'« amour » de Staufen et du VIH, un ingrédient qui a été capital durant mon doctorat et l'écriture de cette thèse. Grâce à vous, j'ai travaillé pendant six ans sur un sujet qui m'a réellement passionné. Luc, merci pour votre disponibilité et votre écoute dans les meilleurs comme dans les pires moments. Nos discussions « philosophico-staufenesque » me manqueront énormément. Vous resterez pour moi mon « contrôle positif » d'une carrière scientifique réussie et saine. Andrew, tout d'abord, je vous remercie d'avoir accepté d'être mon codirecteur il y a si longtemps sans même m'avoir rencontré ou parlé. J'ai énormément appris à vos côtés et je pense sincèrement que vous m'avez bien formé pour la suite de ma carrière scientifique. De plus, grâce à vous, on peut dire que mon niveau en anglais est passé de la catégorie « minable » à « moins minable », ce qui n'est pas un mal en science.

Malheureusement, durant ces six ans, il y a eu des périodes de découragement plus sombres (Ça, c'est le côté « haine » de ma relation avec Staufen!). Dieu merci, j'ai surmonté ces obstacles grâce à un environnement scientifique privilégié où beaucoup de mes collègues étaient, sont et resteront mes amis. Outre mon intérêt pour la science, grâce à eux, je ne suis jamais rentré dans un laboratoire à reculons. Je veux donc leur rendre hommage.

Au début, j'ai appris à travailler dans 15 m² avec deux personnes sans que l'on finisse par s'entre-tuer (plus dur que dans « le loft »!). Mais ceci a été possible en partie grâce à toi, Véro, et à ta patience légendaire notamment face à l'« invasion française de bench » et aux bouteilles de tampon vides. La seule chose de cette période que j'aimerais effacer de ma mémoire est notre initiation au « Blanche-Neige ». J-F, cela a été un plaisir de travailler avec toi, malgré tes goûts musicaux douteux, tes incrustations répétitives sur mes gels d'acrylamide et tes colliers en bois (qui ne toucheront jamais mon cou, fais-toi une raison). Hélas, grâce à toi, je reconnaît à la première note malgré moi toutes les reprises punk de classiques rock. Cela ne m'empêche pas d'avoir à chaque fois le sourire aux lèvres, comme quoi, ce n'est pas si mal.

George(tte), mon gougnole préféré, et Demian(ita), sans qui mon épaule gauche serait encore fonctionnelle et vierge de bleus, vous restez encore pour moi Les Séniors du lab' car j'ai appris à « tous » les niveaux à vos côtés. Merci pour tous ces surnoms stupides, Céloran, Loreng, Playmobil, qui m'ont vraiment manqués cette dernière année. Levon, thank you for all these scientific and « para-scientific » discussions. I really appreciated your honesty and support, I won't forget it. Céline, cela a été un plaisir d'être ton bourreau (préféré, j'espère) car ton aide à la fin de mon doctorat a été inestimable. Catherine, merci beaucoup pour m'avoir fait découvrir les joies du BRET et également plusieurs restos aussi sympas qu'exotiques. Sam(« ED209 »)uel, mon voisin d'en face, tu incarneras toujours pour moi la force tranquille et je n'oublierai pas de si tôt notre périple troublant dans Google Images. Marjo, ma tête de turc préférée, je sais désormais grâce à toi, que les saumons géants, hé bien ça existe pour vrai, que je ne comprend rien à l'accent acadien, que les cerveaux sont visibles en Western blot et que je peux enfin mettre un visage sur ma haine de Star Académie. Furax, comment je vais faire maintenant sans une encyclopédie vivante? Maintenant que je pars, il va falloir que je lise plus. Bonne chance pour la suite, mec, avec Nahum.

Je remercie mes autres collègues de laboratoire présents et passés qui m'ont toujours aidé ou fait rire à un moment ou à un autre, Linda, Kathy, Gabriel, Will (le gars des îles), Kim, Miro, Mélanie, Lara, Maria, Véro T., Frédérique, Philippe et Francis. Pour tous ces bons moments passés durant ces six années et votre support, je vous remercie sincèrement du fond du coeur.

Je tiens également à rendre hommage à ces personnes qui ne faisaient pas partie du laboratoire mais que j'ai côtoyées tous les jours pour 1 microlitre d'enzyme « mouetté », pour des conseils scientifiques, pour du soutien quand les papiers sont refusés et des fêtes quand ils sont acceptés, ou tout simplement pour dîner, boire et rire en bonne compagnie. Je remercie donc Ti-Fred (la version chauve de He-Man), St-Louis (ainsi que sa mère pour toutes ces nuits de réconfort), Pitch et son « crayon clonage », Véro de nouveau, Rod, l'« Argentinian lover » Ariel, Fernando « Mon Chum » et tous les autres que j'oublie.

Je remercie également mes stagiaires, Julie, Alex I (Ben Amor) et Alex II (Desjardins) pour m'avoir aidé dans mes manip' à des moments où j'en avais bien besoin.

Un gros merci à Louise Cournoyer pour « je-ne-sais-pas-combien » de milliards de cellules 293T mises en culture pour moi en cinq ans.

Je remercie les Dr. Éric Cohen et Wainberg, ainsi que les membres de leur laboratoire respectif pour leur aide et leur accueil qui ont très précieux.

Je remercie les membres de mes comités de thèse et d'examen pré-doctoral pour leurs conseils scientifiques avisés au cours de ces six années.

Je remercie également le département de Biochimie et la Faculté des Études Supérieures pour m'avoir octroyé chaque année une bourse d'excellence qui m'a vraiment aidé financièrement notamment pour me « ressourcer » en Europe chaque Noël.

Je remercie également le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) dont les subventions allouées aux Drs. DesGroseillers et Mouland respectivement ont permis non seulement de payer mon salaire durant mon doctorat mais également d'effectuer les travaux présentés dans cette thèse.

Je remercie mes parents à qui je dédie cette thèse. Depuis le début, vous m'avez soutenu financièrement et surtout psychologiquement même si ce que je faisais était du domaine de l'abstrait pour vous. Je ne vous l'ai pas souvent dit, mais vous m'avez beaucoup manqué. Malgré la distance qui nous sépare, vous avez participé indirectement à mon doctorat via les valeurs précieuses que vous m'avez apportées. Ce doctorat est donc un peu le votre. Un grand merci à mon frangin, Fabien; je n'appelle pas beaucoup mais le coeur y est. Si tu savais à quel point tes colis de biscuits « à la française » ont été réconfortants pour ton frère expatrié.

Finalement, je remercie la personne la plus chère à mes yeux, ma toute belle, ma collègue, ma voisine de « bench », ma confidente, ma cuisinière trop souvent hélas, mais surtout mon amoureuse, Karine. Woody Allen a dit « L'éternité, c'est long! Surtout vers la fin. ». C'est vrai! En tout cas en ce qui concerne un doctorat. Et ma fin de doc, tu l'as subie à 100% avec moi et à tous les niveaux. Je ne l'oublierai pas quand viendra ton tour. De plus, être seul au labo le soir, c'est bien; à deux c'est mieux! Sans toi, je n'en serais pas là et serais probablement encore en train de faire des expériences à la place d'écrire ces lignes. J'espère être aussi bon pour toi que tu l'as été pour moi durant ces dernières années. Je t'aime ma belle.

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) représente la maladie humaine la plus destructive que l'histoire ait connue puisqu'il est la cause du décès de 25 millions de personnes depuis 1981 dont 3,1 millions en 2005 [1]. L'agent causatif du SIDA est le virus d'immunodéficience humaine (VIH) et a été découvert en 1983 par les équipes des Professeurs Montagnier et Gallo [2, 3]. L'infection par ce virus mène à une déplétion du système immunitaire puisqu'il provoque la destruction des cellules immunitaires. À long terme, après plusieurs années de latence clinique, les personnes immunodéficientes meurent suite à une maladie opportuniste qui serait normalement maîtrisée par le système immunitaire de l'hôte.

On estime qu'actuellement 40,3 millions de personnes vivent avec le VIH dont 5 millions ont été nouvellement infectés. Cette maladie touche principalement l'Afrique subsaharienne avec 30 millions de personnes infectées [1].

Malgré les efforts déployés dans le développement de vaccins et de drogues antivirales, on est toujours incapable de guérir les gens du SIDA ou de prévenir la primo-infection par le VIH. Cependant, l'avènement de la trithérapie (des traitements basés sur la combinaison de plusieurs drogues anti-rétrovirales) a permis d'allonger considérablement la durée de vie des personnes infectées.

Le développement de nouveaux traitements antiviraux représente un enjeu de santé publique (et financier pour l'industrie) énorme. C'est pourquoi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques stimule grandement la recherche fondamentale via l'étude moléculaire des différentes étapes du cycle viral. De plus, ce type de recherche représente également un stimulus fondamental considérable puisque le VIH-1 (comme les virus

oncogéniques en leur temps) est un passeport formidable pour l'étude du fonctionnement moléculaire de processus cellulaires.

Ainsi, cette thèse parlera beaucoup du VIH-1, bien sûr, mais aussi énormément de son hôte sur lequel on a beaucoup appris grâce à ce virus.

CHAPITRE 1 : LE VIH-1

1 Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus

Le VIH-1 est un virus enveloppé dont le génome est de l'ARN simple-brin, linéaire, non segmenté et de polarité positive. L'affiliation du VIH-1 à la famille des rétrovirus provient de sa stratégie de réplication : En effet, suite à l'infection, son génome doit être rétrotranscrit en ADN double-brin linéaire qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte [4].

Le VIH-1 fait partie d'un sous-groupe des rétrovirus qui est celui des lentivirus. Une des caractéristiques de ces derniers est qu'ils ont évolué pour qu'ils puissent infecter des cellules quiescentes (et donc, qui ne se divisent pas). Ceci se traduit souvent par une longue période de latence après l'infection et donc, par une progression lente de la maladie [4].

2 Les protéines du VIH-1

Quinze protéines virales sont codées par le génome du VIH-1 et sont suffisantes pour que le virus se réplique dans la cellule suite à l'infection. Toute l'information génétique nécessaire à la synthèse de ces protéines est contenue dans le génome viral consistant en une seule espèce d'ARN (ARN génomique) simple brin d'orientation positive d'environ 9 kilobases .

On peut regrouper ces 15 protéines virales en 5 grandes catégories :

- 1 : Les protéines virales de structure composent la capsid (ou la coque) qui représente la « charpente » de la particule virale. Elles sont la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC), p6, p2 et p1. Chacune d'entre elles possède un ou des rôles bien précis lors de certaines étapes du cycle viral.
- 2 : Les enzymes virales sont la protéase (PR), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT). Elles représentent depuis le début des cibles de choix pour le développement de drogues anti-virales.
- 3 : Les protéines de l'enveloppe gp41 (TM) et gp120 (SU) présentes à la surface du VIH-1 médient l'entrée du virus dans la cellule hôte.
- 4 : Les protéines régulatrices Tat et Rev permettent de contrôler l'expression des gènes viraux au niveau transcriptionnel et posttranscriptionnel.
- 5 : Les protéines accessoires Vpr, Nef, Vpu et Vif possèdent des activités importantes pour le virus qui seront néanmoins peu abordées dans cette thèse.

3 Survol du cycle de réplication du VIH-1

Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1 sont schématisées dans la figure 1. Le VIH-1 contient à sa surface les glycoprotéines de l'enveloppe gp41 (ou TM) et gp120 (ou SU) qui sont indispensables à l'étape d'entrée du virus dans la cellule hôte. En effet, suite à l'interaction de gp120 avec son récepteur, CD4 et son corécepteur (CXCR4 ou CCR5) présents à la surface de la cellule cible, gp41 médie la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane plasmique de la cellule. La capsid virale est donc relarguée à l'intérieur du cytoplasme de la cellule cible. Le génome d'ARN du virus est ensuite

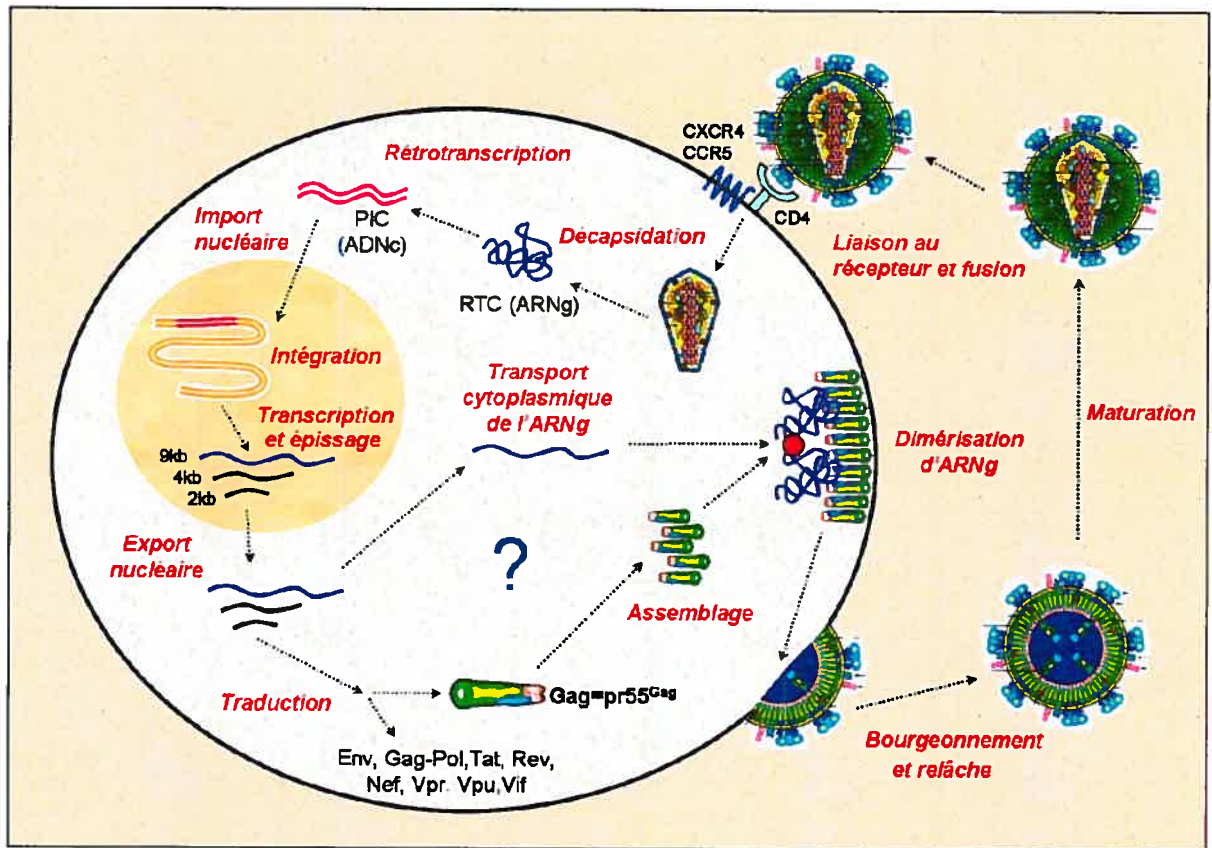


Figure 1 : Le cycle de réplication du VIH-1.

Les différentes étapes du cycle viral sont représentées schématiquement. Le point d'interrogation illustre le fait que l'on possède peu d'informations à propos du contrôle de l'assemblage de pr55^{Gag} et de la sélection de l'ARNg par le virus, notamment concernant les interactions virus-hôte impliquées dans ces régulations. Les représentations schématiques des éléments viraux sont adaptées de Coffin *et al.* (1997)[4].

décapsidé, c'est-à-dire qu'il est partiellement libéré des protéines de structure. Ceci permet à la transcriptase inverse virale (RT) grâce à ses activités ADN polymérase et ARNase H, de générer de l'ADN viral double-brin à partir de l'ARN génomique (ARNg). Cet ADN viral, au sein du complexe de préintégration (PIC), est transporté activement dans le noyau de la cellule hôte en partie grâce aux protéines virales Vpr et MA. Il est ensuite intégré dans le génome cellulaire grâce à l'intégrase virale (IN) et constitue ainsi le provirus. Ce dernier contient la totalité de l'information génétique virale. Sous le contrôle du promoteur viral, la transcription des gènes viraux commence et est hautement régulée par la protéine virale Tat en synergie avec des facteurs de transcription cellulaires. La protéine virale Rev contrôle l'export nucléaire ainsi que l'épissage des ARN messagers viraux qui sont par la suite traduits afin de générer les protéines virales [5-7].

Les protéines virales de structure qui composent la capsid (ou la coque) du virus sont synthétisées sous forme d'un précurseur de 55 kDa que l'on appelle $pr55^{Gag}$ (ou plus généralement Gag). L'assemblage du VIH-1 consiste en la formation de nouvelles particules virales infectieuses qui seront relâchées dans le milieu extérieur. Cette étape est en partie médiée par la multimérisation ordonnée d'environ 5000 molécules de $pr55^{Gag}$. La matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC), p6, p2 et p1 sont les différents sous domaines composant $pr55^{Gag}$ et participent au processus d'assemblage qui est finement régulé dans le temps et dans l'espace. Les enzymes virales sont synthétisées également sous forme de précurseur appelé $pr160^{Gag-Pol}$ (ou Gag-Pol) qui interagit avec $pr55^{Gag}$. $pr55^{Gag}$ sélectionne 2 copies d'ARNg qui sont spécifiquement encapsidées dans le virus néosynthétisé. Ces processus impliquent le transit de $pr55^{Gag}$ et de l'ARNg par plusieurs compartiments cellulaires tels que les corps multivésiculaires ou le centre organisateur des microtubules. De leur côté, les protéines de l'enveloppe gp41 et gp120 sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, elles aussi sous forme de précurseur appelé ENV. ENV emprunte la voie de sécrétion et est recruté au sein des complexes d'assemblage. Les virus néosynthétisés bourgeonnent de la membrane plasmique par évagination et sont

relâchés dans le milieu extracellulaire sous forme dite immature. Pendant ou juste après la relâche, la protéase virale (PR) est activée et clive $\text{pr}55^{\text{Gag}}$ et $\text{pr}160^{\text{Gag-Pol}}$, ce qui génère des protéines MA, CA, NC, p6, p1, p2, PR, IN et RT indépendantes. Le précurseur ENV quant à lui est clivé par des furines cellulaires. Cette maturation des protéines virales provoque des réarrangements structuraux majeurs aboutissant à un virus maintenant mature qui est capable d'infecter une autre cellule cible [7-9].

On a souvent essayé de comprendre les bases moléculaires du cycle viral par l'étude *in vitro* des protéines virales isolées, réduisant ainsi la complexité du virus. Or, le VIH-1 est un parasite intracellulaire obligatoire et, pour se répliquer, recrute (ou exclut) à son avantage des complexes cellulaires qui assistent les protéines virales lors de leur(s) action(s). En effet, la presque totalité des étapes décrites ici requièrent la présence de co-facteurs cellulaires qui permettent un contrôle fin et complexe du cycle viral. Ainsi, depuis les dernières années, il y a un intérêt énorme et grandissant quant à l'identification de ces facteurs cellulaires dont on commence à comprendre les rôles cruciaux dans le cycle viral.

4 Stratégies antivirales

4.1 La situation actuelle

Lors du développement de drogues anti-rétrovirales, la communauté scientifique et l'industrie ont surtout concentré leurs efforts sur la découverte de composés inhibant des étapes cruciales à la production virale impliquant des réactions enzymatiques spécifiques du virus telles que la rétrotranscription ou la maturation. Ainsi, des drogues qui inhibent surtout les enzymes virales RT et PR ont émergé [10, 11]. Cependant, la RT possède intrinsèquement un pouvoir mutateur énorme dû à une fidélité de lecture moindre. C'est pourquoi énormément de virus mutants sont générés lors de l'étape de rétrotranscription.

Ainsi, dans tous les cas où l'on applique une pression sélective sur le VIH, on observe toujours l'émergence de virus mutants qui sont résistants à la drogue utilisée et possèdent donc un avantage sélectif sur les virus sauvages. Pour essayer de pallier à ceci dans la mesure du possible, les traitements antiviraux actuels consistent en la combinaison de plusieurs drogues antivirales afin d'augmenter la pression sur le virus et de limiter au maximum sa réplication. Bien que ces traitements anti-viraux aient grandement allongé l'espérance de vie des personnes séropositives, ils provoquent néanmoins des effets secondaires énormes (tels que, entre autres, des nausées, des pertes de la masse osseuse, des hyperglycémies, des pancréatites ou des troubles gastro-intestinaux selon les médications) chez ces patients traités dont la qualité de vie est ainsi dégradée. De plus, le virus finit toujours par devenir résistant et par contourner l'effet antiviral de ces traitements.

À l'heure actuelle, on essaie de découvrir de nouveaux inhibiteurs étant le moins possible toxique pour l'organisme et ciblant des étapes du cycle viral qui auraient une adaptabilité moindre face au traitement. Ainsi, on retrouve maintenant sur le marché une drogue qui cible l'infection virale à sa source, soit l'entrée. En effet le T-20 est un inhibiteur de fusion du VIH avec sa cellule cible [12]. De plus, des drogues prometteuses ciblant IN et la maturation de pr55^{Gag} sont actuellement en cours d'essais cliniques chez l'humain [10, 11, 13-16].

4.2 Le défi des années futures

Le défi dans le développement de nouvelles drogues qui seraient vraiment efficaces contre le VIH à long terme réside dans le choix de la cible. En effet, il s'agit de trouver un élément critique pour la réplication virale qui ne supporterait pas ou très peu de variabilité. Par exemple, des processus viraux qui impliquent des domaines de protéines virales qui sont extrêmement conservés dans leur séquence ou leur structure tridimensionnelle parmi

tous les sous-types de virus connus, pourraient constituer, dans certains cas, des cibles de choix, d'autant plus si ce domaine ne supporte pas de mutations. Cependant, il est probable que le virus réussira toujours à générer des souches résistantes à plus ou moins long terme.

Il est clair que le VIH-1 recrute des machineries cellulaires qui sont absolument nécessaires à toutes les étapes du cycle viral [7, 17]. On peut donc imaginer que cibler ces interactions virus/hôte, qui sont probablement conservées entre les différentes souches de VIH (et même parfois entre les différents types de virus), pourrait abolir efficacement la réplication virale. Cette stratégie représenterait plusieurs avantages. En effet, ces facteurs ne seraient pas soumis au pouvoir mutateur de la RT puisque codés par le génome cellulaire. La possibilité pour le virus de générer des souches résistantes serait moindre puisque l'utilisation exclusive de cette interaction serait conservée parmi les différentes souches de VIH-1 et impliquerait des structures tertiaires virales faisant place à peu de variabilité. En effet, il semble improbable que, sous cette pression sélective, le virus évolue en une souche qui parasite une machinerie cellulaire alternative qui est « étrangère » à la réplication virale. Cependant, ce genre de traitements antiviraux provoquerait probablement des effets secondaires sérieux chez le patient puisque ciblant un processus cellulaire. Il faudrait donc optimiser le composé en question de sorte qu'il touche spécifiquement cette interaction virus/hôte en affectant le moins possible les fonctions normales de ce facteur cellulaire.

En conséquence, dans cette optique de découverte de nouvelles cibles antivirales, il est important de mettre à jour les interactions virus/hôte cruciales lors de la réplication du virus. Par ailleurs, ce domaine de recherche représente un intérêt fondamental énorme puisque c'est l'occasion de mieux comprendre comment certaines protéines cellulaires fonctionnent. Ainsi, dans la description détaillée des différentes étapes du cycle viral, je mettrai l'accent sur les facteurs cellulaires qui y participent (ou y participeraient) afin de mettre en valeur l'importance des interactions virus/hôte.

5 Le cycle de réplication du VIH-1

5.1 Structure du VIH-1

Le VIH-1 se présente sous la forme d'une sphère dont le diamètre est d'environ 145 nm (Figure 2) [18]. Cette sphère est délimitée par une bicouche lipidique riche en sphingomyélines et en cholestérol [19] qui sont acquis de la membrane de la cellule productrice. La présence de cholestérol « viral » semble importante lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte [20]. Le virus possède à sa surface les protéines virales gp120 et gp41 issues du clivage protéolytique du précurseur ENV.

À l'intérieur du virus se trouve la capsid virale dont la charpente est constituée des protéines de structure issues du clivage de pr55^{Gag} par PR. Les protéines MA tapissent la face interne de la bicouche lipidique du virus. Le génome viral est présent au sein du noyau (ou « core ») en forme de cône constitué d'unités hexamériques de CA d'un diamètre de 9.6 nm reliées entre elles (Figure 2). Ce cône est fermé et possède en moyenne une longueur d'axe principal de 119 nm, un diamètre maximum de 60 nm (perpendiculaire à l'axe principal) et un angle au bout du cône de 22 degrés tels que déterminés par microscopie cryo-électronique [18]. Dans le noyau, sont présentes 2 copies d'ARNg viral au sein du complexe ribonucléo-protéique (RNP) où l'ARN viral est complètement recouvert de protéines NC qui le protègent.

L'ARN présent dans le virus ne l'est pas seulement à des fins de transmission d'information génétique mais également à titre structural. En effet, chez le virus de la leucémie murine (ou MLV pour « murine leukemia virus »), il a été montré que même lorsqu'il est incapable d'encapsider son génome, le virus compense ce manque en

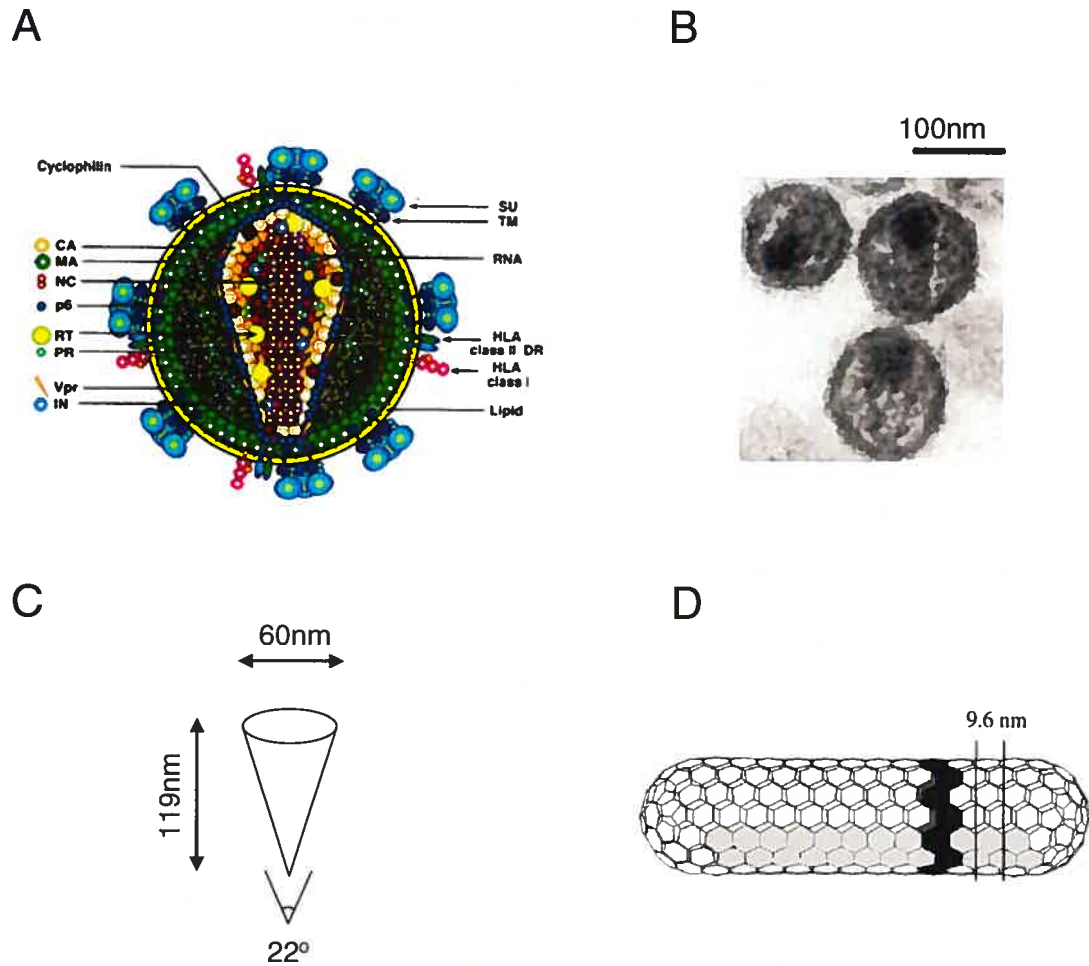


Figure 2 : La structure du VIH-1.

(A) Représentation schématique du VIH-1. Le génome viral est recouvert de protéines NC et est présent au sein du noyau (« core ») viral en forme de cône délimité par la protéine CA. MA tapisse la face interne de la bicouche lipidique formant l'enveloppe virale. Tirée de Coffin *et al.* (1997)[4]. (B) Le VIH-1, tel qu'observé par microscopie électronique à transmission. On discerne parfaitement le noyau viral à l'intérieur du virus. Au sein de ce dernier, une région plus dense électroniquement correspond à l'ARNg. Tirée de Joshi *et al.* (2006)[21]. (C) Représentation schématique des dimensions du noyau viral. (D) Représentation schématique de l'organisation des hexamères de CA constituant le noyau viral. Tirée de Briggs *et al.* (2003)[18].

incorporant de l'ARN cellulaire de sorte que la quantité d'ARN dans le virus reste constante [22, 23]. De plus, il a été montré qu'un traitement des virus à des RNases compromet grandement l'intégrité du noyau viral [23]. Ces résultats mettent en lumière que l'ARN (qu'il soit d'origine virale ou cellulaire) semble constituer un élément crucial de l'architecture des particules rétrovirales.

Outre les protéines décrites plus haut, toutes les enzymes virales sont incorporées dans le virus. En effet, RT et IN sont essentielles aux étapes précoces du cycle viral. De plus les protéines virales Vif, Nef et Vpr sont également encapsidées dans le virion.

Il est à noter que des protéines cellulaires sont incorporées au sein du virus, soit à l'intérieur soit à sa surface (voir section 5.8 et Tableau I) [24-26]. De même, des ARN cellulaires sont présents à l'intérieur du virus. Notamment, l'ARN de transfert 3 chargé de lysine (ARNt^{lys3}) indispensable lors de l'étape de rétrotranscription est encapsidé en complexe avec RT et l' ARNg [27].

5.2 Les étapes précoces du cycle viral

5.2.1 Entrée virale

Le VIH peut entrer dans la cellule hôte soit par endocytose, soit par fusion membranaire entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale. Cependant, on pense qu'une infection productive ne se produit que suite à une entrée par fusion dans les cellules hôtes [28, 29], exception faite des trophoblastes qui sont infectés par endocytose [30].

La protéine virale gp120 est présente sous forme trimérique à la surface du virus et lie la protéine CD4 à la surface de la cellule, ce qui déclenche des réarrangements conformationnels de gp120 promouvant sa liaison subséquente à des récepteurs de

chimiokines. Ces protéines à 7 domaines transmembranaires sont des récepteurs couplés aux protéines G et sont normalement impliqués dans le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques via la régulation de certaines voies de signalisation cellulaire. Cependant, cette fonction ne semble pas être importante lors de l'entrée du virus [6, 7]. *In vivo*, seulement deux de ces récepteurs semblent être importants. Ce sont les récepteurs CXCR4 et CCR5 présents respectivement à la surface des cellules T et des macrophages au sein de domaines lipidiques riches en cholestérol et en sphingomyéline que l'on appelle « rafts » ou barges lipidiques [31]. La présence de ces microdomaines semble être importante lors des mécanismes d'entrée du VIH [31-33] bien que la littérature à ce sujet soit controversée. La liaison de gp120 à CD4 et CCR5 ou CXCR4 induit des changements conformationnels dans la structure de gp41 provoquant ainsi la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule hôte. Ceci permet au virus de libérer son contenu dans le cytoplasme de la cellule.

La protéine cellulaire de surface ICAM-1 est acquise par le virus lors de sa production de sorte qu'elle est présente à la surface du virus. Son récepteur LFA-1 est quant à lui présent à la surface de la cellule T. Il a été montré que le contact virus/cellule cible via l'association entre LFA-1 et ICAM-1 favorisait l'entrée du virus probablement grâce à la stabilisation de l'interaction CD4/gp120 [34-36]. D'autres protéines membranaires de l'hôte sont incorporées par le virus et pourraient potentiellement participer à l'étape d'entrée.

Gp120 est également capable de lier avec une forte affinité la protéine DC-SIGN (pour « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin »)[37]. DC-SIGN est une lectine exprimée à la surface des cellules dendritiques. La liaison du virus à DC-SIGN n'entraîne pas la fusion membranaire mais promeut plutôt l'internalisation du virus à l'intérieur de la cellule dans un compartiment acide [38]. Par la suite, cette cellule migrera vers les organes lymphoïdes et relâchera le virus par exocytose dans le milieu

extracellulaire où se trouvent les cellules T. Ainsi le VIH-1 peut donc se servir des cellules dendritiques telles un « cheval de Troie » [7] pour atteindre son objectif sans avoir complété les étapes précoces du cycle viral. On appelle ce mode de propagation (encore controversé) « transmission en *trans* ».

5.2.2 La décapsidation virale

La fusion effectuée, traverser le réseau cortical d'actine tapissant la membrane plasmique à l'intérieur de la cellule représente un défi de taille pour les capsides entrantes. Il a été proposé que la protéine virale Nef qui est présente au sein du virus [39, 40] permettrait au virus de franchir cet obstacle bien que son mécanisme d'action soit inconnu [41].

Suite à la relâche du noyau viral dans le cytoplasme de la cellule, il doit être décapsidé, c'est-à-dire que la capside doit se défaire afin que les étapes subséquentes du cycle viral puissent se faire correctement (Figure 3)[6]. D'une manière générale, il est accepté que cet événement se fait tout de suite après la fusion membranaire puisque l'on n'a jamais observé par microscopie électronique de noyau viral en forme de cône dans le cytoplasme de la cellule hôte nouvellement infectée. De plus, la nature faible des interactions CA-CA au sein de la capside suffit à maintenir l'intégrité du noyau dans le virus étant donné la haute concentration locale de CA. Ceci supporte l'hypothèse que dès l'entrée du noyau dans la cellule, il serait désassemblé via un simple effet de dilution. Néanmoins, ce processus semble être finement régulé et influence les étapes subséquentes puisque des mutations dans CA augmentant ou diminuant la stabilité du noyau affectent la rétrotranscription ou éventuellement des étapes plus en aval telles que

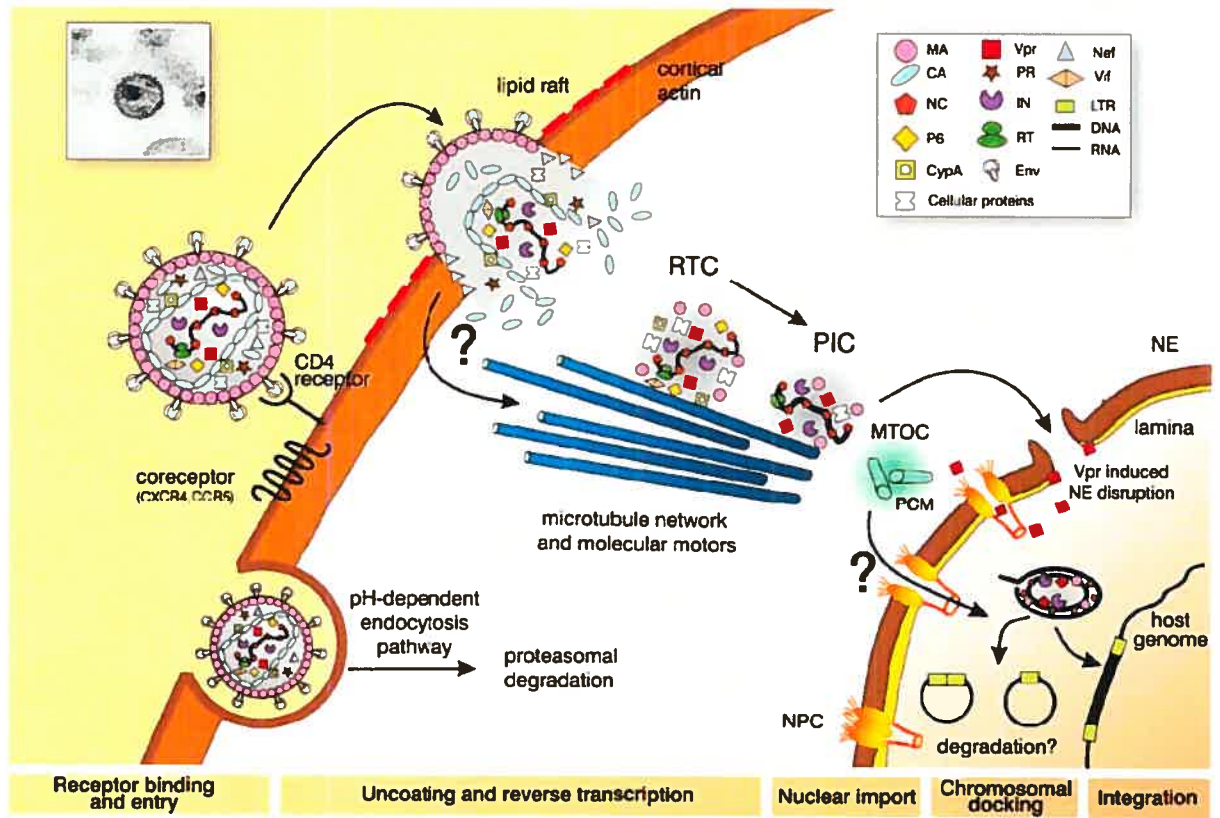


Figure 3 : Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1. Tiré de Lehmann-Che *et al.* (2004)[6].

l'import nucléaire et l'intégration du provirus [42, 43]. Ainsi, la qualité de la décapsidation influence la suite des événements. On ignore encore où et quand dans la cellule cette étape se produit exactement.

On ignore quasiment tout des facteurs cellulaires qui régulent le processus de décapsidation virale. Cependant, lors de cette étape, l'association du noyau viral avec certains facteurs cellulaires tels que la cyclophiline A ou TRIM5 α constitue un « laissez-passer » pour le virus lui permettant d'échapper aux mécanismes d'immunité innée dans les cellules humaines et de poursuivre son cycle de réplication (Voir Discussion)[44].

5.2.3 La rétrotranscription

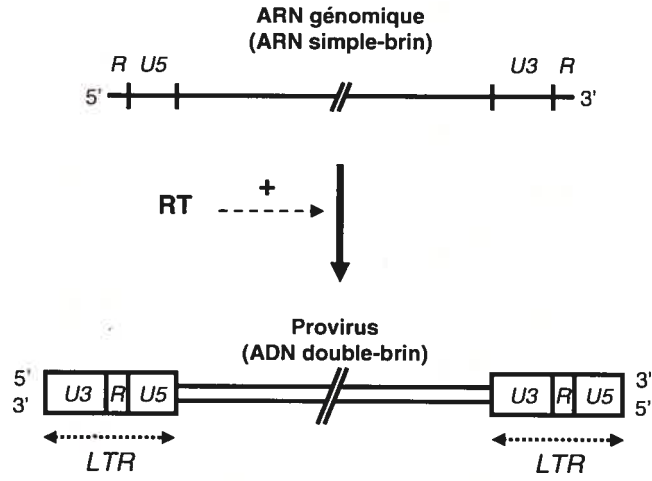
5.2.3.1 Principe

Afin d'être compétent pour l'intégration dans les chromosomes de la cellule hôte, le génome viral doit être sous la forme d'un ADN double-brin linéaire alors qu'existant sous forme ARN simple-brin suite à l'entrée et la décapsidation. Cette forme ADN du génome viral est le précurseur du provirus et est colinéaire avec l'ARNg dont il est issu (Figure 4). Cette conversion s'effectue grâce à l'enzyme virale RT au sein du complexe de transcriptase inverse (RTC pour « reverse transcription complex ») contenant également NC, les deux copies d'ARNg et de l'ARNt^{lys3} hybridés sur ces derniers via une structure d'ARN appelée site de liaison à l'amorce (ou PBS pour « primer binding site »). Cet ARNt sert d'amorce pour la RT afin de générer le provirus à partir de l'ARNg qui est donc utilisé comme matrice [4, 6, 7].

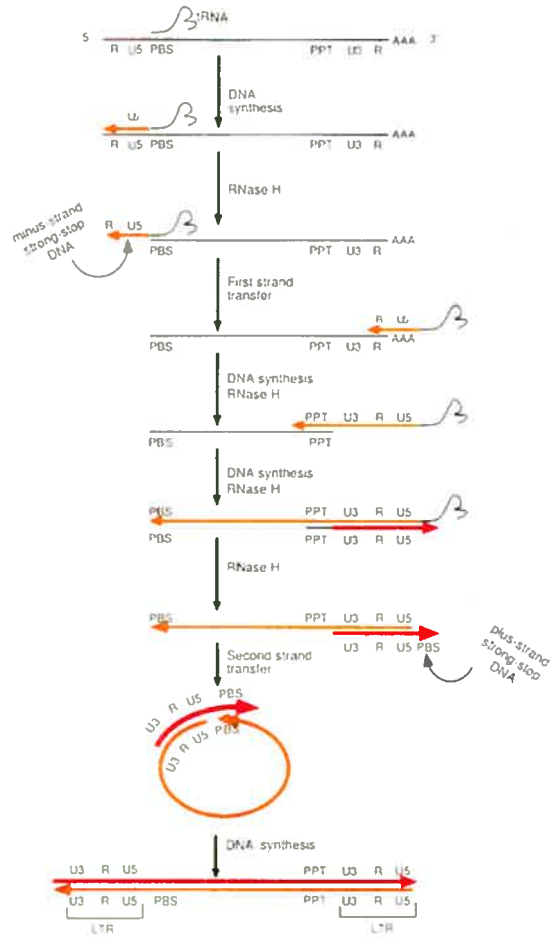
Figure 4 : La rétrotranscription

(A) L'étape de rétrotranscription mène à la formation des LTR du provirus du VIH-1. (B) Les différentes étapes de la rétrotranscription du VIH-1. L'ARN (ARN_g et ARN_t^{lys3}) est en noir. Le brin (-) de l'ADN viral est en orange tandis que le brin (+) est représenté en rouge. Tiré de Coffin *et al.* (1997)[4].

A



B



5.2.3.2 La formation des LTR

Outre la conversion du génome viral d'ARN en ADN, le processus de rétrotranscription sert également à générer les longues répétitions terminales (ou LTR pour « long terminal repeat ») absentes de l'ARNg. Tel que l'indique leur nom, les LTR sont des répétitions en tandem qui se retrouvent aux 2 extrémités du provirus. Ils contiennent le promoteur viral qui contrôle la transcription de tous les ARN viraux et sont également extrêmement importants lors de l'étape d'intégration. Un LTR peut être subdivisé en trois régions (Figure 4A)[4]:

- La région U3 qui dans l'ARNg est unique et située à l'extrémité 3', est le promoteur viral contrôlant la transcription.
- La région R est répétée en tandem aux deux extrémités de l'ARNg
- La région U5 est unique dans l'ARNg, à son extrémité 5'

La rétrotranscription est un processus complexe qui se fait en plusieurs étapes basées sur les 2 activités enzymatiques de RT. Premièrement, RT est une ADN polymérase qui utilise l'ADN ou l'ARN comme matrice. Deuxièmement, elle possède une fonction nucléase appelée RNase H qui dégrade spécifiquement l'ARN hybridé avec de l'ADN.

5.2.3.3 Les différentes étapes de la rétrotranscription

Le processus général de la reverse transcription chez les rétrovirus s'effectue comme suit (Figure 4B)[4]:

-L'ARNt^{lys3} hybridé au PBS (situé proche de l'extrémité 5' de l'ARNg) sert d'amorce à la RT qui génère le brin d'ADN complémentaire à l'ARNg. La présence de NC est importante puisque cette protéine favorise l'hybridation entre l'ARNt et l'ARNg. La synthèse d'ADN

se poursuit jusqu'à ce que l'extrémité 5' de l'ARNg soit atteinte, ce qui génère un intermédiaire d'ADN relativement court nommé -sssDNA (pour « minus-strand strong stop DNA »).

-L'ARN hybridé à l'ADN néosynthétisé est dégradé via l'activité ARNase H de RT et le -sssDNA subit un premier transfert de brin de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ARNg. Ceci est possible grâce à 2 séquences nommées R qui sont identiques et répétées en tandem aux 2 extrémités de l'ARNg. En effet la séquence complémentaire à R est présente dans l'extrémité 3' de -sssDNA et est issue de la séquence R en 5' de l'ARNg à présent dégradée. NC, de par son activité chaperonne, favorise grandement ce transfert de brin.

-Une fois ce transfert effectué, la synthèse du brin complémentaire à l'ARNg (-DNA) continue générant à l'extrémité 3' une séquence complémentaire au PBS. En parallèle, l'ARNg est quasiment complètement dégradé.

-Cependant, une séquence dans l'ARNg riche en purine (PPT pour « polypurine tract ») est résistante à cette dégradation et sert d'amorce à RT pour la synthèse du brin d'ADN + à partir du brin d'ADN-. La synthèse est stoppée une fois que la portion de l'ARNtlys3 qui était auparavant hybridée au PBS a été utilisée comme matrice. L'ADN ainsi généré est appelé +sssDNA (plus-strand strong stop DNA) et possède un nouveau PBS

-Le PPT et l'ARNtlys3 sont dégradés ce qui fait que le PBS du +sssDNA est flanquant.

-S'en suit, le deuxième transfert de brin qui consiste en l'hybridation entre le PBS du +sssDNA et sa séquence complémentaire sur le brin -. Comme pour le premier transfert, NC favorise ce processus.

-RT finit de générer le précurseur du provirus à partir de toutes les séquences d'ADN flanquantes.

5.2.3.4 Le « DNA flap »

Chez les lentivirus et les virus « mousseux » (« foamy viruses »), le brin + est en fait synthétisé en 2 moitiés à partir du PPT et d'une autre séquence en 5' du PPT résistante à l'activité RNase H, appelé cPPT. En conséquence, chez les lentivirus spécifiquement, le produit final de la RT possède en son centre une structure d'ADN inhabituelle appelée « central DNA flap » [6]. C'est un triplex d'ADN d'environ 99 nucléotides de long composé d'un brin – et de 2 brins + qui se chevauchent. Chez le VIH-1, cette structure servirait de signal lors des étapes subséquentes menant à l'intégration (voir section 5.2.4.2)[45].

5.2.3.5 L'implication de facteurs cellulaires

La plupart des étapes de la rétrotranscription décrites ici ont été étudiées grâce à des expériences faites *in vitro* avec des protéines et des acides nucléiques purifiés. C'est pourquoi, on ignore presque tout des facteurs cellulaires requis *in vivo* dans la régulation fine des différentes étapes de la rétrotranscription. Les seuls exemples de facteurs cellulaires connus sont l'ARN hélicase A (RHA pour « RNA hélicase A ») et Gemin2 (interagissant avec IN) dont les déplétions respectives dans la cellule hôte atténuent la synthèse d'ADN complémentaire viral [46, 47]. On ignore cependant à quelle étape exactement et comment ces protéines influencent ce processus.

5.2.4 Importation du complexe de préintégration

5.2.4.1 Le PIC

L'ADN double-brin viral qui doit être intégré en tant que provirus dans les chromosomes de l'hôte se trouve au sein d'une structure contenant également des protéines virales et cellulaires que l'on appelle complexe de préintégration (ou PIC pour « preintégration complex »). Le PIC a la taille d'un ribosome et une masse de plusieurs mégadaltons. Au sein du PIC, on retrouve l'ADN proviral, les protéines virales IN, MA, NC, RT, Vpr, ainsi que plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'intégration (Figure 3)[5-7].

5.2.4.2 La régulation de l'import nucléaire du PIC

Une des caractéristiques des lentivirus est qu'ils infectent des cellules qui ne se divisent pas à la différence des autres rétrovirus qui tirent avantage de la disparition du noyau cellulaire lors de la mitose pour accéder aux chromosomes. Ainsi, atteindre le site d'intégration du provirus représente pour le VIH-1 un défi sérieux puisque le PIC doit préalablement atteindre le noyau et y être importé ce d'une manière active vu son haut poids moléculaire. Bien que le cytosquelette d'actine soit nécessaire au processus de rétrotranscription [48], il semble que le PIC rejoint l'enveloppe nucléaire par le biais du cytosquelette de microtubules [49]. Il a été observé que le virus atteint le centre organisateur des microtubules (ou MTOC), un locus spécialisé et périnucléaire qui pourrait donc représenter le point d'entrée du PIC à l'intérieur du noyau [49].

Il est généralement accepté que le PIC est transporté dans le noyau par le complexe de pore nucléaire (ou NPC pour « nuclear pore complex ») et ce, d'une manière active. Plusieurs facteurs semblent influencer l'import du PIC dans le noyau :

- Des signaux de localisation nucléaire (NLS pour « nuclear localization signal ») sont présents au sein de protéines du PIC, tel que IN et MA ce qui leur confère des propriétés karyophiles via des interactions avec des navettes de transit nucléocytoplasmiques, appelées importines. Ces NLS (en tout cas celui de MA) semblent indispensables pour la réplication du VIH-1 [6, 50-54].
- Vpr, présent au sein du PIC ne possède pas de séquence NLS canonique mais peut être importé dans le noyau [55, 56]. Cependant le mécanisme de ce phénomène reste inconnu. De plus, Vpr est capable d'induire des ruptures réversibles de l'enveloppe nucléaire ouvrant ainsi la voie au PIC vers le génome de l'hôte [57]. Bien que des virus déficients en Vpr soient capables d'infecter efficacement des cellules ne se divisant pas [54], Vpr peut potentiellement influencer l'import nucléaire du PIC via ces mécanismes.
- Le « DNA flap » semble servir de signal pour l'import nucléaire du PIC. En effet, des virus mutés incapables de générer cette structure, complètent apparemment normalement la rétrotranscription mais les PIC s'accumulent dans une région périnucléaire de la cellule. Ce processus représenterait pour le virus le moyen parfait d'empêcher l'import nucléaire de son information génétique tant que la rétrotranscription n'est pas achevée [45, 58, 59].
- Tel que dit plus haut, une décapsidation ordonnée et correctement effectuée semble être un facteur important puisque des mutations affectant la stabilité des noyaux entrant dans la cellule affectent l'import et l'intégration du PIC sans nuire à la rétrotranscription [43].
- La protéine LEDGF/p75 (pour « human lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator p75 ») interagit avec IN et possède un NLS

canonique. Ceci fait qu'elle peut réguler le trafic nucléo-cytoplasmique de IN [60, 61]. Cependant son implication lors de l'import du PIC en entier est controversée.

- Finalement, la protéine cellulaire importine 7 (IPO7), responsable de l'import de protéines ribosomiques et de l'histone H1, semble être impliquée dans l'import nucléaire du PIC [62].

Les rôles potentiels du « DNA Flap », de IOP7 et de Vpr décrits ici ont été remis en question par d'autres études [54, 63-65]. De plus, il est très probable que des protéines sans signal de localisation nucléaire recrutent des protéines de transport karyophiles. Le processus régissant l'import nucléaire du PIC reste donc flou et controversé. Son mécanisme d'action est apparemment complexe et concerté impliquant plusieurs facteurs aussi bien viraux que cellulaires.

5.2.5 Intégration du provirus

5.2.5.1 La réaction catalysée par IN

L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte est catalysée par l'enzyme virale IN. Elle nécessite la présence de la protéine virale NC qui protège probablement l'ADN viral [66]. La réaction d'intégration se fait en 2 étapes bien caractérisées. La première étape est la maturation en 3' (« 3' processing ») du provirus pendant laquelle IN enlève un dinucléotide GT présent à l'extrémité 3' de chaque LTR proviral et adjacent à un dinucléotide CA hautement conservé. Ceci s'effectue dans le cytoplasme avant l'import nucléaire du PIC. La deuxième étape catalysée par IN est le transfert de brin qui est l'étape d'intégration en tant que tel qui établit le provirus du VIH dans le chromosome hôte. En effet, IN médie une attaque nucléophile concertée (car les 2 extrémités sont liguées en même temps) par les résidus 3' de l'ADN viral sur des liens phosphodiester situés sur l'ADN cible. Par transestérification, l'extrémité 3' CA de l'ADN

viral est liguée à l'extrémité 5'-O-phosphate de l'ADN chromosomique. Les 2 nucléotides flanquants en 5' de l'ADN viral sont excisés. La distance entre les 2 sites d'intégration dans le génome est de 5 nucléotides dans le cas de VIH-1. La réparation par la cellule du trou simple-brin (entre les extrémités 5' virales et 3' cellulaires) laissé suite à l'intégration provirale mène à la duplication de ces 5 nucléotides [5].

IN peut également catalyser la formation de 3 types de structures d'ADN viral alternatives qui ne produisent jamais de virus infectieux (Figure 3)[4] :

- Les 2 extrémités de l'ADN viral peuvent se liguer et ainsi former un « cercle à 2 LTR ».
- Le génome viral peut subir une recombinaison homologe des LTR formant ainsi un « cercle à un LTR ».
- Enfin, l'ADN viral peut s'intégrer dans sa propre séquence générant une forme d'ADN virale qui est circulaire et réarrangé. Cet événement est parfois appelé « auto-intégration suicidaire ».

5.2.5.2 Les co-facteurs d'intégration

In vitro, IN n'insère pas le provirus dans des séquences nucléotidiques spécifiques. De plus, même si le VIH-1 s'intègre au sein de gènes actifs *in vivo*, le patron de sites d'intégration ne semble pas corrélérer avec celui des gènes les plus transcrits. Ceci montre que l'intégration ne se fait pas au hasard et ne dépend pas seulement de l'état de relâchement de la chromatine et donc de l'accessibilité de l'ADN cible par IN. En fait, il semblerait que le choix du site d'intégration soit plutôt dicté par des protéines cellulaires présentes au sein du PIC qui feraient le lien physique et fonctionnel entre ce dernier et la chromatine. On appelle ces protéines des co-facteurs d'intégration [5, 6, 67].

Bien que controversé, l'exemple le plus pertinent est probablement celui de LEDGF/p75, un facteur de transcription liant l'ADN ainsi que IN. Premièrement, LEDGF/p75 protège IN et donc sûrement le PIC de la dégradation par le protéasome [68]. Deuxièmement, tel que discuté plus haut, il est probablement impliqué dans l'import nucléaire du PIC [60, 61]. Troisièmement, plusieurs études montrent que ses niveaux d'expression dans la cellule influencent le taux d'intégration dans le génome de l'hôte [69, 70]. Quatrièmement, elle favoriserait l'intégration du provirus au sein de gènes dont elle régule la transcription [69].

Le facteur de barrière à l'autointégration (ou BAF pour « barrier-to-autointegration factor ») lie l'ADN et MA [71]. BAF semble, *in vitro* tout du moins, favoriser l'intégration et limiter les événements d'autointégration suicidaire nuisibles à la réplication virale [72, 73]. La pertinence de son rôle *in vivo* vient d'une étude très récente démontrant le rôle crucial d'une protéine de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, Emerin qui influence l'intégration provirale et ce, d'une manière BAF-dépendante [74].

Par ailleurs, INI1 (pour « integrase interactor 1»), une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI-SNF est le premier interactant d'IN qui a été identifié [75]. INI1 semble quant à lui limiter *in vivo* l'intégration [76].

L'identification des autres facteurs cellulaires présents au sein du PIC permettra d'élucider comment le virus « choisit » son site d'intégration.

Finalement, plusieurs études suggèrent fortement que l'intégration provirale nécessitait la machinerie de réponse aux dommages causés à l'ADN impliquant entre autres les protéines ATM et ATR [77-79]. Cependant, ceci a été remis en question par deux études publiées récemment [80, 81].

5.3 Expression des gènes viraux

5.3.1 Structure du provirus

Le provirus du VIH-1 est d'une longueur d'environ 9 kilopaires de bases. Il est délimité à ses 2 extrémités par les LTR qui ont été générés suite à la rétrotranscription. Les 15 protéines virales sont codées à partir de seulement 8 gènes viraux puisque nombre de protéines virales sont synthétisées sous forme de précurseurs. Il est à noter que pour la plupart des protéines (à l'exception de Tat et de Rev), les séquences codantes sont situées au sein du même exon (Figure 5A)[7].

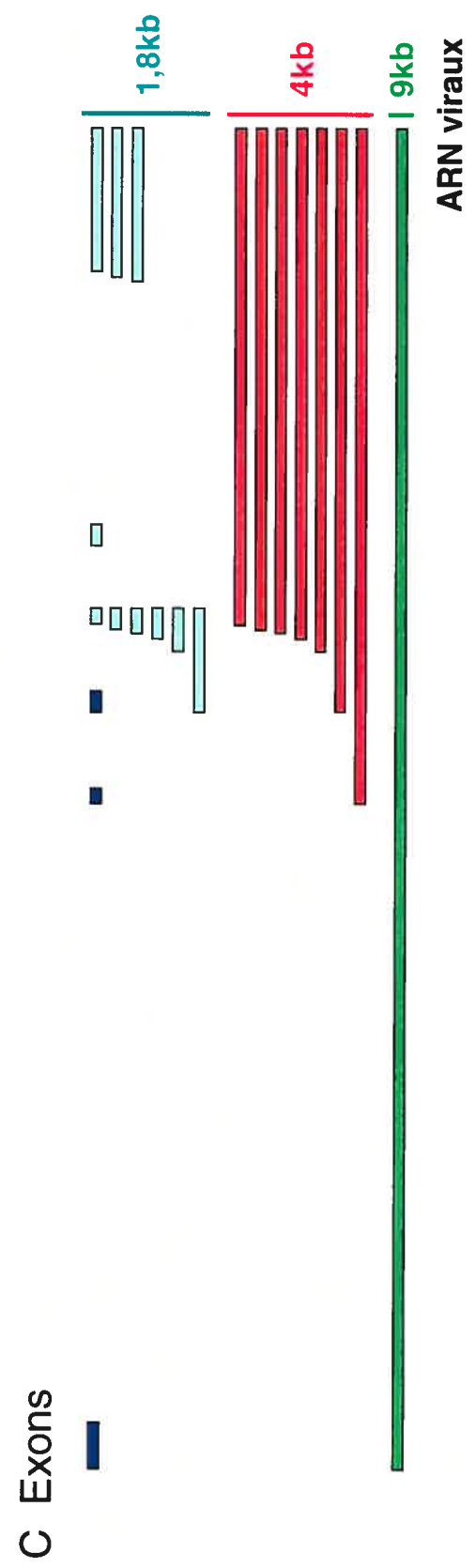
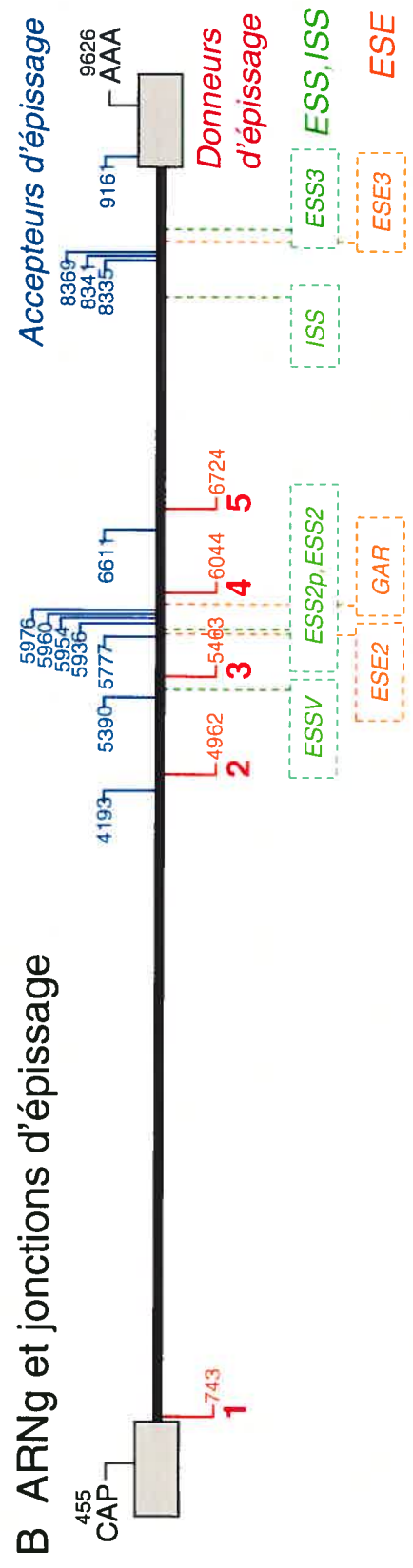
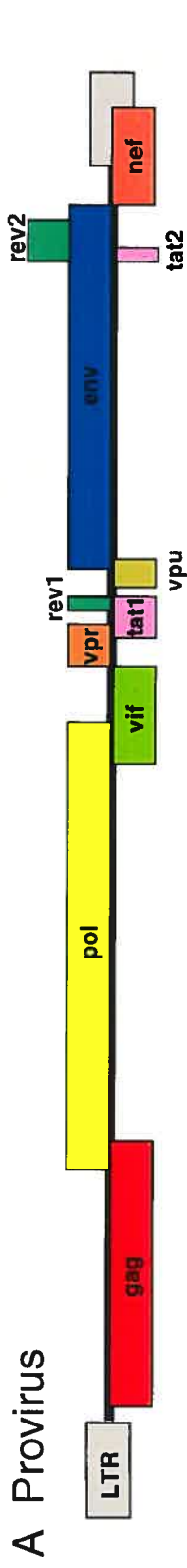
5.3.2 Régulation de la transcription virale

Au sein du génome de l'hôte, le LTR sert de promoteur transcriptionnel de l'expression virale et fonctionne comme n'importe quel promoteur eucaryote. L'initiation de la transcription dépend de la boîte TATA et de 3 sites Sp1 positionnant l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription. Le LTR contient également des éléments de réponse aux facteurs de transcription NF κ B et NFAT dont le recrutement dans le noyau dépend de l'activation cellulaire. La transcription commence mais elle n'est pas processive et est prématurément avortée générant ainsi peu d'ARN messagers souvent incomplets. Cependant, une structure d'ARN appelée élément TAR (pour « transactivation response») et présente à l'extrémité 5' des ARNm viraux semble stabiliser ces derniers. Ces ARNs vont être épissés, exportés du noyau puis traduits par les ribosomes afin de générer les protéines virales, Tat, Rev et Nef [7].

La transcription contrôlée par le LTR est transactivée plusieurs centaines de fois par la protéine Tat. En effet, Tat, en association avec la cycline T1, lie l'élément TAR, et

Figure 5 : Le provirus du VIH-1, ses gènes et la régulation de l'épissage alternatifs de l'ARN viral.

(A) Représentation schématique du provirus contenant 8 gènes codant pour 15 protéines virales. (B) Localisation dans l'ARNg des séquences régulatrices de l'épissage et des site donneurs 5' et accepteurs 3' d'épissage. (C) Les différents ARN viraux générés suite à l'épissage alternatif.



recrute sur le LTR le facteur cellulaire Cdk9 (pour « cyclin-dependent kinase 9 »). Au sein du complexe P-TEFb (pour « positive transcription-elongation factor b »), Cdk9 phosphoryle la queue C-terminale de l'ARN polymérase II. Ce signal favorise la transition de l'initiation à l'élongation de la transcription chez les eucaryotes et augmente considérablement la processivité de l'ARN polymérase II. De plus, l'action de Tat dépend également de la présence de co-facteurs de transcription interagissant avec le LTR tels que TBP (pour « TATA-binding protein »), Sp1 ou cyclin E/cdk2 entre autres. Cette transcription soutenue génère un ARNg pleine longueur qui sera ou non épissé afin de produire environ 30 sortes d'ARNm viraux que l'on peut regrouper en 3 grandes classes (Figure 5C) : 1,8 kb (ARN épissé plusieurs fois), 4 kb (ARN épissé une fois) et 9 kb (ARN non épissé)[7, 82].

5.3.3 Épissage des ARN viraux

L'ARN viral de 9kb est pris en charge par la machinerie de maturation des ARNm de la cellule. En effet, comme n'importe quel ARNm cellulaire, il est polyadénylé et une coiffe (5-méthyl-guanosine ou CAP) est rajoutée à son extrémité 5'. De plus, cet ARN subit un épissage alternatif qui génère près de 30 ARNm différents codant les 15 protéines virales [82]. L'information génétique du VIH-1 est donc très condensée en un seul ARN au départ mais confère une grande diversité protéomique au virus. L'épissage de l'ARN viral est un processus hautement régulé et très important pour le virus puisqu'il permet la production de chaque protéine virale en quantité appropriée et en proportion optimale par rapport aux autres. L'épissage alternatif de l'ARN viral se fait par un choix combinatoire parmi 5 sites d'épissage 5' donneurs et 9 sites d'épissage 3' accepteurs [83].

La régulation de l'épissage alternatif est très complexe et se fait surtout au niveau du choix du site 3' d'épissage par l'entremise d'autres séquences *cis* situées pour la plupart dans les exons de l'ARN (Figure 5B). Ainsi ces séquences peuvent être regroupées en deux

classes : les ESE (pour « exon splicing enhancer ») favorisant la sélection du site d'épissage 3' adjacent, et les ESS (pour « exon splicing silencer ») inhibant l'utilisation du site d'épissage 3'. À l'heure actuelle, on dénombre 3 ESE, contrôlés par des membres de la famille des protéines SR (incluant SF2/ASF), ainsi que 4 ESS qui sont régulés en partie par les protéines de la famille hnRNP A/B. Il est à noter qu'il existe également une séquence intronique inhibitrice connue (ou ISS pour « intronic splicing silencer ») régulée par hnRNP A1 [83].

Enfin, il semble que Rev ainsi que la forme acétylée de Tat influencent négativement l'épissage afin de favoriser, suite à leur production et import nucléaire, la synthèse d'ARN de 4 et 9 kb nécessaires à la production virale [84, 85]. Ces protéines virales permettraient le recrutement sur l'ARNg de p32 qui inhibe SF2/ASF et donc l'épissage sous le contrôle des ESE.

5.3.4 Régulation de l'export nucléaire des ARNs viraux

Une des caractéristiques du VIH est qu'il code plusieurs familles d'ARNm qui peuvent être ciblés vers des voies d'export nucléaire complètement différentes. Ainsi, les ARNs viraux complètement épissés (1,8 kb) sont exportés du noyau de la même manière que n'importe quel ARNm cellulaire. En effet ils empruntent la voie d'export régulée par TAP (connu aussi sous le nom de NXF1). La protéine Rev, une fois synthétisée est importée dans le noyau via les importines β , 5 et 7 puis s'associe avec une grande affinité aux ARN viraux de 4 et 9kb via une séquence d'ARN très structurée appelée RRE (pour « Rev-responsive element ») qui est située dans la région codante du gène Env. De par cette liaison, Rev limite l'épissage (voir plus haut) et, via son signal d'export nucléaire (ou NES) riche en leucine, permet l'export nucléaire des ARN liés en les ciblant vers la voie de transport contrôlée par CRM-1/importin 1 et Ran. Ce système se charge normalement

d'exporter du noyau les protéines, les petits ARN ainsi que les ARNs ribosomiques. En absence de Rev, les ARN viraux de 4 et 9 kb restent séquestrés dans le noyau à l'inverse des ARN viraux complètement épissés qui s'accumulent dans le cytoplasme [7, 83, 86].

Il est à noter que plusieurs co-facteurs cellulaires tels que Sam68, DDX1, DDX3, hRIP et RHA influencent l'export des ARNs viraux Rev-dépendant et donc l'expression virale [87-94]. Cependant, on ignore encore si tous ces facteurs agissent au même moment puisque leur déplétion respective mène parfois à des phénotypes différents (accumulation péri-nucléaire ou intra-nucléaire d'ARNg).

5.3.5 Régulation de la traduction des protéines virales

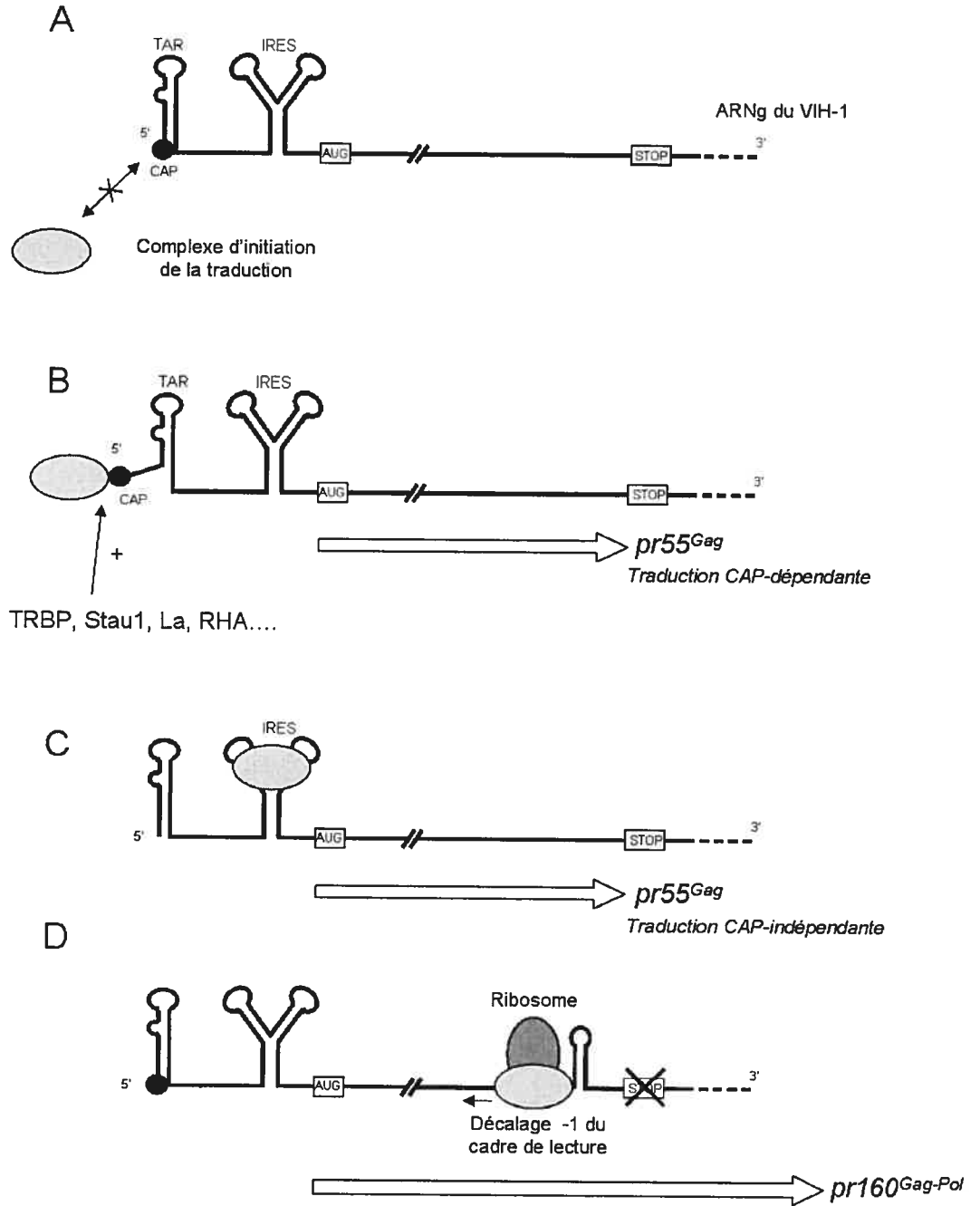
Une fois dans le cytoplasme, les ARNm viraux doivent être traduits afin que les protéines virales soient synthétisées. Alors que les ARNm de 4kb sont traduits par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux synthétisant ENV dans le lumen de ce dernier, les ARNm génomique et de 1,8kb sont traduits par les polysomes dans le cytosol.

L'initiation de la traduction se fait d'une manière classique (Figure 6), c'est-à-dire via le balayage 5'-3' de l'ARN par le complexe d'initiation de la traduction depuis la coiffe jusqu'au premier AUG (codon initiateur). Un site d'entrée interne du ribosome (ou IRES pour « internal ribosome entry site ») a été identifié dans l'ARNg [95, 96]. Ce dernier permet l'initiation de la traduction d'une manière CAP-indépendante et semble être fonctionnel surtout dans les phases G2 et M du cycle cellulaire durant laquelle il y a peu de traduction initiée depuis la coiffe (Figure 6C) [96].

Tous les ARNm du VIH-1 possèdent à leur extrémité 5' l'élément TAR (voir section 5.6.1) consistant en une tige-boucle. Cette structure constitue un environnement défavorable lors de l'initiation de la traduction, probablement parce que la coiffe est

Figure 6 : La régulation de la traduction des protéines virales

(A) La présence de l'élément TAR, à l'extrémité 5' des ARN viraux fait que la coiffe est inaccessible vis-à-vis des facteurs d'initiation de la traduction. (B) La traduction des ARN viraux peut être cependant déréprimée par le recrutement de facteurs cellulaires sur TAR. (C) La traduction peut être également initiée d'une manière indépendante de la coiffe grâce à la présence d'un IRES dans l'ARNg. (D) Dans 5% des cas, le ribosome subit lors de l'élongation, un décalage -1 de son cadre de lecture au niveau d'une séquence « glissante » permettant la synthèse de pr160^{Gag-Pol}.



inaccessible pour les facteurs d'initiation (Figure 6A). Cependant, en utilisant des ARNm rapporteur possédant TAR en 5', il a été montré que certaines protéines liant TAR pour la plupart, telles que l'auto-antigène La, TRBP (pour « TAR RNA binding-protein ») et Staufen1 pouvaient déréguler cette inhibition (Figure 6B)[97-99]. Bien que l'ARN hélicase A lie TAR [100], il semble qu'elle dérégule la traduction via sa liaison à une région structurée de l'ARNg plus grande mais qui inclut TAR [87]. Dans la plupart de ces cas, l'implication de ces protéines dans la régulation de la traduction dans le contexte proviral (et donc, en présence de Tat) n'a pas été démontrée. Ceci est probablement ardu étant donné l'effet énorme de Tat au niveau transcriptionnel qui est perdu dans le cas où la séquence TAR est mutée. Par ailleurs, il semblerait, qu'en plus des activités décrites plus haut, Rev pourrait réguler positivement la traduction des ARN possédant un RRE [101].

Dans 90 à 95% des cas, la traduction de l'ARNg s'arrête au codon stop à la fin de la séquence codante de pr55^{Gag}. Cependant dans 5 à 10% des cas, le ribosome subit un décalage -1 du cadre de lecture de la traduction (Figure 6D). Ainsi la traduction continue au delà du codon stop habituel étant donné qu'il n'est plus reconnu en tant que codon par le ribosome. En conséquence, le cadre de lecture de la séquence codant les enzymes virales étant décalé d'un nucléotide par rapport à celui de la séquence de pr55^{Gag}, le précurseur pr160^{Gag-Pol} peut être synthétisé. Ce décalage du cadre de lecture est programmé par le virus puisque sa fréquence (5-10%) est bien plus élevée que normalement au sein d'un ARNm classique. Ceci est possible grâce à la présence d'un élément *cis* dans l'ARNg à la fin de la séquence codante de pr55^{Gag}. Cette région régulatrice est constituée d'une séquence dite glissante suivie d'une tige-boucle provoquant ainsi une pause du ribosome lors de l'élongation favorisant ainsi le changement de cadre de lecture [102]. Ce mode de régulation génique permet donc au virus de produire les protéines structurales et enzymatiques selon un rapport adéquat qui est critique à sa pleine infectivité [103, 104].

Finalement, il est à noter que la protéase virale est capable de protéolyser eIF4G (pour « eukaryotic initiation factor 4G ») et PABP (pour « poly-A-binding protein), des facteurs de traduction critiques lors de l'initiation CAP-dépendante [105, 106]. La pertinence biologique de ces activités pour le cycle viral reste inconnue mais il a été proposé que cette activité inhibe la traduction rendant ainsi disponible l'ARNg à des fins d'encapsidation dans les virus néosynthétisés. Une autre hypothèse est que ce processus favoriserait l'initiation de la traduction CAP-indépendante médiée par l'IRES de l'ARNg.

5.4 L'assemblage du VIH-1

5.4.1 pr55^{Gag}

5.4.1.1 pr55^{Gag} est le « LEGO » de l'assemblage viral

Pr55^{Gag} (communément appelé Gag) est le précurseur des protéines de structure du virus. Cette protéine de 55 kDa est nécessaire et suffisante pour la formation de la coque du virus. En effet, pr55^{Gag} constitue le « LEGO » utilisé par le virus pour fabriquer une nouvelle coque virale puisque celle-ci est issue de la multimérisation ordonnée d'environ 5000 copies de pr55^{Gag} (Figure 7A)[107]. Lorsqu'il est exprimé dans la cellule en absence de toute autre protéine virale, pr55^{Gag} est quand même capable de former des particules appelées VLP (pour « virus-like particles »)[8, 9]. Ces VLP, qui sont évidemment dépourvues d'ARNg et non-infectieuses, s'assemblent, bourgeonnent de la membrane plasmique puis sont relâchées dans le milieu extracellulaire apparemment via les mêmes processus que des virus complets. Par ailleurs, lorsque observées par microscopie électronique à transmission (Figure 7B), les VLP ont la même morphologie que des virus immatures (c'est-à-dire dans lesquels pr55^{Gag} n'a pas été protéolysé par PR)[108]. Ceci indique que pr55^{Gag} contient la plupart des déterminants nécessaires à la formation de nouvelles particules. C'est pourquoi énormément d'études sur l'assemblage ont été effectuées dans un contexte où pr55^{Gag} était la seule protéine virale exprimée et donc prise en compte, simplifiant ainsi les interprétations scientifiques.

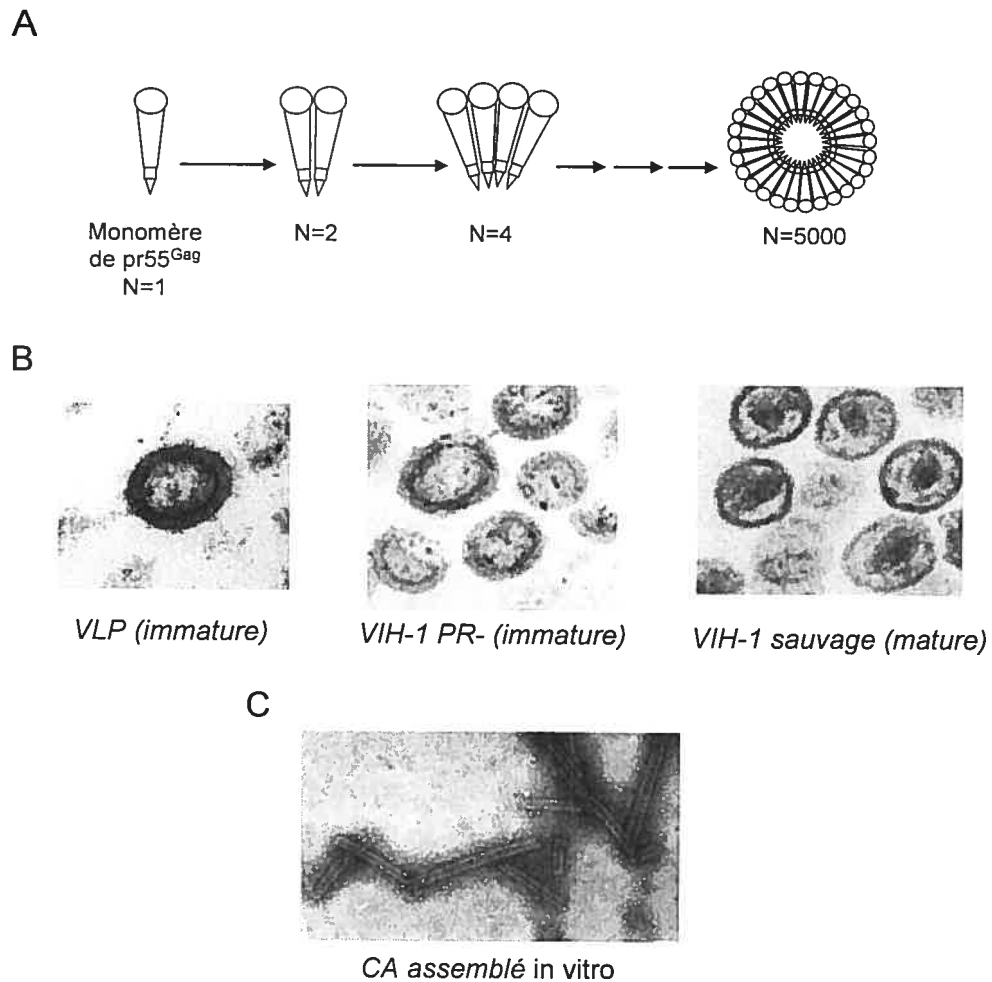


Figure 7 : La multimérisation de pr55^{Gag} génère de nouvelles capsides

(A) Représentation schématique des différentes étapes de la multimérisation de pr55^{Gag} à partir d'un monomère jusqu'à la particule complètement assemblée. N représente le nombre de molécules de pr55^{Gag} présentes au sein du complexe d'assemblage. (B) Visualisation par microscopie électronique à transmission d'une VLP, de virus immatures (générés suite à la mutation R57G dans PR) et de virus matures. Images tirées de Ako-Adjei *et al.* (2005), Ott *et al.* (2003) et Joshi *et al.* (2006) [21, 109, 110]. (C) Les tubules formés par CA *in vitro* tels qu'observés par microscopie électronique à transmission. Image tirée de von Schwedler *et al.* (1998)[111].

5.4.1.2 Les domaines fonctionnels de pr55^{Gag}

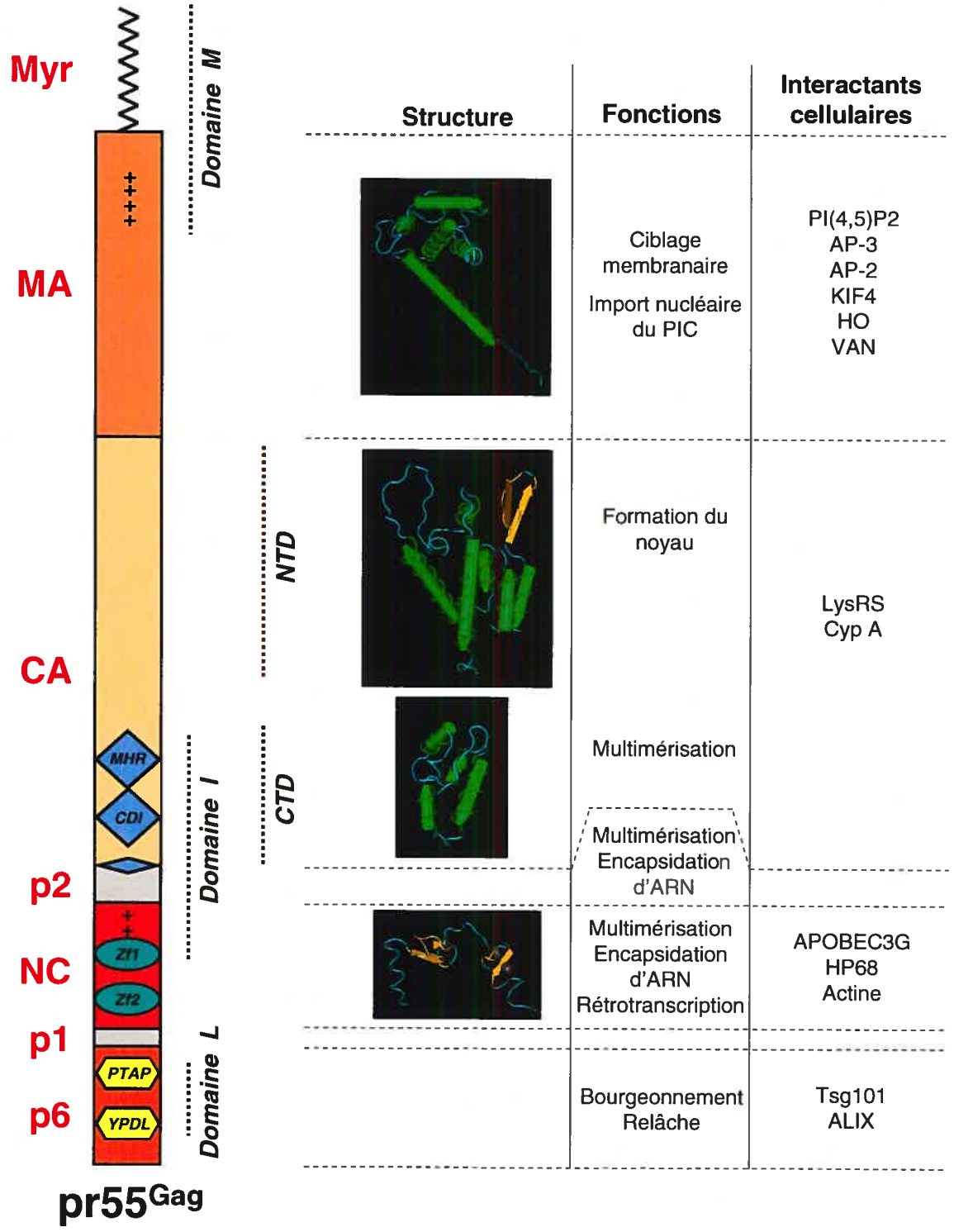
pr55^{Gag} est une protéine modulaire composée de plusieurs domaines (Figure 8) qui fonctionnent indépendamment les uns des autres et qui possèdent tous un ou plusieurs rôles particuliers durant la réplication du VIH-1. Ses domaines sont au nombre de 6 (MA, CA, p2, NC, p1 et p6) et participent tous à un moment ou à un autre à l'assemblage tel que décrit plus loin. On connaît la structure de presque tous ses domaines sous forme de protéine mature [112]. En revanche, on ignore la structure de pr55^{Gag} dans sa totalité.

L'assemblage du VIH-1 et des rétrovirus en général dépend de 3 domaines fonctionnels que l'on retrouve au sein de pr55^{Gag} (Figure 8) :

- Le domaine M (M pour « membrane ») est responsable de l'association des complexes d'assemblage aux membranes. Chez le VIH-1, le domaine M est situé à l'extrémité N-terminale de pr55^{Gag} dans le domaine MA. Le domaine M contient un signal de myristylation et une région basique indispensables à l'ancrage de pr55^{Gag} dans la membrane plasmique ou les endosomes tardifs (voir section 5.4.6.3)[9].
- Le domaine I (I pour « interaction ») est impliqué dans la multimérisation de Gag et sa délétion totale ou partielle nuit grandement la production virale. Chez le VIH-1, ce domaine comprend le dernier tiers C-terminal du domaine CA, le domaine p2 ainsi que l'extrémité N-terminale de NC. Certaines études proposent que les activités des domaines I et M sont reliées (voir section 5.4.6.3).
- Le domaine L (L pour « late ») est impliqué dans les dernières étapes du cycle viral, le bourgeonnement et la relâche du virus néo-synthétisé dans le milieu extracellulaire. Chez le VIH-1, le domaine L est situé dans le domaine p6 de pr55^{Gag} (voir section 5.2).

Figure 8: pr55^{Gag} et ses domaines fonctionnels

À gauche, une représentation schématique de pr55^{Gag} myristylé et de ses différents domaines est représentée. Les ellipses, les losanges et les hexagones présents dans pr55^{Gag}, désignent ses sous-domaines fonctionnels décrits dans la section Introduction. La structure tridimensionnelle de chaque domaine est montrée. Ces images ont été générées à l'aide du logiciel Cn3D version 4.1 et des fichiers PDB 1UPH, 1GWP, 1A43 et 1F6U. Des exemples de fonctions et de partenaires protéiques connus pour chaque domaine sont également indiqués. (+ : régions riches en acide aminés basiques; Zf : doigt de zinc)



5.4.2 L'assemblage est un processus actif et dynamique

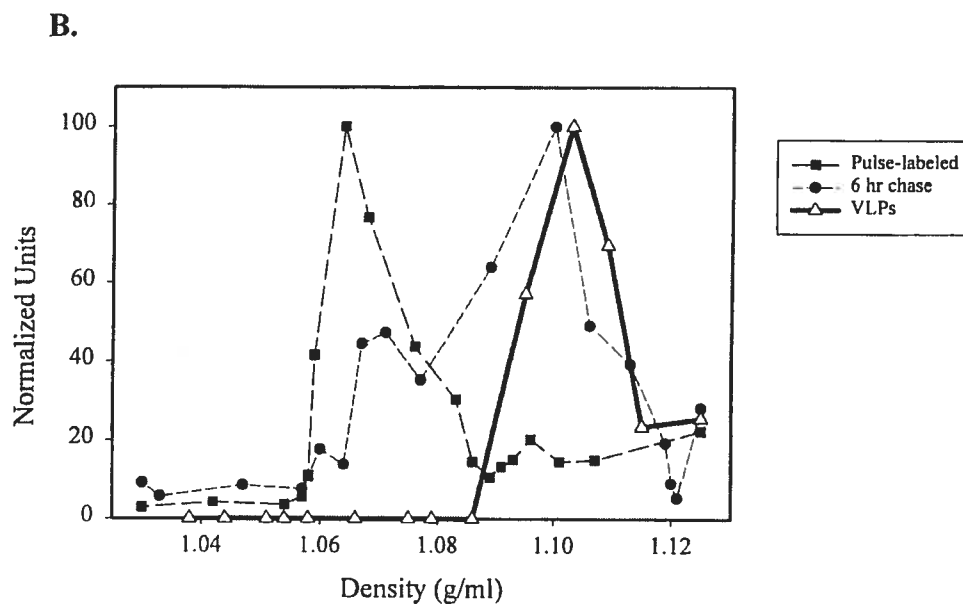
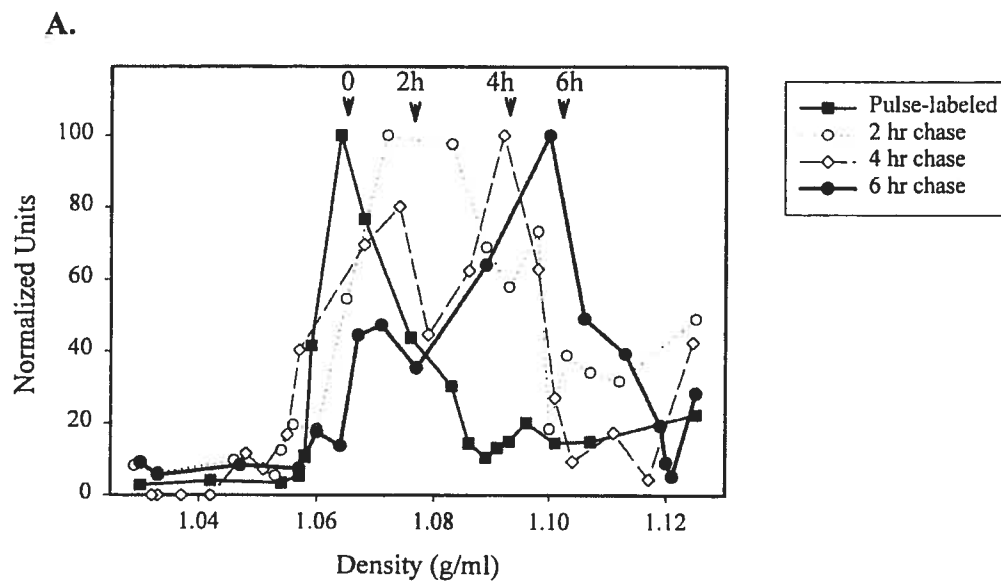
L'assemblage est un processus actif qui requiert de l'énergie sous forme d'ATP [113, 114]. En pratique, il est encore difficile de discerner les unes des autres les différentes étapes de l'assemblage dans la cellule. Ceci est en partie dû au fait que les virus s'assemblent relativement vite (quelques heures) [115] et d'une manière asynchrone. Ainsi, pour suivre les étapes de l'assemblage, il faut souvent avoir recours à des expériences de chasse suite à un marquage métabolique afin de suivre le destin post-traductionnel de molécules de pr55^{Gag} marquées radioactivement (dont l'assemblage est ainsi synchronisé). Le suivi d'une population de pr55^{Gag} montre que la densité des complexes augmente en fonction du temps (Figure 9)[115]. Ce phénomène est probablement la conséquence de la formation de complexes de pr55^{Gag} ayant un ordre de multimérisation croissant. En accord avec ceci, la densité finale de ces complexes correspond à celle des VLP relâchés [115]. Pour simplifier, les complexes de faible densité détectés juste après leur traduction correspondraient à des monomères de pr55^{Gag} tandis que ceux avec la plus grande densité contiendraient environ 5000 molécules de pr55^{Gag} multimérisées. Ces différents complexes dynamiques menant à la formation de nouvelles particules virales prêtes à être relâchées dans le milieu extracellulaire sont appelés intermédiaires d'assemblage.

En effectuant un essai d'assemblage *in vitro* un peu plus artificiel avec des extraits de germe de blé, il a été possible d'identifier plusieurs intermédiaires d'assemblage annotés selon leur coefficient de sédimentation en Svedberg (S) et exhibant un ordre de multimérisation de pr55^{Gag} croissant [116-119]. Ces études concluent que l'assemblage se fait comme suit :

Monomère de pr55^{Gag} ⇔ 10S ⇔ 75S ⇔ 150S ⇔ 500S ⇔ 750S

Figure 9 : La densité des complexes d'assemblage du VIH-1 augmente au cours du temps.

(A) Des cellules COS-1 exprimant pr55^{Gag} ont été traitées pendant 7 minutes avec de la méthionine radioactive. Cette dernière est incorporée dans les protéines néosynthétisées. Les cellules ont été collectées tout de suite après ce marquage (0; « pulse labeled ») ou 2, 4 et 6 heures après. Les extraits cytoplasmiques ont été soumis à une ultracentrifugation à 100000xg. Les culots ont été fractionnés au sein d'un gradient de densité d'Optiprep 0-18%. Chaque fraction collectée a été soumise à une immunoprécipitation dirigée contre pr55^{Gag}. Les protéines pr55^{Gag} néosynthétisées et purifiées ont été ensuite détectées par autoradiographie suite à une électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant. Chaque fraction du gradient correspond à une densité bien précise. L'élucidation de la distribution des molécules de pr55^{Gag} marquées au sein du gradient permet donc de déterminer la densité moyenne des complexes d'assemblage à un temps donné. (B) Même expérience que (A) mais effectué également avec des VLP purifiés. Ceci montre qu'après 6 heures, les complexes d'assemblage ont la même densité que des particules complètement assemblées, soit les VLP. Figure tirée de Tritel *et al.* (2000)[115].



On ignore à quoi correspondent exactement ces intermédiaires et combien de molécules de pr55^{Gag} coexistent au sein de chaque intermédiaire. De plus, outre l'importance supposée de NC dans l'initiation de l'assemblage (voir section 5.4.5.1), on ne sait pas encore quelle est la contribution de chaque domaine de pr55^{Gag} lors de la transition d'un intermédiaire spécifique vers un autre.

5.4.3 Le contrôle spatio-temporel de l'assemblage

L'assemblage est finement régulé dans le temps et dans l'espace. En effet, chaque intermédiaire d'assemblage est localisé dans la cellule très probablement dans un compartiment qui lui est spécifique où il recrute des facteurs cellulaires qui contrôlèrent chaque transition ainsi que son trafic intracellulaire. De plus, chaque domaine de pr55^{Gag} est sollicité à différents moments bien précis de l'assemblage vraisemblablement à des endroits de la cellule spécifiques d'un intermédiaire d'assemblage. Inversement, durant le reste du processus d'assemblage, ces domaines doivent rester inactifs puisque certaines étapes de l'assemblage ne requièrent pas leur activité. La compréhension de ces mécanismes de régulation représente un défi pour les prochaines années dans ce domaine.

À titre d'exemple, ABCE1 (ou HP68), une protéine liant l'ATP, interagit avec le domaine NC de pr55^{Gag} et est capitale pour la formation de particules complètement assemblées [117, 119]. En effet, l'expression d'un dominant négatif de cette protéine affecte grandement la production virale. De plus, la déplétion de ABCE1 dans les extraits utilisés dans des essais d'assemblage *in vitro* affecte les niveaux de capsides assemblées 750S au profit d'autres intermédiaires plus précoces. De plus, le caractère dynamique de cette interaction virus-hôte est mis en lumière par le fait qu'elle ne se fait qu'au sein d'intermédiaires d'assemblage spécifiques (80S, 150S et 500S) tandis que ABCE1 est exclu de l'intermédiaire 10S et des particules assemblées (750S).

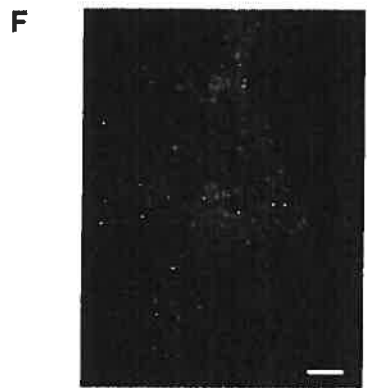
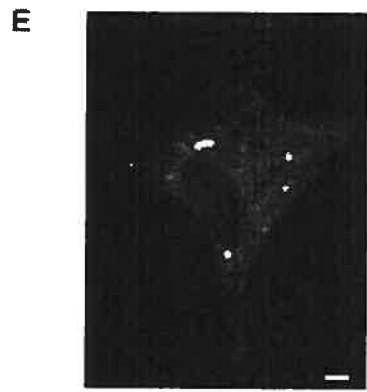
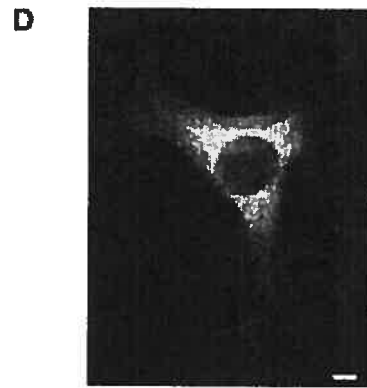
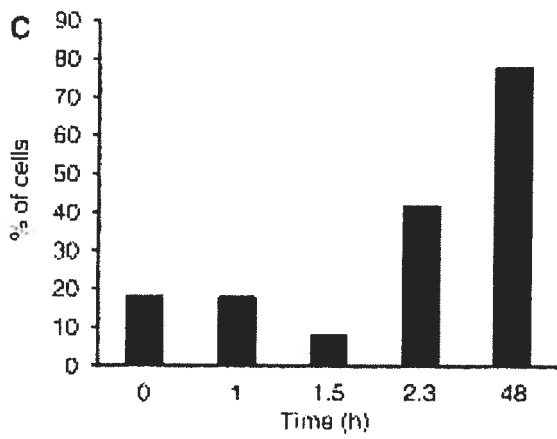
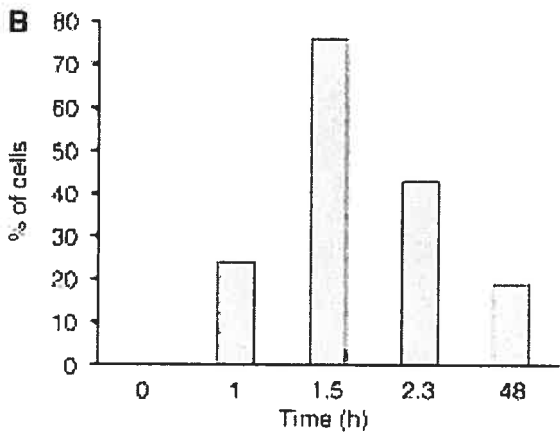
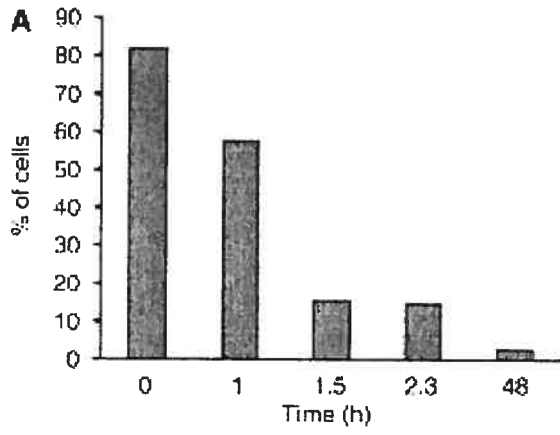
5.4.4 Les premiers intermédiaires d'assemblage détectés

À l'état basal, la majorité des molécules de pr55^{Gag} sont associées à la membrane. Cette interaction se fait rapidement suite à la traduction (en deçà d'une heure) [115, 120]. Malgré cela, il existe beaucoup d'études mettant en évidence l'existence de complexes d'assemblage cytosoliques. Tout d'abord, des études de fractionnement cytoplasmique les ont identifiés en montrant qu'à l'inverse des protéines pr55^{Gag} membranaires, ces complexes étaient résistants aux traitements par des détergents non ioniques mais sensibles à la trypsine étant donné l'absence de membrane les protégeant [121, 122]. Ces mêmes complexes ont été observés en microscopie électronique à transmission suite à un marquage de pr55^{Gag} avec des billes d'or [123]. L'existence d'intermédiaires d'assemblage cytosoliques est supportée également par plusieurs études qui ont montré que l'association de pr55^{Gag} aux membranes dépendait de sa multimérisation préalable via le domaine I dans le cytosol [124, 125].

Au sein d'une étude publiée très récemment, Perlman *et al.* ont effectué un suivi dans le temps par microscopie de la localisation cellulaire des molécules de pr55^{Gag} néo-synthétisées (Figure 10) [126]. Cette étude montre que suite à la traduction de pr55^{Gag}, sa distribution est diffuse dans la cellule mais qu'une heure et demie plus tard, pr55^{Gag} est présent au sein de complexes périnucléaires apparemment cytosoliques puisqu'ils ne colocalisent avec aucun des marqueurs de compartiments membranaires testés. Des études suggèrent que ce compartiment serait le centre organisateur des microtubules et représenterait non seulement la plateforme de transit de pr55^{Gag} vers des compartiments membranaires [127, 128] mais également le site de sélection de l'ARNg viral [128]. Plus tard dans l'assemblage, pr55^{Gag} est associé avec des endosomes tardifs puis/et/ou avec la membrane plasmique (voir section 5.4.6 et figures 10, 12 et 13).

Figure 10 : Le suivi temporel du destin intracellulaire de complexes d'assemblage.

Des cellules COS-1 ont été transfectées avec un expresseur de pr55^{Gag} fusionné à la protéine fluorescente verte (GFP). Trois heures suite à la transfection, les cellules ont été traitées pendant trois heures avec de la cycloheximide afin d'inhiber la synthèse protéique puis dans du milieu complet sans drogue pendant différentes périodes (1 heure; 1,5 heure; 2,3 heures; 48 heures) durant lesquelles pr55^{Gag}-GFP est produite. La localisation cellulaire des protéines pr55^{Gag} néosynthétisées à ces différents temps est visualisée par microscopie à fluorescence. Les phénotypes observés sont séparés en trois catégories : (A, D) distribution de pr55^{Gag} diffuse; (B, E) localisation de pr55^{Gag} au sein d'amas périnucléaires; (C, F) distribution de pr55^{Gag} ponctuée (reflétant probablement l'association de pr55^{Gag} avec les MVB). La fréquence de chaque phénotype est quantifiée par la détermination du pourcentage de cellule montrant un phénotype à chaque temps suivant la levée du blocage traductionnel par la cycloheximide. Figure tirée de Perlman *et al.* (2006)[126].



Ainsi, ces intermédiaires d'assemblage correspondraient aux toutes premières étapes de l'assemblage de pr55^{Gag}. Cependant, on ne dispose que de très peu d'informations à leur propos puisqu'ils se trouvent en amont du processus d'assemblage et que leur existence au sein du cytosol est très transitoire et difficile à détecter. On peut cependant imaginer que la formation de ces premiers complexes correspond aux premiers contacts pr55^{Gag}-pr55^{Gag} médiés par le domaine I.

5.4.5 Le domaine I et la régulation de la multimérisation de pr55^{Gag}

5.4.5.1 La participation présumée de NC dans les premiers contacts pr55^{Gag}-pr55^{Gag}

Tel que décrit plus haut, la multimérisation de pr55^{Gag} dépend du domaine I. En fait, la dimérisation de pr55^{Gag} initiant le processus d'assemblage semble être médiée par le domaine NC. Le domaine NC contient beaucoup d'acides aminés basiques ainsi que deux doigts de zinc (Figure 11). Tout d'abord NC est le domaine minimal de pr55^{Gag} capable d'homodimériser dans des essais double hybride chez la levure suggérant que les contacts NC-NC sont les plus faciles et donc, les premiers à s'effectuer [129]. Par ailleurs, l'assemblage peut se faire normalement si NC est remplacé par un domaine de dimérisation hétérologue comme une agrafe à leucine (« leucine zipper »), ou des doigts de zinc (« zinc fingers ») de protéines cellulaires [130, 131]. D'ailleurs, la protéine Gag minimale qui est capable de produire des VLP contient ces domaines de dimérisation et la séquence de NC n'y est pas indispensable [132]. *In vitro*, on peut imiter la dimérisation de Gag médiée par NC par la formation de contacts intermoléculaires par le biais de ponts di-sulfures suite à la substitution de NC par une cystéine [133].

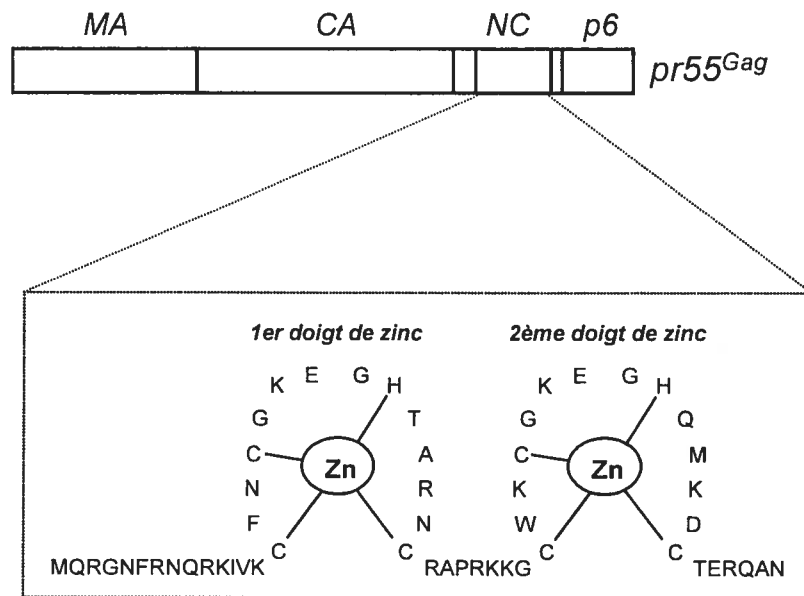


Figure 11 : Représentation schématique de la séquence protéique du domaine NC de pr55^{Gag}.

La séquence en acides aminés de NC est montrée. Ce domaine contient deux doigts de zinc mais également beaucoup d'acides aminés basiques (surtout des arginines et des lysines).

Ainsi, bien que l'assemblage viral dépende grandement du domaine NC de pr55^{Gag}, il semble que la dimérisation médiée par ce domaine constitue simplement un signal d'initiation de l'assemblage qui favorise la formation de multimères de plus grand ordre via l'intervention d'autres domaines de pr55^{Gag}.

Il a été proposé que le mécanisme régissant la dimérisation de NC dépend en partie de sa capacité à lier l'ARN. En effet, NC peut s'associer non seulement à l'ARNg viral (voir section 5.6.4.2) d'une manière spécifique par l'intermédiaire de ses doigts de zinc [134-136], mais aussi d'une façon non spécifique à l'ARN en général via ses acides aminés basiques [137-139]. Ces résidus chargés positivement forment des interactions électrostatiques avec le squelette phosphaté (chargé négativement) de l'ARN et permettraient ainsi le recrutement d'ARN dans les complexes d'assemblage. Ces derniers se serviraient de ces acides nucléiques tels une charpente permettant ainsi d'augmenter la concentration locale de pr55^{Gag} et de favoriser sa multimérisation subséquente. Ce modèle est supporté par le fait, qu'*in vivo*, ces résidus et l'ARN sont importants pour l'assemblage [137, 138] tandis qu'*in vitro* la présence d'ARN facilite la multimérisation de Gag [140]. Certaines études ont montré que les doigts de zinc de NC, quant à eux pouvaient également influencer l'assemblage [135, 141]. Cependant, leur participation à la multimérisation de pr55^{Gag} est considérée comme mineure par rapport à celle des acides aminés basiques.

5.4.5.2 Le rôle de CA dans l'assemblage

5.4.5.2.1 Les observations à partir d'études *in vitro*

Une des manières les plus évidentes de comprendre l'assemblage était d'étudier les propriétés intrinsèques de multimérisation de chaque domaine de pr55^{Gag} *in vitro* en absence de tout autre élément. Bien qu'effectuées dans un contexte ne reflétant que très peu

l'environnement intracellulaire, beaucoup d'études montrent que la protéine CA est capable d'homo-multimériser *in vitro*. On considère que CA contient 2 domaines fonctionnels, soit un domaine N-terminal (ou NTD) [142] et un domaine C-terminal (ou CTD) [143], possédant tous deux la capacité d'homo-multimériser [143, 144]. Ainsi, *in vitro*, CA, via le NTD peut former des hexamères [145, 146]. Ces structures sont reliées entre elles grâce à l'homo-dimérisation du CTD et éventuellement via un autre contact NTD - NTD (voir figure 18A et section 5.7.2).

Lorsque observée par microscopie électronique, cette matrice d'hexamères se présente *in vitro* sous la forme de tubules (Figure 7C), de cônes ou éventuellement de sphères dépendamment du pH [145-149]. Bien que ces essais *in vitro* soient effectués dans des conditions de haute force ionique et à des concentrations non physiologiques, des structures tubulaires ou coniques avec la même organisation que CA *in vitro* sont également observées par microscopie cryo-électronique dans le noyau mature du virus purifiés [18]. Ceci suggère que ces interactions CA-CA sont importantes plutôt pour l'intégrité de la capsid virale que lors de l'assemblage. Cependant, l'utilisation d'un précurseur immature de CA, contenant MA, p2 et NC mène à la formation du même type de structure qu'avec CA seule [140], suggérant qu'elle existe dans la cellule avant la maturation et représente donc un complexe d'assemblage.

5.4.5.2.2 Les observations à partir d'études *in vivo*

Beaucoup d'études montrent que CA est effectivement un élément déterminant dans l'assemblage de virus quand ils sont produits dans des cellules en culture. En fait, il semble que les deux tiers N-terminaux de CA ne soient pas indispensables pour l'assemblage ce qui est contradictoire avec les études *in vitro*. En effet, seule l'extrémité C-terminale contribue au domaine I de pr55^{Gag} et est requise au sein de constructions minimales de Gag capables de produire des VLP [132, 150]. La région N-terminale quant à elle est impliquée

dans la structure du noyau viral [42]. Plusieurs déterminants importants dans la région C-terminale de CA ont été identifiés grâce à des études structurales et biochimiques via la mutagenèse dirigée (Figure 8) :

- La région d'homologie majeure (ou MHR pour « major homology region ») très conservée parmi les rétrovirus et les différentes souches de VIH [150-152].

- Les 14 acides aminés juste après l'extrémité C-terminale du MHR forment l'hélice 9 de CA qui permet l'homodimérisation de CA. Cette région est appelée l'interface de dimères de CA (ou CDI pour « capsid dimer interface »)[139, 153-155].

- Les 11 derniers acides aminés de CA : Cette séquence est très conservée et a une structure désordonnée, contrairement au reste du CTD adoptant une structure rigide. En fait, ces acides aminés jouent un rôle au sein d'une séquence plus grande incluant p2 et éventuellement les premiers acides aminés de NC. La région chevauchant les domaines CA et p2 formerait une hélice alpha selon des prédictions structurales [156-158]. Des études structurales par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que cette région est également flexible [159] mais avec une certaine propension à adopter effectivement une conformation d'hélice alpha [160]. Cette dynamique structurale est probablement importante lors de l'assemblage.

5.4.5.3 La participation potentielle de MA dans la multimérisation de pr55^{Gag}

Certaines études ont montré que le domaine basique de MA pouvait contribuer à la multimérisation de pr55^{Gag} [139, 161, 162]. Ceci est supporté par le fait que MA est capable de trimériser en solution [162, 163]. Pourtant, l'implication de MA dans l'assemblage du VIH-1 est controversée puisque d'autres études ont montré que MA n'était pas indispensable (contrairement au domaine I) à la formation de nouvelles particules.

5.4.6 L'assemblage au sein de compartiments membranaires : La controverse.

5.4.6.1 Le mode d'assemblage du VIH-1 semble dépendant du type cellulaire

Une des questions très controversées sans réponse claire dans le domaine de l'assemblage est dans quel compartiment membranaire de la cellule se fait l'assemblage. Il est clair qu'à l'état basal (« steady state »), pr55^{Gag} est localisé aux membranes mais au sein de compartiments différents selon le type cellulaire. En effet, dans les cellules T, HeLa et 293T (cellules de type I), pr55^{Gag} est localisé majoritairement au niveau de la membrane plasmique à partir de laquelle les virus bourgeonnent et sont relâchés (Figure 12A)[120].

En revanche, dans les cellules dendritiques et les macrophages (cellules de type II), pr55^{Gag} semble être détectée plutôt au sein d'un compartiment contenant des marqueurs d'endosomes tardifs (tels que la protéine CD63) et qui ressemblent à des corps multivésiculaires (ou MVB). Les virus bourgeonnent et sont relâchés au sein de ces structures intracellulaires (Figure 12B). Suite à l'exocytose des MVB, les virus sont libérés dans le milieu extra-cellulaire [164-166]. Il est à noter que certaines études rapportent qu'apparemment une fraction de pr55^{Gag} est localisée au MVB dans les cellules T, HeLa et 293T [127, 167-169]. Ce fait reste cependant extrêmement controversé.

5.4.6.2 Les différents modèles du trafic intracellulaire de pr55^{Gag}

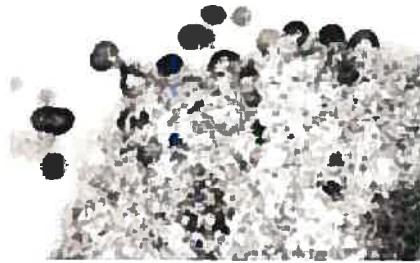
Le trafic de pr55^{Gag} au sein de complexes membranaires peut être expliqué par au moins trois modèles (Figure 12C-E) :

Modèle 1 : Le lieu d'assemblage du VIH diffère selon le type cellulaire infecté. Dans les cellules de type I, l'assemblage se fait au niveau de la membrane plasmique et

Figure 12 : Les différents modes d'assemblage du VIH-1.

(A) La relâche du VIH-1 au niveau de la membrane plasmique de cellules 293T (cellules de type I), telle qu'observée par microscopie électronique à transmission. Image tirée de Grigorov *et al.* (2006)[168]. (B) Le bourgeonnement du VIH-1 au sein des MVB dans les macrophages (cellules de type II) tel qu'observé par microscopie électronique à transmission. Dans ce cas, les virus sont marqués avec un anticorps anti-MA couplé avec des billes d'or. Image tirée de Pelchen-Matthews *et al.* (2003)[165]. (C, D, E) Les trois différents modèles de l'assemblage du VIH-1 exposés dans la section introduction.

A



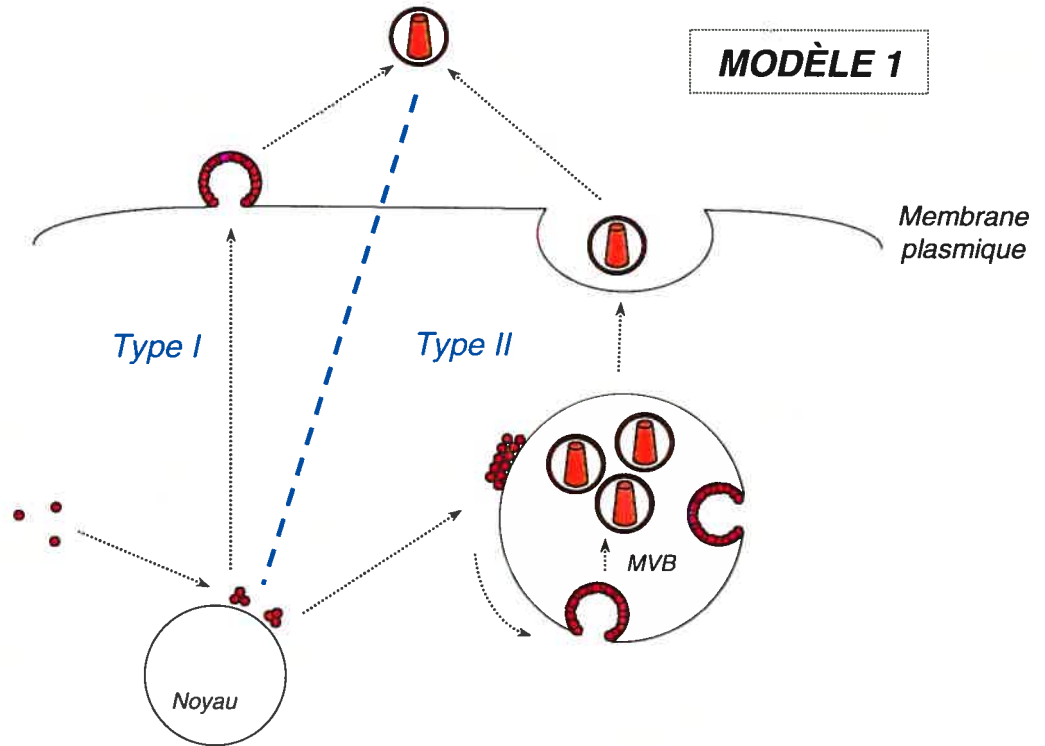
Cellule 293T (type I)

B

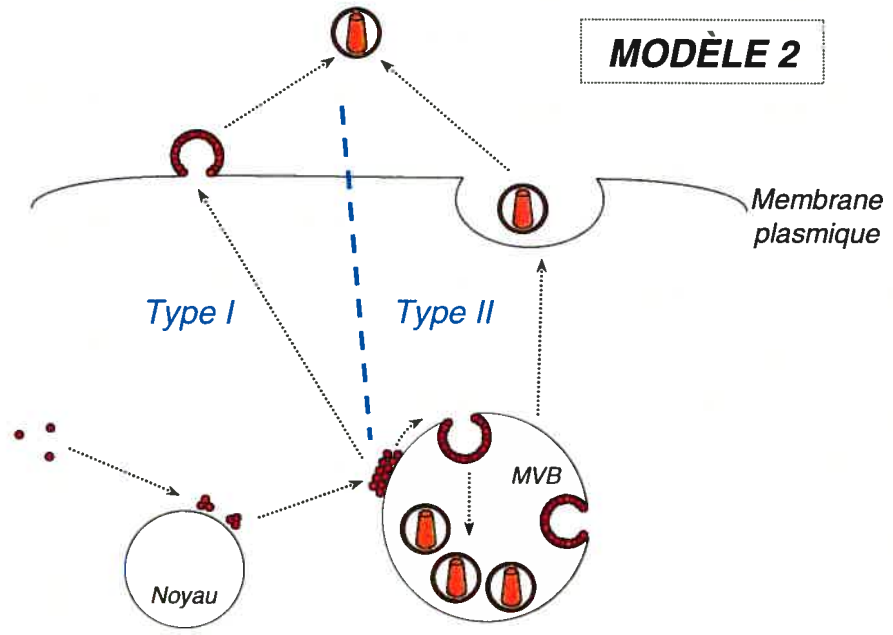


Macrophages (type II)

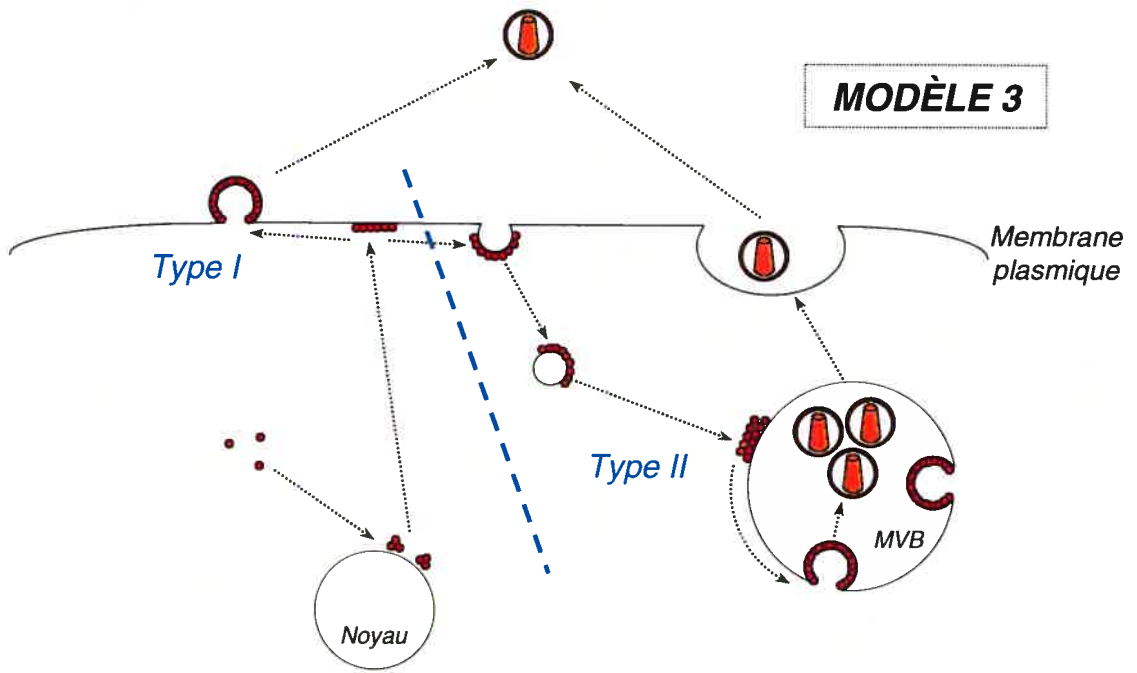
C



D



E



pr55^{Gag} ne transite jamais par les MVB et le virus est relâché suite à son bourgeonnement depuis la membrane plasmique. On pense que les microdomaines membranaires supportant la relâche virale s'apparentent, de par leurs propriétés biochimiques (résistance aux détergents non-ioniques à 4 degrés), aux barges lipidiques (« lipid rafts »)[170-172]. En revanche dans les cellules de type II, l'assemblage s'effectue au niveau des MVB. Le virus bourgeonne au sein de ces structures et est donc relâché dans la lumière des MVB. Suite à l'exocytose régulée des MVB, les virus sont ainsi libérés dans le milieu extracellulaire (Figure 12C).

Modèle 2- pr55^{Gag} est d'abord ciblé aux MVB dans tous les types cellulaires. Dans les cellules T, l'exocytose des MVB au niveau de la membrane plasmique est constitutive et très rapide. Ceci explique pourquoi l'on observe pr55^{Gag} dans les 2 compartiments à l'état basal. Pour ce qui est des cellules dendritiques et des macrophages, pr55^{Gag} se comporte comme dans le modèle 1 (Figure 12D).

Modèle 3- pr55^{Gag} se localise rapidement suite à sa synthèse au niveau de la membrane plasmique au sein de microdomaines spécialisés capables de subir une endocytose ciblant par la suite pr55^{Gag} vers les MVB. Les virions sont finalement relâchés à l'extérieur de la cellule par exocytose. Il a été proposé récemment que la protéine virale Vpu permet le maintien de l'assemblage au sein de la membrane plasmique en régulant négativement l'endocytose des intermédiaires d'assemblage (voir section 5.4.6.3.4)[173, 174]. Ainsi la capacité de certains types cellulaires à endocytoser pr55^{Gag} déterminerait le site d'assemblage (Figure 12E).

Finalement, il n'est pas exclu que les complexes d'assemblage transitent à un moment ou à un autre par le réseau *trans* de l'appareil de Golgi (TGN pour « trans-golgi network »). En effet, plusieurs études ont démontré que la déplétion de protéines transitant par ce compartiment telles que POSH1, Rab9, TIP47, p40, PIKfyve et Rab11A, affectait la

production virale [175, 176]. Cependant, la véritable implication du TGN dans l'assemblage n'a pas été prouvée de manière définitive compte tenu du caractère dynamique de la localisation de ces protéines.

5.4.6.3 La régulation de l'association aux membranes par le domaine M

5.4.6.3.1 Qu'est-ce-que le domaine M du VIH-1 ?

Une des caractéristiques de pr55^{Gag} est que cette protéine est capable de s'associer aux membranes grâce à son domaine M résidant dans MA (Figure 8). Cet évènement est indispensable à la production virale et est possible car pr55^{Gag} est myristylée à son extrémité N-terminale d'une manière co-traductionnelle. Cette modification post-traductionnelle survient après l'élimination du premier acide aminé N-terminal de pr55^{Gag} par la méthionine amino-peptidase et consiste en l'ajout covalent d'un acide gras myristate sur pr55^{Gag} par la N-myristoyl-transférase [9].

Cependant, en plus du myristate ajouté, l'association de pr55^{Gag} avec la membrane dépend également d'une séquence au sein du domaine MA riche en acides aminés basiques. Le myristyl, qui est hydrophobe, s'insère dans la bicouche lipidique tandis que la région basique de MA interagit de manière électrostatique avec les charges négatives des phospholipides membranaires (Figure 13A). Ces deux signaux sont donc les deux composantes du domaine M de pr55^{Gag} [9].

5.4.6.3.2 L'interupteur myristylique (« myristoyl switch »)

a) Principe

Il s'est avéré que, contre toutes attentes, la liaison de pr55^{Gag} aux membranes était contrôlée via un mécanisme finalement complexe et régulé. Dans un contexte où MA est

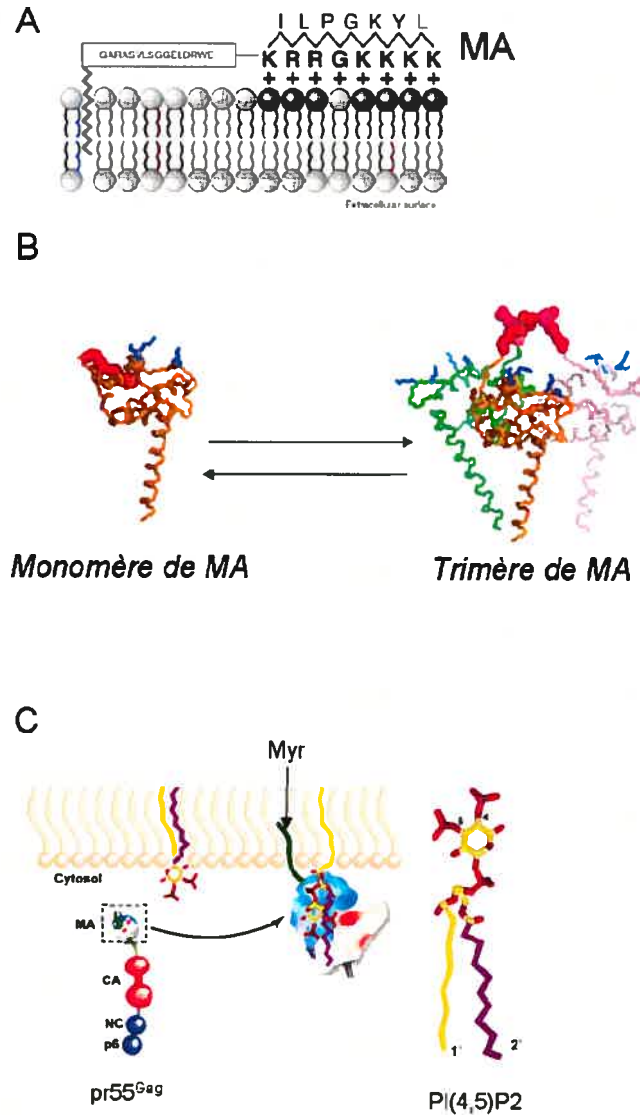


Figure 13 : L'interrupteur myristylique et son contrôle.

(A) Représentation schématique de l'interaction entre MA et une bicouche lipidique. Le myristyle de MA s'insère dans la bicouche lipidique tandis que sa région basique interagit de manière électrostatique avec les phospholipides membranaires. Tiré de Resh (2005)[9]. (B) Schéma illustrant que lorsque MA est sous forme trimérique, son myristyle est exposé. Le myristyle de MA est représenté en rouge tandis que ses acides aminés basiques le sont en bleu. Tiré de Tang *et al.* (2004)[163]. (C) L'association de MA avec la chaîne d'acide gras insaturé (en violet) de PI(4,5)P2 induit l'exposition de son myristyle qui peut s'insérer dans la bicouche lipidique. Adapté de Freed (2006)[177].

sous forme mature et myristylée, il s'avère que le groupement myristyle est séquestré à l'intérieur de la protéine au sein d'une poche hydrophobe (Figure 13B) [163]. Dans ce cas, MA peut quand même s'associer avec la bicouche lipidique via des interactions électrostatiques grâce à sa région basique. Cette interaction est faible et est appelée « liaison faible » (« loose binding »).

Pour pouvoir s'insérer dans la bicouche lipidique, le groupement myristyle doit être exposé via un réarrangement conformationnel dans MA (Figure 13B). L'association de MA aux membranes engageant sa région basique et son acide gras est dans ce cas plus stable et est appelée « liaison forte » (« tight binding »). Ainsi, le mode de liaison de pr55^{Gag} aux membranes serait régulé par un interrupteur myristylique (traduction de « myristoyl switch »). La régulation fine de cet équilibre pourrait influencer le type de membrane lié par pr55^{Gag} et donc le compartiment cellulaire supportant l'assemblage. À ce jour, deux facteurs l'influençant ont été identifiés.

b) Influence de la multimérisation de pr55^{Gag}

In vivo, la liaison de pr55^{Gag} aux membranes semble être dépendante de l'activité du domaine I et donc des premiers événements de multimérisation [124, 125, 178]. Cependant, certaines études contredisent cette affirmation et suggèrent que pr55^{Gag} peut s'associer aux membranes en tant que monomère [179, 180]. Pourtant, des études structurales semblent appuyer la première hypothèse et montrent que lorsque le domaine CA est rajouté à la protéine MA myristylée, cette protéine, capable alors de multimériser, possède un groupement myristyle qui est exposé (Figure 13B)[163].

En conséquence, une multimérisation préalable de pr55^{Gag} dans le cytosol favoriserait son association avec les membranes en influant sur l'interrupteur myristylique. Cependant, grâce à des expériences de marquage métabolique, il est clair que l'apparition

d'intermédiaires d'assemblage de haute densité dans la cellule est observée dans une fenêtre temporelle dans laquelle pr55^{Gag} est déjà associé aux membranes [115]. Ceci montre que la plus grosse partie de l'assemblage s'effectue au sein de complexes membranaires. Ainsi, il est très probable que le virus commence son assemblage dans le cytosol grâce au domaine I mais que la liaison aux membranes de pr55^{Gag} est un signal positif pour la suite de l'assemblage et la finition des virus.

c) L'influence du PI(4,5)P2

Le phospho-inositol 4,5 bis-phosphate, ou PI(4,5)P2 est un phospholipide de la couche interne de la membrane plasmique dont la déplétion affecte la localisation cellulaire de pr55^{Gag} et la production virale [181]. En effet, cette déplétion induit la relocalisation des complexes d'assemblage de la membrane plasmique vers les MVB, un phénotype également observé dans le cas de mutations de MA ne permettant qu'une « liaison faible » aux membranes.

Il a été montré très récemment que PI(4,5)P2 est capable d'interagir avec MA *in vitro* via des interactions hydrophobes et électrostatiques [182]. Ceci supporte tout d'abord que PI(4,5)P2 permet l'ancrage de pr55^{Gag} à la membrane plasmique spécifiquement. Par ailleurs, la liaison de PI(4,5)P2 favorise l'exposition du myristyle de la même manière que cela a été observé suite à la multimérisation de pr55^{Gag} (voir plus haut et figure 13C). Ceci suggère que l'association à PI(4,5)P2 promeut la formation d'un deuxième contact entre pr55^{Gag} et la membrane plasmique via l'insertion du myristyle dans la bicouche lipidique (« liaison forte »). De plus, il a été proposé que la forme de PI(4,5)P2 liée à MA aurait plus d'affinité pour les barges lipidiques, permettant ainsi le ciblage de pr55^{Gag} dans ces microdomaines importants pour la production virale. Ainsi, via ce type de régulation, la liaison de pr55^{Gag} à PI(4,5)P2 influencerait sur le ciblage des intermédiaires d'assemblage vers la membrane plasmique (« liaison forte ») ou vers les MVB (« liaison faible »)[182].

5.4.6.3.3 Le ciblage de pr55^{Gag} vers les MVB

Plusieurs déterminants dans pr55^{Gag} permettant son association aux MVB ont été identifiés. Tout d'abord, le domaine I de pr55^{Gag} (partie C-terminale de CA) contient deux signaux d'internalisation potentiels de type di-leucine qui, selon Lindwasser *et al.*, seraient importants aussi bien pour la production virale que pour l'association de pr55^{Gag} aux MVB [183]. Cependant, une étude très récente et convaincante remet en question cette dernière conclusion et démontre que ces deux motifs sont plutôt impliqués dans la structure et la multimérisation de pr55^{Gag} [21].

Récemment, on a découvert que la protéine adaptatrice AP-3 (pour « adaptator protéin-3») interagissait avec le domaine MA de pr55^{Gag}. La déplétion d'AP-3 par RNAi ou l'expression d'un dominant négatif affectent grandement la production virale. Dans ces conditions pr55^{Gag} ne colocalise plus avec des marqueurs des endosomes tardifs suggérant un rôle critique de cette interaction lors de l'association de pr55^{Gag} aux MVB [167]. Cette étude supporte la thèse que pr55^{Gag} doit au moins transiter par les MVB lors de l'assemblage.

Par ailleurs, la surexpression de RILP, une protéine impliquée dans le transport rétrograde des endosomes tardifs dans la cellule, provoque une accumulation de pr55^{Gag} dans une région périnucléaire identifiée comme le centre organisateur des microtubules (MTOC pour « microtubules organization center »)[127]. Même si ce phénotype a été remis en question récemment [184], ceci suggère tout d'abord que pr55^{Gag} est effectivement associé aux endosomes tardifs et que ces derniers seraient impliqués dans le trafic des complexes d'assemblage. De plus, ces observations supportent l'hypothèse que le MTOC serait le compartiment cellulaire supportant les événements précoces de l'assemblage avant l'association de pr55^{Gag} aux membranes.

5.4.6.3.4 Membrane versus MVB : Les arguments

Beaucoup d'études se contredisent en démontrant que l'assemblage s'effectue majoritairement au sein de la membrane plasmique ou des MVB. Même si l'implication des MVB dans les cellules de type II est plutôt acceptée, dans le cas des cellules de type I (incluant l'hôte naturel du VIH-1, les cellules T), les études contradictoires se multiplient [120, 127, 167-169, 185]. Pour la plupart, les résultats sont basés sur la visualisation de la localisation cellulaire de pr55^{Gag} par microscopie confocale ou électronique. Toutes ces études sont d'autant plus dures à réconcilier qu'elles ne sont pas toutes effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Par exemple, l'utilisation d'expressions de pr55^{Gag}, fusionné ou non à diverses étiquettes (GFP, HA, FLAG), prime souvent pour des raisons techniques et d'interprétations sur celle de provirus complets, ce qui pourrait biaiser certaines conclusions. Plusieurs lignes d'évidences soutiennent l'une ou l'autre de ces thèses et sont récapitulées dans la section suivante.

a) Arguments en faveur de l'assemblage au niveau de la membrane plasmique

Le Docteur Eric Freed et son équipe ont apporté beaucoup d'éléments de réponse à cette énigme qui favorise la thèse de l'assemblage au sein de la membrane plasmique. Tout d'abord, ils ont montré que la déplétion du PI(4,5)P₂, un phospholipide spécifique de la membrane plasmique, compromet non seulement la production virale mais entraîne également la relocalisation de pr55^{Gag} vers les MVB dans lesquels on observe du bourgeonnement viral [181]. Le même type de relocalisation est observé lorsque des mutations sont introduites dans la région basique du domaine MA de pr55^{Gag} [186, 187] ou lorsque le cholestérol, constituant fondamental des barges lipidiques, est déplété dans la cellule [170]. De plus, l'élucidation du lipidome du VIH-1 (issus de cellules T) a mis en lumière que son enveloppe était constituée majoritairement de constituants des barges

lipidiques [19]. Tous ces résultats suggèrent fortement que, dans les cellules T, le virus bourgeonne depuis les rafts de la membrane plasmique même si les complexes d'assemblage sont capables de transiter par les MVB.

La clé de cette énigme repose peut-être dans la protéine virale accessoire Vpu. Depuis longtemps on sait que Vpu augmente les niveaux de virus relâchés mais on ignorait pourquoi [188]. Récemment, il a été montré que, dans le contexte proviral, Vpu permet aux complexes d'assemblage de rester localisés au niveau de la membrane plasmique [173, 174]. En effet, lorsque Vpu n'est plus exprimé, pr55^{Gag} est rapidement internalisé au sein des endosomes et ciblé aux MVB dans les cellules humaines. En fait, il semble que Vpu permet aux complexes d'assemblage de surmonter l'activité d'un facteur cellulaire dominant et non identifié qui restreint l'assemblage au sein des MVB dans les cellules humaines [189]. Ces résultats récents supportent le modèle 3 décrit dans la section 5.4.6.2

b) Arguments en faveur de l'assemblage au niveau des corps multivésiculaires

Il a été démontré que, lors de l'assemblage, pr55^{Gag} avait une demi-vie très courte c'est-à-dire que la majeure partie de pr55^{Gag} était dégradée. Ainsi, les molécules de pr55^{Gag} localisées aux MVB pourraient en fait représenter des protéines engagées dans la voie normale de dégradation lysosomiale qui implique les endosomes tardifs. Cependant, ces molécules de pr55^{Gag} au sein de ce compartiment sont capables de s'assembler en particules qui bourgeonnent dans le lumen des MVB, tel qu'observé par microscopie électronique à transmission. Ce bourgeonnement intracellulaire est très clair dans les macrophages [164-166].

De plus, récemment, une étude a réussi à démontrer que les composantes du virus cofractionnent avec des marqueurs des MVB dans un gradient de saccharose [168]. Ces virus semi-purifiés sont infectieux suggérant que l'assemblage du virus au sein des MVB est efficace pour le VIH-1.

Par ailleurs, lorsque l'on stimule l'exocytose des MVB en augmentant la concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+} , la relâche virale est augmentée supportant que l'exocytose des MVB peut représenter un mode de sortie pour le virus [126, 168].

5.4.7 Rôles potentiels des modifications post-traductionnelles de pr55^{Gag}

Finalement, la régulation spatio-temporelle de l'assemblage pourrait dépendre du patron de modifications post-traductionnelles au sein de pr55^{Gag}. En effet, il a déjà été montré que pr55^{Gag} était myristylé, phosphorylé [190-192], ubiquitiné [193-195] et sumoylé [196] et ce, sur beaucoup de résidus dispersés le long de la polyprotéine. Ces modifications post-traductionnelles ont été recensées dans presque tous les domaines de pr55^{Gag}.

La myristylation de pr55^{Gag} à son extrémité N-terminale est impliquée dans le ciblage membranaire des complexes d'assemblage tel que discuté dans la section 5.4.6.3. Il est accepté que l'ubiquitination du domaine p6 est très importante pour sa fonction de relâche via le recrutement de complexes cellulaires cruciaux lors de ce processus (voir section 5.5). De même, l'activité de ce domaine semble être régulée via sa phosphorylation par ERK-2 [197]. Par ailleurs la phosphorylation de MA pourrait être importante lors des étapes précoces du cycle viral [190, 192]. Pour les autres types de modification, on ignore encore quasiment tout des propriétés qu'elles pourraient conférer à pr55^{Gag} ou de l'identité des enzymes qui modifient pr55^{Gag}. Cependant, comme dans le cas des protéines cellulaires, on peut facilement imaginer que ces modifications régulent la localisation cellulaire de pr55^{Gag} ou son association avec des facteurs de l'hôte.

Il est fort probable que pr55^{Gag} subisse d'autres types de modifications encore non identifiées telles que la méthylation ou l'acétylation. On peut imaginer qu'il existe différents patrons de modifications posttraductionnelles de pr55^{Gag} et que chacun de ceux-ci régule des étapes spécifiques de l'assemblage.

5.4.8 La participation de pr160^{Gag-Pol} lors de l'assemblage

5.4.8.1 L'importance du rapport pr55^{Gag}/pr160^{Gag-Pol}

Plusieurs études ont montré que le rapport pr55^{Gag} /pr160^{Gag-Pol} est un critère qui influence l'assemblage. Premièrement il a été prouvé que le changement de ce rapport soit en sur-exprimant en *trans* pr160^{Gag-Pol} [103], soit en perturbant le changement de cadre de lecture traductionnelle contrôlant la production de pr160^{Gag-Pol} [104], avait un effet délétère sur l'infectivité des virus. Deuxièmement, outre des effets sur la maturation de pr55^{Gag} et sur la dimérisation de l'ARNg (voir section 5.6.3), des défauts d'assemblage du virus ont été observés par microscopie électronique suite à ces variations des niveaux de pr160^{Gag-Pol} [198].

5.4.8.2 Mode d'action de pr160^{Gag-Pol} sur l'assemblage

Des troncations dans pr160^{Gag-Pol} (notamment au niveau du domaine IN) peuvent affecter les niveaux de production de virus [199] démontrant clairement la participation de pr160^{Gag-Pol} dans l'assemblage du VIH-1. pr160^{Gag-Pol} pourrait influencer la production virale via le recrutement de co-facteurs cellulaires spécifiques. En effet, INI1 interagit avec IN [75] et est incorporé dans le virus via le domaine IN de pr160^{Gag-Pol} [200]. Outre son rôle lors des étapes précoces du cycle viral (section 5.2.5.2), INI1 est impliquée lors de la relâche puisque l'expression d'un dominant négatif de cette protéine inhibe la production des virus [200].

L'action de pr160^{Gag-Pol} sur l'assemblage dépend probablement de sa capacité à interagir avec pr55^{Gag}. En effet pr160^{Gag-Pol} contient les mêmes déterminants que pr55^{Gag} vis-à-vis de la multimérisation. Cependant, il semble que les complexes pr55^{Gag}/pr55^{Gag}

n'aient pas exactement les mêmes propriétés biochimiques que les complexes pr55^{Gag}/pr160^{Gag-Pol} [137, 201].

5.4.9 Les enjeux dans le domaine de l'assemblage du VIH-1

Bien que les rôles respectifs de chacun des domaines de pr55^{Gag} et des quelques partenaires protéiques connus aient été grandement étudiés lors de l'assemblage, on comprend encore mal comment est contrôlée leur synergie d'action, et quelle est la chronologie des événements. En fait, il est fort probable que la régulation spatio-temporelle de l'assemblage repose sur l'acquisition (et le relargage) séquentielle de co-facteurs cellulaires par les différents intermédiaires d'assemblage dans des compartiments spécifiques de la cellule. On peut dire que le « virus prend à la cellule ce dont il a besoin où et quand il en a besoin ».

C'est pourquoi, selon moi, le grand défi dans les prochaines années sera de comprendre comment s'effectue la régulation spatio-temporelle de l'assemblage. Ceci passera non seulement par l'élucidation de la structure de la protéine pr55^{Gag} pleine longueur, mais aussi par la caractérisation protéomique de chaque intermédiaire d'assemblage et donc par l'identification des différents facteurs cellulaires influençant chaque étape de l'assemblage.

5.5 Bourgeonnement et relâche du VIH-1

5.5.1 Le domaine L du VIH-1 p6

Le bourgeonnement et la relâche des rétrovirus dépendent du domaine L (pour « late »). Ce domaine recrute des facteurs cellulaires. Trois types de séquences protéiques

conférant une activité de domaine L ont été identifiées à ce jour : PT/SAP, PPXY et YPDL. Bien que PPXY soit la plus commune (retrouvée chez MLV, RSV, M-PMV, HTLV-1 entre autres), les séquences PT/SAP et YPDL sont retrouvées dans le domaine p6 de pr55^{Gag} du VIH-1 (Figure 14A)[202].

5.5.2 La participation des ESCRT

Il est à présent clair que les domaines L des virus, et notamment celui du VIH-1, interagissent avec les machineries cellulaires d'ubiquitination et de tri endosomal (« endosomal sorting »). Tout d'abord le domaine p6 de pr55^{Gag} est ubiquitiné mais l'enzyme responsable de cette modification post-traductionnelle demeure inconnue [193-195]. Cependant l'ubiquitination de pr55^{Gag} est apparemment importante pour la régulation de la relâche virale. De plus, l'inhibition du protéasome, un complexe cellulaire responsable de la dégradation des protéines poly-ubiquitinées, affecte la relâche virale renforçant l'hypothèse d'un rôle de l'ubiquitination lors de cette étape du cycle viral [203]. Finalement, l'élucidation du mode de fonctionnement des domaines L a vraiment explosé par l'identification par criblage double-hybride de Tsg101 en tant que facteur de l'hôte interagissant avec le domaine PT/SAP de pr55^{Gag} du VIH-1 et du virus Ebola et indispensable à leur relâche (Figure 14B)[204, 205].

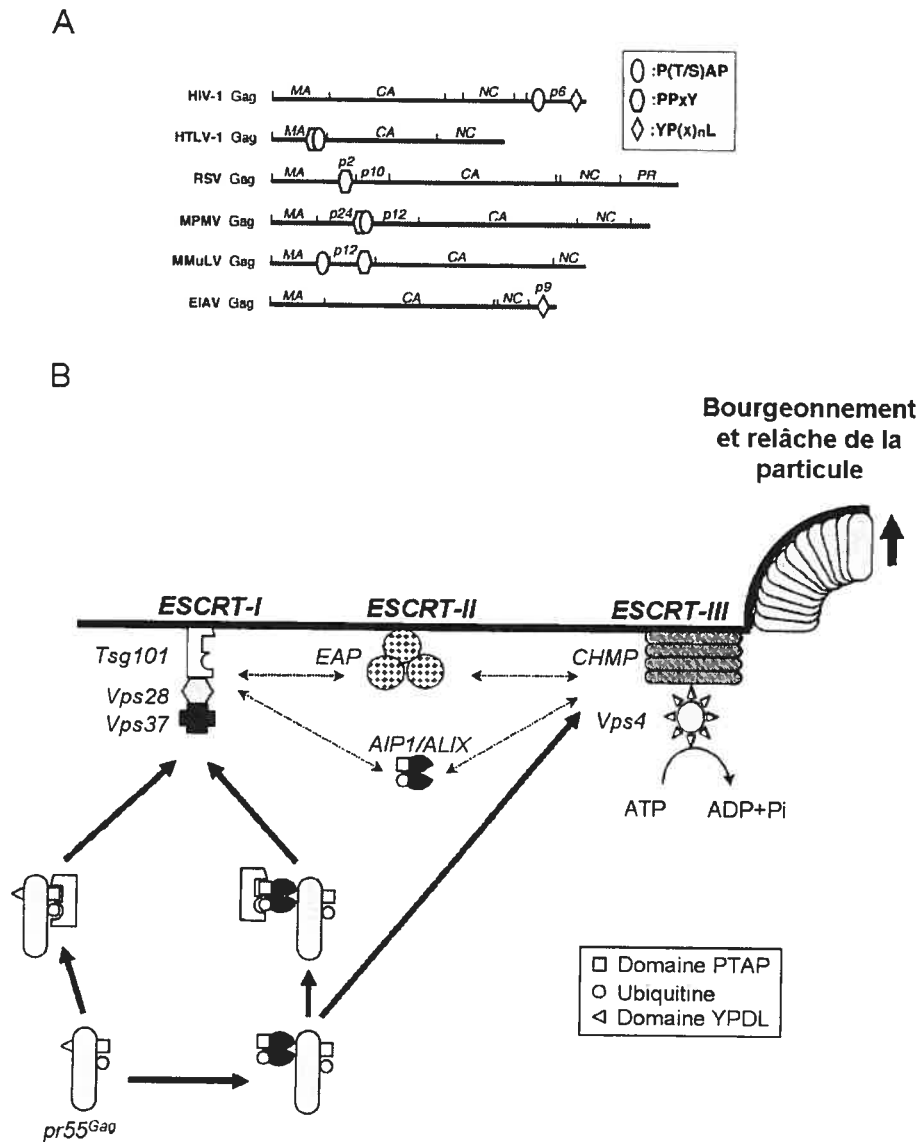


Figure 14 : Le domaine L et son implication dans la relâche virale.

(A) Schéma récapitulant les différents domaines L retrouvés chez les protéines Gag de différents rétrovirus. Tiré de Morital et al. (2004)[202]. (B) Modèle récapitulant comment le domaine L de $pr55^{Gag}$ recrute les machineries ESCRT indispensables à la relâche virale.

Tsg101 fait partie du « premier complexe de tri endosomal requis pour le transport » (ou ESCRT-I pour « endosomal sorting complex required for transport I»). Dans la cellule, ESCRT-I, de concert avec ESCRT-II et ESCRT-III cible certains cargos monoubiquitinés dans le lumen des MVB [202].

Lors de la production de nouveaux virus, Tsg101 est recruté aux sites d'assemblage du VIH-1 et s'associe avec le domaine p6 de pr55^{Gag} via un domaine possédant des similarités de structure avec les enzymes E2 de conjugaison de l'ubiquitine. Cette région est appelée domaine « E2-like » puisque Tsg101 ne possède aucune activité enzymatique [202]. La déplétion et la surexpression de Tsg101 dans la cellule affectent grandement les niveaux de virus relâchés [205]. Ceci mène à l'apparition de virus bourgeonnant qui restent attachés à la cellule. Ce phénotype est clairement observable en microscopie électronique et est identique à celui observé quand le domaine L du virus est muté. Étant donné la dépendance de la relâche vis-à-vis de l'ubiquitination de pr55^{Gag}, il est généralement accepté que l'association de Tsg101 à pr55^{Gag} dépend de cette modification post-traductionnelle.

Plus récemment, un deuxième site important pour la relâche a été identifié dans p6. En effet ce domaine de pr55^{Gag} contient une séquence YPDL qui recrute la protéine ALIX (nommée également AIP-1)[206, 207]. Cette protéine joue normalement le rôle d'un adaptateur entre ESCRT-I et ESCRT-III. La déplétion d'ALIX/AIP-1 provoque des défauts majeurs de relâche tout comme celle de Tsg101 dont la contribution semble pourtant être plus importante. Ainsi, ALIX permettrait le recrutement d'ESCRT-III vers les complexes d'assemblage (Figure 14B).

En accord avec ceci, il semble que la machinerie d'ESCRT-III (composée des protéines CHMP) ainsi que le complexe ATPase en aval (Vps4) soient également importants lors de ces processus puisque des variations dans les niveaux des protéines

composant ces complexes ou l'expression de dominants négatifs, influencent les niveaux de relâche virale [206-210]. On n'a démontré aucun rôle dans la relâche pour ESCRT-II dont on ne comprend pas encore vraiment la fonction cellulaire si ce n'est qu'il est l'intermédiaire entre ESCRT-I et ESCRT-III.

Bien que les composantes des ESCRT-I et -III soient requises pour la formation de nouvelles particules, on ignore encore s'ils agissent au niveau des MVB, de la membrane plasmique, dans un autre compartiment ou à ces trois endroits. De plus, à l'inverse des cargos cellulaires, ces complexes ne sont pas impliqués dans le ciblage de l'assemblage au sein des MVB.

5.6 Le destin cytoplasmique de l'ARN génomique du VIH-1

Le destin infectieux du virus réside bien sûr dans la qualité de sa production mais aussi dans sa capacité à transduire la cellule cible avec son propre génome. Outre son rôle dans l'expression génique virale, l'ARNg doit donc, lors de l'assemblage, être sélectivement encapsidé dans le virus, et ce, sous forme de dimère. Ceci représente tout un défi pour le virus car ce processus doit faire face à plusieurs contraintes:

- L'ARNg doit tout d'abord être ciblé vers les complexes d'assemblage qui se trouvent à des endroits bien spécifiques de la cellule.
- L'ARNg doit homo-dimériser.
- L'ARNg est grandement enrichi dans les virus par rapport à sa concentration dans la cellule.
- De plus, bien qu'il représente l'espèce majeure d'ARN dans le virus, seulement 2 copies d'ARNg sont encapsidées.

En bref, le virus a développé des mécanismes permettant de sélectionner spécifiquement l'ARNg mais en quantités limitées (un dimère par virus) tout en excluant les ARN cellulaires. Les éléments permettant au virus d'outre-passer ces obstacles résident en partie au sein de l'ARNg même. L'ARNg fait 9kb de long et est probablement hautement structuré même si on ne connaît pas sa structure secondaire en entier. Pour ce qui est de sa structure tertiaire, on en sait encore moins (voir section 5.6.3). Cependant, beaucoup de séquences *cis* importantes ont été identifiées.

5.6.1 La région « 5' leader »

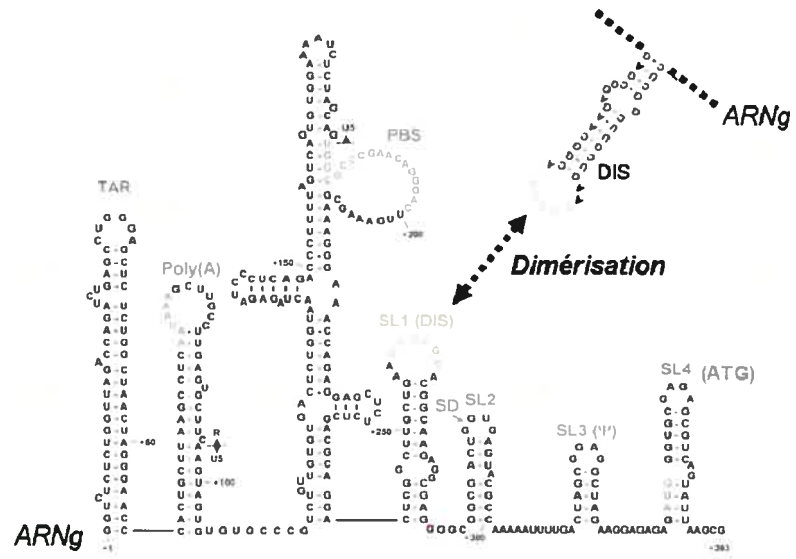
Beaucoup de ces éléments régulateurs se trouvent dans la région 5' non traduite, souvent appelée « 5' leader » (Figure 15A) qui, pour cette raison a été l'objet de beaucoup d'études structurales et fonctionnelles. Elle est constituée de plusieurs motifs secondaires qui jouent chacun un (des) rôle(s) à des étapes spécifiques du cycle viral [211, 212]:

- L'élément TAR : Il est impliqué dans la transcription, la traduction de l'ARN viral mais également dans la transcription inverse
- Le signal de polyadénylation (poly A) : Cette séquence est répétée aux deux extrémités de l'ARNg. Puisque présent dans l'extrémité 5' de l'ARNg, ce signal doit rester silencieux lors de la transcription afin d'éviter la production d'un ARNg incomplet.
- Le PBS : l'ARNt^{lys3} est hybridé à cette structure qui est donc cruciale lors de l'initiation de la rétrotranscription.
- SL1. Il représente le site d'initiation de la dimérisation de l'ARNg (ou DIS pour « dimérisation initiation site »).
- SL2 (ou SD pour « splice donor ») contient le premier site 5' donneur d'épissage
- SL3 (Ψ) est le signal d'encapsidation de l'ARNg dans le virus. On inclut souvent SL1, SL2 et SL4 dans Ψ .

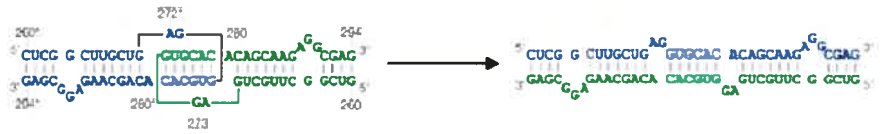
Figure 15 : La région « 5' leader » de l'ARNg du VIH-1 et sa dimérisation.

(A) Structure secondaire de la région 5' leader de l'ARNg. Deux DIS peuvent former des contacts intermoléculaires. Adaptée de Russell *et al.* (2004)[212]. (B) Représentation schématique de la dimérisation de deux copies d'ARNg (rouge et bleu) formant les premiers contacts intermoléculaires. Ces derniers sont en partie médiés par la boucle du DIS de chaque molécule d'ARNg (complexe « kissing », KLC). L'hybridation intermoléculaire s'étend au delà de la boucle pour former un dimère plus stable (complexe étendu). (C) Structures tridimensionnelles du KLC et du complexe étendu telles que déterminées par résonance magnétique nucléaire. Chaque molécule d'ARN est représentée avec une couleur (rouge ou verte) différente de son partenaire. Figures adaptées de Paillart *et al.* (2004)[211].

A



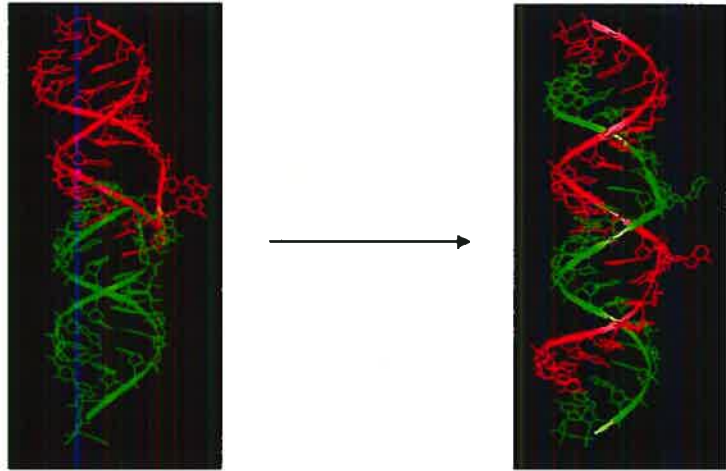
B



Complexe "Kissing"

Complexe étendu

C



- SL4 (ou ATG) contient le codon initiateur de la traduction de pr55^{Gag} et de pr160^{Gag-Pol}

5.6.2 Transport de l'ARNg

5.6.2.1 Les éléments de localisation A2RE

On sait peu de choses à propos de la régulation du transport de l'ARNg dans le cytoplasme de la cellule. Cependant, 2 éléments de localisation ont été identifiés au sein de l'ARNg. On les appelle A2RE (pour « hnRNP A2 response element ») et s'associent avec la protéine hnRNP A2 [213]. Des mutations silencieuses dans ces séquences au sein de l'ARN viral qui réduisent la liaison à hnRNP A2 affectent remarquablement la réplication virale dans les cellules T. Ce phénotype corrèle avec des défauts de localisation de l'ARNg mutant dans la cellule. En effet, l'ARN s'accumule dans le noyau et est encapsidé dans les virus en plus faible quantité [214]. Ces données suggèrent que la localisation et le ciblage cytoplasmique de l'ARNg influencent les processus de sélection d'ARN à des fins d'encapsidation. Lorsque hnRNP A2 est déplété dans la cellule, l'ARN s'accumule à proximité d'un compartiment cellulaire périnucléaire identifié comme le centre organisateur des microtubules (MTOC)[184]. Ces résultats montrent que les A2RE sont des séquences *cis* de l'ARNg influençant sa localisation et le cycle viral en partie via son association avec hnRNP A2.

5.6.2.2 Le transport de l'ARNg et les endosomes

Dans le cas de MLV, il a été montré que l'ARNg est transporté sur les endosomes tardifs. Ce processus dépend de la présence de Gag mais aussi de la séquence Ψ de l'ARNg

[215]. Bien que ce type de régulation n'ait pas été montré chez le VIH-1, l'utilisation du FRET comme méthode de détection d'interactions ARN/protéine a pu montrer que pr55^{Gag} s'associait avec l'ARNg dans la région périnucléaire du MTOC [128]. De plus, lorsque le transport rétrograde des endosomes est favorisé suite à la surexpression de RILP, l'ARNg s'accumule au sein du MTOC [184]. Ceci montre que ce compartiment représente effectivement une station de transit aussi bien pour le transport de l'ARNg que pour celui de pr55^{Gag}. Cela suggère que très tôt dans l'assemblage, pr55^{Gag} est associé à l'ARNg et serait responsable de son transport jusqu'au site de relâche du virus. On peut supposer que le MTOC permet le ciblage de ces composantes virales du cytosol vers les membranes internes (probablement des endosomes tardifs).

5.6.3 Dimérisation de l'ARN génomique

Les 2 copies d'ARNg dans le virus sont sous forme de dimère stable. Bien que le processus de dimérisation de l'ARNg ait été longuement étudié aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, on ne comprend pas encore complètement sa régulation qui apparaît très complexe. Le déterminant majeur de la dimérisation est le DIS (pour « dimerization initiation site ») qui est un motif d'ARN présent au sein du 5' UTR de l'ARNg viral entre le PBS et le premier site donneur d'épissage (Figure 15A). La séquence d'ARN constituant le DIS se replie en une tige-boucle dont la boucle contient un palindrome de 6 nucléotides. Ce motif médie la dimérisation initiale de 2 molécules d'ARNg via des interactions intermoléculaires symétriques (Figure 15A-C). Ce dimère d'ARN assez instable (« loose dimer ») est appelé KLC (pour « kissing loop complex »). *In vitro*, l'ajout de la protéine NC, permet la stabilisation de ce dimère via sa conversion en un duplexe étendu (« extended duplex »). Cette structure résulte de l'hybridation intermoléculaire plus étendue impliquant les tiges du DIS (Figure 15B-C)[211].

In vivo, deux types de dimères d'ARNg possédant une stabilité différente, peuvent être détectés. En effet, dans les virus néosynthétisés, la stabilité thermique du dimère d'ARNg augmente via un processus qui dépend de la maturation de pr55^{Gag} par PR [216]. Ceci suggère qu'*in vivo*, la protéine NC mature possède la capacité de stabiliser le dimère d'ARNg tel qu'observé *in vitro*. Cependant, on ne sait pas si ces 2 formes de dimères identifiées *in vivo* correspondent aux KLC et au complexe étendu observés *in vitro*. En effet, bien que le DIS joue un rôle critique dans la réplication virale [217, 218], sa délétion n'abolit pas complètement la formation de dimères [219]. De plus, il a été montré que d'autres séquences et/ou structures à l'extérieur du DIS (telles que la tige du bas du PBS, TAR ou SL3, par exemple) sont importantes lors de la dimérisation de l'ARNg [220-222]. Il est à noter également que pr160^{Gag-Pol} et le domaine p1 de pr55^{Gag} semblent influencer la dimérisation du génome viral [103, 223].

Cette étape du cycle viral est donc un processus dont la régulation est très complexe et dépendante de beaucoup de facteurs. Finalement, on ne peut pas exclure la possibilité que certains facteurs cellulaires assistent pr55^{Gag}/NC ou remodelent la structure de l'ARNg lors de ces processus puisqu'il existe des protéines cellulaires qui possèdent des activités chaperonnes ou lient des ARN sous formes de dimères [224-226].

5.6.4 Régulation de l'encapsidation de l'ARN génomique

Bien que la régulation de l'encapsidation sélective de deux copies d'ARNg ne soit à l'heure actuelle que partiellement comprise, il est généralement accepté que pr55^{Gag}, via son association à l'ARNg, en est le principal déterminant.

5.6.4.1 Le signal d'encapsidation de l'ARNg

On a longtemps réduit notre vision de cette étape à la liaison de NC à un signal d'encapsidation présent dans l'ARNg viral (et absent des ARN viraux épissés) que l'on appelle Ψ . Ce motif correspond à la tige-boucle SL3 (Figure 15A), présente entre celles contenant le premier site donneur d'épissage (SD/SL2) et le codon initiateur de pr55^{Gag} (AUG/SL4)[134, 227]. Des mutations dans cette structure affectent les niveaux d'encapsidation d'ARN (mais pas complètement). Par ailleurs, l'ajout de cette structure au sein d'un ARN hétérologue, permet son encapsidation efficace [228]. SL3, étant situé en aval du premier site donneur d'épissage, est absent des ARN viraux épissés mais aussi des ARN cellulaires ce qui permettrait donc l'exclusion de ces ARN des virus lors de l'étape d'encapsidation.

Cependant, beaucoup de groupes considèrent que Ψ correspond plutôt à la région contenant les tiges-boucles SL1, 2, 3 et 4. En effet des mutations dans ces autres tiges-boucles affectent également les niveaux d'encapsidation. Finalement, le signal d'encapsidation est vraiment plus étendu (au moins 300-400 nucléotides) et complexe qu'envisagé au départ puisqu'il inclut l'élément TAR, la structure polyA, la région U5/PBS (des structures toutes en amont du site donneur d'épissage !) et même le début de la séquence codante de *gag*, dont les mutations affectent également cette étape [220, 229-231].

5.6.4.2 pr55^{Gag} et l'encapsidation de l'ARNg

5.6.4.2.1 La participation de NC

NC est constitué de plusieurs sous-domaines. Il contient deux doigts de zinc capables de lier l'ARN ainsi que beaucoup d'acides aminés basiques dont les charges positives pourraient former des interactions électrostatiques avec l'ARN (chargé négativement). Cependant, la contribution de chacun de ces sous-domaines (acides aminés basiques versus doigts de zinc ; premier doigt de zinc versus deuxième doigt de zinc) lors de la sélection spécifique de l'ARNg reste très floue puisque beaucoup d'études se contredisent [212, 232]. De plus, le fait que ces domaines influencent également d'autres processus tels que la multimérisation de pr55^{Gag}, rend l'interprétation souvent difficile.

In vitro, la protéine mature NC lie SL2 et SL3 avec une haute affinité mais s'associe également avec SL1 et SL4 avec des affinités moindres mais non négligeables [233-236]. Cependant, considérant que NC est une protéine hautement basique et qu'elle lierait n'importe quel ARN *in vitro*, il n'est pas clair que de telles études puissent nous permettre de comprendre comment pr55^{Gag} sélectionne spécifiquement le génome viral. D'ailleurs les molécules de NC dans le virus recouvrent et protègent complètement l'ARNg sur toute sa longueur et sans aucune spécificité ce qui est contradictoire avec une fonction dans l'encapsidation sélective de l'ARNg.

Ainsi, la capacité de liaison à l'ARN de NC ne peut pas expliquer à elle seule comment le virus encapside l'ARNg en excluant les ARN viraux épissés ainsi que les ARN cellulaires. Même si NC a plus d'affinité pour l'ARNg via SL2 et SL3, ce dernier est très dilué dans la cellule par rapport aux autres ARN. De plus, en admettant que l'affinité de NC pour l'ARNg explique tout, comment expliquer le fait qu'un virus, constitué d'environ 5000 molécules de pr55^{Gag}, n'encapside que seulement deux copies d'ARNg? Plusieurs

études ont mis en lumière la complexité du processus d'encapsidation d'ARNg *in vivo* et fournissent des éléments de réponse à ces questions.

5.6.4.2.2 Les contributions des autres domaines de pr55^{Gag}

Tout d'abord, NC est effectivement le déterminant majeur de cette étape mais c'est au sein de pr55^{Gag} et non en tant que protéine mature que NC y participe. En effet, des mutations dans PR n'affectent pas dramatiquement les niveaux d'ARNg encapsidés. Par ailleurs, des études ont montré que, même *in vitro*, NC a plus d'affinité pour l'ARNg quand il est synthétisé sous forme de précurseur plutôt que sous forme mature [237]. De plus, plusieurs études suggèrent que d'autres domaines que NC au sein de pr55^{Gag} y participent.

En effet, le domaine MA de pr55^{Gag} est capable de lier l'ARN. Grâce à une approche SELEX, il a été possible d'identifier un site de liaison à MA dans la séquence codante de pol, présente uniquement au sein de l'ARNg [238]. Des mutations dans ce site de liaison à MA affectent la réplication virale. De plus, il a été proposé que quand MA ne peut pas contrecarrer son propre signal de localisation nucléaire, l'ARNg est moins encapsidé puisque séquestré dans le noyau [239]. Finalement, les propriétés de liaison à l'ARN de MA participeraient également au recrutement d'ARN échafaudage (incluant l'ARNg) au sein des complexes d'assemblage (voir section 5.4.5.1)[240].

De plus, au sein de pr55^{Gag}, le domaine p2, adjacent à NC, est important pour la spécificité d'encapsidation d'ARNg [241]. En effet, des virus possédant des mutations pour p2 encapsident de grandes quantités d'ARN viraux épissés normalement exclus des virus.

5.6.4.2.3 Multimérisation de pr55^{Gag} et sélection d'ARN

Une des façons pour le virus de pallier à la contrainte stoechiométrique du respect des proportions entre l'ARNg et pr55^{Gag} serait que la sélection de l'ARNg par pr55^{Gag} soit spécifique d'un intermédiaire d'assemblage. En effet, on peut imaginer qu'un complexe d'assemblage contenant 2500 molécules de pr55^{Gag} soit assemblé de telle manière que sa structure quaternaire lie avec haute affinité une seule molécule d'ARNg. Ceci expliquerait pourquoi il n'y a que 2 ARNg par virus soit 5000 molécules de pr55^{Gag}. On peut également penser que la localisation cellulaire de cet intermédiaire serait très spécifique et correspondrait au point de rencontre avec l'ARNg transporté par un trajet différent mais convergeant vers ce compartiment. Ainsi la régulation spatio-temporelle de la multimérisation de pr55^{Gag} pourrait être un facteur influençant l'encapsidation d'ARNg.

Bien que ce mécanisme de régulation soit plausible, ce modèle reste hypothétique puisqu'aucune étude n'a montré que ce type de régulation existait. Ceci réside probablement dans le fait qu'il est encore difficile techniquement de séparer et caractériser les différents intermédiaires d'assemblage. De plus, l'interprétation des résultats s'avère difficile puisqu'il est très ardu d'obtenir des mutants de NC qui s'assemblent moins sans toucher à sa fonction de liaison à l'ARN, ce domaine étant multifonctionnel.

Une seule étude supporte l'hypothèse d'un lien direct entre la multimérisation de pr55^{Gag} et l'encapsidation d'ARNg [237]. Elle démontre qu'*in vitro*, NC a une plus grande affinité pour l'ARNg sous forme immature. Il semble que cette association se fasse lorsque Gag est sous forme de multimère puisque des monomères s'associent beaucoup moins avec l'ARNg. Ceci suggère que la multimérisation de pr55^{Gag} influence sa capacité à lier l'ARNg.

5.6.4.3 Implication de structures tertiaires

La haute spécificité d'encapsidation de l'ARNg provient peut-être de l'ARN lui-même car ce dernier se replie et forme une structure tertiaire probablement très complexe étant donné sa taille de 9kb. Tel que décrit plus haut, il est clair que la région 5' leader contient des éléments *cis* fonctionnellement indépendants possédant une structure secondaire caractéristique. En revanche, on ne dispose que de très peu d'informations concernant la structure tridimensionnelle de l'ARNg qui pourrait assurer des fonctions bien précises dans des étapes du cycle viral telles que la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg.

5.6.4.3.1 Le lien entre la dimérisation et l'encapsidation

Étant donné que des mutations dans SL1 affectent la plupart du temps aussi bien la dimérisation de l'ARNg que ses niveaux d'encapsidation (mutations répertoriées dans [211]), il a été depuis longtemps proposé que ces deux processus étaient couplés. Il est donc très difficile de dissocier ces deux événements et on ignore s'ils se passent au même moment ou au même endroit dans la cellule. La duplication du DIS au sein de l'ARNg provoque son encapsidation en tant que monomère, qui dépend de l'interaction intramoléculaire conférée par les DIS [221, 242]. Ces données supportent la thèse du couplage fonctionnel. D'autres études ont montré que certains virus mutants peuvent encapsider des monomères d'ARNg sans duplication du DIS, mais dans ces conditions, les niveaux d'ARNg encapsidés sont en général plus faibles et l'infectivité est grandement affectée [243]. Ceci suggère, que sans être une condition *sine qua non* à l'encapsidation d'ARN, la formation de dimère l'influence probablement grandement.

5.6.4.3.2 L'interaction tertiaire polyA/MA

La plupart des connaissances sur la structure tertiaire de l'ARNg ont été acquises grâce à des études effectuées *in vitro* sur l'extrémité 5' de l'ARNg. Paillart *et al.* ont identifié une interaction longue distance entre la boucle du signal de polyadénylation (poly A) avec une séquence dans la région codante de MA[244]. Il est à noter que cette structure tertiaire implique un motif commun à tous les ARNs du VIH-1 (poly A) puisqu'il se trouve en amont du premier site donneur d'épissage. Pourtant, ce contact intramoléculaire est spécifique de l'ARNg, la séquence de MA étant retrouvée uniquement dans cet ARN. Ce motif tridimensionnel représenterait donc un signal parfait pour l'encapsidation spécifique de l'ARNg.

5.6.4.3.3 BMH versus LDI

L'équipe du Docteur Ben Berkhout a mis à jour durant les dernières années les propriétés dynamiques de la région 5' leader de l'ARNg. En effet, elle a tout d'abord identifié une autre interaction tertiaire au sein de cette région. Effectivement, une séquence dans la région U5 juste en amont du PBS peut s'hybrider *in vitro* avec les nucléotides chevauchant le codon initiateur AUG de la séquence codante de pr55^{Gag} (Figure 16). Sous cette conformation appelée BMH (pour « branched multiple hairpin »), le DIS ainsi que SL3 seraient exposés à des fins de dimérisation et d'encapsidation de l'ARNg [245, 246]. Cependant, *in vitro*, l'ARNg peut adopter une structure tertiaire alternative appelée LDI (« pour long distance interaction) dans laquelle ces motifs secondaires n'existent plus ou sont masqués puisque impliqués dans des interactions tertiaires [246]. Le LDI serait incompétent pour sa dimérisation et son encapsidation. Ce « switch » conformationnel peut être modulé *in vitro* par la protéine NC favorisant la formation du BMH.

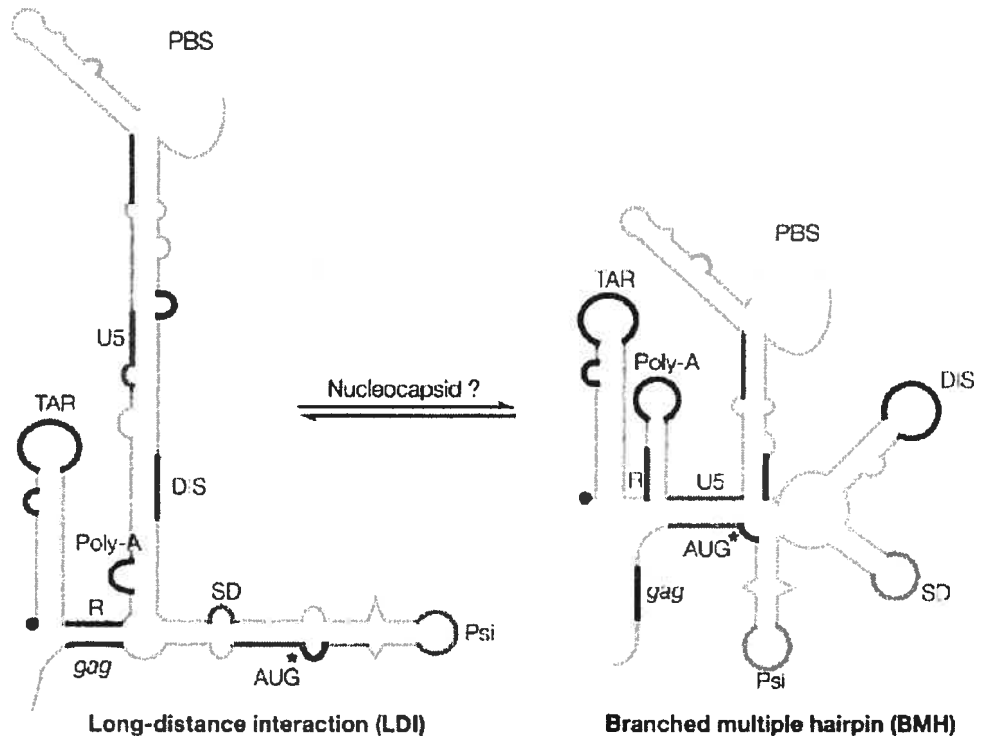


Figure 16 : Les conformations BMH et LDI de la région « 5' leader » de l'ARNg.

Représentation schématique de la structure secondaire de l'ARNg. Chacun des motifs de la région « 5' leader » est représenté par une couleur qui lui est propre. L'équilibre entre ces deux conformations régulerait les fonctions de ces motifs. Par exemple, lorsque l'ARNg est sous la conformation BMH, la boucle du DIS n'est pas disponible pour l'initiation de la dimérisation puisque impliquée dans des interactions intramoléculaires. Figure tirée de Paillart *et al.* (2004)[211].

Ce modèle met en évidence que les fonctions de l'ARNg pourraient être assurées grâce à sa dynamique structurale. Bien que des études basées sur la mutagenèse dirigée supportent que ce mode de régulation existe *in vivo* [247], aucune des structures tertiaires décrites ici n'ont pu être détectées par attaque chimique (« chemical probing ») de l'ARNg *in vivo* [248]. Cependant, si l'on considère que l'existence du BMH est très transitoire dans la cellule et donc difficilement détectable, on peut très bien imaginer que cette structure régule effectivement l'encapsulation spécifique d'un nombre de molécules d'ARNg si limité dans le virus. Par ailleurs, des facteurs cellulaires pourraient influencer cet équilibre, s'associer spécifiquement à ces structures tertiaires au sein de l'ARNg et participer à son encapsidation.

L'élucidation de la structure tertiaire et de la dynamique conformationnelle de l'ARNg du VIH-1 *in vivo* permettra de mieux comprendre comment le virus sélectionne son génome et quelles sont les protéines virales ou cellulaires qui assistent cette étape.

5.6.4.4 Le locus cellulaire de la sélection de l'ARNg par le virus

À l'heure actuelle, on ignore quasiment tout du lieu dans la cellule où le virus néosynthétisé sélectionne l'ARNg. Ceci réside dans le fait qu'on ne connaît pas vraiment le « chemin » parcouru par l'ARNg dans la cellule. Mais il est certain que la localisation cellulaire de l'ARN ainsi que les facteurs *trans* acquis lors de son « périple » cytoplasmique influencent son ciblage vers les sites d'assemblage du virus.

Il est possible que très tôt lors de l'assemblage, pr55^{Gag} interagisse avec l'ARNg et qu'ainsi ce dernier est présent tout au long de l'assemblage servant éventuellement d'échafaudage lors de la multimérisation de pr55^{Gag}.

Tout d'abord, il a été proposé que le virus du sarcome de Rous (RSV) sélectionne son génome dans le noyau grâce à la présence d'un NLS dans Gag [249]. Chez le VIH-1, la seule étude supportant ce modèle a démontré l'influence d'un NES au sein du domaine MA de pr55^{Gag} lors de l'export nucléaire mais aussi lors de l'encapsidation et la dimérisation de l'ARNg [239].

Tel que décrit plus haut, pr55^{Gag} interagit avec l'ARNg au niveau de la région périnucléaire du MTOC (et donc probablement suite à l'export nucléaire de l'ARNg) [128]. Ce complexe pourrait alors être transporté par les endosomes tardifs comme dans le cas de MLV [215].

Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré un modèle d'encapsidation cotraductionnel. Ce dernier propose qu'une molécule de pr55^{Gag}, suite à sa synthèse par les ribosomes, s'associerait directement à l'ARN messager dont elle est issue [250, 251]. Dans ce cas, l'ARNg est à la fois traduit puis encapsidé, l'interaction ARNg/pr55^{Gag} permettant le relargage des ribosomes de l'ARN. Ce modèle, qui propose donc que le lieu de sélection n'est autre que le site de traduction de pr55^{Gag}, a cependant été réfuté par d'autres études [252, 253]. En accord avec ce modèle, chez MLV, des virus dont la protéine NC est mutée de sorte qu'ils n'encapsident presque plus d'ARNg, incorporent en revanche des ribosomes entiers, suggérant que l'interaction NC/ARNg permet l'exclusion de la machinerie traductionnelle de l'intérieur des virus. Chez VIH-1, lorsque les doigts de zinc de NC sont non fonctionnels ou délétés, aussi bien la localisation cellulaire que l'encapsidation de l'ARNg sont affectées.

5.7 Maturation du VIH-1

5.7.1 Principe

L'activation de PR et le clivage subséquent de pr55^{Gag} provoque des réarrangements majeurs au sein du virus : Cet événement, appelé maturation, se traduit par la réorganisation de la coquille dense aux électrons au pourtour du virus immature en une structure conique, appelée noyau, située au centre du virus maintenant mature et infectieux (Figures 7B et 1.17A).

La cinétique de protéolyse de pr55^{Gag} par PR n'est pas la même pour tous les sites de clivage. En effet, pr55^{Gag} est clivé par PR selon un ordre bien précis (représenté dans la figure 17B)[254]), ce qui se traduit lors d'immunobuvardages contre CA par exemple, par la détection d'intermédiaires de protéolyse tels que les protéines MA-CA-p2 ou CA-p2 (Figure 17C). L'activité de PR semble dépendre du ratio $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr160}^{\text{Gag-Pol}}$ [103] mais aussi de l'initiation de la dimérisation de l'ARNg [255].

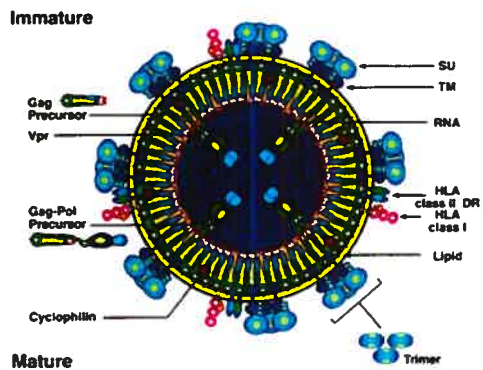
5.7.2 Le clivage de pr55^{Gag} par PR peut lui conférer de nouvelles propriétés

Pourquoi les protéines de structure sous forme de précurseur sont capables de multimériser radialement pour former une nouvelle particule virale sphérique alors que sous forme mature, elles s'organisent complètement différemment en formant le noyau viral et la RNP? Certaines études récentes permettent de répondre partiellement à cette question.

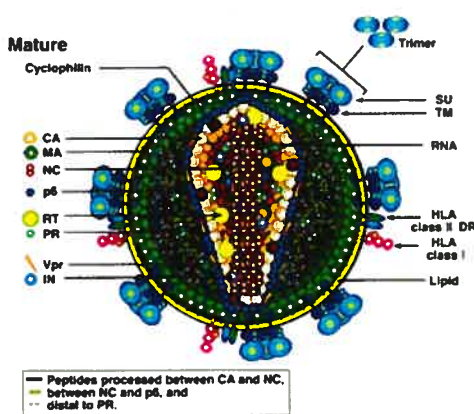
Figure 17 : La maturation de pr55^{Gag} par PR

(A) Représentation schématique d'une coupe transversale d'un virus immature. Environ 5000 copies de pr55^{Gag} sont associées à la face interne de l'enveloppe virale. (B) Le clivage de pr55^{Gag} par PR induit des réarrangements structuraux majeurs au sein du virus. MA (en vert) reste associé à la face interne de l'enveloppe. CA (en jaune) forme le noyau viral en forme de cône NC (en rose) recouvre complètement l'ARNg. Ces changements structuraux sont observables par microscopie électronique (voir figure 12). Figure tirée de Coffin *et al.* (1997)[4]. (C) Représentation schématique du clivage séquentiel de pr55^{Gag} par PR. Figure tirée de Shehu-Xhilaga *et al.* (2001)[254]. (D) Les différents produits issus de la protéolyse de pr55^{Gag} sont visibles par immunobuvardage. Des lysats de cellules produisant du VIH-1 ont été analysés par immunobuvardages avec des anticorps dirigés contre CA. On détecte facilement la protéine immature (pr55^{Gag}), la protéine mature (CA) ainsi que les intermédiaires de clivage (MA-CA-p2 et CA-p2). Image adaptée de Beriault *et al.* (2004)[214].

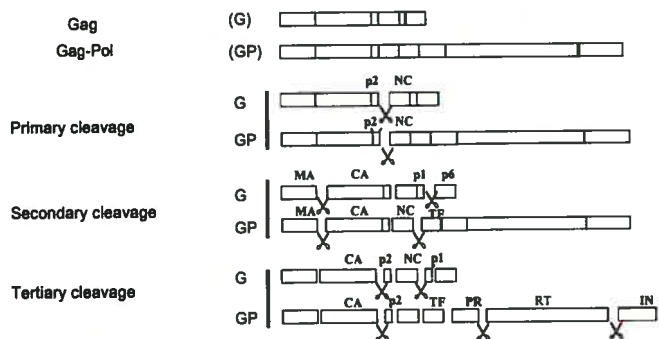
A



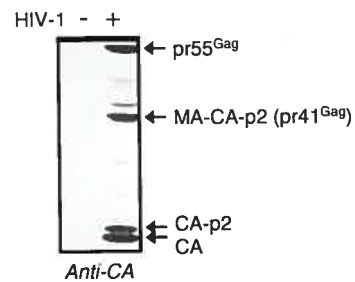
B



C



D



In vitro, des protéines Gag dans lesquelles le domaine p6 est délété, peuvent s'assembler en particules sphériques dont la morphologie ressemble à celles des virus immatures. Le groupe du Docteur Hans-Georg Kräusslich a montré que si le domaine p2 de ces protéines est délété, ces dernières s'assemblent plutôt en forme de tubes ou de cônes ressemblant au noyau viral des particules matures *in vitro* [256]. Par ailleurs, l'extension N-terminale de la protéine CA (qui forme des cylindres) promeut son assemblage sous formes de sphères [111, 257]. Cette observation est en accord avec des données structurales utilisant la RMN qui montrent que dans le contexte immature, l'extrémité N-terminale du NTD de CA est non structurée alors que repliée sous forme d'épingle à cheveux de type β dans CA mature (Figure 18A)[258]. La présence de cette épingle à cheveux est cruciale lors de la formation du noyau viral. Ces résultats suggèrent que le clivage de pr55^{Gag} par PR promeut un changement conformationnel au niveau de CA permettant ainsi la maturation du virus, soit la transition d'une structure sphérique en un noyau viral condensé et conique.

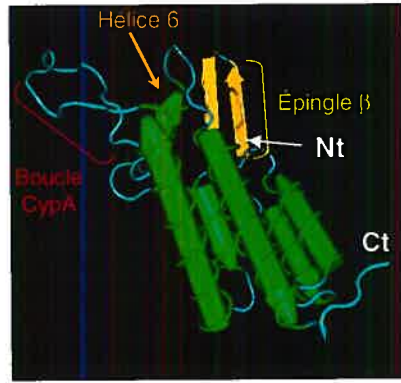
Par ailleurs, l'étude structurale citée ci-dessus utilisant la RMN avait en fait mis à jour la structure des 283 premiers acides aminés de pr55^{Gag} qui inclut son domaine MA et le NTD de son domaine CA [258]. Bien que ces domaines aient approximativement les mêmes structures sous forme matures ou immatures, certaines différences notables ont été identifiées (Figure 18A). Le fait que l'extrémité N-terminale de CA ne se replie pas en épingle à cheveux β dans le contexte immature (voir au-dessus), la boucle de liaison à la cyclophiline A n'est pas au même endroit que dans la protéine mature. Cette différence de contexte expliquerait pourquoi la cyclophiline A a plus d'affinité pour pr55^{Gag} que pour CA mature [259].

Il a été également proposé que la formation du noyau viral suite au clivage protéolytique de pr55^{Gag} par PR, serait due à un réarrangement de l'organisation quaternaire des hexamères de CA. En effet, ces structures peuvent s'arranger selon soit un empilement serré, caractéristique d'un virion immature, soit un arrangement plus relâché

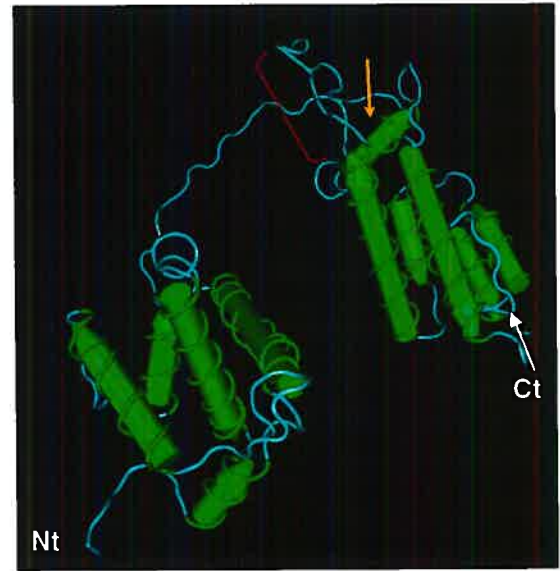
Figure 18 : La maturation du VIH-1 confère de nouvelles propriétés à ses protéines de structure.

(A) La comparaison des structures tridimensionnelles du NTD de CA seul ou dans le contexte immature (avec MA à son extrémité N-terminale) suggère que le clivage par PR du site situé entre ces deux domaines induit probablement, dans le NTD de CA, la formation d'une épingle à cheveux β (en jaune) critique à la formation du noyau viral ainsi que le déplacement de l'hélice 6 (en orange) et de la boucle de liaison à la cyclophiline A (en rouge). Ces images ont été générées à l'aide du logiciel Cn3D version 4.1 et des fichiers PDB 1L6N et 1GWP. (B) Les différents arrangements (serré et relâché) des anneaux hexamériques de CA *in vitro* selon que cette protéine est dans le contexte mature ou immature. Ces arrangements sont illustrés par un schéma (en haut) et des images reconstruites (générées par projection bidimensionnelle) de cristaux de ces protéines acquises par microscopie électronique (en bas). La distance séparant deux centres d'anneaux hexamériques est indiquée sous chaque image et reflète le niveau de compaction des hexamères. Figures et images tirées de Huseby *et al.* (2005) et Mayo *et al.* (2003)[140, 146].

A



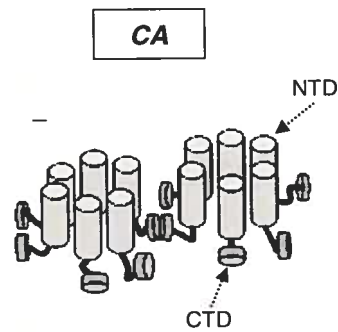
NTD de CA



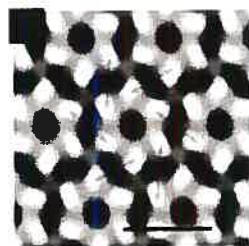
MA

NTD de CA

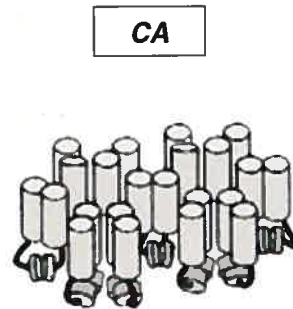
B



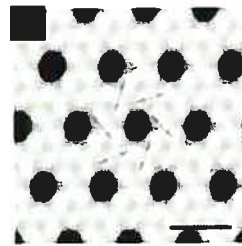
Arrangement relâché
(contacts CTD-CTD)



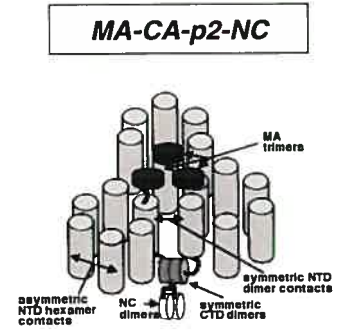
9,5-11 nm



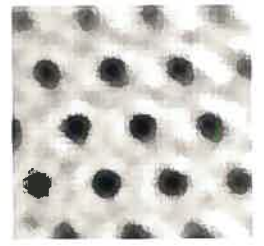
Arrangement serré
(contacts NTD-NTD
et CTD-CTD)



6,5-8 nm



Arrangement serré
(contacts NTD-NTD, CTD-
CTD, NC-NC et MA-MA-MA)



8 nm

ressemblant à l'organisation de CA au sein du noyau viral (Figure 18B) [146]. Une protéine Gag immature contenant presque la totalité de pr55^{Gag} (MA-CA-p2-NC), s'assemble préférentiellement selon l'organisation serrée [140]. Ceci suggère que le clivage de pr55^{Gag} permet à CA de passer d'une organisation relâchée plus propice à la formation de structures coniques, soit le noyau viral. Ce « relâchement » du réseau de CA, suggère que CA lors de l'assemblage, est en excès par rapport aux quantités requises pour la formation du noyau. Cette hypothèse a été confirmée dans une étude montrant que la particule immature contenait plus de molécules de CA que le VIH-1 mature, suggérant qu'une grosse partie (près des deux tiers!) de CA serait exclue du virus lors de la maturation [107].

Finalement, toutes ces constatations mettent en valeur le fait que les protéines structurales du VIH-1 n'ont pas forcément les mêmes propriétés quand elles sont matures ou immatures. Compte tenu de la dynamique structurale de Gag lors de sa protéolyse, bon nombre de facteurs cellulaires sont probablement exclus (ou éventuellement acquis) par la particule virale néosynthétisée. Le gros défi à l'heure actuelle est de mettre à jour la structure entière de pr55^{Gag} ce qui, je n'en doute pas, permettra de comprendre comment il régule l'encapsulation de l'ARNg et son homo-multimérisation.

5.8 Les facteurs de l'hôte et le VIH-1 : Récapitulons !

Afin de mettre en valeur l'importance des interactions virus/hôte, j'ai essayé tout au long de la description détaillée du cycle viral, d'inclure pour chaque étape tous les facteurs cellulaires connus et pertinents qui y participent. Ils sont, pour la plupart, récapitulés dans le tableau I. En plus de l'intérêt fondamental, étudier en profondeur les interactions virus/hôte est d'autant plus pertinent que le recrutement (ou non) de certains de ces facteurs influence grandement l'infectivité. D'ailleurs, depuis les cinq dernières années, les articles traitant de ce sujet se sont multipliés à une vitesse exponentielle. À long terme, cibler

certaines interactions virus/hôte critiques pourrait représenter des stratégies antivirales efficaces.

Plusieurs de ces facteurs cellulaires sont encapsidés dans le virus tel qu'indiqué dans le tableau I. Pour la plupart, on ignore encore pourquoi. Cependant, certains sont acquis par le virus afin d'assurer, suite à l'entrée, une fonction précoce comme la rétrotranscription [46] ou la protection du virus face à l'immunité innée de l'hôte (Voir section Discussion)[260]. De plus, certains facteurs pourraient être encapsidés à des fins structurales et de stabilisation du noyau viral ou des dimères d'ARNg.

Tableau I : Exemples de facteurs cellulaires impliqués dans diverses étapes du cycle de réplication du VIH-1.

Ce tableau indique les étapes du cycle viral visées par le facteur en question, ses partenaires viraux identifiés et si ce facteur est encapsidé dans le VIH-1. * : Ces protéines ne sont encapsidées que dans des virus n'exprimant pas la protéine virale Vif. ** : Annexine 2 participe au cycle viral seulement dans les macrophages.

Facteur cellulaire	Fonction(s) connue(s)	Incorporation virale	Partenaire(s) viral(aux)	Référence(s)
ABCE1/HP68	Multimérisation pr55 ^{Gag}	Non	pr55 ^{Gag} (NC), Vif	[119, 141]
Actine	?	Oui	pr55 ^{Gag} (MA, NC)	[26, 261, 262]
AIP-1/Alix	Bourgeonnement, relâche	Oui	pr55 ^{Gag} (p6)	[206, 207]
Annexine 2	Maturation**	Oui	pr55 ^{Gag}	[25, 263]
AP-3	Assemblage	?	pr55 ^{Gag} (MA)	[167]
APOBEC3F	Activité antivirale	Oui *	Vif, pr55 ^{Gag} ?	[264]
APOBEC3G	Activité antivirale	Oui *	Vif, pr55 ^{Gag} (NC), ARNg	[265-269]
ARN 7sl	?	Oui	?	[270]
ARNt ^{lys3}	Rétrotranscription	Oui	ARNg, RT, NC	[271]
BAF	Intégration	Oui	pr55 ^{Gag} (MA), MA	[71-73]
CD4	Entrée	Non	gp120	[7]
CypA	Protection contre l'immunité innée	Oui	pr55 ^{Gag} (CA), CA	[44]
DDX1	Export nucléaire ARNg	?	Rev	[91]
DDX3	Export nucléaire ARNg	?	Rev	[90]
EF-1 α	Traduction?	Oui	pr55 ^{Gag} (MA, NC)	[26, 272]
Emerine	Intégration	?	IN?	[74]
Gemin2	Rétrotranscription	Non	IN	[47]
hnRNP A2	Transport et encapsidation ARNg	Non	ARNg	[184, 214]
hRIP	Export nucléaire ARNg	?	Rev	[88, 89]
Hsp70	Assemblage?	Oui	pr55 ^{Gag}	[273]
ICAM-1	Entrée	Oui	pr55 ^{Gag}	[274]
Importine 7	Import nucléaire du PIC	?	?	[62]
INI1	Assemblage, intégration	Oui	pr160 ^{Gag-Pol} (IN), IN	[200]
LEDGF/p75	Intégration, import nucléaire du PIC	?	IN	[60, 61, 69, 70]
LysRS	Rétrotranscription	Oui	pr55 ^{Gag} (CA), CA	[271]
hPOSH	Assemblage	?	?	[176]
Rab9	Assemblage	?	?	[175]
RHA	Rétrotranscription	Oui	pr55 ^{Gag} (NC), ARNg	[46, 87]
Sam68	Export nucléaire ARNg	?	Rev	[92-94]
Staufen1	Multimérisation pr55 ^{Gag} , encapsidation d'ARN	Oui	pr55 ^{Gag} (NC), ARNg	[275, 276]
TRBP	Transcription, traduction, immunité innée	Non	TAR	[277]
Trim5 α	Immunité innée	?	CA	[44]
Tsg101	Bourgeonnement, relâche	Oui	pr55 ^{Gag} (p6)	[205]
UNG	Rétrotranscription	Oui	IN, Vpr	[278]

CHAPITRE 2 : LA PROTÉINE STAUFEN1 HUMAINE

1 La famille des protéines liant l'ARN double-brin

Staufen1 appartient à la grande famille des protéines liant l'ARN double-brin. Cette affiliation leur est conférée par la présence en leur sein d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN double-brin (ou dsRBD pour « double-stranded RNA binding-domain »)(Figure 19). La structure d'un dsRBD est très caractéristique et consiste en un repliement α - β - β - β - α [279](Figure 19A).

Cette grande famille regroupe des protéines telles que PKR, DICER, Drosha, RHA et TRBP, qui sont impliquées dans divers processus comme la régulation de la transcription, de la traduction, de la maturation ou du transport d'ARN [280].

2 Staufen chez la drosophile (dStau) : la genèse

La protéine Staufen a été identifiée en premier chez la drosophile et représente également le premier exemple identifié d'agent *trans* responsable de la localisation d'ARN [281]. dStau possède 5 dsRBD numérotés de 1 à 5 (Figure 19B). Il est à noter que les dsRBD2 et 5 sont incomplets et ne possèdent aucune activité de liaison à l'ARN.

Staufen est très important lors de l'ovogenèse et de l'embryogenèse puisqu'un ovocyte de drosophile invalidé pour le gène *staufen* se développe en une mouche ayant des défauts au niveau des structures antérieures [281]. Lors de sa genèse, l'ovocyte est constitué d'un cytoplasme volumineux dans lequel des ARN maternels capitaux pour le développement de la mouche doivent être transportés et localisés à des endroits spécifiques

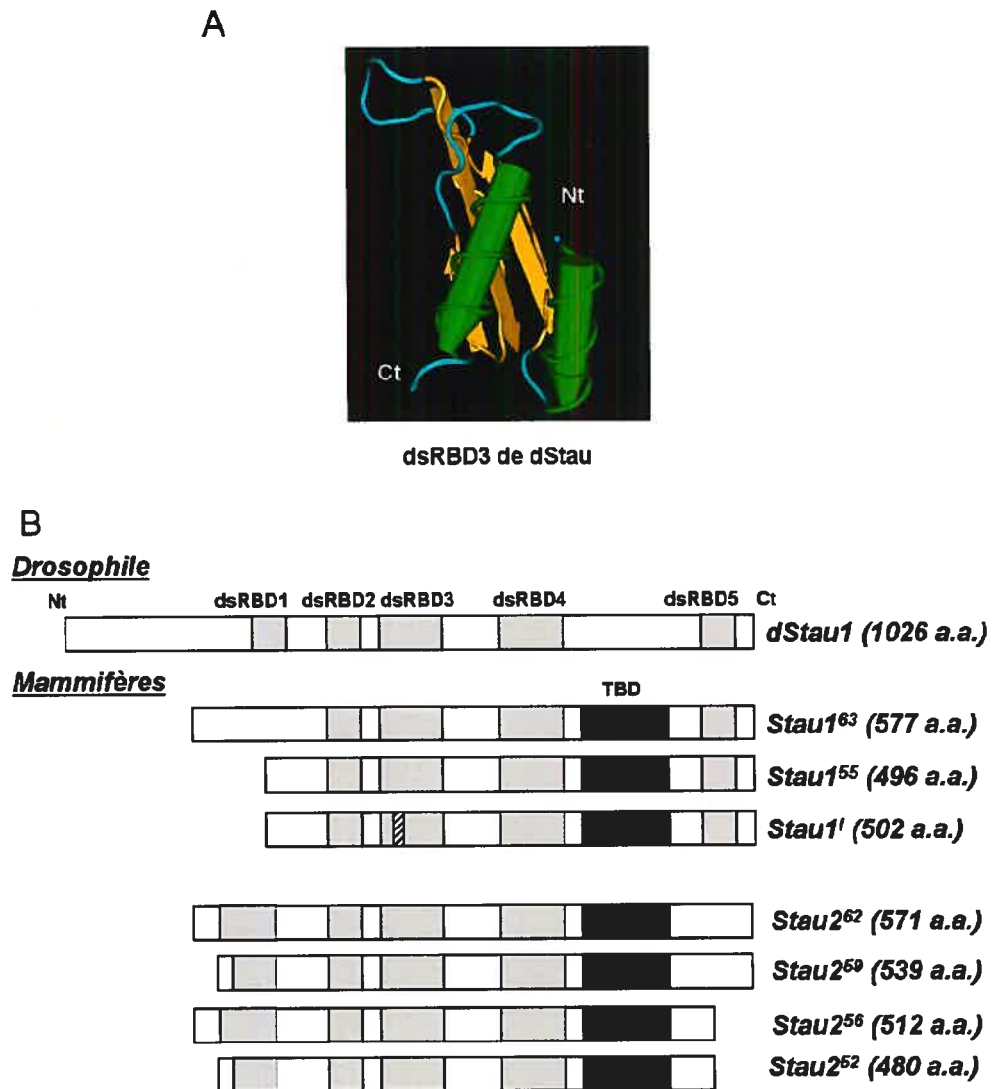


Figure 19 : La protéine Staufen

(A) Structure tridimensionnelle du dsRBD3 de dStau telle que déterminée par résonance magnétique nucléaire. Cette image a été générée à l'aide du logiciel Cn3D version 4.1 et du fichier PDB 1STU. (B) Représentation schématique de l'organisation des différents isoformes de des protéines Staufen chez la drosophile (dStau) et chez les mammifères (Stau1 et Stau2). Chez ces derniers, les isoformes sont annotés selon leur poids moléculaire en kDa, indiqué en exposant dans le nom de la protéine (sauf pour Stau1¹). dsRBD : domaine de liaison à l'ARN double-brin; TBD : domaine de liaison à la tubuline.

du cytosol. Ainsi, l'ARNm *bicoid* est localisé au pôle antérieur de l'oeuf tandis que l'ARNm *oskar* l'est au pôle postérieur de l'ovocyte. dStau est responsable du transport des ARN *bicoid* et *oskar*, dont la traduction doit être réprimée tout le long de ce processus (Figure 20A-F)[282]. L'association de Staufen à ces ARN est médiée par son dsRBD3. Les autres dsRBD de Staufen sont plutôt impliqués dans des interactions protéine/protéine. Par exemple, le dsRBD2 est important pour la localisation du complexe *oskar*/dStau au pôle postérieur de l'ovocyte [283] et donc pour le transport sur le cytosquelette microtubulaire en tant que tel. Une fois cette RNP ancrée au pôle postérieur, le dsRBD5 de Staufen médie la dépression de la traduction d'*oskar* aboutissant donc à la synthèse locale de la protéine Oskar [283].

Par ailleurs, lors de l'embryogenèse, Staufen est impliquée dans la localisation de l'ARNm *prospero* au niveau du côté basal des neuroblastes (cellules souches du système nerveux) lors de leur division asymétrique (Figure 20G-H)[284, 285]. La séquestration de cet ARN dans les cellules ganglionnaires mères (issues du neuroblaste) est importante pour leur destin. À la différence de *bicoid* et *oskar*, le transport de *prospero* requiert le cytosquelette d'actine ainsi que la protéine Miranda qui interagit avec le dsRBD5 de Staufen [286, 287]. Ceci met en évidence que, tout du moins chez la drosophile, l'activité de Staufen ne se restreint pas à un seul type de réseau cytosquelettique.

A priori, Staufen ne possède aucune activité motrice intrinsèque. Ainsi, cette protéine contrôle le transport de l'ARN probablement via le recrutement vers le complexe RNP ARN/Staufen, de protéines couplant ce dernier au cytosquelette et aux moteurs moléculaires qui y sont associés (tels que la kinésine, la dynéine ou la myosine).

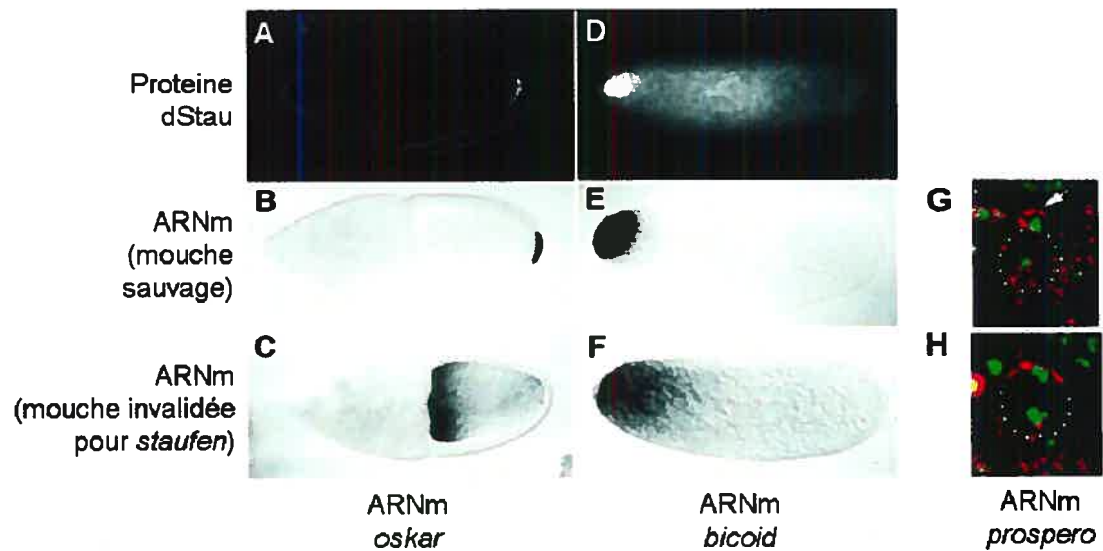


Figure 20 : dStau est impliqué dans le transport de l'ARN.

Dans l'ovocyte de drosophile au stade 9, dStau (A) co-localise avec l'ARNm *oskar* (B) au pôle postérieur. (C) Dans les ovocytes n'exprimant pas dStau, *oskar* n'est plus localisé à cet endroit. Dans l'oeuf, dStau (D) co-localise avec l'ARNm *bicoid* (E) au pôle antérieur. (F) Dans les oeufs issus d'ovocytes n'exprimant pas dStau, *bicoid* n'est plus ancré au pôle antérieur de l'embryon. (G) Durant la division asymétrique des neuroblastes, l'ARNm *prospero* (en rouge) est séquestré dans la cellule fille. (H) Lorsque dStau est absent, ce processus n'est plus possible. Les noyaux des cellules sont également marqués en vert. Figure adaptée de Ferrandon *et al.* (1994) et Li *et al.* (1997)[282, 284].

3 Les protéines Staufen chez les mammifères : Staufen1 et Staufen2

Chez les mammifères, deux orthologues de dStau ont été identifiés [288-291]. Ces derniers, Staufen1 (Stau1) et Staufen2 (Stau2) sont codés par deux gènes indépendants qui génèrent plusieurs isoformes différents par épissage alternatif. Bien que possédant une organisation et des propriétés communes, ces 2 paralogues semblent être impliqués dans des processus complètement indépendants.

3.1 Organisation de Staufen1

L'épissage alternatif de l'ARNm *stau1* permet la production de 2 isoformes majeurs Stau1⁵⁵ (55 kDa) et Stau1⁶³ (63 kDa) qui diffèrent dans leur extrémité N-terminale (Figure 19B)[288]. L'organisation des deux isoformes est très proche de celle de dStau mais certaines différences entre ces trois protéines sont notables. À l'instar de dStau, la liaison à l'ARN double-brin est conférée par le dsRBD3 de Stau1 et les dsRBD2 et 5 sont incomplets. Cependant, contrairement à dStau, Stau1 ne possède pas de dsRBD1. De plus, on a identifié un site de liaison à la tubuline (ou TBD pour « tubulin binding-domain ») qui a une homologie avec la protéine associée aux microtubules MAP-1B [288]. En effet, *in vitro*, Stau1 est capable de s'associer avec la tubuline suggérant que Stau1 pourrait faire le lien entre l'ARN et le cytosquelette. Bien que l'on connaisse la structure en solution du dsRBD3 de dStau [279], on ne dispose d'aucune donnée structurale au sujet de Stau1.

Un troisième isoforme de Stau1 a été identifié. Cet isoforme, Stau1ⁱ, est généré également par épissage alternatif [292]. Il est quasiment identique à Stau1⁵⁵ si ce n'est qu'il contient une insertion de 6 acides aminés dans le dsRBD3 affectant grandement ses

propriétés de liaison à l'ARN. Lorsque surexprimé, cet isoforme diminue la quantité d'ARN présente au sein des complexes contenant Stau1 de par sa faculté de dimériser avec Stau1⁵⁵ [292].

3.2 Organisation de Staufen2

Comme pour Stau1, l'épissage alternatif génère plusieurs isoformes de Stau2. Ces isoformes sont Stau2⁶², Stau2⁵⁹, Stau2⁵⁶ et Stau2⁵², nommés en fonction de leur poids moléculaire respectif (Figure 19B)[291]. Ces quatre isoformes diffèrent par la longueur de leur extrémités N- et C-terminales respectives. L'organisation de ces protéines ressemble à celle de Stau1. Cependant, comme dStau, elles possèdent un dsRBD1 tandis que le dsRBD5 est absent [291].

3.3 Les différences d'affectation fonctionnelle de Stau1 et Stau2

Étant donné l'origine évolutive commune et les similarités d'organisation des ces deux paralogues, on pourrait penser que, dans la cellule, ces protéines sont impliquées dans les mêmes processus. Pourtant, très rapidement on s'est aperçu que même si ces protéines étaient présentes au sein de compartiments similaires, elles ne se retrouvaient jamais dans les mêmes complexes lorsque visualisées dans les neurones et les oligodendrocytes [291, 293]. De plus, des approches protéomiques ont montré que Stau2 n'était pas détectée dans les complexes purifiés contenant Stau1 [294, 295]. Cette conclusion semble confirmée par le fait que le seul partenaire protéique de Stau2 identifié, ZFR, ne s'associe pas avec Stau1 [296]. Par ailleurs, l'expression de Stau1 est plutôt ubiquiste au sein de l'organisme [288] tandis que celle de Stau2 est plus restreinte (avec une expression plus abondante dans le cerveau) [291] suggérant des fonctions indépendantes. On peut donc penser que même si

ces deux protéines partagent des similarités de fonction (tel que le transport d'ARN ou l'association aux ribosomes), elles sont vraisemblablement affectées dans la cellule à des sous-populations d'ARN différentes au sein de complexes indépendants.

3.4 Les fonctions cellulaires de Staufen1

3.4.1 L'activité de liaison à l'ARN de Stau1

Il est clair que Stau1 et Stau2 sont capables de lier l'ARN double-brin en partie via leur dsRBD3. Cependant, *in vitro*, Stau1 et Stau2 n'ont aucune spécificité de séquences lors de liaison à l'ARN double-brin puisqu'elles lient avec une haute affinité un ARN double-brin synthétique, le poly I-poly C [288, 291]. En effet, des études structurales effectuées avec le dsRBD3 de dStau par résonance magnétique nucléaire (RMN) en association avec un ARN double-brin (Figure 21) a montré que cette protéine forme plusieurs contacts avec l'ARN dont un avec son squelette phosphaté (un élément retrouvé dans n'importe quel ARN) [297]. Cette interaction fait que l'association du dsRBD3 de Staufen à l'ARN est plutôt non spécifique *in vitro* même si quelques contacts avec des bases qui pourraient conférer une sélectivité de liaison, ont été identifiés.

Pourtant, il est clair qu'*in vivo* Stau1 possède une spécificité de liaison puisque seulement une vingtaine d'ARNm ont été enrichis suite à la purification des complexes contenant Stau1 [298]. La caractérisation du site de liaison de Stau1 (ou SBS pour « Stau1 binding site ») à un de ses ligands, l'ARNm *arf1* (pour « ADP-ribosylation factor 1 »), a montré que le SBS se trouvait dans le 3' UTR de cet ARN au sein d'une région de 230 nucléotides pouvant potentiellement former un motif secondaire spécifique [298]. La caractérisation de ce motif secondaire et son identification dans d'autres ligands de Stau1

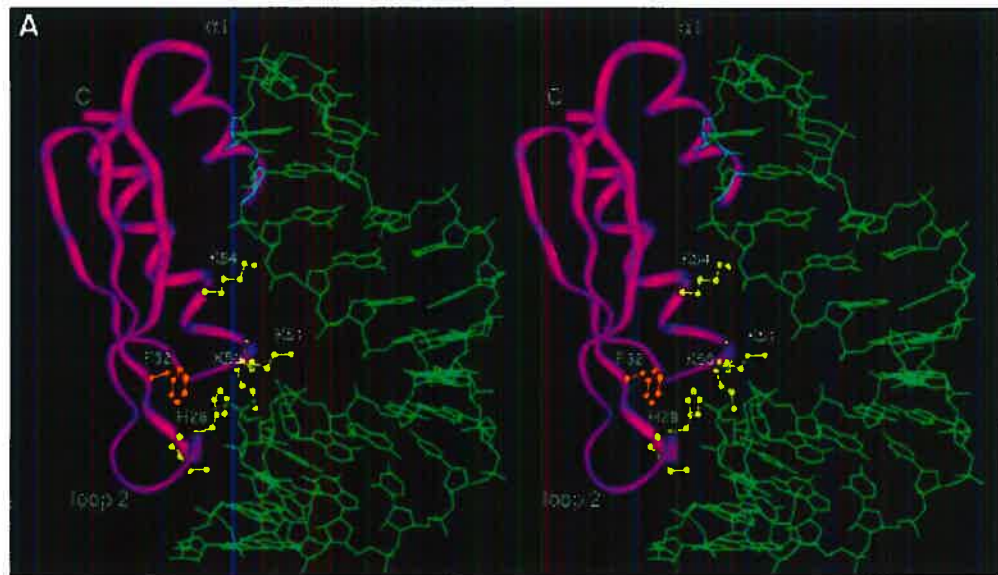


Figure 21 : Image stéréo de la structure tridimensionnelle à basse énergie du dsRBD3 de dStau interagissant avec de l'ARN double-brin. La boucle 2 du dsRBD3 interagit avec les bases dans le sillon mineur de l'ARN tandis que sa boucle 4 s'associe avec le squelette phosphaté du sillon majeur. Figure tirée de Ramos *et al.* (2000)[297].

sont en cours afin de comprendre pourquoi et surtout comment Stau1 lie spécifiquement l'ARN.

Par ailleurs, dans le contexte du VIH-1, Stau1 et l'ARNg viral co-purifient au sein d'un complexe ne contenant pas les ARN viraux épissés (sujet de cette thèse, [275]) ce qui supporte une spécificité de liaison de Stau1 à l'ARN *in vivo*.

La clé conférant la spécificité de liaison de Stau1 reste indéfinie. Chez la drosophile, on sait que dStau s'associe à l'ARNm *bicoid* lorsque ce dernier est sous forme d'homodimère [226, 299]. Ainsi, il n'est pas exclu que chez les mammifères, Stau1 s'associe à l'ARN via ce type de structure tertiaire encore non identifiée. Finalement, le patron de modifications post-traductionnelles de Stau1 (qui est encore à caractériser) ou ses partenaires protéiques pourraient lui conférer cette spécificité d'association.

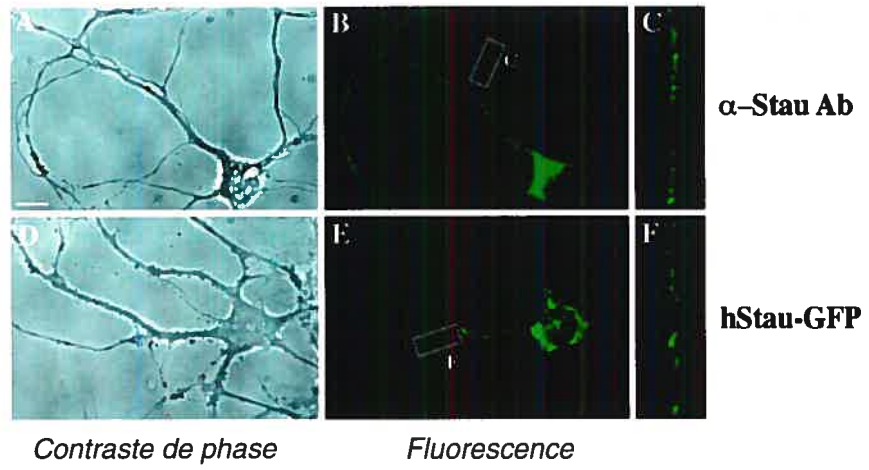
3.4.2 Stau1 transporte des ARN messagers

Le parallèle avec dStau étant évident, on a rapidement associé Stau1 à la régulation du transport de l'ARN qui, chez les mammifères, était mal et peu comprise. Tout comme chez la drosophile, la localisation d'ARN permet la synthèse locale de protéines et est impliquée dans différents processus importants pour l'organisme. L'exemple le plus étudié chez les mammifères est probablement le transport d'ARN dans les dendrites des neurones au sein de gros complexes dynamiques appelés granules d'ARN. Ces complexes permettent la synthèse locale de protéines importantes pour la transmission synaptique et l'établissement de la mémoire. Stau1, dont la distribution est somato-dendritique dans les cellules neuronales, est présente au sein des granules d'ARN (Figure 22A) et est mobile dans les cellules neuronales [300, 301]. En effet, on peut clairement voir le déplacement de molécules de Stau1 étiquetées avec une protéine fluorescente dans les dendrites de

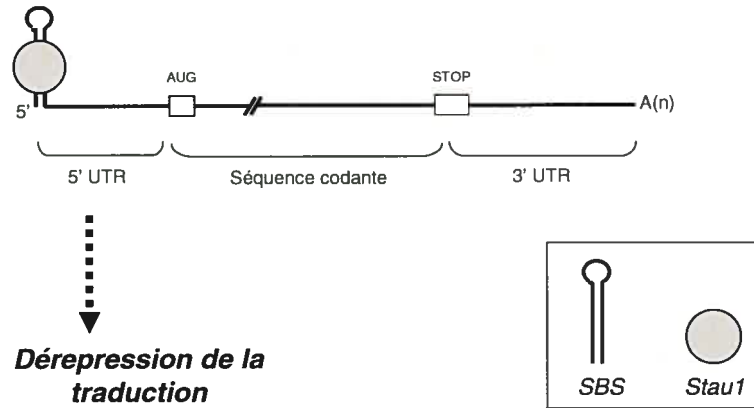
Figure 22 : Les fonctions cellulaires de Stau1.

(A) La distribution de Stau1 est somato-dendritique dans les neurones d'hippocampe de rat. La présence et la localisation de la protéine Stau1 endogène dans les neurones peuvent être visualisées par microscopie suite à un marquage immuno-histochimique avec un anticorps dirigé contre Stau1. (Panneaux du haut) La protéine surexprimée Stau1 fusionnée à la GFP peut être visualisée dans les neurones transfectés par microscopie via la détection d'émission fluorescente verte (Panneaux du bas). Figure tirée de Kohrmann *et al.* (1999)[301]. (B, C) Les rôles de Stau1 dans l'expression génique. (A) Le recrutement de Stau1 par un SBS situé dans la région 5' non traduite d'un ARNm induit la dérégulation de la traduction (s'il y a lieu). (B) En revanche, lorsque le SBS est situé dans la région 3' non traduite d'un ARNm (comme dans *Arf1*), la liaison de Stau1 avec le SBS provoque la dégradation de cet ARNm.

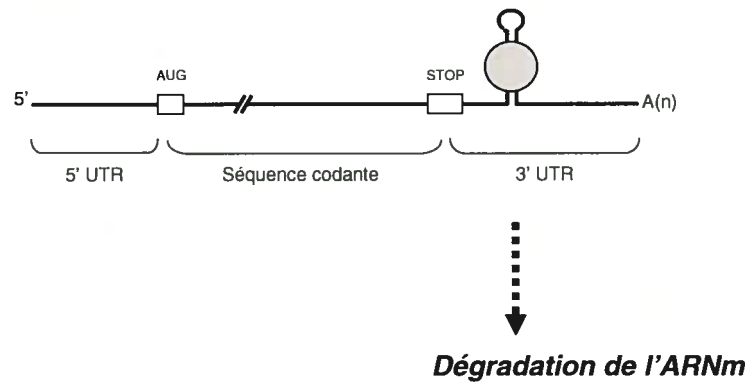
A



B



C



neurones vivants [301]. Ce transport peut être favorisé suite à une stimulation neuronale [302].

La surexpression dans les neurones de rat d'un mutant de Stau2 dont la région C-terminale (incluant le TBD) a été délétée provoque une accumulation d'ARN dans le corps cellulaire du neurone [302, 303]. Cette activité de dominant-négatif suggérait fortement l'implication de Stau2 et Stau1 dans le transport dendritique d'ARN. La preuve la plus convaincante a été fournie par une étude de Kanai *et al.* qui a montré que, suite à la déplétion de Stau1 par RNAi, l'ARN messager codant pour CaMK-II n'était plus localisé dans les granules d'ARN [304]. Par ailleurs, le transport d'ARN médié par Stau1 pourrait impliquer une étape nucléaire. En effet, il a été montré que Stau1 peut transiter dans le noyau de la cellule via un signal de localisation nucléaire bipartite et plusieurs déterminants au sein de la protéine [305]. Ceci suggère que Stau1 pourrait interagir avec l'ARN dans le noyau et être rapidement exporté dans le cytoplasme.

3.4.3 Stau1 et la traduction

Lorsque l'ARNm est transporté dans le cytoplasme, il doit rester sous forme silencieuse pour la traduction. Ceci signifie que la traduction est réprimée (souvent au niveau de l'initiation) jusqu'à l'arrivée de l'ARN à son site d'ancrage afin d'éviter l'expression ectopique et superflue de protéines. Une fois l'ARNm localisé, un signal permet la dérégulation de la traduction et la synthèse locale de la protéine codée par l'ARNm en question [306].

Plusieurs études de protéomique et de fractionnement cellulaire ont montré que Stau1 se trouvait au sein de complexes RNP de haut poids moléculaire qui contiennent des ribosomes [294, 295, 307]. De plus, on sait que Stau1 est capable d'interagir avec les ribosomes [99, 308]. D'ailleurs, des expériences de fractionnements cytoplasmiques ont

clairement montré que la majorité de Stau1 est associé aux polysomes [99]. Ceci suggère que Stau1 pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction des ARNm qui lui sont associés.

Il est connu que des ARNm possédant dans leur région 5' non-traduite un motif secondaire d'ARN très structuré, voient leur traduction réprimée à cause de l'inaccessibilité de la coiffe par les facteurs d'initiation de la traduction. Lorsque présents dans le 5' UTR d'un ARNm, la séquence TAR du VIH-1 ainsi que le SBS sont capables d'inhiber la traduction [97, 99]. Stau1 s'associe à ces deux motifs et déréprime la traduction de ces ARNm quand il est surexprimé (Figure 22B). Ces phénotypes corrélerent avec un enrichissement de l'ARNm en question au niveau des polysomes [99].

Ces résultats suggèrent que Stau1 serait capable de déréprimer la traduction d'ARNm, une fois ces derniers localisés, comme dans le cas de l'ARNm *oskar* chez la mouche [283]. On ignore cependant quel est le signal qui simule cette activité de Stau1 vraisemblablement inexistante lors du transport de l'ARN et quel est le mécanisme régissant cet événement.

3.4.4 La dégradation d'ARNm médiée par Stau1

Une autre fonction importante de Stau1 dans l'expression génique a été découverte. En effet, lorsque le SBS est situé dans la région 3' UTR de l'ARNm, la liaison de Stau1 à ce motif entraîne la dégradation de cet ARN (Figure 22C) [298]. Ce mécanisme de régulation négative de l'expression génique est appelé « dégradation de l'ARNm médiée par Stau1 » (ou SMD pour « Stau1-mediated decay ») et implique une partie de la machinerie de dégradation des ARNm non-sens (ou NMD pour « non-sense mRNA decay »).

Alors que le NMD représente un contrôle-qualité permettant l'élimination de n'importe quel ARNm possédant des mutations non-sens (c'est-à-dire des codons stop prématurés)[309], le SMD consiste quant à lui en la dégradation d'une sous-population spécifique d'ARN cellulaires normaux associés à Stau1. Ce mécanisme de contrôle des niveaux d'ARN a été observé pour l'ARNm endogène codant pour Arf1 au sein duquel le SBS a été identifié [298]. Cette activité de Stau1 implique son association avec Upf1, le dernier effecteur du NMD qui recrute la machinerie de dégradation [298]. Mis à part le positionnement du SBS au sein de l'ARNm (5' UTR ou 3' UTR), on ignore quels sont les signaux qui régulent le recrutement différentiel par Stau1 des machineries du SMD ou de la dérégulation de la traduction.

4 Staufen dans les autres organismes

Différents orthologues de Staufen ont été identifiés dans d'autres espèces que les mammifères et la drosophile. Chez le xénope (*xenopus laevis*), deux orthologues XStau1 et XStau2 ont été identifiés [310, 311]. XStau1 joue un rôle lors de l'ovogenèse car il est important pour la localisation au pôle végétal de l'ovocyte des ARNm Vg1 et VegT1 impliqués dans la spécification du mésoderme et de l'endoderme [311]. Chez le poisson-zèbre, les deux orthologues de Staufen identifiés sont importants pour la migration et la survie des cellules germinales primordiales qui mènent à la formation des gamètes [312]. Chez l'aplysie, Staufen régule, dans les neurones sensoriels, la distribution de l'ARNm codant pour la syntaxine, une protéine-clé du processus de facilitation à long terme [313]. Cette conservation fonctionnelle au cours de l'évolution met en évidence l'importance du rôle des protéines Staufen dans le métabolisme de l'ARN et la régulation de l'expression génique.

CHAPITRE 3 : STAUFEN1 ET VIH-1 : LES DÉBUTS

Le sujet de mon doctorat était directement basé sur une étude dirigée et publiée par mes directeurs de recherche démontrant pour la première fois l'implication de Staufen1 dans la réplication du VIH-1 [276]. L'hypothèse d'une interaction Stau1/VIH-1 est en fait née de résultats préliminaires (à l'époque) qui démontraient qu'*in vitro*, Stau1 avait une grande affinité pour la séquence TAR du VIH-1. L'élément TAR est un ARN très structuré qui est constitué quasiment entièrement de régions double-brin. Il représentait donc un bon ARN modèle pour l'élucidation des fonctions de Stau1 via sa liaison à l'ARN double-brin. Par ailleurs, ces résultats suggéraient également un rôle physiologique potentiel de Stau1 dans le métabolisme de l'ARN du VIH-1 et donc dans la réplication virale. Considérant que l'on connaissait très peu de choses à l'époque à propos de la régulation du transport et de l'encapsidation de l'ARNg (et c'est encore le cas!), Stau1 représentait un candidat idéal en tant que co-facteur cellulaire influençant ces processus.

1 L'encapsidation de Stau1 dans le VIH-1 et ses déterminants

Stau1 est un facteur cellulaire qui est acquis par le virus. En effet, on est capable de détecter Stau1 par immunobuvardage de type Western dans des préparations de virus issus aussi bien d'isolats cliniques que des souches virales utilisées en routine dans les laboratoires. En fait, Stau1 a été détecté également dans d'autres rétrovirus tels que VIH-2 ou MLV. En revanche, Stau1 est absent des virus à ADN testés (virus herpes humain 6, virus Epstein-Barr et adénovirus) suggérant un rôle de Stau1 spécifique aux virus à ARN.

Stau1 est présent à l'intérieur du virus et non à sa surface puisqu'il est toujours possible de le détecter suite au traitement des virus purifiés avec la protéase subtilisine qui

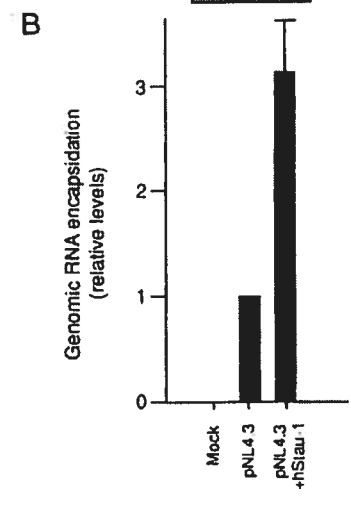
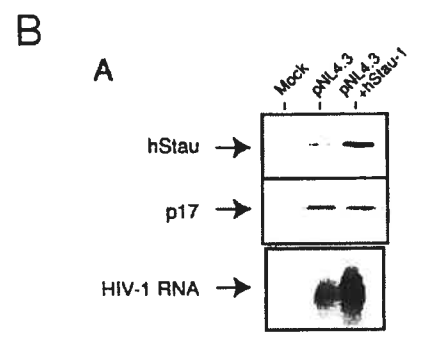
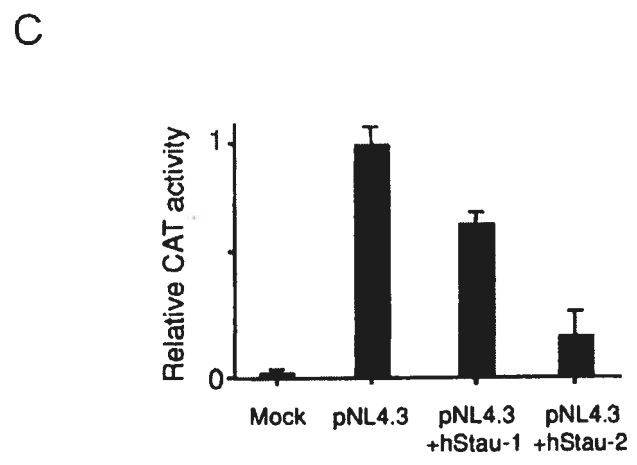
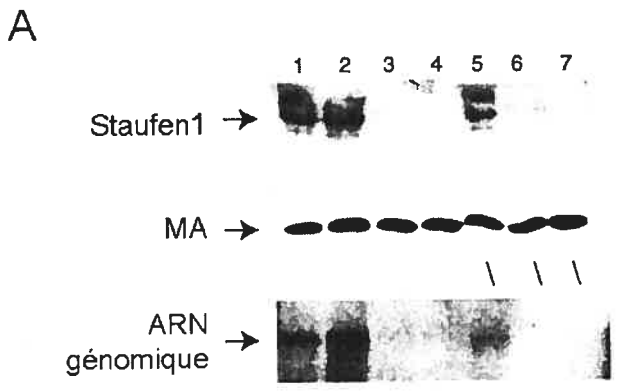
ne digère que les protéines de surface. De plus, des expériences de fractionnement viral ont montré que Stau1 co-sédimente avec des composants de la capsid virale tels que CA, IN et l'ARNg. En fait, Stau1 est dans les mêmes complexes que l'ARNg aussi bien dans le virus qu'à l'intérieur de la cellule et ce, d'une manière dsRBD3-dépendante. Ceci suggère que Stau1 est présent dans le virus au sein du noyau viral et qu'il interagit directement avec l'ARNg.

Cette encapsidation de Stau1 dépend de l'intégrité de son dsRBD3, le domaine majeur de liaison à l'ARN. De plus, dans le cas de virus dans lesquels NC ou Ψ sont mutés de sorte qu'ils encapsident de l'ARNg en moindre quantité, les niveaux de Stau1 et d'ARNg dans le VIH-1 varient de façon similaire (Figure 23A). Finalement, Stau1 n'est pas encapsidé dans les VLP produites en absence d'ARNg. Tous ces faits supportent la conclusion que l'encapsidation de Stau1 dans le VIH-1 est spécifique et intimement liée à celle de l'ARNg.

Il est connu que les cellules relâchent dans le milieu extracellulaire une grande quantité de microvésicules qui peuvent contenir beaucoup de protéines cellulaires. Puisque les microvésicules représentent souvent une source de contamination dans les préparations de virus [314], il faut être très prudent dans l'interprétation des résultats lorsque l'on étudie l'encapsidation de facteurs cellulaires dans le VIH-1. Cependant, Stau1 n'est pas détecté dans des préparations de microvésicules purifiées. De plus, le fait que certains virus mutants ou les VLP encapsident beaucoup moins de Stau1 supportent la conclusion que les protéines Stau1 détectées dans les préparations virales sont associées spécifiquement au virus et non aux microvésicules.

Figure 23 : Stau1 et le VIH-1

(A) Les niveaux d'encapsidation de Stau1 dans le VIH-1 corrèlent avec ceux de l'ARNg. Différents virus ont été produits dans les cellules 293T et purifiés. Des quantités égales de virus ont été analysées pour leur contenu en Stau1, en MA et en ARNg. Lignes 1 et 2 : VIH-1 sauvage; ligne 3 : mutations dans les deux doigts de zinc de NC; ligne 4 : mutations dans le premier doigt de zinc de NC; ligne 5 : mutations dans le deuxième doigt de zinc de NC; ligne 6 : délétion de Ψ . (B) Des particules virales issues de cellules surexprimant Stau1 encapsident non seulement plus de Stau1 mais également plus d'ARNg. (C) La surexpression de Stau1 dans les cellules productrices affecte l'infectivité des virus néosynthétisés. Des quantités croissantes de Stau1 (hStau-1 et hStau-2 sur la figure) ont été exprimées dans les cellules productrices. Les virus (souche pNL4-3) produits dans ces cellules ont été purifiés. Des quantités équivalentes de virus ont été utilisées pour infecter une lignée cellulaire monocytique (BF-24) rapporteuse contenant le gène codant la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous le contrôle du LTR viral. Plus le virus est infectieux, plus CAT est produite. Ainsi, des variations dans l'activité enzymatique de CAT reflètent directement des changements dans l'infectivité d'un virus. Figures tirées de Moulard *et al.* (2000)[276].



2 Les rôles potentiels de Stau1 dans le cycle viral

Quand Stau1 est sur-exprimé dans la cellule, les virus produits encapsident non seulement plus de Stau1 mais également davantage d'ARNg (Figure 23B). Ceci suggère que Stau1 pourrait représenter un co-facteur cellulaire qui régulerait le processus d'encapsulation d'ARN. Cette conclusion est d'autant plus supportée que, tel qu'expliqué plus haut, les niveaux d'encapsulation de Stau1 et de l'ARNg co-varient dans le cas de virus mutants et que Stau1 est associé à l'ARNg dans la cellule et les virus. De plus, en tant que protéine transportant de l'ARN, Stau1 pourrait être impliqué dans la localisation de l'ARNg dans la cellule aux sites d'assemblage du virus.

La pertinence d'étudier l'impact de Stau1 sur le cycle de réplication du VIH-1 est justifiée dans cette étude par le fait que sa sur-expression affecte grandement l'infectivité des virus néosynthétisés (Figure 23C). Ceci démontre que les niveaux de Stau1 dans la cellule productrice et/ou dans le virus sont critiques pour la pleine infectivité du virus

Ainsi, cette étude identifiait Stau1 comme le premier facteur cellulaire influençant l'étape d'encapsulation d'ARNg par le VIH-1. Son impact sur l'infectivité virale mettait en lumière, à cette époque- là, l'importance d'étudier en détail les interactions virus-hôte afin d'identifier de nouvelles cibles antivirales mais aussi de mieux comprendre les bases moléculaires du cycle viral. Ce domaine de recherche de la virologie a depuis littéralement « explosé ».

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Au début de mon doctorat, plusieurs questions avaient émergé de ces découvertes. Tout d'abord, l'encapsidation d'ARN est un phénomène qui est intimement lié à l'activité de pr55^{Gag} (via son domaine NC). Il était donc pensable que Stau1 influençait l'encapsidation d'ARN via une interaction potentielle avec pr55^{Gag}. Le fait que des mutations dans pr55^{Gag} affectent grandement l'encapsidation de Stau1, supportait notre hypothèse. De plus, des expériences préliminaires effectuées dans le laboratoire du Dr. Mouland consistant en des essais double-hybrides effectués dans la levure montraient que Stau1 pouvaient interagir faiblement avec pr55^{Gag} (Données non publiées). Nous voulions donc confirmer l'existence de cette interaction et étudier son impact dans la réplication du VIH-1.

La plupart des conclusions tirées de l'étude décrite plus haut, l'avaient été suite à des expériences dans lesquelles Stau1 était sur-exprimé. À cette époque, il était très difficile techniquement de diminuer les niveaux d'une protéine endogène dans la cellule si ce n'est par invalidation de gènes ou par des approches anti-sens. De plus, dans le cas du VIH-1, aucun mutant de Stau1 faisant office de dominant négatif n'avait été identifié. Cependant, le début des années 2000 (et donc de mon doctorat) a vu l'avènement de l'utilisation de l'ARN interférence (RNAi) comme outil de déplétion de protéines endogènes. Cette avancée fondamentale et technologique (une fois accessible financièrement !) allait enfin nous permettre de répondre à cette question : « Est-ce que Stau1 est vraiment indispensable à l'infectivité du VIH-1 ? ». Par ailleurs, si c'était effectivement le cas, il faudrait déterminer quelle étape du cycle viral exactement est affectée par cette déplétion et quels sont les mécanismes moléculaires régissant l'activité de Stau1 sur le VIH-1.

RÉSULTATS

ARTICLE 1 : Identification of Staufen in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ribonucleoprotein Complex and a Role in Generating Infectious Viral Particles

Mise en contexte

Au début de mon doctorat, nous étions très intéressés à caractériser les interactions entre Stau1 et le VIH-1. Plusieurs évidences discutées plus haut nous laissaient penser que Stau1 interagissait avec pr55^{Gag}, une hypothèse que nous avons testée dans cette étude.

De plus, le début des années 2000 a vu l'avènement de l'utilisation de l'ARN interférence dans le but de dépléter spécifiquement une protéine dans la cellule. Cette technique représentait donc un outil de choix pour démontrer que l'expression de Stau1 dans la cellule est importante pour la production de virus pleinement infectieux.

Cette étude a été publiée en avril 2004 dans *Molecular and Cellular Biology* aux pages 2637-2648

Note : Contribution(s) des auteurs :

LCC: Construction et caractérisation des provirus chimériques et des protéines de fusion. Fractionnements cellulaires. Co-immunoprécipitations. RT-PCR. Essais BRET. Écriture du manuscrit.

JFC: Optimisation de l'ARN interférence sur l'expression de Stau1 via l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA). Essais d'infectivité. Écriture du manuscrit.

CM: Construction de l'expresser de Stau1⁵⁵-YFP. Optimisation des essais BRET impliquant Stau1.

VB: Aide dans les expériences de co-immunoprécipitations Stau1/ARNg.

AG: Conseils sur les approches expérimentales et sur l'interprétation des données.

LDG: Supervision générale et écriture du manuscrit.

AJM: Supervision générale et écriture du manuscrit.

**Identification of Staufen in the Human Immunodeficiency Virus Type 1
Gag Ribonucleoprotein Complex and a Role in Generating Infectious
Viral Particles**

Laurent Chatel-Chaix^{1,2}, Jean-Francois Clément^{1,3}, Catherine Martel², Véronique Bériault^{1,4}, Anne Gatignol^{1,4,5}, Luc DesGroseillers² and Andrew J. Mouland^{1,3,4,5,6,7}

¹Lady Davis Institute for Medical Research-Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital; ²Department of Biochemistry, ³Microbiology and Immunology, Université de Montréal; Depts. of ⁴Microbiology & Immunology and ⁵Medicine, ⁶Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

⁷Corresponding author: email: [REDACTED]

Andrew J. Mouland, Ph.D.

HIV-1 RNA Trafficking Laboratory,

Lady Davis Institute for Medical Research, Room 323A,

Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital,

3755 Côte-Ste-Catherine Road,

Montréal, Québec, Canada H3T 1E2.

Tel.: (514) 340-8260

Fax: (514) 340-7537.

Abstract

Staufen is a host protein that is selectively incorporated into HIV-1 particles in a poorly defined process that involves the selection of HIV-1 genomic RNA for encapsidation and the activity of its third double-stranded RNA-binding domain (dsRBD3). To better understand this, we have characterized its interactions with pr55^{Gag}, the principal mediator of HIV-1 genomic RNA encapsidation. Chimeric proviruses harbouring wild-type or mutant forms of Staufen were expressed in 293T cells. Cell fractionation analyses demonstrated that Staufen co-sediments with pr55^{Gag} within detergent-resistant, trypsin-sensitive complexes that exclude mature Capsid (CA) and Matrix (MA) proteins. Co-immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays demonstrated a specific and direct interaction between Staufen and the Nucleocapsid (NC) domain of pr55^{Gag} *in vitro* and in live cells. This interaction is shown here to be mediated by Staufen's dsRBD3 with a contribution from its C-terminal domain. Immunoprecipitation and RT-PCR analyses showed that the 9kb genomic RNA was found within Staufen-containing immune complexes. Spliced HIV-1 RNAs were not detected in these Staufen complexes indicating a preferential association of Staufen with the 9kb species. These results substantiate that Staufen and pr55^{Gag} directly interact during HIV-1 expression. Knockdown of Staufen expression by small interfering RNA (siRNA) in HIV-1-expressing cells demonstrates that this cellular protein is important for the generation of infectious virus. These data show that Staufen, pr55^{Gag} and genomic RNA are part of the same intracellular complex and they support a role for Staufen in pr55^{Gag} function in viral assembly, genomic RNA encapsidation and the generation of infectious viral particles.

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assembly is an ordered series of steps that is characterized by the formation of intermediate assembly complexes of the viral precursor Gag or pr55^{Gag}. While the expression of pr55^{Gag} alone is sufficient to generate virus-like particles (VLPs) {Cimarelli, 2002 #86}, viral assembly steps following pr55^{Gag} synthesis are poorly defined. Each step of the assembly process appears to be regulated by distinct domains of pr55^{Gag}. Since the minimal Gag domain for self-association was recently shown to be NC (47), oligomerization of pr55^{Gag} mediated by the NC domain is thought to be one of the first events of the assembly process. NC's role in assembly has also been shown to depend on its non-specific RNA binding activity mediated by basic amino acid residues (8, 11). CA (14, 30, 48), MA (21, 32) and the p2 (31) domains of pr55^{Gag} all contribute to the highly ordered steps of Gag multimerization that likely lead to ultrastructural and morphological changes of intracellular assembly complexes. Although the MA domain is dispensable for multimerization, it is essential to target Gag to membranes via its amino-terminal myristic acid, and it is also a critical determinant for particle formation (20, 37). Genomic RNA is selected for packaging by the NC domain of pr55^{Gag} and the p6 domain of pr55^{Gag} is involved in virus budding and release (9). Following these latter steps, pr55^{Gag} is processed by the viral protease to generate MA, CA, NC, p6 proteins and two spacer peptides, p2 and p1, leading to structural rearrangements and to the formation of a mature virus (9).

HIV-1 assembly also involves the activity of several cellular factors that, for the most part, interact with pr55^{Gag} to mediate their incorporation. An ATP-binding protein HP68 was found to co-localize and interact with pr55^{Gag} and was shown to participate in virion assembly and capsid formation (50). Tsg101 is an endosomal sorting protein that influences morphogenesis and budding events via an interaction with pr55^{Gag} (17). The proteins VAN, EF-1 α and actin all interact with pr55^{Gag} and are present in purified virus preparations but have poorly defined roles in assembly and morphogenesis, gene expression

and earlier events of the HIV-1 lifecycle (6, 10, 28, 38, 45). These data underscore the importance of studying pr55^{Gag}-host interactions during the late assembly steps of the HIV-1 lifecycle since these interactions can potentially be exploited as new targets for therapeutic intervention (19).

We recently demonstrated that the double-stranded RNA (dsRNA) binding protein, Staufen, is selectively packaged into HIV-1 virions and is associated to viral RNA in the cytoplasm and in the virus (34). Staufen incorporation in HIV-1 depends on the integrity of the principal RNA-binding domain, dsRBD3 (34) and it is likely mediated by its RNA-binding capacity (34). These data strongly favored a role for Staufen in the selection of genomic RNA for encapsidation and also inferred that it functioned somehow in the intravirion HIV-1 RNP or reverse transcription complex. While Staufen's role in mammalian cells is proving to be one that is involved in RNA trafficking, especially in neuronal cells (24), details about its roles in HIV-1 replication remain obscure.

In this study, we provide new information on the virus-host interaction involving Staufen from *in vitro* experiments as well as in live cells. We show that Staufen co-fractionates with pr55^{Gag} within detergent-resistant cytosolic complexes and is a component of an intracellular HIV-1 ribonucleoprotein complex. Furthermore, we demonstrate that Staufen specifically interacts with the NC domain of pr55^{Gag} in a direct and RNA-independent manner, as shown *in vitro* as well as in live cell assays. We also show that the HIV-1 genomic RNA -and not the 1.8 or 4kb spliced RNA species- selectively co-immunoprecipitates with Staufen. Finally, RNA interference experiments demonstrate that the specific knockdown of Staufen gene expression results in a significant reduction in viral infectivity. The results presented here suggest that Staufen influences HIV-1 replication at steps that include viral assembly and this is achieved via specific interactions with HIV-1 pr55^{Gag} and genomic RNA.

Results

Expression of Staufen from HIV-1 chimeric proviruses

To characterize a putative interaction between Staufen and HIV-1 proteins/RNA, we constructed HIV-1 chimeric proviruses in which Staufen cDNA was inserted into the *nef* open reading frame (Figure 1A). In this context, Staufen should be expressed early during HIV-1 expression, since Nef is amongst the first viral proteins to be expressed. We also prepared two additional chimeric proviruses containing either the full-length Staufen protein with a point mutation in dsRBD3 that abolishes its RNA binding capacity (Staufen^{F135A}), or a C-terminal truncated mutant (dsRBD2-4) lacking the tubulin binding domain (TBD) and the dsRBD5. To verify Staufen expression in this proviral context, expression levels were analyzed by Western blotting of extracts of transfected 293T cells. As shown in Figure 1B, Staufen proteins were all expressed at comparable levels. In addition, Staufen expression in the context of the provirus did not affect Gag expression levels or Gag processing since the same levels of pr55^{Gag}, CA and CAp25 were observed (Figure 1B).

Staufen and HIV-1 pr55^{Gag} cofractionate on sucrose gradients

We first studied the subcellular distributions of Staufen and HIV-1 Gag during HIV-1 replication. These studies showed that Staufen and pr55^{Gag} partially colocalized in the cytoplasm of HIV-1/Staufen expressing cells (L.C.-C., L.D. and A.J.M., data not shown). We therefore performed sucrose gradient sedimentation assays in order to determine the relationships between cytosolic Staufen and HIV-1 pr55^{Gag} or CA. This technique allows for the separation of cellular compartment/organelles according to their buoyant density. Cytoplasmic cell extracts were prepared from pNL4-3- and pNL4-3/Staufen-HA-expressing cells and separated on sucrose gradients (20-60% w/v in Panels A

Figure 1: Construction and characterization of Staufen-expressing HIV-1 chimeric proviruses. (A) Schematic representation of chimeric proviruses. cDNAs coding for either wild-type Staufen protein, the full-length Staufen with a point mutation in the RNA-binding domain dsRBD3 (Staufen^{F135A}) and a C-terminal truncated mutant containing dsRBD2, 3 and 4 (dsRBD2-4) were inserted in the *nef* open reading frame of pNL4-3/PKR. Staufen proteins were tagged with an HA epitope. (B) Expression of chimeric proviruses. 293T cells were transfected with an empty vector (lane M), pNL4-3 (lane 1), pNL4-3/Staufen-HA (lane 2), pNL4-3/Staufen^{F135A}-HA (lane 3) or pNL4-3/dsRBD2-4-HA (lane 4) and cell extracts were analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-CA antibodies to monitor expression of both Staufen-HA and Gag proteins.

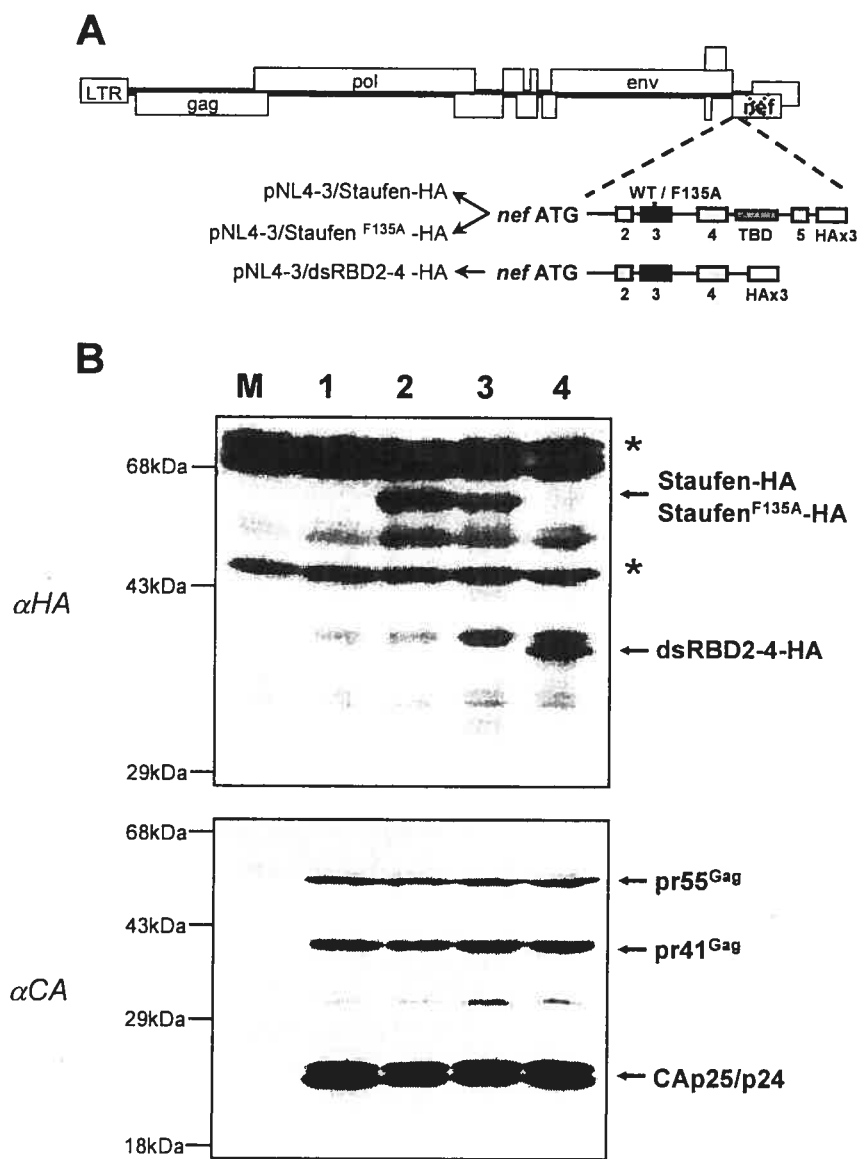


Figure 1

and B of Figure 2). Each fraction was analyzed by Western blotting for the presence of Staufen and HIV-1 proteins. In cells that express pNL4-3 only, endogenous Staufen was found in fractions 10 to 13 with a peak in fraction 13. Ribosomal protein L7, a marker of whole ribosomes, was also found in these Staufen fractions (Figure 2A) as shown previously (29). When anti-CA was used to identify Gag proteins, unprocessed pr55^{Gag}, like Staufen, was principally found in fractions 11 to 14 with a peak in fraction 13 (indicated in the shaded box under Figure 2B). In contrast, the processed forms of pr55^{Gag}, CAp24/p25 sedimented mainly in fractions 6 to 12, likely corresponding to budding viruses. Approximately 50% of the total CA was detected in the low density fraction 15, likely representing lysed viruses. Identical results were obtained for the distribution of Staufen-HA in cells expressing pNL4.3/Staufen-HA (Figure 2B) such that Staufen co-fractionated with pr55^{Gag} and not with the processed forms of pr55^{Gag}. This set of experiments demonstrates that while the distribution of Staufen and pr55^{Gag} were not identical, both proteins cosedimented in sucrose gradients and peaked in the same fraction. It also shows that the expression of Staufen in the context of pNL4-3/Staufen does not affect the cytoplasmic distribution of HIV-1 proteins, and moreover, HIV-1 gene expression does not have any apparent effects on that of Staufen.

To further characterize these complexes, we repeated these sucrose gradient analyses in the presence of non-ionic detergent (Figure 2C; using a 10-60% sucrose gradient). This treatment disrupts weak interactions and releases membrane-associated complexes. Under these conditions, Staufen and pr55^{Gag} co-sedimented with a similar profile in intermediate density fractions 7-13. Because a 10-60% gradient was used in this latter analysis, we expected that the sedimentation profiles of Staufen and pr55^{Gag} profiles be slightly different, which is what we observed. The data show that detergent treatment did not significantly change the sedimentation profile of either Staufen or pr55^{Gag}. These proteins sedimented in fractions 7-13 (34.5-24% sucrose) after detergent treatment (Figure 2C) or mainly in fractions 10-13 (34.5-25% sucrose) without detergent (Figure 2A or 2B). In contrast, the processed forms of Gag such as CAp25/p24 and MA (not shown) were no

Figure 2: Staufen and pr55^{Gag} cofractionate on sucrose gradients. (A) 293T cells were transfected with pNL4-3 and cell extracts were separated on a 20-60% sucrose gradient. Fifteen fractions were collected and analyzed by Western blotting using mouse monoclonal anti-Staufen, anti-CA and anti-ribosomal protein L7 antibodies as indicated. Input from mock (M) and transfected (T) cells are shown on the right. (B) Same experiment as in (A) except that 293T cells were transfected with pNL4-3/Staufen-HA. Staufen was detected with a mouse monoclonal anti-HA antibody. (C) 293T cells were transfected with pNL4-3/Staufen-HA and lysed in a buffer containing 0.5% NP-40. Cell lysates were separated on a 10-60% sucrose gradient containing 0.5% NP-40. Fractions were analyzed by Western blot analyses using anti-HA, anti-CA and anti-L7 antibodies as indicated.

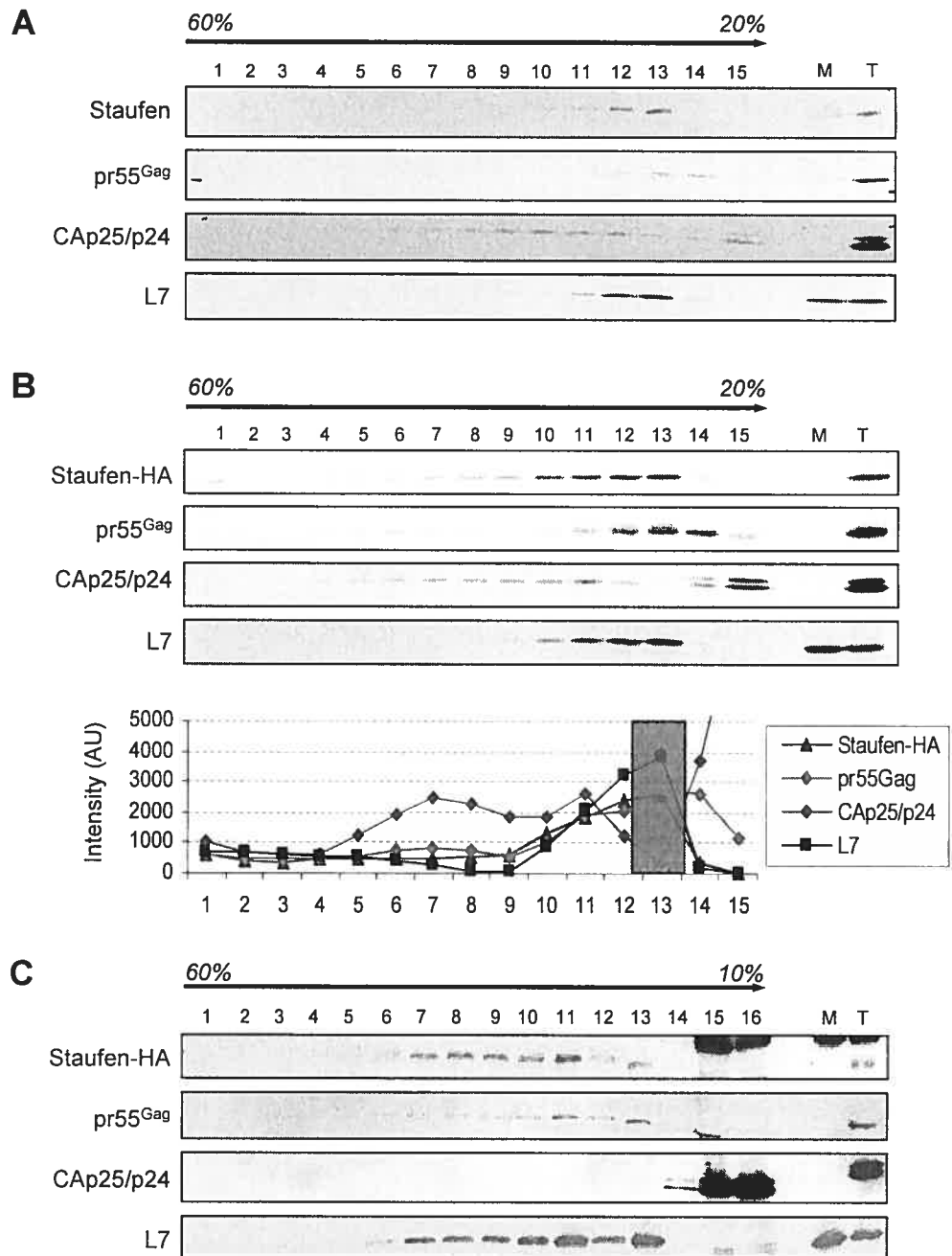


Figure 2

longer present in high density fractions (6-12 in Figure 2A-B) but were found at the top of the gradient (mainly in fractions 14 and 15) following detergent treatment, likely corresponding to detergent-solubilized viral particles. Therefore, Staufen and pr55^{Gag} are found in detergent-resistant complexes (DRC) consistent with previous Gag data (26, 27). When cell extracts were treated with trypsin before gradient analysis, neither Staufen nor pr55^{Gag} was detectable in sucrose gradients indicating that both proteins are sensitive to trypsin digestion and are mainly in a cytosolic compartment (L.C.-C., L.D., A.J.M., data not shown). In contrast, CAp25/p24 levels and distribution were not affected since they are most likely protected from trypsin by their association to membranes. Our results now show that Staufen co-fractionates with pr55^{Gag} and is likely part of the same HIV-1 DRC, a complex that was previously shown to mainly contain pr55^{Gag} and to correspond to cytoplasmic virion assembly intermediates (26, 27).

Staufen interacts with HIV-1 pr55^{Gag} in an RNA-independent manner

In preliminary studies, yeast two hybrid analyses revealed that full-length Staufen and pr55^{Gag} interacted (34) to a level similar to that found for pr55^{Gag}/pr55^{Gag} (2). Our immunofluorescence results also suggested that at least a proportion of Staufen and pr55^{Gag} are in close proximity and could be components of the same HIV-1 assembly complex (data not shown). To address this possibility, we first determined whether endogenous Staufen interacted with pr55^{Gag} during proviral expression. To determine this, cells were mock transfected or transfected with pNL4-3 alone. Extracts from these cells were immunoprecipitated using a monoclonal anti-CA antibody. A cell extract was analyzed for endogenous Staufen prior to immunoprecipitation using a rabbit polyclonal antibody used previously (34) (Figure 3A, top-left panel). This antibody reacts with two isoforms of Staufen [(55 and 63kDa (34)]. pr55^{Gag} was then immunoprecipitated from equal quantities of extracts and the immunoprecipitates were analyzed for the presence of endogenous Staufen protein (Figure 3A, top-right panel), and immunoprecipitated Gag products (Figure

Figure 3: Treatment of the Staufen Gag complexes does not affect their interaction. (A) 293T cells were transfected with either an empty vector (M) or pNL4-3 (T) and the cell lysates were immunoprecipitated using anti-CA antibodies. Endogenous Staufen was identified in cellular lysates (A, top-left panel). Following immunoprecipitation using the anti-CA antibody, Staufen (A, top-right panel) and Gag products (A, lower panel) were identified by Western analyses in the immunoprecipitates. (B, C) 293T cells were transfected with an empty vector (lane M), pNL4-3 (lane 1), pNL4-3/Staufen-HA (lane 2), pNL4-3/Staufen^{F135A}-HA (lane 3) or pNL4-3/dsRBD2-4-HA (lane 4) and cell extracts were immunoprecipitated with anti-CA (B) or anti-HA (C) antibodies. Proteins in the pellets were analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-CA as indicated. (D) 293T cells were transfected with an empty vector (lane M), pNL4-3 (lane 1) or pNL4-3/Staufen-HA (lane 2). Cell lysates were incubated in the presence (+) or absence (-) of RNases A and T1 during 30 minutes prior to immunoprecipitation analysis. The asterisk (*) shows non-specific IgG labelling. Data shown are representative of four independent experiments.

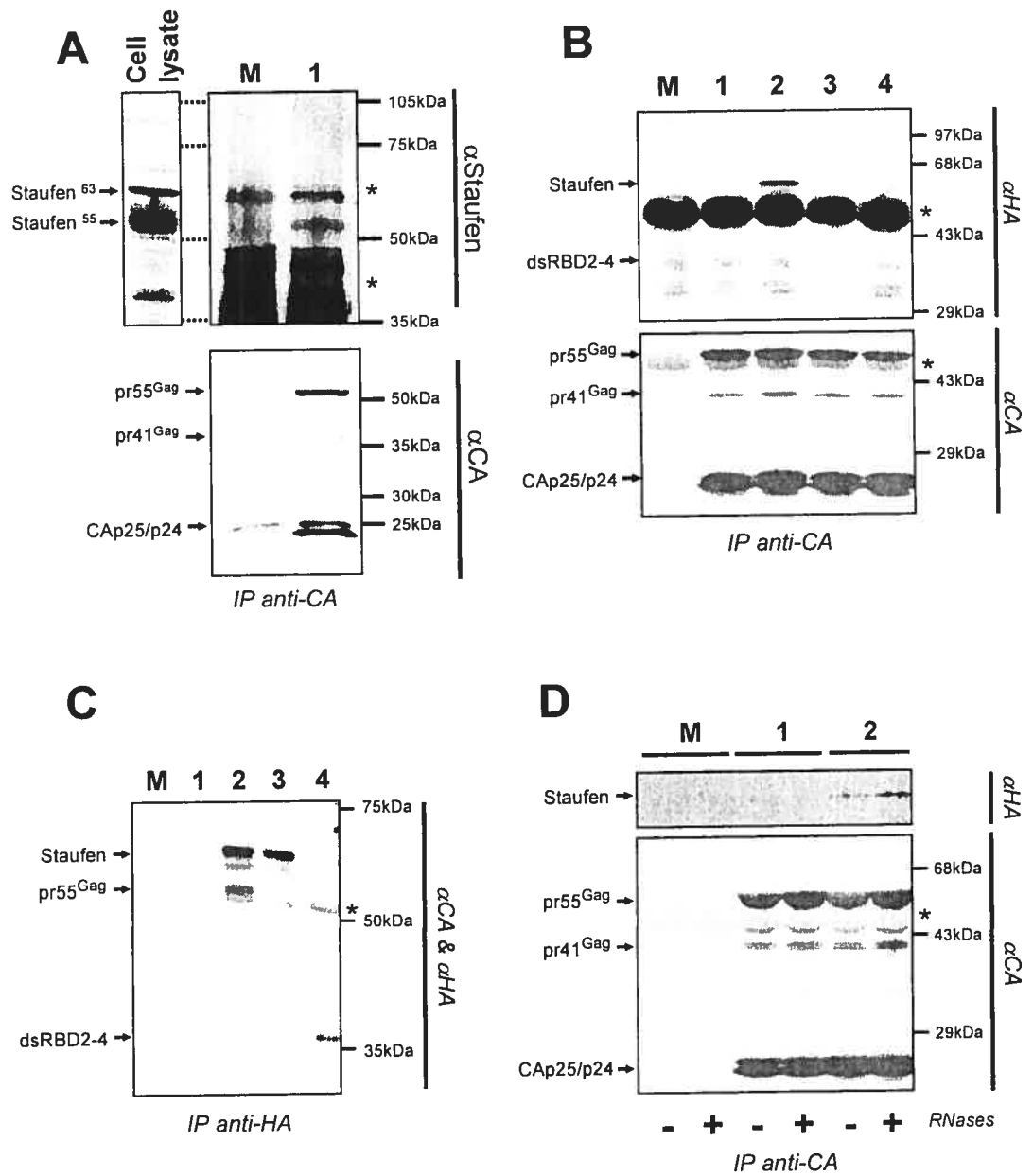


Figure 3

3A, lower panel). Staufen was found to be present in the HIV-1 Gag immunoprecipitates during HIV-1 expression, but not in the immunoprecipitate from mock-transfected cell lysates. There was a specific immunoprecipitation with the 55kDa Staufen isoform (Figure 3A, top-right panel). A 63-65 kDa protein signal was obtained in both conditions and is not related to the 63kDa Staufen isoform. These results suggest that endogenous Staufen is physically recruited to pr55^{Gag}-containing complexes during proviral gene expression.

In order to map the determinants in the Staufen protein that are important for this interaction, 293T cells were transfected with the chimeric Staufen proviruses shown in Figure 1 followed by immunoprecipitation/Western analysis. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-CA antiserum, and Staufen-HA was identified in the immunoprecipitates by Western blot. From cells transfected with pNL4-3/Staufen-HA provirus, a 60kDa band corresponding to Staufen-HA was detected using an anti-HA antibody in the Gag immunoprecipitate, whereas Staufen was not detected in Gag immunoprecipitates from pNL4-3/Staufen^{F135A}-HA- or dsRBD2-4-HA-expressing cells (Figure 3B). An approximately equal amount of Gag (pr55^{Gag}, pr41^{Gag}, CAp24/p25) was immunoprecipitated in all conditions. These results demonstrate that Staufen's interaction with pr55^{Gag} in HIV-1-expressing cells requires contributions from both an intact dsRBD3 and C-terminal domain.

In the reverse experiment, cells were transfected with pNL4-3 or the pNL4-3/Staufen proviruses and Staufen-HA was immunoprecipitated using anti-HA. Immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot analysis using monoclonal anti-CA. Anti-HA was included to identify Staufen-HA proteins at the same time. This analysis shows that pr55^{Gag} co-immunoprecipitates with wildtype Staufen-HA but not with either of the Staufen mutants (Figure 3C). We were not able to detect processed forms of pr55^{Gag}, CA and NC, in the immunoprecipitates (data not shown), consistent with our gradient analysis in which we show that these do not co-fractionate with Staufen (Figure 2A-B). These data strongly suggest that Staufen preferentially interacts with the Gag precursor, pr55^{Gag}.

Since a single point mutation in Staufen's dsRBD3 abolishes both its RNA-binding activity (29) and the Staufen/pr55^{Gag} interaction (Figure 3B), we investigated whether RNA contributes to this interaction, as it does for the pr55^{Gag}/EF-1 α , pr55^{Gag}/pr55^{Gag} and pr55^{Gag}/Gag-Pol (or pr160^{Gag/Pol}) interactions (8, 10, 11, 22). Cell lysates were mock-digested or digested with RNases A and T1 prior to immunoprecipitation with anti-CA antiserum. As shown in Figure 3D, Staufen remained associated with Gag-containing complexes in the presence of RNase, demonstrating that this interaction is maintained even if the cellular RNA is removed. However, we can not exclude the possibility that bridging RNA may be protected from RNase digestion by the Staufen/pr55^{Gag} complex using this assay and these results, while reproducible, should be interpreted with care.

Staufen/pr55^{Gag} interaction requires the HIV-1 NC domain

Co-immunoprecipitation assays were also used to map the pr55^{Gag} domain that interacts with Staufen. Full-length pr55^{Gag} as well as four deletion mutants containing different Gag subdomains (MA-CA, CA, CA-p1, CA-p6) were fused in-frame with *Renilla reniformis* luciferase (*Rluc*) (Figure 4A). The CA subdomain was included in each mutant in order to allow for immunoprecipitation by our anti-CA antibody. 293T cells were co-transfected with the Gag/*Rluc* and Staufen-HA expressors. In the cell lysates, Gag/*Rluc* deletion mutants and Staufen-HA were all expressed at comparable levels, except for pr55^{Gag}/*Rluc* which was consistently expressed at low levels (Figure 4B). Following immunoprecipitation with anti-CA antibodies, co-precipitated proteins were analyzed by Western blotting using anti-HA to detect Staufen-HA (Figure 4C). Although each Gag mutant was immunoprecipitated at comparable levels (Figure 4C, bottom panel), Staufen-HA was only detected in the immunoprecipitates when the NC subdomain was expressed (lanes 1, 4 & 5). These results show that Staufen interacts with pr55^{Gag} with a major contribution from the NC domain. Negligible amounts of Staufen-HA co-precipitated with

Figure 4: Staufen binds pr55^{Gag} via the NC domain. (A) Schematic representation of pr55^{Gag} and deletion mutants fused to *Rluc*, labelled 1-5. (B, C) 293T cells were cotransfected with these constructs [labeled 1 to 5 in (A) and corresponding to lanes 1 to 5 in (B, C)] and a Staufen-HA expressor. Cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-CA and anti-HA antibodies to detect expression of the proteins (B) or immunoprecipitated with anti-CA antibodies (C). Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-CA (as control) antibodies. The asterisk (*) shows non-specific IgG labeling. Data shown are representative of two independent experiments.

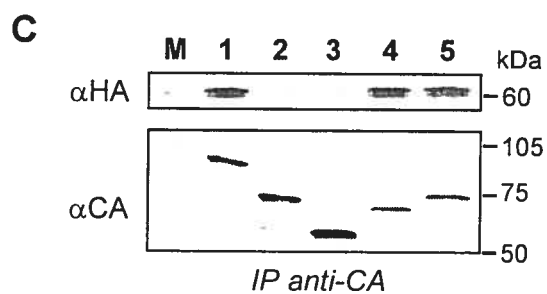
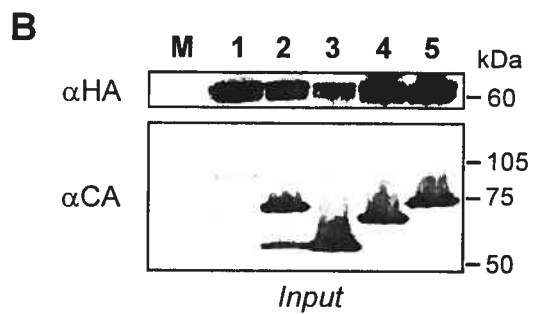
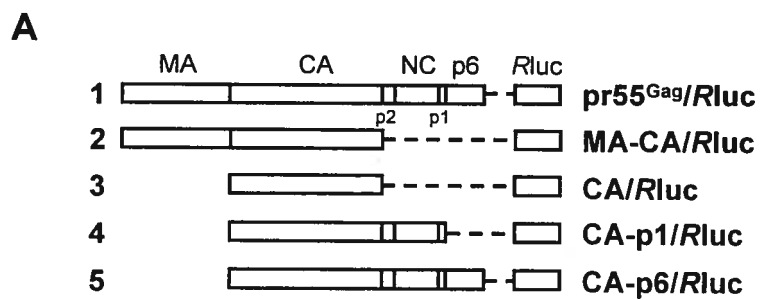


Figure 4

CA/Rluc and MA-CA/Rluc. Moreover, these results suggest that the interaction does not require the expression of additional viral components.

Staufen and HIV-1 NC domain of pr55^{Gag} directly interact in live cells

To determine whether the characterized Staufen/pr55^{Gag} interaction above was not an artifact that may result from the preparation of detergent-solubilized cellular extracts, we performed protein interaction assays in live cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) analysis (1). For this method, a BRET is achieved when two proteins directly interact (with a physical separation of approximately $\leq 50\text{\AA}$). Energy from the donor luciferase molecule is transferred to the red-shifted GFP (YFP) molecule acceptor, which then produces a fluorescent light emission to produce a positive BRET signal, calculated as described in Materials and Methods. Staufen was fused to YFP (acceptor) and all of the Gag mutants were fused to Rluc (donor) as shown in Figure 5A. 293T cells were cotransfected with Staufen-YFP and each of the Gag/Rluc expressors and BRET ratios were determined in live cells 40h post-transfection. Because full-length pr55^{Gag}/Rluc was poorly expressed (Figure 4B), it was not included in this set of experiments. As seen in Figure 5A, positive BRET ratios were always observed when Staufen-YFP was co-expressed with Gag mutants containing the NC domain (CA-p1/Rluc, CA-p6/Rluc, p2-p1/Rluc, NC/Rluc). In contrast, negligible BRET ratios were obtained when the Gag fragments lacked the NC domain (MA-CA/Rluc, CA/Rluc, MA/Rluc, p6/Rluc). Positive BRET ratios were consistently 2- to 3-fold higher when NC was expressed in the form of a precursor (CA-p1 or CA-p6/Rluc) than when it was expressed as a mature protein (NC/Rluc). Dose-response assays with cells transfected with Staufen/YFP or YFP alone provided further evidence that this association in live cells was specific (Figure 5B and see Materials and Methods). These data confirm our results obtained in the co-immunoprecipitation analyses and further show that Staufen and pr55^{Gag} interact directly in live cells. We have mapped the pr55^{Gag}

Figure 5: Staufen directly binds the HIV-1 NC domain of pr55^{Gag} in living cells. (A) 293T cells were cotransfected with Staufen/YFP and different Rluc-fused truncated Gag expressors. BRET ratios were defined as described in Material and Methods. *N* in the replicate number and the error bars represent the SEM calculated from at least three experiments for each interaction set. (B) 293T cells were cotransfected with constant amounts of pCMV-CA-p1/Rluc and varying amounts of either Staufen/YFP or YFP expressors. The graph presented here is a representative example of the saturation curves performed to provide evidence for a specific interaction between the proteins. BRET ratios were plotted as a function of the “excited YFP activity/total Rluc activity” ratio, allowing comparison of BRET ratios between Staufen-YFP and YFP when expressed at the same levels.

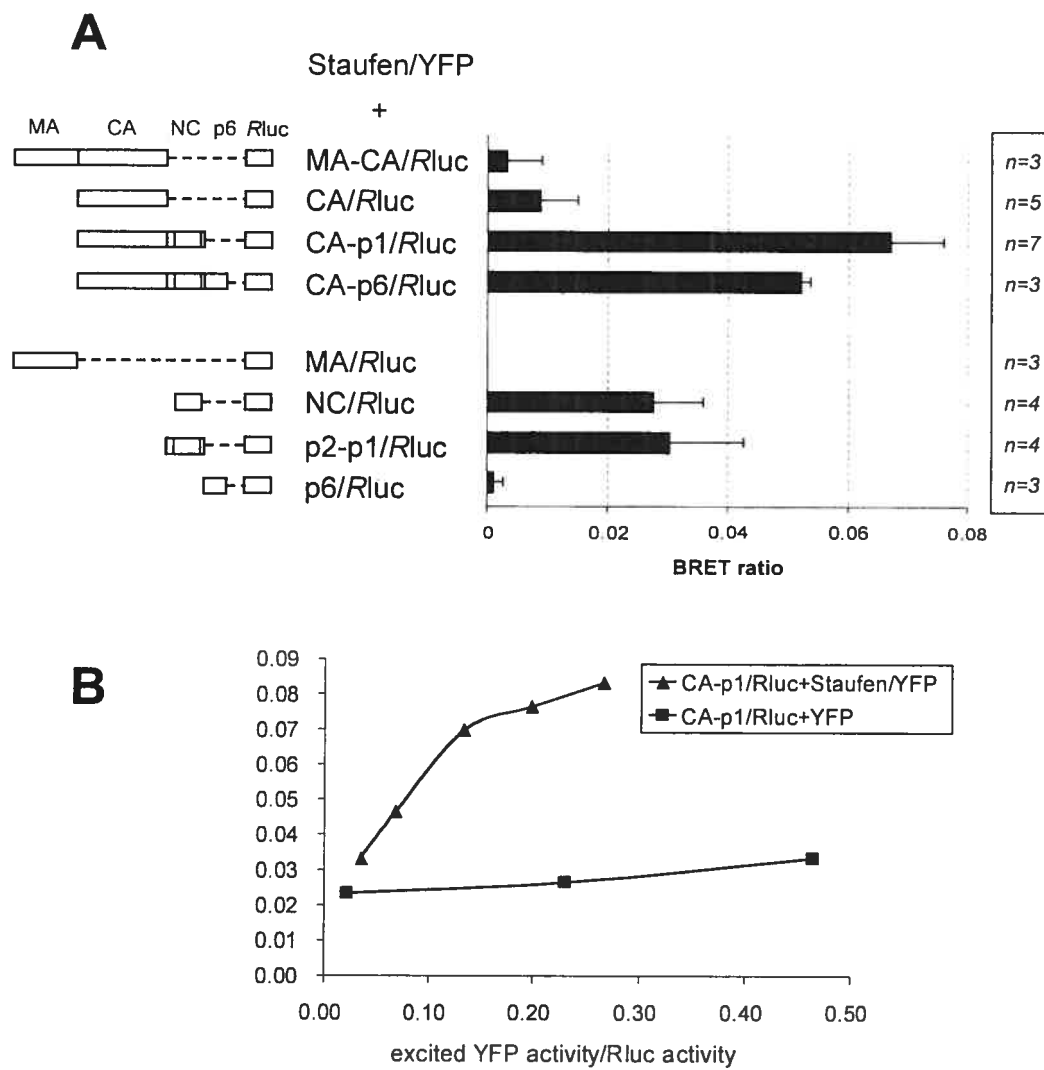


Figure 5

interacting domain to the NC domain and the data also suggest that Staufen has higher affinity for the pr55^{Gag} than for the mature Gag proteins.

HIV-1 genomic RNA is found in the Staufen immune complex

We previously documented a direct correlation between the level of expression of Staufen and the abundance of genomic RNA encapsidated into virus particles (34). This suggested that Staufen was implicated in the selection of genomic RNA for encapsidation. While the NC domain of pr55^{Gag} is the principal mediator of this process (49) that depends on an interaction between pr55^{Gag} and genomic RNA (13), the relationship between Staufen- and pr55^{Gag}-mediated genomic RNA encapsidation was not clear. Therefore, to further characterize the Staufen-pr55^{Gag} complex and the relationship between Staufen and HIV-1 RNA, we attempted to identify the Staufen-associated HIV-1 RNA species in co-immunoprecipitation assays using our Staufen proviral constructs. 293T cells were transfected with pNL4-3/Staufen-HA and mutant proviruses, and cell extracts were immunoprecipitated using anti-HA. The identification of the co-immunoprecipitated HIV-1 RNA species was determined by RT-PCR with 3 primer pairs that recognized either the genomic RNA, the 4 kb or the 1.8 kb spliced RNAs, as previously described (39) and illustrated in Figure 6A. Using primer pair #1 for genomic RNA, we detected a specific DNA product of the expected size in the immunoprecipitates isolated from HIV-1/Staufen-HA lysates (Figure 6B; lane 3). The amplification was specific since there was no signal when the AMV reverse-transcriptase was omitted. In contrast, RT-PCR from HIV-1 alone (Figure 6B, lane 2), or from the pNL4-3/Staufen^{F135A}-HA or pNL4-3/dsRBD2-4-HA immunoprecipitates did not lead to a detectable PCR product using the primer pair for genomic RNA (Figure 6B, lanes 4-5). Using the same immunoprecipitated RNA extracts, RT-PCR was repeated with primer pairs specific for spliced HIV-1 RNAs. In both cases, there was no evidence of a PCR product following 35 cycles (Figure 6C and 6D). To further rule out the presence of HIV-1 spliced RNAs following the RT reaction, PCR was

Figure 6: Selective association of HIV-1 genomic RNA with Staufen-containing complexes. (A) Schematic representation of the three different primer pair combinations. Each primer pair is specific for the amplification of either the 9 kb genomic RNA (primer pair #1) or the spliced 4 kb (primer pair #2) or 1.8 kb (primer pair #3) RNA species, respectively. (B,C,D) 293T cells were transfected with empty vector (lane 1), pNL4-3 (lane 2), pNL4-3/Staufen-HA (lane 3), pNL4-3/Staufen^{F135A}-HA (lane 4) or pNL4-3/dsRBD2-4-HA (lane 5) and cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibodies. Coimmunoprecipitated RNAs were RT-PCR amplified with the primer pair described above. PCR products obtained with primer pair #1 (B), #2 (C) and #3 (D) were analyzed on 0.8% agarose gels. Negative controls included RT-PCR amplification in the absence of RNA (lane 6) or reverse transcriptase (lane 7) and amplification of mock-transfected cells (lane 8). Positive controls included RT-PCR amplification of RNA from pNL4-3-transfected cells before immunoprecipitation (lane 9). Amplification of RNA from cell extracts in the absence of reverse transcriptase did not yield a PCR signal (not shown). (E, F) PCR products obtained with primer set #2 (E) or #3 (F) were analyzed on 6% denaturing acrylamide gels after 2 or 5 additional PCR cycles in the presence of [³²P]dCTP. Products from spliced RNA species are indicated on the right.

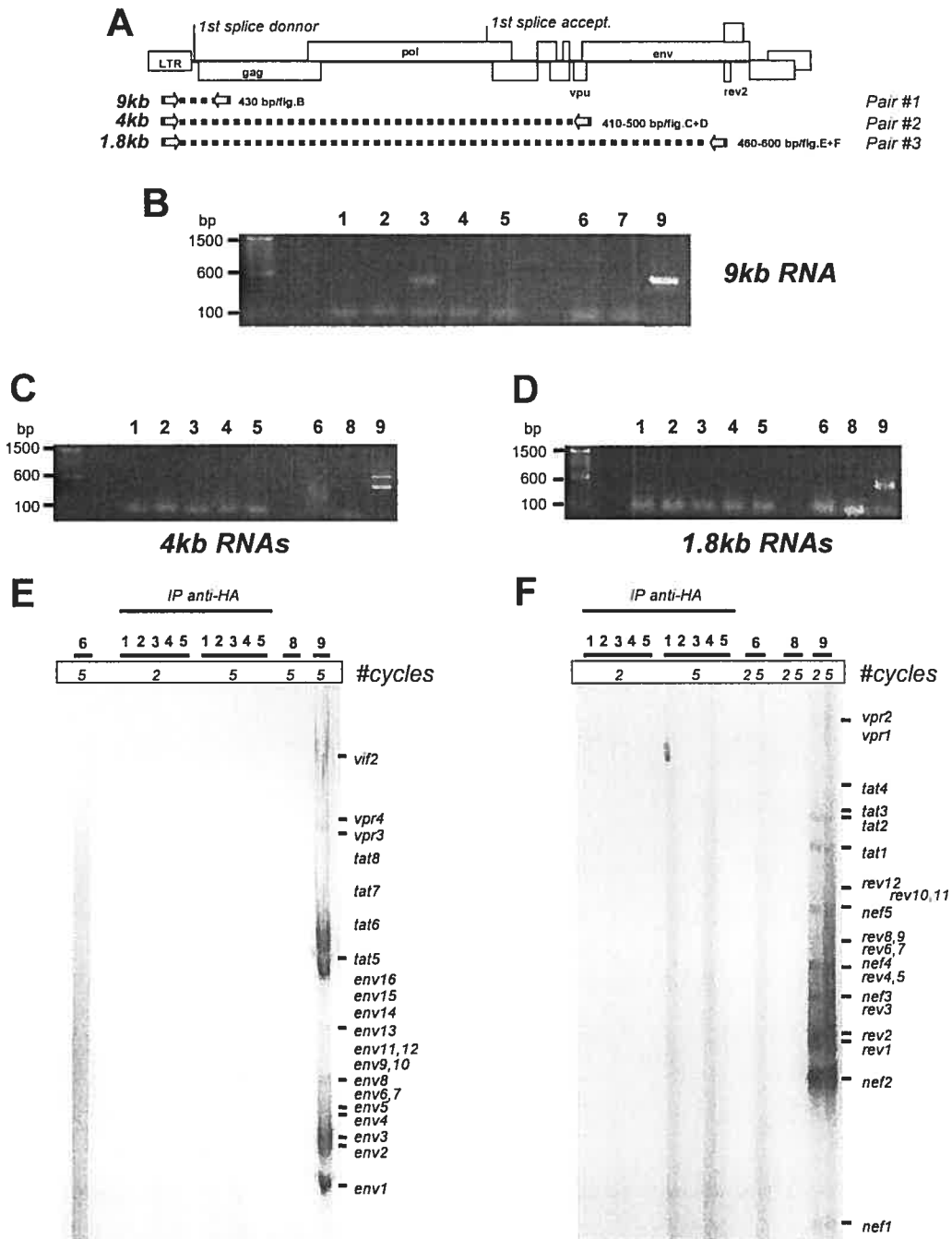


Figure 6

performed and the last two or five PCR cycles were performed in the presence of [³²P]dCTP. PCR products were resolved on 6% polyacrylamide gels. As shown in Figure 6E-F we did not detect an association with the 4 and 1.8 kb RNA species even in these conditions. The expected pattern of spliced RNAs was obtained using cell extracts from pNL4-3-expressing cells using this strategy [Figure 6E-F; (39)]. These results demonstrate that there is selectivity for genomic RNA by Staufen in HIV-1-producing cells supporting a role for Staufen in the selection of genomic RNA for encapsidation. This immunoprecipitation/RT-PCR analysis was also performed for endogenous Staufen during the expression of HIV-1 and the results also demonstrate that HIV-1 genomic RNA selectively co-immunoprecipitates with Staufen (data not shown). Furthermore, similar analyses were performed with the related dsRNA-binding protein TRBP. Whereas Staufen exhibited selectivity for the 9kb RNA as described above, TRBP was found to co-immunoprecipitate with all HIV-1 RNA species (data not shown).

Staufen knockdown by RNA interference generates HIV-1 with compromised infectivity

Staufen expression was targeted by 21-basepair small interfering RNA duplexes as described in Materials and Methods. Cells were either mock transfected (with a non-silencing control RNA duplex) or transfected with pNL4-3 (plus a non-silencing control RNA duplex), or with pNL4-3/Staufen (plus a Staufen siRNA 3084) following the procedure described in Materials and Methods. Staufen siRNA 3084 knocked down Staufen protein expression by 80% (Figure 7A) and *staufen* mRNA levels by almost 60% as shown in RT-PCR analyses (Figure 7B). Staufen siRNA 3084 did not affect either GAPDH protein and RNA levels (Figure 7A-B) or those of actin (data not shown). However, when HIV-1 infectivity was assessed with equal quantities of virus as determined in a p24 ELISA (3, 5), Staufen siRNA 3084 resulted in a two-fold drop in viral infectivity (Figure 7C). In

our previous work, Staufen overexpression also caused a significant decrease in viral infectivity (34). These data demonstrate that an optimum amount of Staufen expression is required to produce fully infectious viral particles.

Figure 7. siRNA-mediated knock-down of Staufen expression results in decreased HIV-1 infectivity. (A) Western Blot analysis of Staufen and HIV-1 structural proteins levels in 293T cells 48h post-transfection. HxBRU plasmid (2 μ g) were transfected in the presence of a non silencing (N-S) siRNA (lane 2) and with 50 nM of Staufen siRNA 3084 directed against Staufen (lane 3). Blots were probed with monoclonal antibodies to Staufen (9E9) and anti-GAPDH to control for protein loading. (B) RT-PCR analysis of intracellular *staufen* mRNA levels 48h after co-transfection of HxBRU and siRNA. RNA was purified from a portion of the samples described for A. 1 μ g of RNA from each sample was reverse transcribed and amplified with oligonucleotides designed for Staufen and GAPDH to control amount of RNA. Western Blot and RT-PCR quantification of intracellular Staufen protein or mRNA seen in A and B was done with a Canberra Packard Alpha-Imager system. The average level of Staufen protein or mRNA present in each sample is given below each lane as a percentage relative to the level found in cells treated with HxBRU and a non-silencing siRNA. Percent standard errors (SE) are given based on the average of three independent experiments. (C) GFP-Based infectivity Assay. The infectivity of virus preparations was determined by infecting CEM-GFP indicator T cells as described in Materials and Methods. Data are expressed as relative infectivity, where HxBRU (treated with a N-S siRNA) infectivity was arbitrarily set to a value of 1. Standard error (SE) is given based on the average of 5 independent experiments.

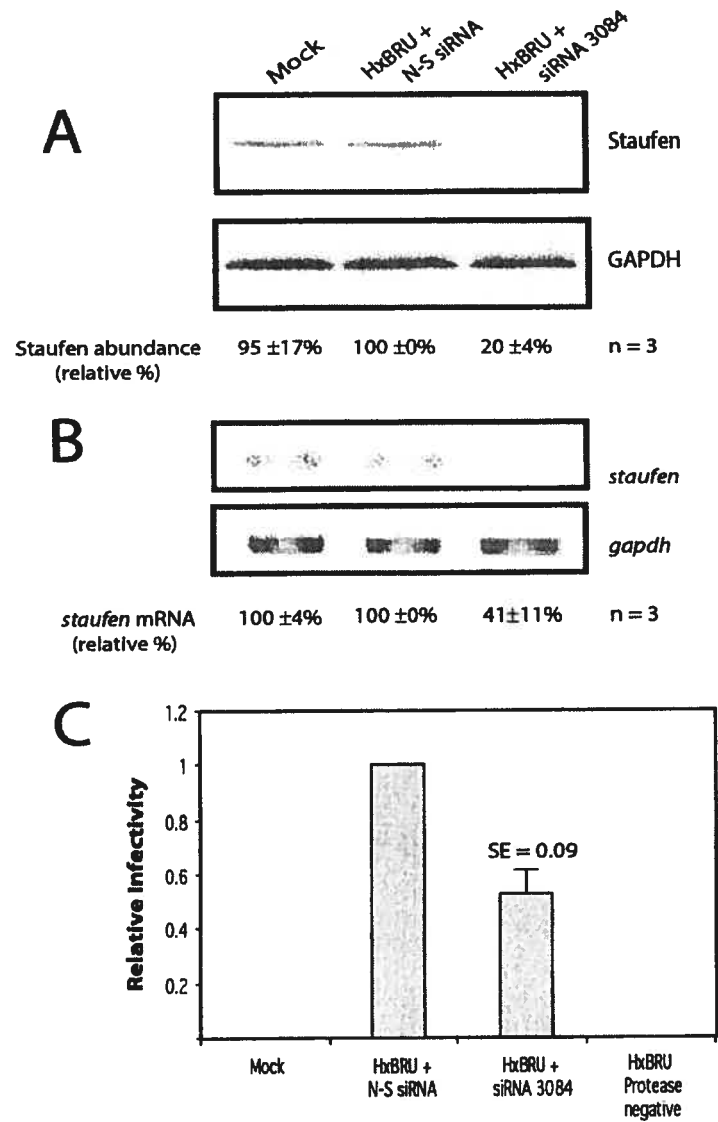


Figure 7

Discussion

In this report, we show that the dsRNA binding protein, Staufen, interacts with the NC domain of HIV-1 pr55^{Gag} during HIV-1 gene expression. This interaction was demonstrated in *in vitro* assays using both proviral and expression constructs and in live cells using BRET analysis, indicating that it is direct and does not require other viral components. Cellular Staufen/pr55^{Gag} complexes only contain HIV-1 genomic RNA but not the spliced HIV-1 RNA species. They are resistant to membrane solubilization by detergent but are sensitive to trypsin proteolysis, two characteristics of the cytoplasmic assembly DRC (26, 27). Taken together, these results suggest that Staufen plays a role during virus assembly and genomic RNA encapsidation. Consistently, our earlier work showed that Staufen overexpression resulted in decreased virus infectivity but at the same time resulted in enhanced genomic RNA packaging in virions (34). siRNA results shown in Figure 7 further support a role for Staufen in virus assembly or at another level that impacts significantly on the infectious potential of virions. More recent work supports the notion that Staufen acts during assembly in that Staufen appears to affect virion morphogenesis (Mouland *et al.*, in preparation). It will be interesting to determine at what stage Staufen is acting in the assembly process since other cellular proteins such as HP68 have been shown to be associated with several Gag assembly intermediates (50).

Confocal imaging analysis of cells transfected with pNL4-3/Staufen-HA provirus did not reveal any apparent changes in Staufen's cellular distribution when compared to cells expressing Staufen alone (not shown). This is in contrast to the dramatic nuclear relocalization of Staufen when influenza virus NS1 protein is expressed (15). Partial colocalization was found between HIV-1 Gag and Staufen suggesting that a proportion of Staufen is associated to pr55^{Gag} at any one time (data not shown). This interaction was substantiated by several assays including yeast two hybrid (34), *in vitro* co-immunoprecipitation and BRET analyses in live cells (Figures 3-5). The interaction appeared to be direct and was consistently found to be in the same order of magnitude than that found for Gag-Gag in these assays indicating that this may reflect a transient

association that is only required for specific steps in the viral replication cycle and/or to allow a fine-tuned regulation of assembly steps (Figure 8). Indeed, dynamic and transient formation and modification of ribonucleoprotein complexes is a major hallmark of RNA transport and localization (41) and this appears to be also the case in the formation of an HIV-1 assembly complex (43, 50).

Immunoelectron microscopy experiments revealed cytoplasmic assembly intermediates representing small Gag oligomers of about 10 molecules (36), likely corresponding to the previously described cytoplasmic DRC (26, 27) and the complexes identified immediately following pr55^{Gag} synthesis (43). Our results favor the idea that Staufen is recruited early by pr55^{Gag} in this cytoplasmic assembly DRC to participate in the first events of NC-mediated Gag multimerization. Consistently, Staufen complexes identified in our fractionation studies have all the characteristics of the cytoplasmic DRC (Figure 2). Furthermore, the Staufen/pr55^{Gag} interaction does not require translocation to the membrane since the interaction of Staufen with Gag occurs when the MA domain is absent (Figures 4-5). Since Staufen likely functions in mRNA trafficking in the cytoplasm (24), it could participate in the translocation of the pr55^{Gag} assembly complexes and/or play a role in the recruitment of genomic RNA to sites of viral assembly.

The results presented in this manuscript point to a role of Staufen in the post-transcriptional steps of the HIV-1 lifecycle (Figure 8). Staufen is likely to be recruited early during viral assembly by newly synthesized pr55^{Gag} via the NC domain (Figure 8, Step 1). Staufen's association with ribosomes (29) and the cosedimentation with ribosomes in sucrose gradients (Figure 2) indicate that a Staufen-pr55^{Gag}-ribosome complex could represent an early assembly complex intermediate in the HIV-1 replication cycle. Cellular mRNAs and/or HIV-1 genomic RNA may then compete with ribosomes to release Staufen-Gag complexes (Figure 8, Step 1). Consistently, a molecular competition is proposed to exist between ribosomal protein L18 and dsRNA for the dsRNA-binding protein, PKR (25), and another that was proposed to exist between ribosomes and genomic RNA^{MLV} for MoMLV Gag that may result in the encapsidation of ribosomes instead of genomic

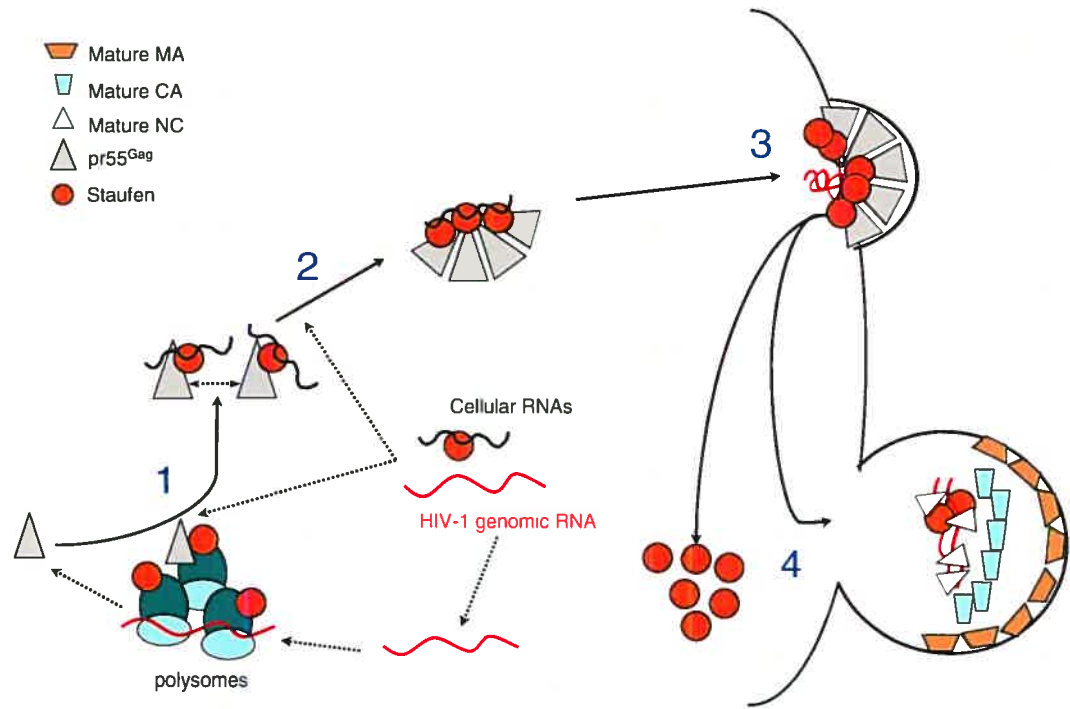


Figure 8

Figure 8: Proposed model for Staufen involvement in the post-transcriptional steps of HIV-1 lifecycle. Following pr55^{Gag} synthesis on polysomes, pr55^{Gag} interacts with Staufen (Step 1). The Staufen-pr55^{Gag}-HIV-1 genomic RNA complex is released from ribosomes and migrates towards the assembly complexes (Step 2). The Staufen/pr55^{Gag}/genomic RNA ternary complexes are assembled as virion particles at the plasma membrane (Step 3). Following viral protease activation, most of the Staufen is excluded from assembly complexes leading to encapsidation of only 2-10 Staufen molecules per virion (Step 4; ref. 34). See text for additional discussion of this model.

RNA^{MLV} (35). Staufen could also contribute to the oligomerization of pr55^{Gag} by recruiting RNA, a component that was shown to be a necessary cofactor for this (8, 11), or likewise promote the association of genomic RNA with pr55^{Gag} (Figure 8, Step 2). Because Staufen is a cytoskeleton-associated protein and is involved in the transport of ribonucleoprotein complexes (24), Staufen may mediate the transport of this assembly complex intermediate toward the plasma membrane, where a ternary assembly complex of Staufen, pr55^{Gag} and genomic RNA is maintained to lead to genomic RNA encapsidation (Figure 8, Step 3). While RNA does not appear to be an important cofactor for the Staufen/pr55^{Gag} association (Figure 3D), genomic RNA is necessary for Staufen incorporation since NC and packaging signal proviral mutants generate virus particles that are devoid of Staufen (34). Because a single point mutation in the Staufen dsRBD3 abrogates both the genomic RNA and pr55^{Gag} association, a dual role for this domain is suggested, as demonstrated for several other related, dsRNA binding proteins such as PKR and TAR-RNA binding protein (12). Knocking down Staufen expression by siRNA will likely disrupt early or subsequent steps of assembly through Staufen's interactions with pr55^{Gag} and RNA and contribute to the generation of poorly infectious virus particles (Figure 7). The contributions of each type of interaction of Staufen during the assembly process will require further analysis.

Sucrose gradient, co-immunoprecipitation and BRET analyses strongly support a preferential association of Staufen to pr55^{Gag}, and not to mature Gag proteins (Figures 2-5). This dictates that during Gag maturation by the viral protease, Staufen may be progressively excluded from Gag assembly complexes by modulation of its affinity for Gag (Figure 8, Step 4). Structural changes in Gag during maturation were previously proposed to explain the partial exclusion of cyclophilin A from HIV-1 (7, 42).

Staufen expression levels appear to be important for HIV-1 replication. For example, Staufen overexpression enhances not only the Staufen copy number within virus particles, but also correspondingly enhances the number of HIV-1 genomic RNA copies packaged into the virion (34). It also results in morphological changes of virus particles (Mouland *et al.*, in preparation) and this could be due to Staufen that is over-represented in

the Staufen-pr55^{Gag}-genomic RNA ternary complex during assembly. Equally so, Staufen knockdown (Figure 7) could also disrupt the composition of this ternary complex at this step of the assembly process. While proof that Staufen and HIV-1 genomic RNA directly interact has been difficult to show experimentally, it is tempting to speculate that genomic RNA dimerization during HIV-1 assembly may play a role in this switch of Staufen to associate with genomic RNA, especially since *Drosophila* Staufen's association with *bicoid* mRNA requires RNA dimerization (16). Staufen's selective association to a complex in which HIV-1 genomic RNA is found (Figure 6), especially when compared to the absence of specificity exhibited by TRBP, is indicative a role of Staufen in the fate of this RNA species during HIV-1 expression. If Staufen participates in the selection of genomic RNA by NC for encapsidation in the context of this Staufen-pr55^{Gag}-genomic RNA complex for instance, we can anticipate that the fine-tuned regulation of the amounts of Staufen associated with fully assembled viral particles could represent a mechanism by which the appropriate number of genomic RNA molecules is packaged into HIV-1 to generate fully infectious viral particles. The experiments presented here and previously (34) support this model while current investigations are underway to study the other putative roles of Staufen during HIV-1 replication.

Acknowledgements

We thank Kristi Bangs for originally identifying efficient siRNA targets for Staufen, Dr. Sylvie Bannwarth for performing the TRBP gradient analysis, Dr. Damian Purcell for DNA constructs and for providing his advice on the RT-PCR analysis, Dr. Éric A. Cohen for his generous supply of materials and antibodies, Dr. Michel Tremblay for ELISA reagents and advice, Dr. Michel Bouvier and Billy Breton for constructs and advice on the BRET assays, the NIH AIDS Reference and Reagent Program and Drs. Spearman and Jacques Corbeil for the anti-MA antibody and CEM-GFP cell line, respectively. We thank Johanne Mercier for her technical contributions to some of these studies and Hugo Dilhuydy, *ing.* for confocal imaging analyses. J.-F.C. and C.M. were supported by studentships from the *Fonds pour la recherche en santé du Québec* (FRSQ) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). A.J.M. is a New Investigator of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and a *Chercheur-boursier* of the FRSQ. This work was supported by grants from the Canadian Foundation for Innovation, the CIHR and the Canadian Foundation for AIDS Research to A.J.M., and from the NSERC to L.D.

Materials and methods

Cell culture and transfection

293T cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagles Medium containing 8% fetal bovine serum and antibiotics (Gibco BRL, Invitrogen). All transfections were performed using the calcium phosphate-mediated co-precipitation method as reported (34) except that a lipofection technique was used for the siRNA experiments described below.

Construction of chimeric proviruses

Staufen-HA cDNA was PCR-amplified from pcDNA3-RSV-hStau-HA (44) using the Pfu polymerase (Stratagene) and sense (5'-GATGCTCGAG ATGAAACTTG GAAAAAACC-3') and antisense (5'-CACATCTAGA TCATTTATTC AGCGGCCGCA CTGAGCAGCGT-3') oligonucleotides. Resulting PCR products were digested with Xho I and Xba I and cloned in pNL4-3/PKR (4) to replace the XhoI/XbaI *pkR* fragment in the *nef* open reading frame. The same approach was used to introduce two Staufen mutants in the *nef* open reading frame: a full-length Staufen protein with a point mutation in dsRBD3 (Staufen^{F135A}) and a C-terminal truncated mutant (dsRBD2-4) lacking the tubulin binding domain (TBD) and dsRBD5. HxBRU provirus (46) was used in the siRNA experiments described below.

Construction of Gag expressors

DNA fragments encoding full-length or different parts of HxB2 Gag polyprotein were PCR-amplified by the Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) using the Rev-independent Gag expressor pCMV55M1-10 plasmid (40) as template. Primer pairs used in the PCR reactions are summarized in Table I. PCR products were digested by KpnI and BamHI and inserted in the KpnI/BamHI cloning sites of pRluc-N1(h) (Packard

Gag mutants	Sense primer (5' → 3')	Antisense primer (5' → 3')
Pr55Gag/Rluc	ACAGGTACCATGGGTGCGAGAGCGTCAG	ACAGGATCCCTTGTGACGAGGGGTCGTT
MA-CA/Rluc	ACAGGTACCATGGGTGCGAGAGCGTCAG	ACAGGATCCCCAAAACCTTGCCTTATG
CA/Rluc	ACAGGTACCATGCCTATAGTGCAGAACAT	ACAGGATCCCCAAAACCTTGCCTTATG
CA-p1/Rluc	ACAGGTACCATGCCTATAGTGCAGAACAT	ACAGGATCCCCAAAATTCCTGGCCTTCC
CA-p6/Rluc	ACAGGTACCATGCCTATAGTGCAGAACAT	ACAGGATCCCTTGTGACGAGGGGTCGTT
MA/Rluc	ACAGGTACCATGGGTGCGAGAGCGTCAG	ACAGGATCCCGTAATTTGGCTGACCTG
p2-p1/Rluc	ACAGGTACCATGGCTGAAGCAATGAGCC	ACAGGATCCCCAAAATTCCTGGCCTTCC
NC/Rluc	ACAGGTACCATGCAGAGAGGCAATTTTA	ACAGGATCCCATTAGCCTGTCTCTCAGT
p6/Rluc	ACAGGTACCATGCTTCAGAGCAGACCAG	ACAGGATCCCTTGTGACGAGGGGTCGTT

Table I: Primer combinations used in PCR amplifications for Gag constructs based on HIV-1 HxB2 pr55^{Gag}

BioScience/PerkinElmer Life Sciences) in frame with the *Renilla reniformis* luciferase coding sequence (1). To construct pCMV-Staufen/YFP, pcDNA3-RSV-Staufen-HA (44) was digested with NotI, treated with the Klenow fragment of DNA polymerase to blunt the extremities and digested with HindIII. The resulting fragment was then inserted in the HindIII/SmaI sites of pCMV-GFP-Topaz (1) in frame with the YFP coding sequence.

Cell fractionation on sucrose gradients

293T cells were homogenized for 1 min in 12.5% sucrose, 10 mM HEPES pH 7.3, 1 mM EDTA and then centrifuged at 1000 x g for 5 minutes. The supernatant was layered onto a continuous 20 to 60% (w/v) sucrose gradient (in 10 mM HEPES pH 7.3, 1 mM MgCl₂) as reported (29). In other experiments to increase stringency, cells were homogenized in a lysis buffer containing detergent (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, pH 7.3) and layered onto a 10 mL continuous 10 to 60% (w/v) sucrose gradient. Both gradients were centrifuged at 31,000 x g for 2.5 h in an SW41 rotor (Beckman-Coulter). Fractions were collected from the top and analyzed by Western blotting for Staufen (using mouse monoclonal anti-HA or anti-Staufen antibodies), CA, MA (from Dr. Spearman, NIH AIDS Reference and Reagent Program), and ribosomal L7 (Novus Biologicals).

Immunoprecipitation and RT-PCR

293T cells were either transfected with Staufen-expressing chimeric proviruses or co-transfected with cDNAs coding for Gag/Rluc and Staufen-HA fusion proteins. Forty hours post-transfection, cells were harvested, washed three times in PBS and lysed [100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 and protease inhibitor cocktail (Roche)]. Staufen and Gag expression was monitored by Western blot analysis using mouse monoclonal anti-HA and anti-CA antibodies, respectively. For immunoprecipitation

analysis, 3-5 mg of cell lysates was precleared with normal rabbit serum and 25 μ L of a 50:50 slurry of protein A-Sepharose (Amersham Biosciences), incubated with rabbit polyclonal anti-CA antiserum (American BioTechnologies; dilution 1/200) for 90 minutes at 4°C and with 25 μ L of a 50:50 slurry of protein A-Sepharose for 1h at 4°C. To immunoprecipitate HA-tagged proteins, lysates were incubated with rat monoclonal anti-HA antibody covalently coupled with agarose beads (Roche Applied Bioscience) for 4h at 4°C. In some cases, stringency of the immunoprecipitation was increased by adjusting the concentrations of NP-40 and SDS to 1% and 0.1%, respectively. Resulting IP-pellets were washed 4 times with lysis buffer and once with PBS. Immunoprecipitates were analysed by SDS-PAGE using mouse monoclonal anti-HA and anti-CA antibodies to detect Staufen and Gag in Western blot analyses. The immunoprecipitation of endogenous Staufen was performed essentially as described above for anti-CA except that a rabbit polyclonal antiserum was used (34). The same rabbit antiserum was used to identify Staufen in Western analyses.

To identify Staufen-associated RNAs, Staufen-HA was first immunoprecipitated with a monoclonal anti-HA antibody as previously described (34). The IP-pellets were incubated with 20 μ g RNase-free DNase I (Invitrogen) for 1h at 37°C and then with 50 μ g proteinase K for 30 min at 42°C. Co-precipitated RNAs were extracted as described (34), dissolved in DEPC-treated water and reverse transcribed with random primers and AMV reverse-transcriptase using First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Bioscience). The resulting cDNAs were PCR-amplified using Taq polymerase (Roche Applied Bioscience) and either of three primer pairs that discriminate between the three HIV RNA size classes. All three sets include the same sense primer (5'-CTGAGCCTGG GAGCTCTCTGGC-3') present in the TAR region of all HIV-1 RNA species (34). Primer pair #1 specifically amplify a 430 bp fragment from the genomic HIV-1 RNA (9 kb) since the antisense primer (5'-TCCAGTGATTTTTTCTCCATGCTTGCCCATACTATATGT TT-3') is located in the *gag* gene. Primer pair #2 preferentially amplify PCR-fragments of 410-500 bp from the spliced 4 kb HIV-1 RNA species since the antisense primer (5'-

TCATTGCCACTGTCTTCTGCTCT-3') hybridizes in the region of the *vpu* gene. This region is absent in spliced 1.8 kb HIV-1 RNA species. Primer pair #3 preferentially amplify 460-600 bp fragments from the spliced 1.8 kb RNA species, the antisense primer (5'-CCGCAGATCGTCCCAGATAAG-3') being localized in the second exon of the *rev* gene. Amplification from genomic and 4kb spliced RNAs is unlikely in our conditions due to the length of the product. RT-PCR products were analyzed on 0.8% agarose gel. When necessary and to enhance the sensitivity of detection, PCR products were submitted to two or five additional PCR cycles in the presence of 10 μ Ci of [α -³²P]dCTP as described (39). Labeled PCR products were resolved on 6% denaturing polyacrylamide gels and detected by autoradiography.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) analysis

293T cells (2X10⁶) were co-transfected with cDNAs coding for Staufeu/YFP and different Gag/Rluc fusion proteins. Forty hours post-transfection, cells were washed in PBS, collected in 1 mL of PBS containing 5 mM EDTA and then diluted to 10⁶ cells/mL. Coelenterazine (Molecular Probes) was added at a final concentration of 5 μ M. Luminescence and fluorescence were quantitated with a Fusion α -FP apparatus (Perkin Elmer-Canberra Packard BioScience). Three measures were obtained: first, light emits at 475-480 nm by Rluc; second, emission fluorescence at 525-530 nm without excitation due to energy transfer from Rluc to YFP; third, emission fluorescence at 525-530 nm after excitation at 485 nm to measure total expression of YFP fusion proteins. "BRET ratio" was defined as [(emission at 510-590nm)-(emission at 440-500nm)xCf]/(emission at 440-500nm) where Cf corresponds to (emission at 510-590nm)/(emission at 440-500nm) for Rluc-fused Gag mutant expressed alone in the same experiments, as previously described (1). To ensure that the BRET ratios reflect a real interaction between fusion proteins, dose-response assays were performed for each tested protein. 293T cells were co-transfected with constant amounts of different Gag/Rluc fusion proteins and increasing concentrations

of either Staufen/YFP or YFP alone. At each concentration the BRET ratios were determined as described above and plotted as a function of the ratio of “total YFP activity after excitation/total *Rluc* activity”. These curves allow us to compare BRET ratios obtained with Staufen/YFP (due to specific interaction with *Gag/Rluc*) and YFP alone (control) at the same expression levels. In these conditions, whereas BRET ratios linearly increase with YFP concentrations, they more rapidly increase and eventually saturate as the expression level of Staufen/YFP increases, reflecting a specific interaction between Staufen and *Gag*.

siRNA Knock-down: Transfections, Western Blot and RT-PCR Analysis

Four small interfering (si) double-stranded 21-basepair RNAs to a selected region of Staufen cDNA were chosen and tested for Staufen knock-down efficiency in preliminary experiments. The duplex siRNA 3084 (5'-AAATAGCACAGTTTGGAAACT-3') was determined to produce the most significant knockdown of Staufen gene expression and was chosen for the experiments presented in this manuscript [purchased from Qiagen-Xeragon (Germantown, MD)]. A control non-silencing (N-S) siRNA (catalog #1022076: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3') was purchased from Qiagen-Xeragon and included in either mock or HxBRU (vpr+, vif+, nef-, vpu-)-transfected cells. 293T cells were trypsinized and plated in 6 well plates at 2×10^5 cells per well for 12-16h before transfection. Transfections were performed using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) with siRNA at a final concentration of 50 nM. Cells were either transfected with N-S siRNA (mock or HxBRU) or Staufen siRNA 3084. At 24 hr, cells were mock-transfected (KSII with N-S siRNA), or transfected with HxBRU (HxBRU+N-S-RNA), or HxBRU (HxBRU+Staufen siRNA 3084). 24 hours later, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in NP-40 buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40). Virus was pelleted by ultracentrifugation of supernatants. Cytosolic extracts quantitated for protein by the micro-Bradford assay and Staufen and

GAPDH were assessed by Western Blot analysis using a mouse monoclonal Staufen antibody (9E9) as described above and a GAPDH antibody (Research Diagnostics, Inc.) Actin was also identified using an anti-actin antibody (not shown). The other half of cellular extract was treated with urea buffer and phenol-chloroform-isoamyl alcohol to extract cytosolic RNA (33). RNA was precipitated with ethanol and glycogen carrier (Roche). The RNA pellets were resuspended in DEPC-treated water and quantitated by OD. 1 µg of RNA from each sample was used in RT-PCR analysis using the Superscript One-Step RT-PCR Kit with Platinum Taq (Invitrogen). Either *staufen* mRNA (to produce a 337 bp PCR product: Sense: 5'-aatctagaTTTACCAGGGCAGCTCCGAA-3'; antisense: 5'-aatctagaCAACTCAGACAGCAACTTTAAGATGT-3') or *gapdh* RNA exactly as described in reference (23) was specifically amplified as described previously (34).

HIV-1 Infectivity Assay

293T cells were treated with a N-S siRNA (Mock or HxBRU alone) or treated with Staufen siRNA 3084 as described above. Virions produced from 293T cells were collected, filtered and pelleted by ultracentrifugation. 8×10^5 cells CEM-GFP cells (18) were infected with equivalent amounts (25 ng) of virus as determined by p24 ELISA (3, 5) in the presence of 10 µg/ml of Polybrene (Sigma-Aldrich) and in a final volume of 200 µl of culture medium. 3h post-infection, CEM-GFP cells were resuspend in 10 ml of fresh medium (RPMI, 10% FBS and 500 µg/ml G418) and incubated for 48 hours. Cells were then pelleted, washed two times with PBS and fixed in 1% formaldehyde in PBS. 10^5 viable cells were then transferred to a 96-well plate. Fluorecence was measured using an Fusion-Alpha Reader Apparatus (Perkin-Elmer Life Sciences) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Data are expressed as relative infectivity where wild-type HIV-1 infectivity (HxBRU treated with a N-S siRNA) was arbitrarily set to a value of 1.

References

1. Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3684-9.
2. Bachand, F., X. J. Yao, M. Hrimech, N. Rougeau, and E. A. Cohen. 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J Biol Chem*. 274:9083-91.
3. Battisti, P. L., A. Daher, S. Bannwarth, J. Voortman, K. W. C. Peden, J. Hiscott, A. J. Mouland, R. Benarous, and A. Gatignol. 2003. Additive activity between the TRBP and Cyclin T1 on HIV-1 expression and viral production in murine cells. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 19:767-781.
4. Benkirane, M., C. Neuveut, R. F. Chun, S. M. Smith, C. E. Samuel, A. Gatignol, and K. T. Jeang. 1997. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J*. 16:611-24.
5. 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.
6. 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.
7. Bristow, R., J. Byrne, J. Squirell, H. Trencher, T. Carter, B. Rodgers, E. Saman, and J. Duncan. 1999. Human cyclophilin has a significantly higher affinity for HIV-1 recombinant p55 than p24. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 20:334-6.
8. 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.
9. Cimarelli, A., and J. L. Darlix. 2002. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 59:1166-84.
10. 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.
11. 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.
12. Daher, A., M. Longuet, D. Dorin, F. Bois, E. Segeal, 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. *Journal of Biological Chemistry*. 276:33899-905.
13. De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers. 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science*. 279:384-8.
 14. Dorfman, T., A. Bukovsky, A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger. 1994. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 68:8180-7.
 15. Falcon, A. M., P. Fortes, R. M. Marion, A. Beloso, and J. Ortin. 1999. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Research*. 27:2241-7.
 16. 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-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO Journal*. 16:1751-8.
 17. 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.
 18. Gervais, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 94:4653-4658.
 19. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*. 8:673-80.
 20. 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.
 21. Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist. 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3099-104.
 22. Khorchid, A., R. Halwani, M. A. Wainberg, and L. Kleiman. 2002. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol*. 76:4131-7.
 23. Kobinger, G. P., A. J. Mouland, J. P. Lalonde, J. Forget, and E. A. Cohen. 1997. Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 VPU gene. *Gene Ther*. 4:868-74.
 24. 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.

25. Kumar, K. U., S. P. Srivastava, and R. J. Kaufman. 1999. Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Molecular & Cellular Biology*. 19:1116-25.
26. Lee, Y. M., B. Liu, and X. F. Yu. 1999. Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol*. 73:5654-62.
27. 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.
28. Liu, B., R. Dai, C. J. Tian, L. Dawson, R. Gorelick, and X. F. Yu. 1999. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol*. 73:2901-8.
29. Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen- ribosome association. *Biochem J*. 365:817-24.
30. Mammano, F., A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger. 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol*. 68:4927-36.
31. Morikawa, Y., D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones. 2000. Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J Virol*. 74:16-23.
32. Morikawa, Y., W. H. Zhang, D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones. 1998. Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. *J Virol*. 72:7659-63.
33. Moulant, A. J., M. Coady, X. J. Yao, and É. A. Cohen. 2002. Hypophosphorylation of Poly(A) Polymerase and Increased Polyadenylation Activity are Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Expression. *Virology*. 292:221-230.
34. Moulant, 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. *J Virol*. 74:5441-51.
35. Muriaux, D., J. Mirro, K. Nagashima, D. Harvin, and A. Rein. 2002. Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *Journal of Virology*. 76:11405-13.
36. Nermut, M. V., W. H. Zhang, G. Francis, F. Ciampor, Y. Morikawa, and I. M. Jones. 2003. Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology*. 305:219-27.
37. 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.
38. Ott, D. E. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Reviews in Medical Virology*. 12:359-74.

39. 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.
40. Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol.* 71:4892-903.
41. St Johnston, D. 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell.* 81:161-70.
42. Tang, C., Y. Ndassa, and M. F. Summers. 2002. Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein. *Nat Struct Biol.* 9:537-43.
43. 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.
44. Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers. 1999. Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 19:2220-30.
45. Wilk, T., B. Gowen, and S. D. Fuller. 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol.* 73:1931-40.
46. 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. *J Virol.* 72:4686-93.
47. Zabransky, A., E. Hunter, and M. Sakalian. 2002. Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association. *Virology.* 294:141-50.
48. Zhang, W. H., D. J. Hockley, M. V. Nermut, Y. Morikawa, and I. M. Jones. 1996. Gag-Gag interactions in the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 p24 capsid antigen are essential for Gag particle assembly. *J Gen Virol.* 77:743-51.
49. Zhang, Y., and E. Barklis. 1997. Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J Virol.* 71:6765-76.
50. 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.

ARTICLE 2 : The host protein Stau1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55^{Gag} multimerization

Mise en contexte

Le fait que Stau1 interagisse avec le domaine NC de pr55^{Gag} suggérait que Stau1 influençait des processus viraux qui dépendent de NC. L'assemblage viral, dont la multimérisation de pr55^{Gag} est l'étape-clé, est en partie contrôlé par ce domaine. Nous avons donc voulu dans cette étude évaluer l'influence de Stau1 dans cette étape critique du cycle de réplication du VIH-1.

Ce manuscrit est en révision pour une re-soumission prochaine dans *Journal of Virology*.

Numéro de référence de la première soumission : JVI01499-06

Note : Contribution(s) des auteurs :

LCC: Optimisation de l'ARN interférence sur l'expression de Stau1 via l'utilisation d'ARN en épingle à cheveux (shRNA). Développement et optimisation de l'essai BRET pr55^{Gag}/pr55^{Gag}. Fractionnements cellulaires. Écriture du manuscrit.

LA: Détermination de la distribution cellulaire de pr55^{Gag} par microscopie à fluorescence (non montrées). Conseils sur les approches expérimentales et sur l'interprétation des données.

CF: Construction et caractérisation de (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA.

AJM: Supervision générale et écriture du manuscrit.

LDG: Supervision générale et écriture du manuscrit.

The host protein Staufen1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55^{Gag} multimerization

Laurent Chatel-Chaix^{1,2}, Levon Abrahamyan², Céline Fréchina¹, Andrew J. Mouland^{2,3,4*} and Luc DesGroseillers^{1*}

From ¹The Département de biochimie, Université de Montréal; ²HIV-1 RNA Trafficking Laboratory, Lady Davis Institute for Medical Research-Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital; Departments of ³Microbiology & Immunology and ⁴Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

***Correspondent footnote:**

Dr. Luc DesGroseillers,

Département de biochimie, Université de Montréal, P.O. Box 6128 Centre Ville, Montréal, Qc, Canada. H3C 3J7. Phone : 514-343-5802. Fax : 514-343-2210. Email :

[REDACTED]

and

Dr. Andrew J. Mouland,

Lady Davis Institute for Medical Research, 3755 Côte-Ste-Catherine Road, Montréal, Québec Canada. H3T 1E2. Phone : 514-340-8260. Fax : 514-340-7502. Email :

[REDACTED]

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires the sequential activities of virus-encoded proteins during replication. As an obligate parasite, the activities of several host cell proteins and machineries are critical to the completion of virus assembly and the release of fully infectious virus particles from cells. One of these proteins, the double-stranded RNA-binding protein Staufen1 (Stau1), selectively associates with the HIV-1 genomic RNA and the viral precursor Gag protein, pr55^{Gag}. In this report, we tested whether Stau1 modulates pr55^{Gag} assembly using a new pr55^{Gag} oligomerization assay based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in both live cells and extracts after cell fractionation. Our results show that both the over-expression and knockdown of Stau1 increase the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET levels, suggesting a role for Stau1 in enhancing pr55^{Gag} oligomerization during assembly. Although we show that Stau1 and pr55^{Gag} interact in both cytosolic and membrane compartments, this effect of Stau1 on pr55^{Gag} oligomerization was only observed in membranes, a cellular compartment in which pr55^{Gag} assembly primarily occurs. Consistently, membrane-associated detergent-resistant pr55^{Gag} complexes were formed when Stau1 expression levels were modulated. Furthermore, expression of Stau1 harbouring a vSrc myristylation signal lead to a 6.5-fold enrichment in membranes and a corresponding enhancement in the Stau1-mediated effect on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET demonstrating that Stau1 acts on assembly when targeted to membranes. Our results indicate that Stau1 influences HIV-1 assembly by modulating pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interactions, a key event that drives virus assembly, as shown in a live cell interaction assay. This likely occurs when Stau1 interacts with membrane-associated assembly intermediates.

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assembly is a process that is defined as the formation of new infectious viral particles. Multimerization of approximately 2-5 thousand copies of the main structural protein pr55^{Gag} in the cell is believed to be the driving force behind virus assembly and pr55^{Gag} expression alone is sufficient for the formation and release of virus-like particles (VLPs) from cells (12, 29). pr55^{Gag} is a modular protein composed of distinct functional domains that are matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), p6 and two spacer peptides (p2 and p1) (29). While many details surrounding the process of HIV-1 assembly are unclear, recent published work supports the idea that it is tightly regulated in time and space (12, 29, 38) and moreover, depends not only on virus-encoded proteins but also on the activities of cellular co-factors (12, 16).

pr55^{Gag} assembly is believed to be initiated in the cytosol by the formation of detergent-resistant assembly complexes (22). The molecular determinant responsible for some of these early pr55^{Gag} assembly events likely resides in the NC domain. Indeed, NC has been shown to be the minimal pr55^{Gag} sub-domain required for self-association (36). Consistently, replacement of NC by a heterologous dimerization domain, such as a leucine zipper or another zinc finger motif can reproduce the first steps of pr55^{Gag} assembly (25, 37). Thus, NC dimerization likely serves to initiate the assembly of complete capsids, although this is a multi-step mechanism that involves other pr55^{Gag} sub-domains such as MA, CA and p2 (5, 17). Following the initial assembly events, pr55^{Gag} complexes are directed to membranes where most of the viral assembly presumably takes place (31, 33). However, very little is known about how the spatio-temporal regulation of pr55^{Gag} multimerization is controlled.

In an attempt to better understand viral replication and to discover new therapeutic targets, there is an increasing interest in dissecting the molecular pathways and identifying cellular proteins involved in HIV-1 assembly and/or release (16). For instance, the adaptor

proteins AP-3 and AP-2 and the trans-Golgi network-associated proteins POSH-1 and Rab9 GTPase are known to be important for pr55^{Gag} intracellular trafficking and virus production (1, 3, 8, 27). Moreover, the ATP-binding protein, ABCE1/HP68, associates with specific viral assembly intermediates via its interaction with the NC domain of pr55^{Gag} and is involved in the formation of complete capsids (38). Finally, virus budding and release involve the recruitment of the components of the endosomal sorting complexes (ESCRT) such as Tsg101 and AIP-1, by the p6 domain of pr55^{Gag} (12).

The double-stranded RNA-binding protein Staufen1 (Stau1) (24, 35) is another host protein shown to interact with pr55^{Gag} (6). The *Stau1* gene encodes several isoforms by differential splicing giving rise to 63 and 55 kDa proteins that differ at their amino terminus (35). At least a portion of Stau1 can be purified in ribonucleoprotein complexes that contain ribosomes (4, 23, 34). Recent studies indicate that Stau1 is involved in various cellular processes related to RNA such as translation of a population of repressed mRNAs (11), degradation of specific mRNAs when bound in their 3'UTR (20) and dendritic transport of RNA granules in neurons (19). During HIV-1 expression, Stau1 coprecipitates in a complex that contains the 9 kb genomic RNA and associates with the NC domain of pr55^{Gag} (6). Stau1 is also selectively encapsidated into HIV-1 particles (26). The biological relevance of these interactions is highlighted by the fact that both Stau1 over-expression or Stau1 depletion using RNA interference (RNAi) lead to impaired infectivity of neosynthesized viral particles (6, 26). Thus, Stau1 may be an important cofactor for viral replication and be involved in replication steps that depend on NC functions such as pr55^{Gag} assembly.

In this report, we evaluated how Stau1 expression levels influence pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction and therefore HIV-1 assembly. Our proximity-based interaction assay that relies on bioluminescence resonance energy transfer (BRET) allowed us to study this in both live cells and in extracts after cell fractionation. Our results show that 1) Stau1 and pr55^{Gag} interact in both membrane-associated and cytosolic complexes, 2) Stau1 over-expression and depletion by RNAi modulate pr55^{Gag} multimerization and 3) these treatments to

modulate Stau1 expression levels promote an accumulation of detergent-resistant pr55^{Gag} complexes in membranes likely as a consequence of enhanced pr55^{Gag} multimerization. These results demonstrate that Stau1 participates in HIV-1 assembly and may represent a potential target for intervention because it impacts on this critical process.

Experimental procedures

Cell culture and reagents

Human embryonic kidney fibroblasts (293T) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (Multicell). Transfections were carried out using either Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) or calcium phosphate precipitation method. For RNA interference experiments, cells were transfected once with the silencing plasmid and again 16 hours later with the pr55^{Gag} expressor and the silencing or non-silencing control plasmid. For Western blots, mouse, rabbit and goat HRP-coupled secondary antibodies were purchased from Dako Cytomation and signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences). Signals were detected with a Fluor-S MultiImager apparatus (Bio-Rad) and quantitated with the Quantity One (version 4.5) software (Bio-Rad).

Plasmid construction

The construction of pCDNA3-RSV-Stau1⁵⁵-HA, pCDNA3-RSV-Stau1^{F135A}-HA, pCMV-pr55^{Gag}-Rluc, pCMV-NC-Rluc, silencing sh1 and non silencing (NS) RNAs-expressing plasmids were reported before (6, 11, 26, 35). pCMV-Myc-TRBP2 plasmid was kindly provided by Dr Anne Gatignol. The protease-defective HIV provirus HxBRU PR- and the Rev-independent pr55^{Gag} expressor were previously described (26, 32). To construct the pCMV-NC-p1-YFP plasmid, pr55^{Gag} cDNA was PCR-amplified from the Rev-independent pr55^{Gag} expressor using the 5'-ACAGGTACCATGCAGAGAGGCAATTTTA-3' sense primer and the 5'-ACAGGATCCCCTCCAAAATTCCTGGCCTTCC-3' antisense primer with the Pfu Turbo (Stratagene). PCR products were purified, digested with *Bam*HI and *Kpn*I restriction enzymes (Fermentas) and cloned into *Bam*HI/*Kpn*I-digested pCMV-GFP-Topaz. The same

strategy was used to construct pCMV-pr55^{Gag}-YFP with the 5'-ACAGGTACCATGGGTGCGAGAGCGTCAG-3' sense primer and 5'-ATCAGGATCCCCACCGCCACCTCCTCCTTGTGACGAGGGGTCGTT-3' antisense primer. To construct the (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA expressor plasmid, Stau1⁵⁵-HA coding sequence was PCR amplified using sense 5'-GATGCTCGAGACCATGGGAAGTTCAAAAAGCAAGCCTAAAGGAAAACCTTGGAAAAAACC-3' and antisense 5'-CACATCTAGATCATTATTCAGCGGCCGCACTGAGCAGCGT-3' primers. The vSrc myristylation signal was included in the sense primer in frame with the 5' extremity of the Stau1⁵⁵ coding sequence. The resulting PCR fragment was purified, digested with *XhoI* and *XbaI* restriction enzymes (Fermentas) and cloned into the *XhoI/XbaI* cassette of pcDNA3.1(+)-Zeo (Invitrogen). For comparative analyses, Stau1⁵⁵-HA cDNA was also sub-cloned into the *KpnI/XbaI* cassette of pcDNA3.1(+)-Zeo.

BRET analyses

BRET experiments in live cells were performed as described before (6). Briefly, proteins of interest were separately fused to *Renilla reniformis* luciferase (*Rluc*) and yellow fluorescent protein (YFP) and expressed in 293T cells using transfection. 48 hours post-transfection, cells were washed and diluted to 10⁶ cells/mL. Coelenterazine H (NanoLight Technology) was added to the cells at a final concentration of 5 μ M. Luminescence (440-500 nm) as well as total and transmitted fluorescence (510-590 nm) emissions were measured using a Fusion α -FP apparatus (Perkin-Elmer). The BRET ratio was defined as [(emission at 510 to 590 nm)-(emission at 440 to 500 nm) x Cf] / (emission at 440 to 500 nm), where Cf corresponds to (emission at 510 to 590 nm) / (emission at 440 to 500 nm) when *Rluc* fused protein is expressed alone. The total YFP activity/*Rluc* activity ratio reflects the relative levels of activity of the two pr55^{Gag} fusion proteins in the cells. The BRET ratio increases with the total YFP activity/*Rluc* activity ratio since more pr55^{Gag}-YFP molecules bind to pr55^{Gag}-*Rluc*. A saturation curve can be drawn when pr55^{Gag}-*Rluc*

becomes saturated by pr55^{Gag}-YFP molecules and an optimal BRET ratio can be calculated at saturation for a specific protein-protein interaction.

Following cell fractionation, the BRET ratio was determined in 90 μ L of each fraction by measuring luminescence after addition of coelenterazine H, as well as total and transmitted fluorescence. BRET ratios in fractions 1, 4, 5 and 6 from the membrane flotation assay were not considered because luciferase activity in these fractions was too low to provide a reliable BRET ratio.

Membrane flotation assays and S100/P100 fractionation

40 hours post-transfection, cells were washed twice with PBS, collected and homogenized in 400 μ L of TE (10 mM Tris pH7.4, 1 mM EDTA pH 8) containing 10% sucrose and proteases inhibitors (Roche) by performing 24 passages through a 23G1 needle or using a Dounce homogenizer. Nuclei were removed by centrifugation at 1,000 x g. 250 μ L of lysate were mixed with 1.25 mL of TE 85.5% sucrose (adjusting the concentration of sucrose at 73%) and deposited at the bottom of a 5 mL centrifugation tube. 2.5 mL of TE 65% sucrose and then 1 mL of TE 10% sucrose were layered at the surface of the lysate. The samples were submitted to ultracentrifugation at 100,000 x g for at least 14 hours at 4°C using either a AH650 rotor (Sorvall) or a SW55Ti rotor (Beckman Coulter). Nine fractions of 550 μ L were collected from the top. An aliquot of each fraction was resolved on 10-12% SDS-containing acrylamide gels and then analyzed by Western blotting using mouse monoclonal anti- α 1 subunit of sodium-potassium (Na-K) ATPase (generously provided by Dr. Michel Bouvier), mouse anti-ribosomal protein L7 (Novus Biologicals), rabbit anti-ezrin (a generous gift of Dr. Gerardo Ferbeyre), mouse monoclonal anti-Stau1 (11), mouse monoclonal anti-HA (ascite #12CA5) and mouse monoclonal anti-HIV-1 CA (26).

For S100/P100 fractionation, 100 μ L of TE 10% sucrose and 100 μ L of fractions 2 and 3 (membranes) from the membrane flotation assay were pooled. 15 μ L of water or of

Triton X-100 20% were added (final concentration of 0.5%). The samples were incubated at room temperature during 5 minutes and then ultra-centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 hour at 4°C . Supernatants (S100) were collected and pellets (P100) were resuspended in 300 μL of TE 28% sucrose (same sucrose concentration than in S100). The same amounts of S100 and P100 were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using mouse anti-CA, mouse anti-Na-K ATPase $\alpha 1$ subunit, mouse anti-Stau1 and mouse anti-HA antibodies.

Immunoprecipitation

Following the membrane flotation assay, 200 μL of TE and 200 μL of membrane fractions 2 and 3 were mixed whereas 200 μL of the last three collected fractions 7, 8 and 9 were pooled. 30 μL of Triton X-100 20% were added (1% final concentration) and samples were incubated 15 minutes at room temperature to release pr55^{Gag} complexes from membranes. Each pool was precleared for one hour with protein A-Sepharose (Amersham) and then, subjected to immunoprecipitation using 60 μL of anti-HA affinity matrix (Roche) for 3 hours at 4°C . The pellets were washed 4 times with TE and analysed by Western blotting using anti-CA and anti-HA antibodies.

For immunoprecipitation of endogenous Stau1 proteins, purified mouse monoclonal anti-Stau1 antibodies were cross-linked to protein A-Sepharose (Amersham) using dimethylpimelimidate (Pierce Biotechnology). Pooled fractions were treated with 0.25% Triton X-100 during 3 minutes and then precleared with 45 μL of protein A-sepharose during 1 hour at 4°C . Stau1 proteins were immunoprecipitated using 45 μL of protein A-crosslinked anti-Stau1 antibodies during 2 hours at 4°C . Immune complexes were washed 3 times with TE and eluted from the resin with 2 volumes of triethylamine 100 mM (pH 10.5). Extracts were neutralized by adding 1/10 volume of Tris 1M (pH 6.8). Purified proteins were analyzed by Western blotting using mouse anti-CA, human anti-ribosomal protein P0 (kindly provided by Dr. M. Reichlin) and mouse anti-Stau1 antibodies.

Results

Stau1 over-expression modulates NC-mediated pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction in live cells

We tested a putative role of Stau1 during virus assembly, a step that is partly driven by the NC domain. We used the BRET technology (see Materials and Methods) that allowed us to follow pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interactions in live cells. For these BRET studies, pr55^{Gag} was fused to either *Rluc* or YFP (Fig. 1A). Western blot analysis confirmed that the pr55^{Gag}-*Rluc* and pr55^{Gag}-YFP fusion proteins were well expressed in transfected 293T cells and that the proteins migrated at their predicted molecular weight (Fig. 1A). When YFP is in close proximity to *Rluc* ($\leq 100\text{\AA}$) as a consequence of pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction, resonance energy is transmitted from the donor *Rluc* to the acceptor YFP that in turn emits a measurable fluorescence (6). By transfecting constant amounts of plasmids expressing pr55^{Gag}-*Rluc* and increasing amounts of plasmids coding for pr55^{Gag}-YFP in a HIV-1 Rev-independent manner, a saturation curve can be generated and an optimal BRET ratio calculated for a specific interaction (see Materials and Methods). Using this assay, a BRET ratio of about 0.06 at saturation (Fig. 1B) was calculated for the pr55^{Gag}-*Rluc*-pr55^{Gag}-YFP interactions in live cells. We then tested if HA-tagged Stau1⁵⁵ overexpression could alter this ratio by modulating pr55^{Gag} self-interaction. Therefore, Stau1⁵⁵-HA was co-expressed with pr55^{Gag} fusion proteins and a saturation curve was generated (Fig. 1B). In the presence of Stau1⁵⁵-HA, an average of 2.57 (+/- 0.57 S.D; standard deviation)-fold increase in the optimal pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio at saturation was observed (n = 17), suggesting that Stau1 has a positive role in pr55^{Gag} multimerization and then in assembly (Fig. 1B, C). As controls for specificity, expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT), of a Stau1 mutant (Stau1^{F135A}) that does not bind pr55^{Gag} (6) and of TAR RNA-binding protein (TRBP2) (10), a member of the dsRNA-binding protein family to which Stau1 belongs, did not significantly increase the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio at saturation when compared to

mock conditions (empty vector) (Fig. 1B, C, D). These results show that the effect on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction is specific to the overexpression of the wild type Stau1 and suggest that Stau1-binding to pr55^{Gag} may be required to enhance pr55^{Gag} oligomerization.

We previously showed that Stau1⁵⁵ binds the NC domain of pr55^{Gag} (6). Therefore, to determine if the Stau1 effect on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction is mediated by the NC domain, we tested NC-NC self-interaction in the presence or absence of Stau1⁵⁵-HA using the BRET assay. Following transfection of the plasmids, NC-Rluc and NC-p1-YFP fusion proteins were well expressed and migrated at the expected molecular masses on a Western blot (Fig. 1E). In the absence of Stau1⁵⁵-HA, the BRET saturation curve in live cells showed an interaction between NC-Rluc and NC-p1-YFP fusion proteins (optimal BRET = 0.03) (Fig. 1F). Interestingly, dose-dependent increases in the BRET ratio were observed when different concentrations of cDNA coding for Stau1⁵⁵-HA were co-transfected with plasmids coding for the fusion proteins (Fig. 1F). These results show that Stau1⁵⁵-HA modulates NC self-interaction and suggest that the effect of Stau1 on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction occurs during NC-dependent processes.

Stau1 depletion increases pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction in live cells

Our results suggest that Stau1 modulates pr55^{Gag} assembly. To determine if Stau1 is necessary for this function, pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET analysis was performed in cells in which the amount of Stau1⁵⁵ was knocked-down by the expression of a silencing short-hairpin (sh1) RNA (11). An 88% reduction in the amounts of both the 55 kDa and 63 kDa Stau1 isoforms was observed (Fig. 2A). Surprisingly, under these conditions, the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET profile was increased by approximately 2-fold (Fig. 2B) suggesting that pr55^{Gag} assembly is improved when low levels of Stau1 are present. An increase in pr55^{Gag} self-interaction was also observed with a short interfering RNA (siRNA) that targeted a different part of *Stau1* mRNA (not shown), eliminating the possibility of an off-target

effect. As controls, transfection of a non-silencing short hairpin RNA (NS RNA) had no major effect on pr55^{Gag} assembly whereas over-expression of Stau1⁵⁵-HA markedly increased pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratios (Fig. 2B). Thus, Stau1 over-expression or depletion leads to the similar effects on pr55^{Gag} multimerization.

Stau1 does not influence HIV-1 pr55^{Gag} membrane association

Shortly after synthesis, pr55^{Gag} assembles on membranes (7, 31, 33). Therefore, at steady state, most of the pr55^{Gag} is observed within membranes (17, 18, 28). To determine if Stau1 is involved in pr55^{Gag} sub-cellular trafficking, a step that may affect assembly, we first tested whether pr55^{Gag} membrane association is modulated in the presence or absence of Stau1. 293T cells were co-transfected with either Stau1⁵⁵-HA or the silencing sh1 RNA expressor and the protease-defective HxBRU provirus. This provirus only generates the unprocessed species of pr55^{Gag} and therefore facilitates the interpretation of results (17, 28, 33). As compared to endogenous Stau1 in control cells (mock, empty vector or NS RNA), Stau1⁵⁵-HA was over-expressed 5-fold whereas the sh1 RNA expressor knocked-down the expression of Stau1 by 65% (Fig. 3A). Cell extracts were then fractionated by the membrane flotation assay in order to separate membrane-free from membrane-associated complexes (17, 33). After centrifugation, nine fractions were collected and their protein content analyzed by Western blotting (Fig. 3B). Antibodies against the α 1 subunit of sodium-potassium (Na-K) ATPase and the ribosomal protein L7 were used as markers for membrane (fractions 2-3; M) and cytosol (fractions 6-9; Cy), respectively. In mock conditions (when an empty vector or the non-silencing RNA plasmid was transfected), about 85% of the total pr55^{Gag} was found in the membrane fractions (Fig. 3B, C) as reported earlier (17, 33). Over-expression of Stau1⁵⁵-HA or down-regulation of endogenous Stau1 expression by sh1 RNA did not significantly modulate pr55^{Gag} membrane association (Fig. 3B, C). Similar conclusions were generated following cytoplasm/membrane

separation on iodixanol continuous gradients (data not shown) (33). Moreover, in 293T cells, the distribution of pr55^{Gag} was primarily at the plasma membrane in protease-defective HxBRU provirus-expressing cells as determined by laser scanning confocal microscopy and there was little change in this when Stau1 was depleted or overexpressed in these conditions (data not shown). Therefore, these results indicate that the effect of Stau1 on pr55^{Gag} multimerization is not attributable to any distinct change in pr55^{Gag} cellular localization or in the impairment of its association with membranes.

Stau1 interacts with pr55^{Gag} within membrane and cytosolic complexes

pr55^{Gag} assembly appears to happen mostly within membranes (7, 31). On the other hand, Stau1 is known to be primarily cytosolic. Consequently, in order to determine whether Stau1 stimulates pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interactions during assembly in membranes or whether it modulates an earlier assembly step in the cytoplasm, we first tested if endogenous Stau1 is at least partly present in membranes. Extracts of non-transfected 293T cells were separated by the membrane flotation assay (17, 33) and each fraction was blotted with anti-Stau1 antibodies (Fig. 4A, left panel). As reported before (23), Stau1 was mainly detected in cytosolic fractions (Cy). However, a proportion of Stau1 representing 2-5% of the total Stau1 protein was found in the membrane compartment (M). Its association with membranes or membrane-associated complexes was confirmed by treating the cell homogenates with detergent prior to fractionation. In these conditions, membranes are solubilized and membrane-associated proteins redistribute in the cytosolic fractions. Stau1 and the membrane-associated control protein, sodium-potassium ATPase were no longer seen in fractions 2-3 (Fig. 4A, right panel) demonstrating that the fraction of Stau1 that redistributed to cytosolic compartment was indeed membrane-associated. Similarly, a fraction of over-expressed Stau1⁵⁵-HA was observed in membrane-fraction (Fig. 4B, left panel). As expected, the signal disappeared following treatment of the cell extracts with

detergent prior to centrifugation (Fig. 4B, right panel, 4C). The proportion of Stau1⁵⁵-HA in membranes vs cytosol was found to be increased several-fold compared to the distribution of endogenous Stau1 (15% vs 2-5% respectively). These results show that cellular Stau1 is present in membrane-associated complexes, in addition to its presence in the cytosol.

To identify the sub-cellular compartment in which Stau1 interacts with pr55^{Gag}, 293T cells were transfected with the Rev-independent pr55^{Gag} expressor in the presence or absence of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA. Membrane and cytosolic fractions were prepared in step gradients as described above. Stau1⁵⁵-HA expression did not change the pr55^{Gag} sub-cellular distribution in the context of VLP production (Fig. 5A). Then, membrane (M) and cytosolic (Cy) fractions were pooled and subjected to immunoprecipitation using monoclonal anti-HA antibodies in analysis for Stau1⁵⁵-HA-containing complexes in each pool. Identification of proteins in the immunoprecipitated complexes was performed by Western blotting. As expected when using the anti-HA antibody, Stau1⁵⁵-HA was immunoprecipitated from both the cytosol and membrane fractions (Fig. 5B). pr55^{Gag} was also successfully co-precipitated with Stau1⁵⁵-HA in each pool (Fig. 5B). As control, pr55^{Gag} was not detected in the precipitate when Stau1⁵⁵-HA was not expressed. We next tested whether endogenous Stau1 is also associated with pr55^{Gag} in membranes and cytosol. 293T cells were transfected with pr55^{Gag} or, as control, a β -galactosidase (β -gal) expressor. Cytosolic and membrane fractions were prepared as before. Anti-Stau1 antibody that was crosslinked to the protein A-Sepharose was added to the pooled fractions to immunoprecipitate endogenous Stau1 (Fig. 5C). To control for immunoprecipitation efficiency, anti-Stau1 and anti-ribosomal protein P0 antibodies were used for Western blotting since Stau1 is a ribosome-associated protein (23). As seen in Fig. 5C, Stau1 and P0 were found in the precipitates from cytosol and membranes. A band of 55 kDa corresponding to pr55^{Gag} was also detected as a co-immunoprecipitating protein in both the membrane and cytosolic fractions when pr55^{Gag} but not β -Gal was expressed (Fig. 5C). Similarly, no specific signal was observed when anti-Stau1 was omitted (Fig. 5C).

These results demonstrate that Stau1 and pr55^{Gag} interact within both membrane-associated and cytosolic complexes.

Stau1 modulates pr55^{Gag} multimerization within membrane-associated complexes

At steady state, most of the pr55^{Gag} is observed within membranes where HIV-1 primarily assembles (7, 18, 31). Because the Stau1-pr55^{Gag} interaction occurs in both membrane and cytosolic compartments, we wanted to determine in which of these compartments Stau1 was exerting its action on the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction that we observed earlier (Fig. 1). Therefore, 293T cells were transfected with pr55^{Gag}-Rluc and pr55^{Gag}-YFP expressors in the presence or absence of the Stau1⁵⁵-HA expressor. Wild type pr55^{Gag} was co-transfected with these plasmids since it is known to rescue the phenotype of tagged versions of pr55^{Gag} that are mislocalized (21). Cell extracts were tested by Western blotting for the expression of the proteins (Fig. 6A) and then separated by membrane flotation assay. Following centrifugation, Western blot analyses showed that pr55^{Gag} fusion proteins were mostly present in fractions with membranes as expected (data not shown). Then, fractions containing membranous or cytosolic materials were used to measure pr55^{Gag}-pr55^{Gag} association by BRET (Fig. 6B). pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction was mainly detected in fractions containing membranes (M) (BRET ratio in fraction 2 = 0.37 +/- 0.05 S.D.; n=5) consistent with the fact that pr55^{Gag} assembles on membranes (7, 31, 33). In the cytosolic fractions (Cy), the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratios were negligible even if Rluc activity was readily detectable. The absence of BRET in cytosolic fractions was not due to the high percentage of sucrose in these samples since Stau1 dimerization was readily detectable by BRET in these fractions (data not shown). As control, no BRET was detected when YFP was expressed with pr55^{Gag}-Rluc (Fig. 6B).

When Stau1⁵⁵-HA was over-expressed, an increase of the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio was observed (1.8-fold +/- 0.37 S.D., n=2) in membrane fractions (M) (Fig. 6B) and there was no detectable enhancement in the cytosolic fractions (Cy). In membrane extracts, no change in *Rluc* activity/total YFP activity ratio was observed showing that the variations in the BRET ratio were not due to changes in the saturation levels of the energy donor by the acceptor (data not shown). Similar conclusions for a Stau1-mediated increase of the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio in membranes were reached after separation of cell extracts on 0-21% continuous iodixanol density gradient (data not shown) (33). These results demonstrate that despite Stau1-pr55^{Gag} interaction in both cytosolic and membrane compartments, the effects of Stau1 on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction is confined to the membrane where pr55^{Gag} assembly primarily takes place. This is consistent with the possibility that Stau1 participates in pr55^{Gag} multimerization.

pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratios were also obtained when endogenous Stau1 was knocked-down by RNAi. As compared to control cells, expression of the sh1 silencing RNA resulted in a 79% decrease in endogenous Stau1 expression in this experiment (Fig. 6C). Following membrane flotation assay (Fig. 6D) or continuous iodixanol density gradients (data not shown), pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratios were calculated in fractions containing membranes or cytosolic materials. When Stau1 was depleted by RNAi, a reproducible 1.47 (+/- 0.1 S.D.)-fold (n = 4) increase in the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio was observed in fractions corresponding to membranes but not in fractions containing cytosolic materials (Fig. 6D). In contrast, no significant effect on the BRET ratio was observed under non-silencing conditions as compared to mock-transfected cells. Altogether, these results confirm that Stau1 modulates pr55^{Gag} assembly and that its effect is observed in the membrane compartments.

Stau1 increases the density of pr55^{Gag}-containing complexes in membranes

Altogether, our BRET results show that Stau1 modulates pr55^{Gag} multimerization and hence assembly within membranes. As a consequence, Stau1 may contribute to the formation of more stable pr55^{Gag}-containing complexes and/or complexes of higher densities. To test this, we transfected cells with the HxBRU PR⁻ provirus in the presence or absence of the Stau1⁵⁵-HA expressor and performed membrane flotation assays as described above. As control, the Stau1 mutant (Stau1^{F135A}) that does not associate with pr55^{Gag} and does not modulate pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction (Fig. 1B, C) was also expressed. Following centrifugation, fractions 2 and 3 were pooled and membrane-associated materials were subjected to high speed centrifugation at 100,000 x g for 1h. The resulting pellets and supernatants were analyzed by Western blotting with anti-CA, anti-Na-K ATPase (as a marker of membranes) and anti-HA antibodies. Proteins detected in the pellet (P100) are insoluble or components of heavy complexes whereas those in the supernatant (S100) are soluble or part of smaller complexes. In mock conditions (empty vector or NS RNA), pr55^{Gag} was mainly found in the P100 fraction (95%) (Fig. 7A). Over-expression of Stau1⁵⁵-HA or Stau1^{F135A}-HA did not change the pattern of sedimentation of pr55^{Gag}-containing complexes. In these conditions, over-expressed Stau1⁵⁵-HA and Stau1^{F135A}-HA were also mostly found in the pellets at levels corresponding to 88% and 93%, respectively. When endogenous Stau1 was depleted with the sh1 RNA (60% reduction, data not shown), no change in the S100-P100 distribution of pr55^{Gag} was observed, 91% of the protein being found in the P100 pellet (Fig. 7A). The membrane marker Na-K ATPase was found almost completely in the P100 fraction (88%) (Fig. 7A), meaning that membranes and membrane-associated proteins were pelleted in the P100 fractions in these conditions.

Therefore, the presence of pr55^{Gag} in the pellets may be due to the density of the pr55^{Gag} assembly complexes (17) or to their association with membranes. To discriminate between these possibilities, we repeated the same experiment in the presence of Triton X-100 to solubilize membranes before the S100-P100 centrifugation. Proteins in the pellets and supernatants were analyzed by Western blotting as above (Fig. 7B) and signals in the P100 fraction were quantified as the percentage of the total signal (S100 + P100) (Fig. 7C). In mock (empty vector or NS RNA) conditions, pr55^{Gag} complexes shifted into the S100 fraction, showing that pr55^{Gag} complexes can not be pelleted under the conditions used here. This might mean that the complexes are not stable or heavy enough to pellet after membrane solubilization. In contrast, when Stau1⁵⁵-HA was over-expressed, about 33% of the pr55^{Gag} complexes were still found in the P100 fractions (Fig. 7B, C), consistent with only a partial solubilization of pr55^{Gag} complexes by detergent due to enhanced multimerization. Similar results were obtained following Stau1 depletion by RNAi where about 24% of pr55^{Gag} was found in the pellet (Fig. 7B, C). Over-expression of Stau1^{F135A}-HA had no effect on pr55^{Gag} sedimentation that was completely found in the S100 fraction following detergent treatment, suggesting that the observed phenotype depends on Stau1 interaction with pr55^{Gag}. This effect parallels the increase in the density/stabilization of pr55^{Gag} complexes in the same conditions, consistent with the observation that Stau1 interacts with pr55^{Gag} in membranes (Fig. 5). Similarly, over-expressed Stau1⁵⁵-HA but not Stau1^{F135A}-HA was partly resistant to solubilization. As controls for membrane solubilization, the Na-K ATPase was always shifted to the S100 fraction. Altogether, these results show that Stau1 over-expression or depletion leads to the formation of detergent-resistant pr55^{Gag} complexes in membranes. These results suggest that pr55^{Gag} multimerization or pr55^{Gag} association with heavy membrane complexes are regulated by Stau1 expression levels in the cell.

Targeting Stau1 to membranes further increases pr55^{Gag} multimerization

Altogether, our results indicate that over-expression or depletion of Stau1 modulate pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction in membranes fractions. To test if membrane-associated Stau1 is responsible for the increase in pr55^{Gag} multimerization, we fused the vSrc myristylation signal to the amino-terminus of Stau1⁵⁵-HA to enhance the targeting to membranes (Fig. 8A; (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA). (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA was expressed in 293T cells and its sub-cellular distribution was analyzed by the membrane flotation assay. As seen in Fig. 8B, the fraction of (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA in the membrane fractions increased several-fold when compared to that of Stau1⁵⁵-HA. This represented about 50% of the total (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA protein (Fig. 8C) and an enrichment of 6.5-fold (+/- 0.47 S.D.; n = 2) in membrane as compared to that of Stau1⁵⁵-HA. As control, treatment of the post-nuclear extract with detergent prior to the membrane flotation assay prevented the presence of (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA in membrane fractions confirming its association with membranes (data not shown). Next, (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA was expressed in 293T cells to test its capacity to improve pr55^{Gag} multimerization as measured by the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET assay in live cells. As compared to Stau1⁵⁵-HA (1.98-fold BRET induction +/- 0.21 S.D.; n=4), (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA further enhanced the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio up to a 3.29 (+/- 0.54 S.D.; n=4) -fold induction (Figs. 8D and 8E). As controls, Western blot experiments showed that Stau1⁵⁵-HA and (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA were expressed to the same levels (not shown). Therefore, this result indicates that the enrichment of Stau1 in membrane compartments substantially enhanced its effect on pr55^{Gag} multimerization, strongly suggesting that Stau1 acts on assembly when it is membrane-associated.

Discussion

Stau1's interaction with pr55^{Gag} via the NC domain (6) suggests that its role is related to the functions of this domain of pr55^{Gag} during HIV-1 replication (6). Multiple functions for NC have been described including pr55^{Gag} dimerization, cellular RNA recruitment and selection of the 9 kb genomic RNA for encapsidation (12). In this report, we studied the potential role of Stau1 in pr55^{Gag}-mediated HIV-1 assembly. We developed a new pr55^{Gag} homo-dimerization assay based on BRET that allowed us to follow virus assembly in live cells. Subtle changes in pr55^{Gag} assembly were documented here with the use of this assay that provide for an exquisitely sensitive measure of protein-protein proximity.

Stau1 levels influence pr55^{Gag} assembly

Our results indicate that Stau1 influences HIV-1 assembly by modulating pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction, a key event during virus assembly. We demonstrate that Stau1 over-expression and Stau1 depletion increase the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio in live cells. The BRET ratio indicates a change in the packing, the proximity and/or the orientation of the pr55^{Gag} molecules in the complexes as a result of Stau1 expression. Moreover, in parallel with a Stau1-mediated enhancement of pr55^{Gag} multimerization, detergent resistant pr55^{Gag}-containing complexes appear in membranes (Fig. 7). This concurs with the observed morphogenesis defects of budding virus particles (Abrahamyan *et al.*, submitted) and the loss of virus infectivity when Stau1 is over- or under-expressed during virus assembly (6, 26). Our results cannot be explained by changes in pr55^{Gag} sub-cellular trafficking that could have influenced its multimerization state. Indeed, both cytoplasmic fractionation assays (Fig. 3) and confocal microscopy analysis (data not shown) indicate that Stau1 expression, while increasing the pr55^{Gag} BRET ratio by about 2-fold in membranes (Fig. 6),

did not change the sub-cellular distribution of unprocessed pr55^{Gag} following proviral expression in 293T cells.

Immunoprecipitation analyses of Stau1 indicates that it interacts with pr55^{Gag} within membranous and non-membranous, cytosolic compartments. Stau1/pr55^{Gag} association may thus occur before pr55^{Gag} association to membranes. Stau1 being mainly associated with ribosomes in the cytosol (11, 23), it is possible that the Stau1-pr55^{Gag} interaction occurs co-translationally or shortly after pr55^{Gag} synthesis, as we have proposed before (6). Nevertheless, despite the evidence for a bona fide interaction between Stau1 and pr55^{Gag} in the cytosolic compartment (this study), the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} interaction as determined by BRET analysis was not detectable in this compartment (Fig. 6B, D). The effect of Stau1 on pr55^{Gag} assembly was only observed in membranes (Fig. 6B). The low levels of pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET signal in the cytosol fractions may indicate that Stau1 interacts with pr55^{Gag} monomers in this compartment before being targeted to membranes where assembly occurs. Alternatively, other viral or cellular co-factors that are only present in membranes and/or are recruited during later steps of virus assembly may be required for Stau1 function on assembly. Finally, the very short transit period of pr55^{Gag} in the cytoplasm following synthesis (33) might not allow us to detect the effect of Stau1 on pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction in the cytoplasm before pr55^{Gag}'s incorporation in membranes. Therefore, we do not exclude the possibility that the primary interaction between Stau1 and pr55^{Gag} occurs in the cytosol. However, the effect of Stau1 on pr55^{Gag} assembly is likely to occur in membranes through a Stau1-pr55^{Gag} complex. This conclusion is strengthened by several experimental data: 1) over-expression or depletion of Stau1 increases the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio in the membrane fractions only; 2) pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio increases proportionally to the amounts of over-expressed Stau1⁵⁵-HA in membranes. As compared to endogenous Stau1 with 2-5% of the total Stau1 protein being found in membranes, Stau1⁵⁵-HA shows 15% of the proteins associated with membranes (Fig. 4) and the myristylated form of Stau1 a further enrichment (Fig. 8). As a consequence, a 2-fold and a 3.5-fold increase in the

pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio is observed following over-expression of Stau1⁵⁵-HA and of (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA, respectively (Fig. 8).

Although detergent-resistant pr55^{Gag} complexes putatively correspond to primary assembly complex intermediates that have been described in the cytosol (22), recent studies show that pr55^{Gag} associates with membranes shortly after its synthesis (31, 33) and that pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction occurs in the membrane compartments (7). This is in agreement with our BRET assay results that demonstrate that the pr55^{Gag}-pr55^{Gag} interaction occurs only in membrane extracts (Fig. 6B, D). The positive effect of Stau1 overexpression on pr55^{Gag} assembly that also occurs within membranes strengthens this conclusion. Since the membrane flotation assay can not discriminate among plasma membrane, late endosomes and other vesicular compartments (data not shown), the membrane sub-compartment in which Stau1 contributes to pr55^{Gag} multimerization remains to be defined. However, considering that Stau1 is packaged into HIV-1 particles and influences virion assembly, the interaction between Stau1 and pr55^{Gag} likely occurs in a membrane compartment that supports assembly such as plasma membrane or late endosomes/multivesicular bodies (29).

Both Stau1 depletion by RNAi and overexpression increase pr55^{Gag} multimerization

One intriguing question that has no obvious answer so far is why do Stau1 depletion by RNAi and Stau1 overexpression cause nearly identical virus morphogenesis and infectivity defects (Abrahamyan *et al.*, submitted) (6, 26) Here we also show that both Stau1 depletion and Stau1 expression increase the pr55^{Gag} BRET ratio in membrane preparations (Fig. 6D). The molecular mechanism by which Stau1 influences pr55^{Gag} assembly is not known. Our results suggest that interaction between Stau1 and pr55^{Gag} is necessary since a Stau1 mutant that does not interact with pr55^{Gag} has no effect on pr55^{Gag}

multimerization. In addition, the stoichiometry of the Stau1-multimerizing pr55^{Gag} complex is crucial for normal HIV-1 assembly. In this context, pr55^{Gag} would recruit the optimal number of Stau1 molecules that is needed for assembly. Depletion or over-expression of Stau1 would change this equilibrium and impair pr55^{Gag} multimerization. Although the resulting phenotypes following Stau1 depletion and over-expression are similar, it is possible that they nevertheless impair different steps during virus assembly. These results also suggest that Stau1 is required for virus assembly since its depletion results in virus morphological defects and reduced infectivity.

The observation that depletion and over-expression of a protein lead to similar defects during HIV-1 replication was also reported for the host protein, TSG101. Modifying the levels of full-length TSG101 leads to two phenotypes. First, it disrupts the cellular endosomal sorting machinery and induces the formation of aberrant endosomal structures. As a result, lysosomal sorting and degradation of the cell surface epidermal growth factor receptor (EGFR) are impaired (2, 9, 15). Second, in the context of HIV-1 particle production, TSG101 depletion or over-expression blocks viral budding and leads to virus-virus tethering (13-15). The relationship between these two phenotypes remains to be fully elucidated but could rely on the importance of precise TSG101's cellular levels for its functions during HIV-1 replication cycle.

Role of Stau1 during HIV-1 assembly

This study raises the question about the role of Stau1 in pr55^{Gag} multimerization. Stau1 likely associates with pr55^{Gag} in the cytosol and is transported to the membrane where assembly occurs. Then, Stau1 may recruit in the complexes scaffolding RNA by its capacity to bind double-stranded RNA molecules. Moreover, Stau1 is likely to play a role in genomic RNA trafficking and packaging since it coprecipitates in a complex that

contains the 9 kb genomic RNA but not the spliced RNA species and is incorporated into HIV-1 particles along with genomic RNA (6, 26). Furthermore, Stau1 knockdown leads to enhanced encapsidation (Abrahamyan *et al.*, submitted). Its association with unprocessed pr55^{Gag} may coordinate this function since in vitro studies suggested that pr55^{Gag} multimerization serves as a signal for specific HIV-1 genomic RNA recognition and packaging (30). Thus, the proposed few Stau1 molecules necessary for pr55^{Gag} assembly may help to sort only two genomic RNA molecules per virion through its action on pr55^{Gag} multimerization.

Moreover, if Stau1 is recruited as a member of ribonucleoprotein complexes instead of as a monomer, other Stau1-associated host proteins will also be recruited and will participate in the regulation of HIV-1 assembly. It remains unclear if the impairment of virus infectivity and morphogenesis observed following depletion and overexpression of Stau1 (Abrahamyan *et al.*, submitted) (6) is a consequence of Stau1-dependent pr55^{Gag} multimerization modulations or defects in other steps of virus assembly. Through its action on pr55^{Gag} multimerization (this study), it is conceivable that Stau1 affects the stoichiometry of pr55^{Gag} molecules in the neosynthesized virus particle which is most likely a critical factor for HIV-1 morphogenesis. Characterization of a Stau1 mutant that interacts with the NC domain of pr55^{Gag} but is unable to stimulate pr55^{Gag} multimerization may help decipher the mechanism of action and the role of Stau1 during virus assembly.

This study highlights the use of BRET as a powerful, fast and technically convenient tool to detect subtle changes in pr55^{Gag} multimerization in live cells. Furthermore, the results shown here unveil a new role for Stau1 in HIV-1 in this process and to our knowledge, Stau1 is the first identified host factor whose expression modulates pr55^{Gag} multimerization. Stau1 could potentially represent a suitable target that would disrupt assembly processes.

Acknowledgments

We thank Louise Cournoyer, Kimberly Hu and Alexandre Desjardins for technical assistance, Karine Boulay for preparing cross-linked antibodies, Drs. Anne Gatignol, George Pavlakis and Éric Cohen for constructs, Drs. Lou Henderson, Robert Gorelick, Michel Bouvier, Gerardo Ferbeyre and M. Reichlin for antibodies and Karine Boulay and Frédérick-Antoine Mallette for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to LDG and grants from the Canadian Institutes of Health Research to LDG and AJM.

References

1. Alroy, I., S. Tuvia, T. Greener, D. Gordon, H. M. Barr, D. Taglicht, R. Mandil-Levin, D. Ben-Avraham, D. Konforty, A. Nir, O. Levius, V. Bicoviski, M. Dori, S. Cohen, L. Yaar, O. Erez, O. Propheta-Meirán, M. Koskas, E. Caspi-Bachar, I. Alchanati, A. Sela-Brown, H. Moskowitz, U. Tessmer, U. Schubert, and Y. Reiss. 2005. The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1478-83.
2. Babst, M., G. Odorizzi, E. J. Estepa, and S. D. Emr. 2000. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1:248-58.
3. Batonick, M., M. Favre, M. Boge, P. Spearman, S. Honing, and M. Thali. 2005. Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2. *Virology* 342:190-200.
4. Brendel, C., M. Rehbein, H. J. Kreienkamp, F. Buck, D. Richter, and S. Kindler. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384:239-46.
5. 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.

6. Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24:2637-48.
7. Derdowski, A., L. Ding, and P. Spearman. 2004. A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* 78:1230-42.
8. Dong, X., H. Li, A. Derdowski, L. Ding, A. Burnett, X. Chen, T. R. Peters, T. S. Dermody, E. Woodruff, J. J. Wang, and P. Spearman. 2005. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* 120:663-74.
9. Doyotte, A., M. R. Russell, C. R. Hopkins, and P. G. Woodman. 2005. Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* 118:3003-17.
10. Duarte, M., K. Graham, A. Daher, P. L. Battisti, S. Bannwarth, E. Segeal, 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.
11. Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-812.
12. Freed, E. O. 2004. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol* 12:170-7.
13. 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.
14. Goff, A., L. S. Ehrlich, S. N. Cohen, and C. A. Carter. 2003. Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol* 77:9173-82.
15. Goila-Gaur, R., D. G. Demirov, J. M. Orenstein, A. Ono, and E. O. Freed. 2003. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* 77:6507-19.

16. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8:673-80.
17. Guo, X., A. Roldan, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang. 2005. Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 79:1803-12.
18. 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.
19. Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-25.
20. Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
21. Larson, D. R., M. C. Johnson, W. W. Webb, and V. M. Vogt. 2005. Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15453-8.
22. Lee, Y. M., B. Liu, and X. F. Yu. 1999. Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol* 73:5654-62.
23. Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365:817-24.
24. 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.
25. McGrath, C. F., J. S. Buckman, T. D. Gagliardi, W. J. Bosche, L. V. Coren, and R. J. Gorelick. 2003. Human cellular nucleic acid-binding protein Zn²⁺ fingers support replication of human immunodeficiency virus type 1 when they are substituted in the nucleocapsid protein. *J Virol* 77:8524-31.
26. 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. *J Virol* 74:5441-51.

27. Murray, J. L., M. Mavrakis, N. J. McDonald, M. Yilla, J. Sheng, W. J. Bellini, L. Zhao, J. M. Le Doux, M. W. Shaw, C. C. Luo, J. Lippincott-Schwartz, A. Sanchez, D. H. Rubin, and T. W. Hodge. 2005. Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol* 79:11742-51.

28. 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.

29. Resh, M. D. 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* 7:84-91.

30. Roldan, A., R. S. Russell, B. Marchand, M. Gotte, C. Liang, and M. A. Wainberg. 2004. In vitro identification and characterization of an early complex linking HIV-1 genomic RNA recognition and Pr55Gag multimerization. *J Biol Chem* 279:39886-94.

31. Rudner, L., S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott. 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* 79:4055-65.

32. Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol* 71:4892-903.

33. 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.

34. 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.

35. Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers. 1999. Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2220-30.

36. Zabransky, A., E. Hunter, and M. Sakalian. 2002. Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association. *Virology* 294:141-50.

37. Zhang, Y., H. Qian, Z. Love, and E. Barklis. 1998. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* 72:1782-9.
38. 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.

Figure legends

Figure 1. Stau1 enhances pr55^{Gag} assembly in live cells. (A) pr55^{Gag}-Rluc and pr55^{Gag}-YFP-expressing plasmids were transfected in 293T cells. 48 hours post-transfection, cells were collected and lysed. pr55^{Gag} fusion proteins were detected by Western blot using anti-CA antibodies. (B) BRET saturation experiments were performed by transfecting 293T cells with constant amounts of pCMV-pr55^{Gag}-Rluc and increasing amounts of pCMV-pr55^{Gag}-YFP. A third plasmid expressing Stau1⁵⁵-HA, Stau^{F135A}-HA or CAT was included in the transfection procedure. Rluc activity as well as transmitted and total YFP activities was measured. BRET ratios were plotted in function of their corresponding “total YFP/Rluc” ratio which allows comparing BRET ratios at the same relative levels of pr55^{Gag} fusion proteins. (C) The value of the optimal BRET ratio was compared to the ratio corresponding to the pr55^{Gag} fusions expressed alone. The BRET induction levels were then determined and are shown in the graph. n represents the number of replicate. (D) pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET saturation experiment in 293T cells which express Stau1⁵⁵-HA or Myc-TRBP2 whose expressions in cells were confirmed by Western blotting using anti-HA and anti-Myc antibodies, respectively (data not shown). (E) NC-Rluc, NC-p1-YFP and YFP were detected by Western blot using anti-NC (left panel) and anti-YFP (right panel) antibodies. (F) BRET saturation experiments in 293T cells expressing NC-Rluc and NC-p1-YFP or YFP. Increasing levels of Stau1⁵⁵-HA expressor were co-transfected. These results were representative of at least two experiments.

Figure 2. Stau1 depletion by RNAi promotes pr55^{Gag} multimerization. pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET saturation curves were obtained in live 293T cells following down-regulation of endogenous Stau1 by RNAi. As controls, the empty vector and a non-silencing RNA were also transfected. (A) Levels of endogenous Stau1 and of pr55^{Gag} fusion proteins were determined by Western blotting using anti-Stau1 and anti-CA antibodies, respectively. Anti-calnexin antibody was used as a loading control. (B) pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratios are plotted in function of the “total YFP/Rluc” ratio.

Figure 3. Stau1 over-expression or depletion by RNAi does not change pr55^{Gag} association with membranes. 293T cells were transfected with plasmids expressing either the empty vector, Stau1⁵⁵-HA, sh1 RNA or the non-silencing (NS) RNA. The next day, cells were transfected with the protease-defective HxBRU PR- provirus. **(A)** An aliquot of each cell extract was analysed by Western blotting using anti-Stau1 antibodies. As loading control, anti-calnexin antibodies were used. **(B)** Cytoplasmic extracts were fractionated by the membrane flotation assay. Nine fractions were collected and analysed by Western blotting using anti-Na-K ATPase, anti-ribosomal protein L7 and anti-CA antibodies. M: membranes; Cy: cytosol. **(C)** pr55^{Gag} signal in each fraction was quantified and plotted as a percentage of total pr55^{Gag} signal in the gradient.

Figure 4. A subset of Stau1 is membrane-associated. Extracts from untransfected cells **(A)** or cells expressing Stau1⁵⁵-HA **(B)** were treated (right panels) or not (left panels) with 1% NP40 to disrupt membranes and then submitted to the membrane flotation assay. Each collected fraction was analyzed by Western blotting using anti-Stau1 antibodies. Distribution of the membrane marker Na-K ATPase is shown to ensure the efficiency of NP40 treatment (M: membranes; Cy: cytosolic). **(C)** Quantification of the percentage of Stau1⁵⁵-HA signal in each fraction of the gradient shown in Fig. 4B.

Figure 5. Stau1 associates with pr55^{Gag} in the cytosol and in membranes. 293T cells were transfected with pr55^{Gag}-expressing plasmid and either pcDNA3-RSV (empty vector) or pcDNA3-RSV-Stau1⁵⁵-HA. Cytoplasmic extracts were prepared and submitted to the membrane flotation assay. **(A)** An aliquot of each collected fraction was analyzed by Western blotting using anti-Na-K ATPase, anti-ribosomal protein L7, anti-CA and anti-HA antibodies. **(B)** Fractions 2-3 (M: membranes) and fractions 7-9 (Cy: cytosolic) were pooled. Triton X-100 was added to release pr55^{Gag} from membranes. Each pool was subjected to immunoprecipitation using anti-HA antibodies. Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting using anti-CA and anti-HA antibodies. **(C)** 293T cells were transfected with pr55^{Gag} or β -galactosidase expressors. Following

membrane flotation assay, fractions were pooled as in A and treated with Triton X-100. Proteins in each pool were immunoprecipitated using protein A-sepharose alone (A) or anti-Stau1 antibodies which were crosslinked to protein A-sepharose (St). Pelleted material was analyzed by Western blotting using anti-CA, anti-ribosomal P0 and anti-Stau1 antibodies. (*: non-specific signals)

Figure 6. Stau1 over-expression or depletion by RNAi increases pr55^{Gag} assembly in membranes but not in the cytosol. (A) 293T cells were co-transfected with pr55^{Gag}-Rluc, pr55^{Gag}-YFP, pr55^{Gag} and Stau1⁵⁵-HA expressors. An aliquot of each cell extract was analyzed by Western blotting for Stau1 and pr55^{Gag} content. As loading control, anti-ribosomal protein L7 antibodies were used. (B) Cytoplasmic extracts were submitted to the membrane flotation assay and pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio was determined in each collected fraction. (C) 293T cells were transfected with the empty vector, the NS or sh1 RNAs-expressing plasmids. The next day, cells were co-transfected with the same plasmids and pr55^{Gag}-Rluc, pr55^{Gag}-YFP and pr55^{Gag} expressors. Cytoplasmic extracts were prepared and analyzed as in A. As loading control, anti-calnexin antibodies were used. (D) Cytoplasmic extracts were submitted to the membrane flotation assay and pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET ratio was determined in each collected fraction. (M: membrane; Cy: cytosol).

Figure 7. Stau1 over-expression or depletion by RNAi induce the formation of detergent-resistant pr55^{Gag} complexes. 293T cells were transfected with the Stau1⁵⁵-HA, Stau1^{F135A}-HA, NS RNA or sh1 RNA-expressing plasmids. The next day, cells were co-transfected with the same plasmids and the protease-defective HxBRU PR- provirus. Membrane-associated proteins were isolated by the membrane flotation assay (fractions 2 and 3) and incubated in the absence (A) or presence (B) of Triton X-100. Samples were centrifuged at 100,000 x g for 1 hour at 4°C. The resulting supernatants (S) and pellets (P) were analyzed by Western blotting using anti-CA, anti-Stau1, anti-HA and anti-Na-K ATPase antibodies. (C) The signals of these proteins in the P100 fraction following Triton

X-100 treatment were plotted as the percentage of the total signal (combined S100 and P100 signals) using the Quantity One software.

Figure 8. Enrichment of Stau1 on membranes increases pr55^{Gag} multimerization. (A) Schematic representation of (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA harbouring the 9 amino acid myristylation signal of vSrc. (B) (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA-expressing plasmid was transfected in 293T cells. The next day, membrane flotation assay was performed. Each fraction was analyzed by Western blotting using mouse anti-HA, anti-L7 or anti-Na-K ATPase antibodies. (C) Quantification of the percentage of (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA signal in each fraction. The result was compared to that obtained with Stau1⁵⁵-HA (Fig. 4B, C). These two gradients were done at the same time. (D) pr55^{Gag}-pr55^{Gag} BRET saturation experiments were performed by transfecting 293T cells with empty vector, Stau1⁵⁵-HA or (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA expressors. Western blot analysis revealed that the expression levels of Stau1⁵⁵-HA and (vSrc)Myr-Stau1⁵⁵-HA were similar in this experiment (data not shown). (E) The induction level of the optimal BRET ratio at the same (total YFP/Rluc) ratio for each condition is shown (n=4).

Figure 1

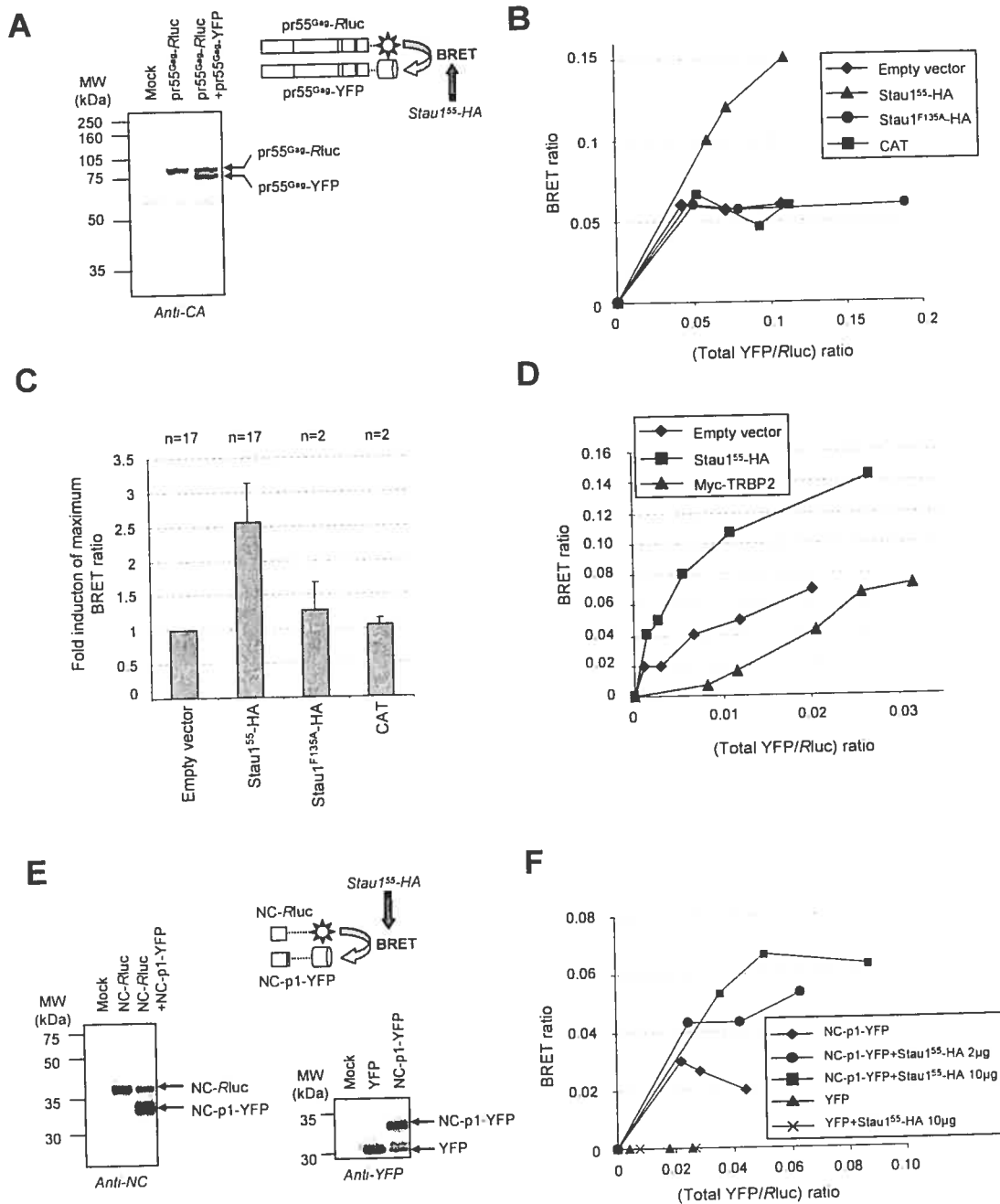


Figure 2

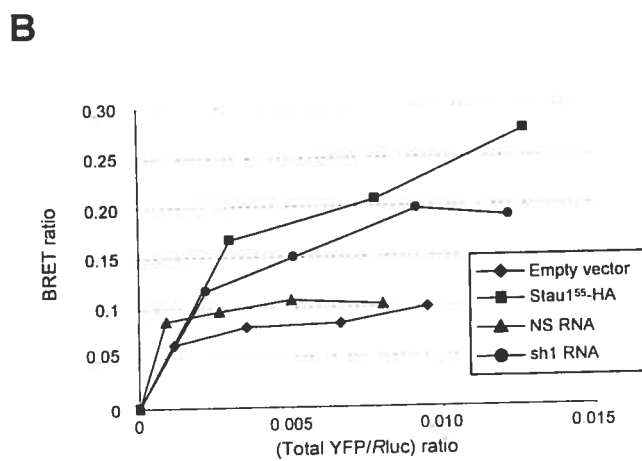
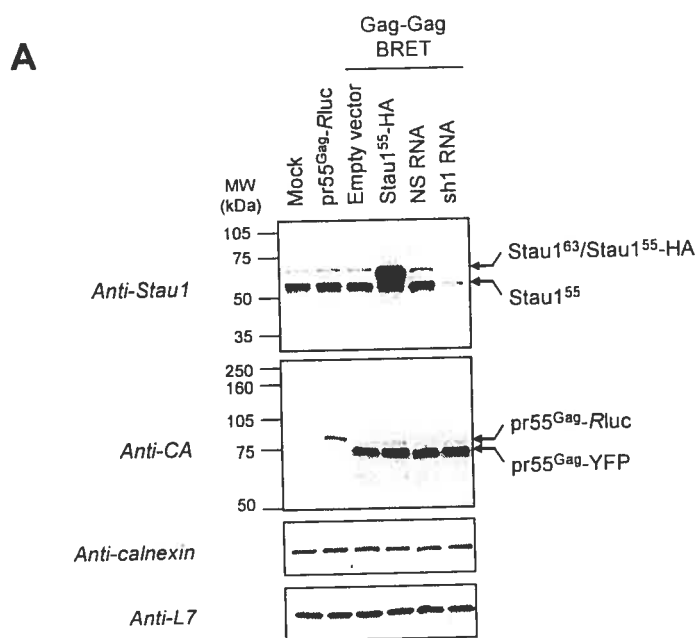


Figure 3

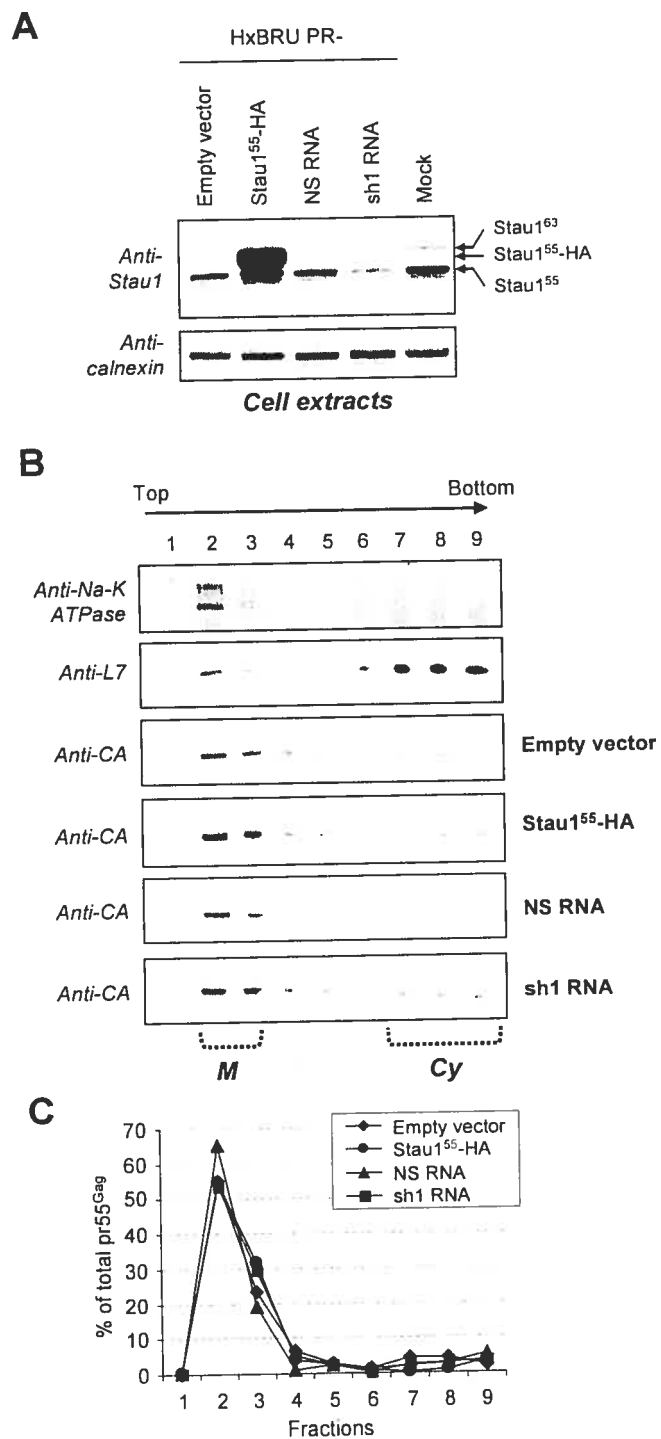


Figure 4

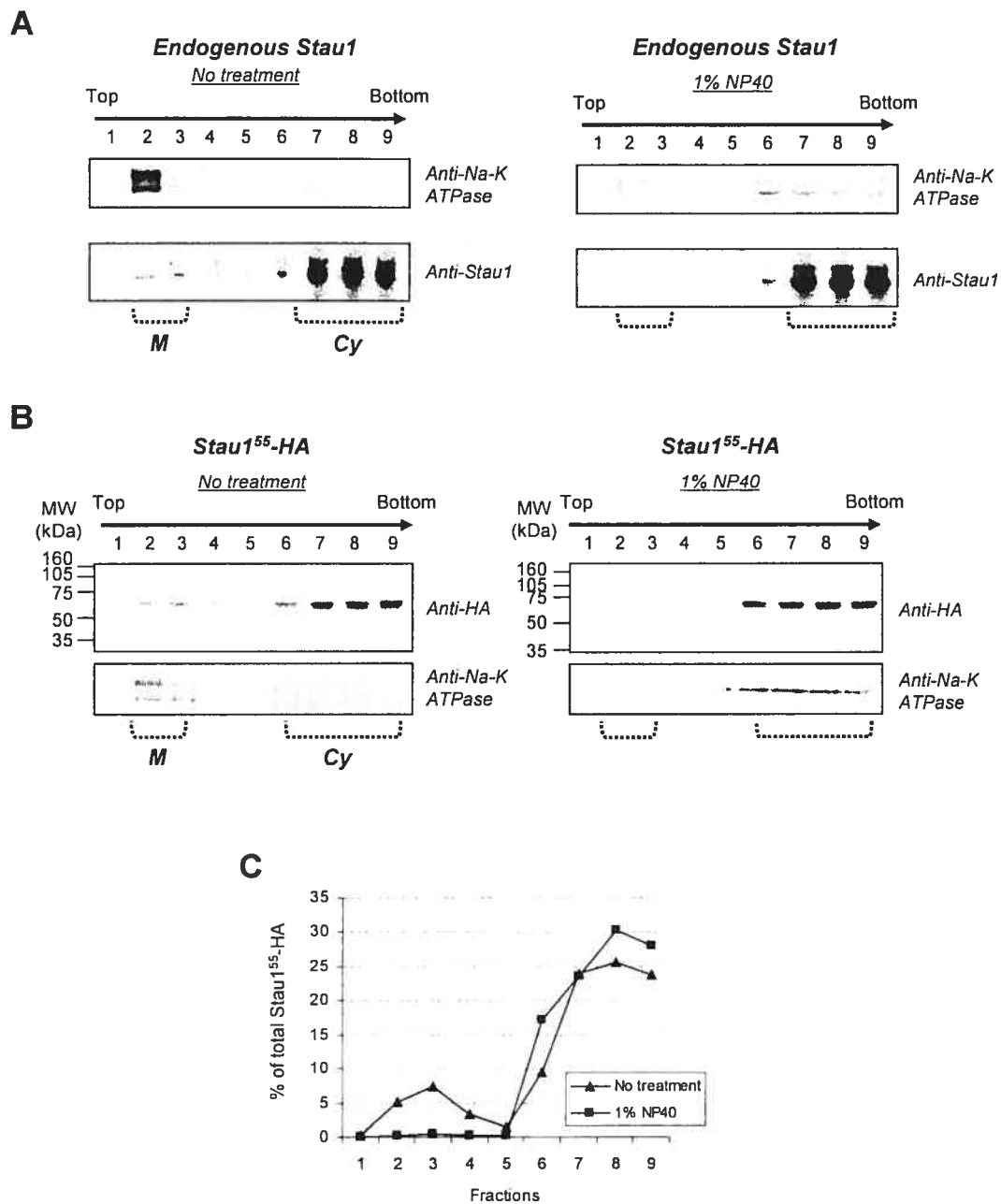


Figure 5

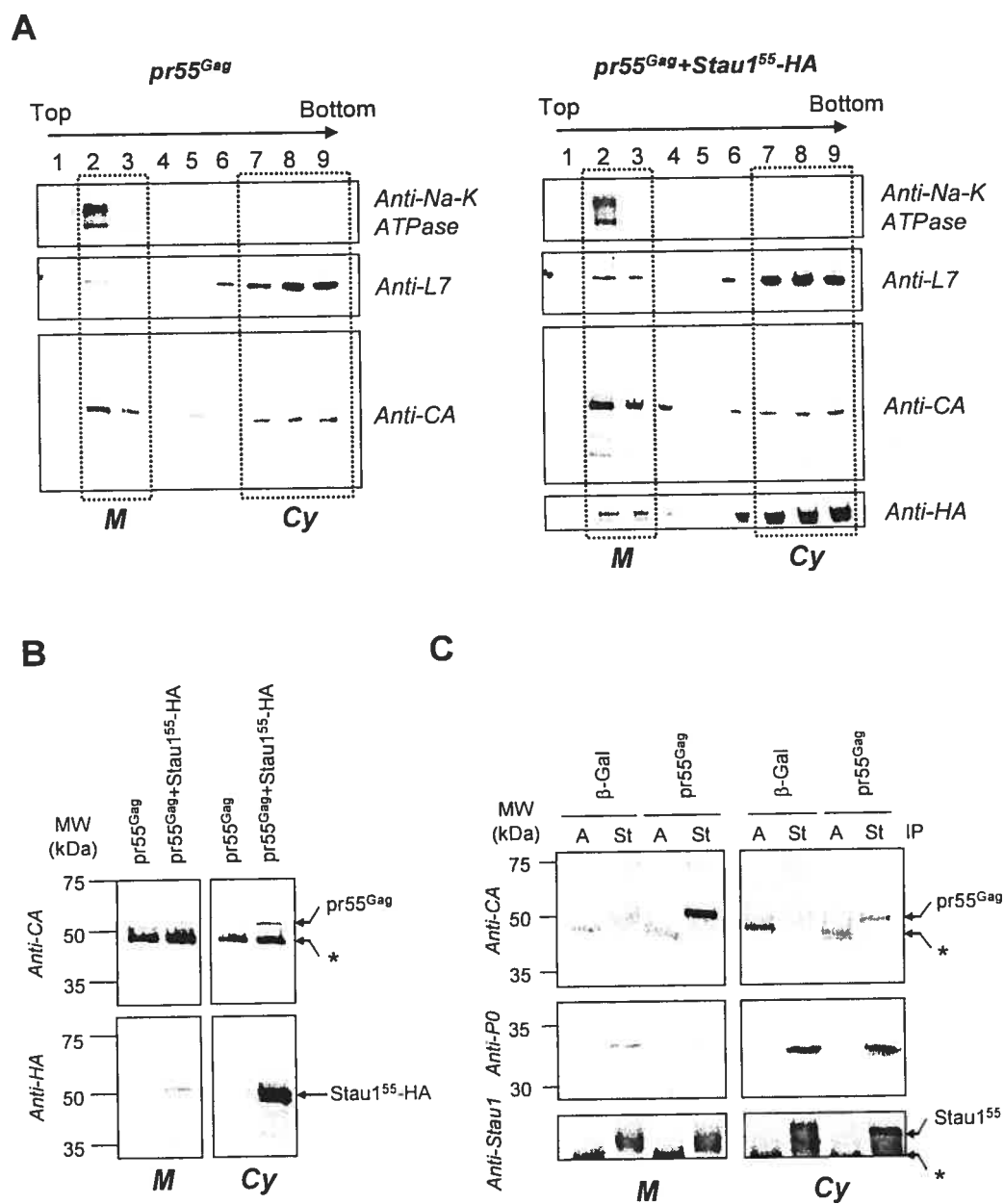


Figure 6

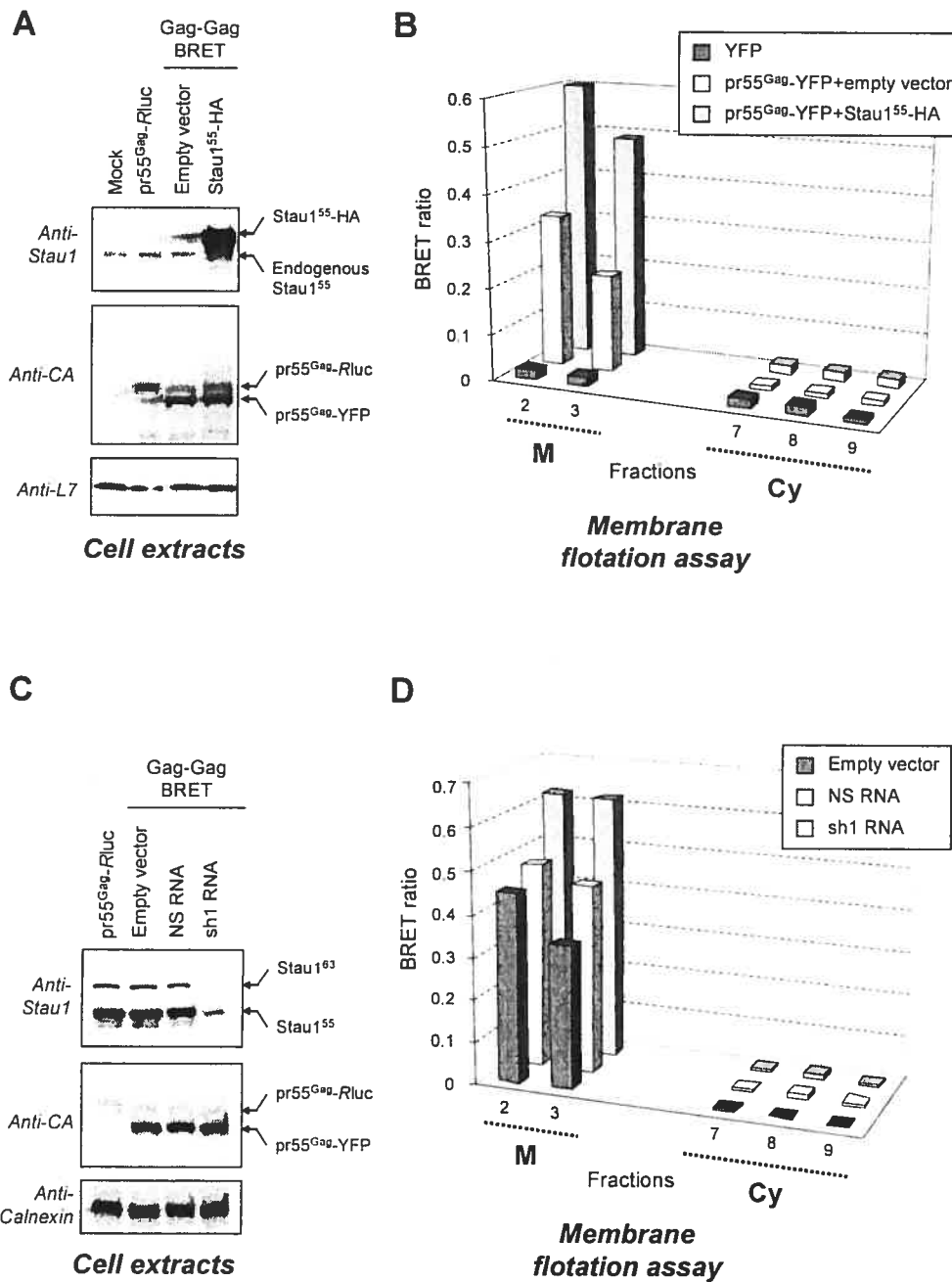


Figure 7

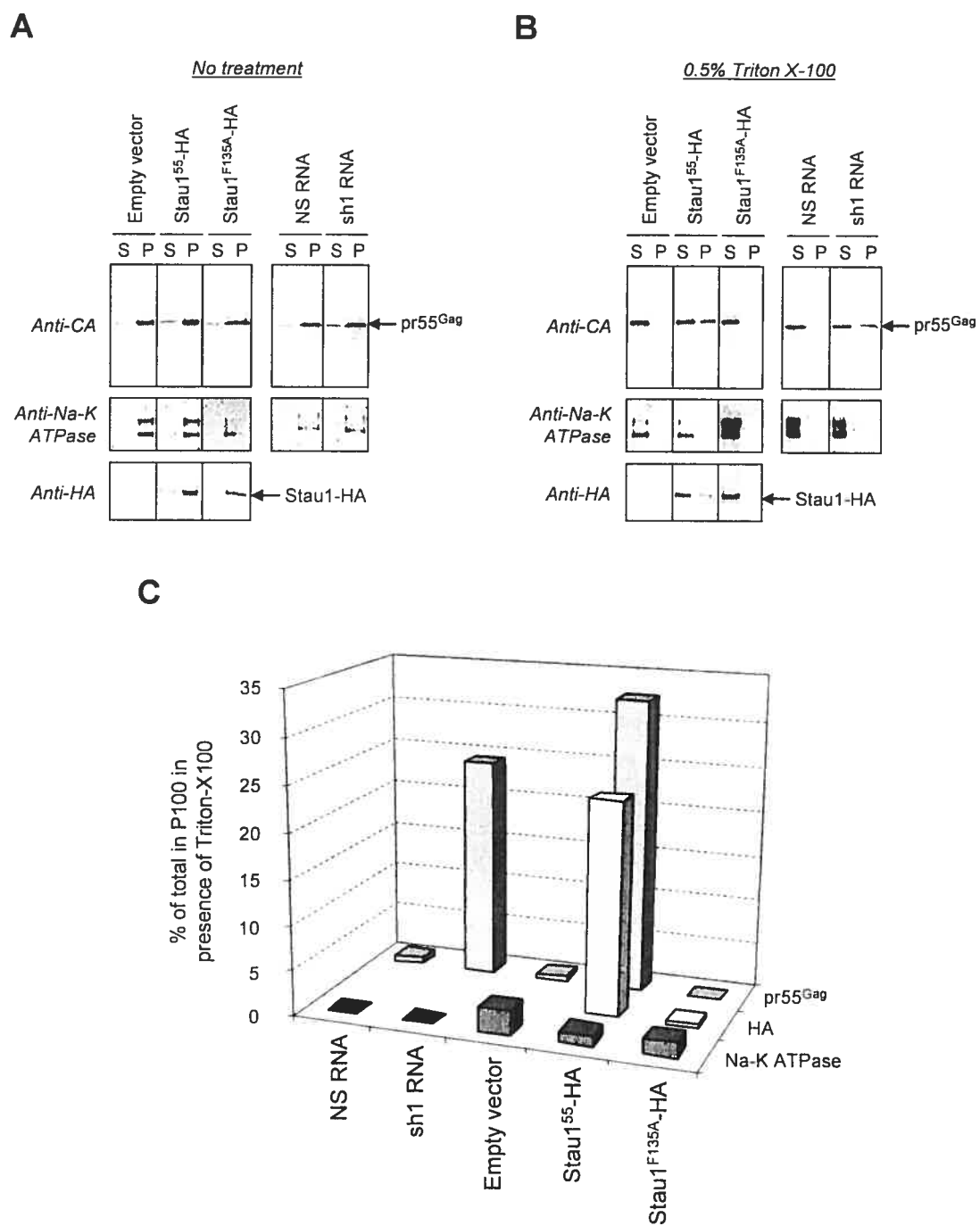
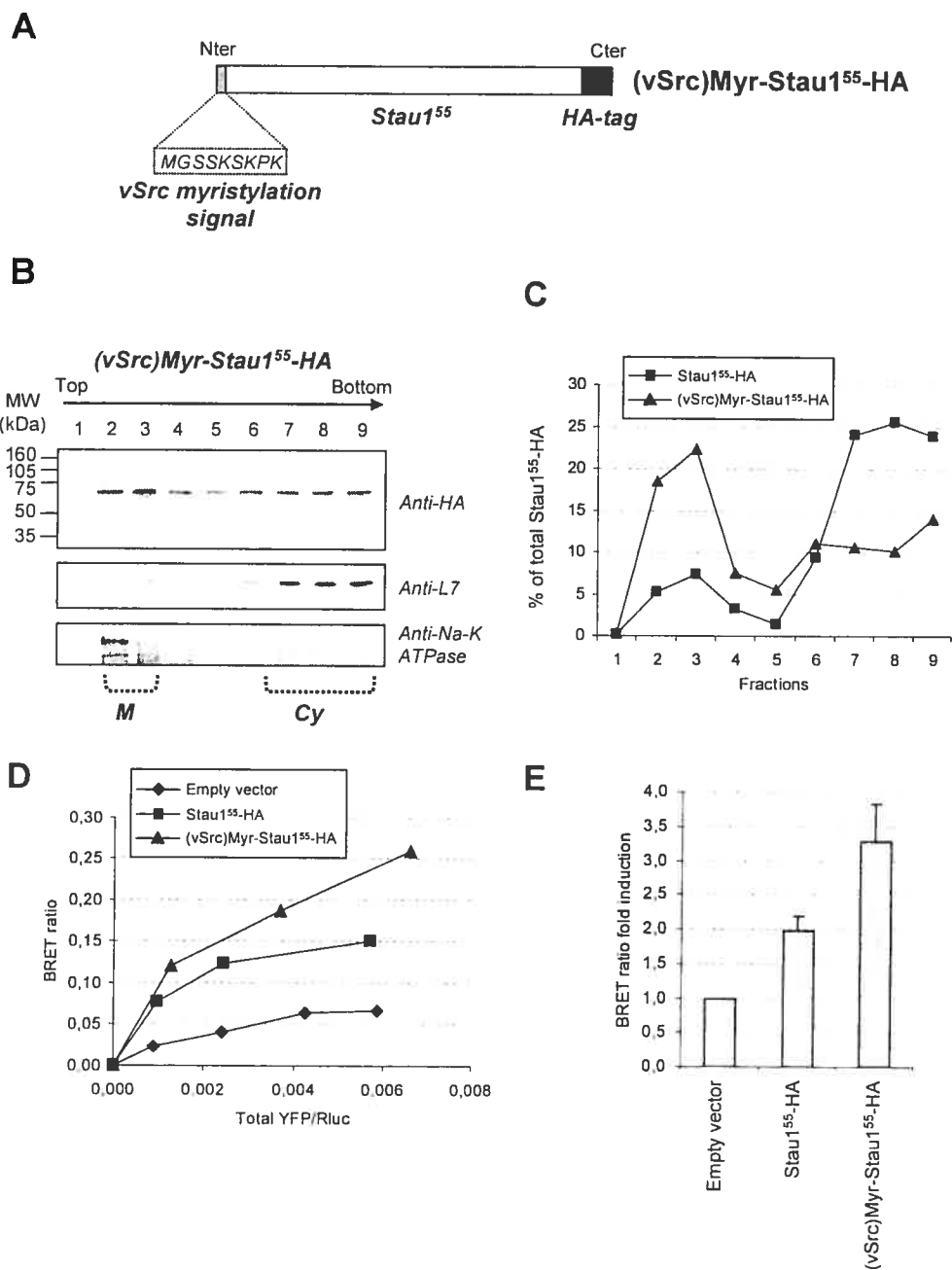


Figure 8



ARTICLE 3 : Characterization of Stau1-mediated effect in human immunodeficiency virus type 1 assembly

Mise en contexte

Suite à l'article 2, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant l'activité de Stau1 lors de l'assemblage du VIH-1, nous voulions identifier les différents déterminants dans NC et Stau1 qui contrôlent ce processus.

Ce manuscrit est en préparation puisque certaines expériences sont à effectuer.

Note : Contribution(s) des auteurs :

LCC: Réalisation de toutes les expériences de l'article. Écriture du manuscrit.

AJM: Supervision générale et écriture du manuscrit.

LDG: Supervision générale et écriture du manuscrit.

**Characterization of Staufen1-mediated effect in human
immunodeficiency virus type 1 assembly**

Laurent Chatel-Chaix^{1,2}, Andrew J. Mouland^{2,3,4} and Luc DesGroseillers^{1*}

From ¹The Département de biochimie, Université de Montréal; ²HIV-1 RNA Trafficking Laboratory, Lady Davis Institute for Medical Research-Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital; Departments of ³Microbiology & Immunology and ⁴Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

*Correspondent footnote:

Dr. Luc DesGroseillers,

Département de biochimie, Université de Montréal, P.O. Box 6128 Centre Ville, Montréal, Qc,
Canada. H3C 3J7. Phone : 514-343-5802. Fax : 514-343-2210. Email :

██████████

Abstract

Human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) assembly is defined as the formation of new infectious viral particles. This process mainly relies on the homomultimerization of 5-thousands molecules of the viral structural polyprotein pr55^{Gag} and depends on the recruitment of crucial host factors towards the assembly complexes. We have previously shown that the double-stranded RNA-binding protein Stau1 (Stau1), likely through the interaction between its third double-stranded RNA-binding domain (dsRND3) and the nucleocapsid (NC) domain of pr55^{Gag} , participates in HIV-1 assembly by influencing pr55^{Gag} multimerization. In order to gain insight into the molecular mechanisms underlying this process, we performed, in this study, the fine mapping of Stau1/ pr55^{Gag} association using co-immunoprecipitation and live cell bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. Our results show that Stau1-NC interaction requires the integrity of at least one of NC two zinc fingers but not that of its N-terminal basic amino acids. Furthermore, we tested several Stau1 deletion mutants for their capacity to enhance pr55^{Gag} multimerization using a previously described $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr55}^{\text{Gag}}$ BRET assay in live 293T cells. Our results show that a Stau1 mutant that lacks the 88 first amino acids, Stau1 $^{\Delta\text{N}188}$ -HA fails to increase pr55^{Gag} multimerization although it is still able to interact with the viral polyprotein. Further mapping of Stau1 N-terminus revealed that a 12 amino acids sequence within this region (MRGGAYPPRYFY) is responsible for Stau1-mediated effect on HIV-1 assembly. This regulatory sequence contains potential signals for Stau1 posttranslational modifications and cellular targeting. These data highlight that Stau1 is a modular protein and suggest that Stau1 influences pr55^{Gag} multimerization via 1) the interaction between its dsRBD3 and pr55^{Gag} zinc fingers, and 2) its regulatory domain within its N-terminus that might recruit host machineries that are critical for the completion of new HIV-1 capsids.

Introduction

Human immunodeficiency type 1 (HIV-1) assembly consists in the formation of new viral particles which is the result of the radial multimerization of approximately 5 thousands copies of the viral polyprotein pr55^{Gag} (also named Gag). Pr55^{Gag} is thought to contain most of the determinants required for viral assembly since the cellular expression of pr55^{Gag} alone triggers the formation and release of virus-like particles (VLPs), structurally indistinguishable from immature HIV-1 (13, 20, 50).

Pr55^{Gag} is a modular protein that contains 7 domains, matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), p6 and two spacer peptides, p2 and p1. Each of these domains plays specific roles during HIV-1 life cycle. During assembly, MA domain of pr55^{Gag} , through its myristylated moiety and its highly basic domain, anchors assembly complexes to membranes where most of the assembly occurs (13, 20, 50). Whether assembly takes place at the inner leaflet of the plasma membrane or at the multivesicular bodies (or both) is still under debate (16, 25, 43, 44, 47, 51, 53).

Pr55^{Gag} multimerization is likely initiated by NC/NC contacts (3, 62) probably when pr55^{Gag} is still in a cytosolic compartment (29, 30, 41, 48). The basic amino acid stretch present in NC is thought to non-specifically recruit RNA that serves as a scaffold for multimerizing pr55^{Gag} (9, 14, 27). Indeed, mutations abrogating the global positive charge of this sub-domain compromise viral assembly (14, 27). NC possesses also two zinc fingers that are important for the specific packaging of HIV-1 genomic RNA (2, 18, 22) but their participation during viral assembly remains unclear. Indeed, the first NC zinc finger is considered as part of the minimal pr55^{Gag} sequence required for multimerization (called I domain)(13, 50). Since NC function during assembly can be mimicked by its substitution with a heterologous oligomerization domain (35, 63), NC/NC contacts probably serves as a

signal for the higher order multimerization of pr55^{Gag} under the control of other domains. Indeed, the C-terminal third of the CA domain and the spacer peptide p2 are part of the I domain and have been shown by mutagenesis and structural analyses, to be also very important players during HIV-1 assembly (1, 7, 9, 12, 21, 31, 36, 38, 42, 49, 58).

HIV-1 assembly process within the cell appears to be tightly regulated in time and space and relies on the sequential acquisition and release of host machineries that are required for the cellular localization, multimerization and budding of new capsids (20, 24). For instance, the ATP-binding protein ABCE1/HP68 is important for the completion of pr55^{Gag} multimerization via a transient interaction with NC domain of pr55^{Gag} (17, 32, 64). Adaptor protein 3 (AP-3) is involved in pr55^{Gag} association with late endosomes through its association with the MA domain of pr55^{Gag} (16). Finally, endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machineries are recruited by the p6 domain of pr55^{Gag} and are crucial for the budding and release of the neosynthesized viral particles (39).

Staufen1 (Stau1) is also a pr55^{Gag}-binding protein that influences HIV-1 assembly (10, 11). Stau1 belongs to the double-stranded RNA-binding proteins superfamily (33, 60) and is involved in various cellular processes related to RNA. Indeed, Stau1 has been shown to mediate dendritic transport of RNA in neurons (26). Also, Stau1 can either alleviate the translational repression (19) or trigger the degradation of selected RNAs (28), depending on the location of the Stau1-binding site within the RNA.

Stau1 is a host factor that is selectively encapsidated into HIV-1 (40). Stau1 co-purifies with HIV-1 genomic RNA and interacts with the NC domain of pr55^{Gag} (11, 40). This suggests that Stau1 assists NC's functions during HIV-1 life cycle. Stau1 levels in the producer cells are important for HIV-1 since both Stau1 overexpression and depletion using RNA interference affect HIV-1 infectivity (11, 40). In addition to a putative role in HIV-1 genomic RNA packaging (40), we recently showed that Stau1 modulates HIV-1 assembly

by influencing pr55^{Gag} multimerization (10). Indeed, using a new pr55^{Gag} multimerization assay relying on bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we demonstrated that both Stau1 overexpression and depletion enhanced multimerization. Although Stau1 and pr55^{Gag} interact in both cytosolic and membrane compartments, this effect of Stau1 on pr55^{Gag} oligomerization was only observed in membranes, a cellular compartment in which pr55^{Gag} assembly primarily occurs. However, the molecular mechanism underlying Stau1 influence in HIV-1 assembly remains unknown.

Using co-immunoprecipitation and BRET assays involving Stau1 and NC mutants that harbour various point mutations, we identified in this study, Stau1 third double-stranded RNA-binding domain (dsRBD3) and both NC zinc fingers as domains involved in Stau1/pr55^{Gag} interaction. Then, in order to gain insight into how Stau1 modulates HIV-1 pr55^{Gag} multimerization process, we tested several Stau1 deletion mutants for their capacity to enhance pr55^{Gag} multimerization using pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assays in live cells or after cell fractionation. We identified a Stau1 mutant in which the first 88 Stau1 N-terminal amino acids were deleted, that was still able to interact with pr55^{Gag} but failed to enhance pr55^{Gag} multimerization. We restrained this regulatory element within Stau1 to a 12 amino acid sequence that contains potential posttranslational modification sites. This study provides important new information about the determinants required for the Stau1 function in HIV-1 assembly.

Materials and methods

Cell culture and reagents

Human embryonic kidney fibroblasts (293T) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (Multicell). Transfections were carried out using either calcium phosphate precipitation method or Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). For Western blots, mouse and rabbit HRP-coupled secondary antibodies were purchased from Dako Cytomation and signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences). Signals were detected with a Fluor-S MultiImager apparatus (Bio-Rad). Anti-Na-K ATPase antibodies were kindly provided by Dr. Michel Bouvier.

Plasmid construction

The construction of pcDNA3-RSV-Stau1⁵⁵-HA, pcDNA3-RSV-Stau1^{F135A}-HA, pCMV-Stau1⁵⁵-YFP, pCMV-Stau1^{F135A}-YFP, pCMV-Stau1^{ΔNt88}-YFP, pCMV-pr55^{Gag}-Rluc, pCMV-pr55^{Gag}-YFP, pCMV-NC-p1-YFP, pCMV-CA-p1-Rluc and HxBRU PR-provirus were reported before (10, 11, 34, 40, 60).

To construct pcDNA-RSV-Stau1^{ΔNt37}-HA, we performed polymerase chain reaction (PCR) using pcDNA3-RSV-Stau1⁵⁵-HA as a template, 5'-ATCAGGTACCATGGGTCCATTTCCAGTTCCACCTTT-3' sense primer, 5'-CACATCTAGATCATTTATTCAGCGGCCGCACTGAGCAGCGT-3' antisense primer and Phusion DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR product was purified and digested with *KpnI* and *XbaI* restriction enzymes (Fermentas) and then cloned into the *KpnI/XbaI* cassette of pcDNA3-RSV.

The expressors of NC-p1-YFP and pr55^{Gag}-YFP point mutants were generated using the PCR all-around technique (34). These two plasmids were used as templates to generate the corresponding mutants. C15S mutation was introduced using the primer pair 5'-AAGAGTTTCAATTGTGGCAAA-3' and 5'-GAAACTCTTAACAATCTTTCT-3'. For the introduction of the C49S mutation, we used 5'-GATAGTACTGAGAGACAGGCT-3' and 5'-AGTACTATCTTTCATTTGGTG-3' primer pair. R7S, R10S and K11S mutations (R7 mutant) were introduced using 5'-TTTAGCAACCAAAGCTCGATTGTTAAGTGTTTC-3' and 5'-AATCGAGCTTTGGTTGCTAAAATTGCCTCTCTG-3' oligonucleotide pair. The PCR reactions were carried out with Phusion enzyme (New England Biolabs) and subjected to 18 PCR cycles (95°C during 50s, 55°C during 60s and 72°C during 90s). The resulting products were incubated with 10 units of *DpnI* enzyme (Fermentas) in order to digest methylated parental plasmid, and then transformed into competent bacteria. Positive clones containing the mutation(s) were screened by restriction and sequencing analyses. To generate double zinc fingers mutant expressors (pCMV-pr55^{Gag} C15-49S-YFP and pCMV-NC-p1^{C15-49S}-YFP), the C49S mutation was introduced into the corresponding construct already containing the C15S mutation.

Membrane flotation assays and S100-P100 fractionation

Forty hours posttransfection, cells were washed twice with PBS and collected. Cytoplasmic extracts were prepared by passing the cells 20 times through a 23G1 syringe in TE (10 mM Tris pH7.4, 1 mM EDTA pH 8) containing 10% sucrose and proteases inhibitors (Roche) and subsequent removal of nuclei by centrifugation at 1,000xg. Resulting extracts were subjected to the membrane flotation assay as previously described (10) and shown in Figure 5A. Membrane-associated complexes were collected (fractions 2 and 3). Membranes were solubilized by treating these complexes with 0.5% Triton X-100

at room temperature during 5 minutes and samples were subjected to S100/P100 fractionation as previously described (10) by ultracentrifugation at 100,000xg during 1 hour at 4°C. The supernatants (S100 fractions) and pellets (P100 fractions) were collected and analyzed by Western blotting using anti-CA, anti-HA and anti-Na-K ATPase mouse antibodies.

BRET assays

293T cells were transfected in 6-well plates with constant amount of the *Rluc*-fused energy donor expressor (25-75 ng), increasing amounts of YFP-fused acceptor expressor (0.25-2 µg) and in certain experiments *Stau1*-HA-expressing plasmid (1-1.5 µg). 48 hours posttransfection, cells were washed twice with PBS, collected in PBS-EDTA 5mM and diluted to approximately 2×10^6 cells/mL. BRET assays were performed as described before (10, 11) using a Fusion α -FP apparatus (Perkin-Elmer). The BRET ratio was defined as [(emission at 510 to 590 nm)-(emission at 440 to 500 nm) x Cf] / (emission at 440 to 500 nm), where Cf corresponds to (emission at 510 to 590 nm) / (emission at 440 to 500 nm) when *Rluc* fused protein is expressed alone. The total YFP activity/*Rluc* activity ratio reflects the relative levels of the two fusion proteins in the cells. The BRET ratio increases with the total YFP activity/*Rluc* activity ratio since more YFP-fused molecules bind to *Rluc*-fused proteins. For $pr55^{Gag}$ multimerization assays, in order to avoid misinterpretation due to variations in relative levels of the $pr55^{Gag}$ fusion proteins, changes in the $pr55^{Gag}/pr55^{Gag}$ BRET ratios following *Stau1* overexpression were always analyzed at similar total YFP activity/*Rluc* activity ratio.

When $pr55^{Gag}/pr55^{Gag}$ BRET assays were performed following membrane flotation assays, *Rluc* substrate, coelenterazine H (NanoLight Technology), was added to 90 µL of each fraction and BRET ratio was determined as in live cells. BRET ratios in fractions 1, 3,

4, 5 and 6 were not considered because luciferase activity was too weak in these fractions and hence, did not lead to the determination of a reliable BRET ratio.

For CA-p1-Rluc/Stau1-YFP and Stau1⁵⁵-Rluc/NC-p1-YFP interaction assays, BRET ratios were always compared at similar total YFP activity/Rluc activity ratio. The BRET ratio determined in the context of the expression of the unfused YFP protein (YFP), corresponds to non specific interactions between the energy donor and the YFP. Hence, this background BRET ratio was always subtracted to every calculated BRET ratio and was set to 0%. The BRET ratio determined under coexpression of the energy donor and the wild type energy acceptor was set to 100%.

For dose-response pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assays, 293T cells were transfected with fixed amounts of pCMV-pr55^{Gag}-Rluc and pCMV-pr55^{Gag}-YFP and increasing amounts (0.25-2 μ g) of different Stau1-HA expressors. BRET assays were performed 48 hours posttransfection as described above.

Co-immunoprecipitation assays

293T cells were transfected with Stau1⁵⁵-HA and Gag expressors using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Twenty hours posttransfection cells were washed twice with PBS and lysed in RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) containing proteases inhibitors (Roche). Each cell lysates (0.75mg of proteins) was precleared with protein A-sepharose (Amersham) during 1 hour at 4°C and then, subjected to immunoprecipitation using anti-HA affinity matrix (Roche) during 3 hours at 4°C. Immune complexes were washed 3 times with cold RIPA buffer, resolved in SDS-containing acrylamide gels and analyzed for their content in Stau1 and Gag proteins by Western blotting using mouse monoclonal anti-HA and anti-GFP (Roche) antibodies.

Results

Both NC zinc fingers mediate Stau1/pr55^{Gag} interaction

The interaction between Stau1 and pr55^{Gag} is likely a critical determinant for Stau1 function in HIV-1 assembly. Indeed we previously showed that a single point mutation in the third double-stranded RNA-binding domain of Stau1 (Stau1^{F135A}) prevented both the association of the mutant to pr55^{Gag} and its influence in HIV-1 assembly (10, 11). Moreover, we showed that Stau1/pr55^{Gag} interaction requires the NC domain (11) that contains several motifs involved in separate processes during HIV-1 assembly. As a first step, to understand the molecular mechanisms underlying Stau1 influence on HIV-1 assembly, we identified which NC sub-domain is required for pr55^{Gag}/Stau1 association using the BRET assay with Stau1⁵⁵-Rluc and wild type or mutant NC-p1-YFP fusion proteins (Figure 2A). Four NC mutants were constructed: Point mutations were introduced in NC-p1-YFP fusion protein to disrupt individual zinc finger (NC-p1^{C15S}-YFP and NC-p1^{C49S}-YFP), both zinc fingers (NCp1-YFP^{C15-49S}) or the N-terminal basic residues (NCp1-YFP^{R7})(Figure 1A)(14, 27). For this mutant, arginine 7, arginine 10 and lysine 11 were substituted for serines (Figure 1A). Constructs encoding these NC fusion proteins were transfected in 293T cells to analyze their expression and size by Western blotting using anti-GFP antibodies. Figure 1B shows that wild type and mutant NC-p1-YFP proteins were well expressed and harboured the expected molecular weight. However, for unknown reasons, NC-p1^{C15-49S}-YFP was always slightly less expressed than the other NC-p1-YFP proteins.

These proteins were then tested for their capacity to interact with Stau1⁵⁵ using the BRET assay in live 293T cells (Figure 2A). This technique allows us to detect protein-protein interaction in live cells between Rluc-fused Stau1 and NC-p1-YFP molecules

(Figure 2A). Indeed, when these two fusion proteins are in close proximity ($\leq 100\text{\AA}$) as a consequence of Stau1-NC interaction, energy is transferred from the emitting *Rluc* to YFP which becomes excited and in turn emits fluorescence. A BRET ratio is calculated for each condition (see Materials and methods). We performed BRET saturation experiments where we transfected 293T cells with constant amounts of pCMV-Stau1⁵⁵-*Rluc* plasmid and increasing amount of different NC-p1-YFP expressors. BRET assays were performed 48 hours posttransfection (Figures 2B, C). BRET saturation experiments allowed us to compare BRET ratios at the same relative ratio between fusion proteins (comparable total YFP/*Rluc* ratio) (Figure 2C). As expected, we readily detected a specific BRET between wild type NC-p1-YFP and Stau1⁵⁵-*Rluc* (arbitrarily set to 100% in Figure 2C) as compared to co-expression of Stau1⁵⁵-*Rluc* and YFP alone (Figures 2B, C). Mutations within NC N-terminal basic stretch apparently did not affect the binding of NC to Stau1 since the saturation profile for Stau1/NC-p1^{R7}-YFP BRET was almost identical than the one obtained with Stau1/NC-p1-YFP (Figures 2B, C). When both zinc fingers were mutated (NC-p1^{C15-49S}-YFP), the BRET saturation profile was comparable to that obtained with YFP alone and hence, attributable to background (Figure 2B). When compared to NC-p1-YFP at the same total YFP/*Rluc* ratio, the corrected BRET ratio was decreased by 80% (Figure 2C). This suggests that NC-p1^{C15-49S}-YFP lost almost completely its ability to interact with Stau1. Single zinc finger mutation (NC-p1^{C15S}-YFP and NC-p1^{C49S}-YFP) affected BRET ratio only by 30-40% and these two mutants harboured an intermediate phenotype (Figures 2B, C). This suggests that the integrity of at least one NC zinc fingers is required for Stau1/NC interaction.

Next, we wanted to confirm the involvement of both zinc fingers for Stau1-NC interaction using a second method. We also choose to study this interaction in the context of full-length pr55^{Gag}. We generated a pr55^{Gag}-YFP-expressing plasmid in which both zinc fingers were mutated (pr55^{Gag} C15-49S-YFP). Co-expression of Stau1⁵⁵-HA with wild type or mutated pr55^{Gag}-YFP in 293T cells was analyzed by Western blot analysis (Figure 2D).

pr55^{Gag}-YFP, pr55^{Gag C15-49S}-YFP and Stau1⁵⁵-HA were well expressed in the cell. Then, Stau1⁵⁵-HA-containing complexes were immunoprecipitated using anti-HA antibodies. Immunopurified material was analyzed by Western blot using monoclonal anti-GFP and anti-HA antibodies (Figure 2E). As expected, pr55^{Gag}-YFP successfully co-precipitated with Stau1⁵⁵-HA. However, despite as abundant as wild type pr55^{Gag} in the cell extract (Figure 2D), we were unable to detect pr55^{Gag C15-49S}-YFP in purified Stau1⁵⁵-HA-containing complexes suggesting that this mutant failed to associate with Stau1 (Figure 2E). Altogether, these results show that the two zinc fingers within the NC domain of pr55^{Gag} mediate its association with Stau1. Moreover, this suggests that Stau1 influences assembly processes that depend on NC zinc fingers.

The N-terminal domain of Stau1 is required for pr55^{Gag} multimerization enhancement

Is Stau1 binding to NC the primary cause of enhanced pr55^{Gag} multimerization? In an attempt to answer this and to better understand how Stau1, following its interaction with NC zinc fingers, is able to influence pr55^{Gag} multimerization, we tested several Stau1 deletion mutants for their capacity to do so. For that purpose, we used the previously described pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assay in live 293T cells as a sensor of changes in pr55^{Gag} multimerization (Figure 4A)(10). Indeed, *Rluc* and YFP-fused pr55^{Gag} coexpression generates a positive BRET ratio in live cells as a consequence of pr55^{Gag} multimerization and VLP production. In order to compare BRET ratio changes at the same relative levels of pr55^{Gag} fusion proteins, we performed this BRET saturation experiments.

As previously reported, when Stau1⁵⁵-HA was co-expressed with pr55^{Gag}-*Rluc* and pr55^{Gag}-YFP in 293T cells, the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio increased as a consequence of enhanced pr55^{Gag} multimerization (Figures 4B, D)(10). Then, several HA-tagged Stau1

mutants were tested for their capacity to enhance $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr55}^{\text{Gag}}$ BRET ratio and hence, pr55^{Gag} multimerization. Most of these mutants enhanced the $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr55}^{\text{Gag}}$ BRET ratio at levels comparable to that obtained following $\text{Stau1}^{55}\text{-HA}$ overexpression (data not shown). As a negative control, a Stau1 mutant that does not bind pr55^{Gag} , $\text{Stau1}^{\text{F135A}}\text{-HA}$, failed to stimulate pr55^{Gag} multimerization (data not shown)(10). Strikingly, one Stau1 mutant whose first 88 amino acids were deleted, $\text{Stau1}^{\Delta\text{Nt88}}\text{-HA}$ (Figure 3), was unable to significantly increase the $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr55}^{\text{Gag}}$ BRET ratio in live cells [1.29 (+/-0.13 S.D. n=4)-fold induction] as compared to $\text{Stau1}^{55}\text{-HA}$ [2.04 (+/-0.09 S.D. n=4)-fold induction] (Figures 4B, D). Western blot analyses show that $\text{Stau1}^{\Delta\text{Nt88}}$ is expressed at the expected molecular weight and at levels similar to that of wild type $\text{Stau1}\text{-HA}$ (Figure 4C). It is to be noted that, when highly expressed, $\text{Stau1}^{\Delta\text{Nt88}}\text{-HA}$ was able to moderately increase pr55^{Gag} multimerization despite always less efficiently than $\text{Stau1}^{55}\text{-HA}$ (see Figure 7D). Therefore, enhanced pr55^{Gag} multimerization by Stau1 depends on both Stau1 dsRBD3-binding to NC and N-terminus.

$\text{Stau1}^{\Delta\text{Nt88}}\text{-HA}$ does not affect the assembly of membrane-associated pr55^{Gag} complexes

Since it is known that HIV-1 assembly primarily occurs within membrane compartments (15, 51, 57), we analyzed the biochemical properties of membrane-associated assembly complexes in the context of $\text{Stau1}^{\Delta\text{Nt88}}\text{-HA}$ or $\text{Stau1}^{55}\text{-HA}$ overexpression. Cytoplasmic extracts from transfected 293T cells were analyzed by the membrane flotation assay (Figure 5A)(10). This assay allows the separation of membrane-associated complexes (fraction 2; M) from the cytosolic ones (fractions 7,8 and 9; Cy). BRET ratio was then determined in each collected fractions. As expected and previously described (10), $\text{pr55}^{\text{Gag}}/\text{pr55}^{\text{Gag}}$ BRET was readily detected in the membrane fraction (BRET ratio of 0.33) but not in the cytosolic fractions consistent with the fact that HIV-1

assembly occurs in membrane compartments (Figure 5B)(15, 51, 57). Moreover, as reported before, Stau1⁵⁵-HA overexpression led to an increase by 1.6-fold of pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio only in the membrane fraction (10). Although Stau1^{ΔN188}-HA was overexpressed as efficiently as Stau1⁵⁵-HA (data not shown), no changes in the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio were observed in fraction 2, suggesting that Stau1^{ΔN188}-HA failed to influence pr55^{Gag} multimerization in contrast to Stau1⁵⁵-HA.

We wanted next to confirm the inability of Stau1^{ΔN188}-HA to modulate pr55^{Gag} multimerization in the context of provirus-driven immature HIV-1 production. We had previously shown that Stau1-mediated increase in pr55^{Gag} multimerization correlated with a partial resistance to mild detergent treatment of membrane-associated pr55^{Gag} complexes (10). We co-transfected 293T cells with Stau1 expressors and the protease-defective provirus HxBRU PR-. Forty hours post-transfection, we performed membrane flotation assays on cytoplasmic extracts and membrane-associated complexes were collected. Since membrane-association confers high density properties to pr55^{Gag} complexes and hence interferes with the detection of changes in pr55^{Gag} multimerization, membranes were solubilized with 0.5% Triton-X100. These resulting complexes were then subjected to ultracentrifugation at 100,000xg during 1 hour (Figure 5C). In this assay, insoluble or high-density complexes pellet (P100) whereas proteins that are soluble or components of small complexes, are retained in the supernatant (S100). Resulting P100 and S100 fractions were analyzed by Western blot. As previously shown (10), under native conditions (no Triton-X100 treatment), pr55^{Gag} as well as the membrane marker, sodium potassium (Na-K) ATPase, were primarily found in the P100 fraction because pr55^{Gag} was membrane-associated (data not shown). This was observed whether Stau1 proteins were overexpressed or not (data not shown). As reported before, membrane solubilization prior to S100/P100 fractionation resulted in a complete shift of pr55^{Gag} complexes and Na-K ATPase into the S100 fraction (Figure 5D)(10). Stau1⁵⁵-HA overexpression led to a partial resistance of 33% of pr55^{Gag} complexes to Triton-X100 treatment, likely as a consequence

of enhanced pr55^{Gag} multimerization (Figure 5D). In contrast, Stau1^{ΔNt88}-HA, as well as Stau1^{F135A}-HA (a mutant that does not associate with pr55^{Gag})(10, 11) failed to increase the density of pr55^{Gag} complexes. Altogether, these results support the conclusion that the N-terminus of Stau1 is required for its action during pr55^{Gag} multimerization.

Stau1^{ΔNt88} still interacts with HIV-1 Gag

One explanation for the incapacity of Stau1^{ΔNt88} to enhance pr55^{Gag} multimerization is that this mutant is unable to interact with pr55^{Gag}. To test this, we performed, BRET assays in live 293T cells between a portion of pr55^{Gag} that was shown to interact with Stau1 (CA-p1-Rluc) and Stau1^{ΔNt88} that was fused to YFP (Figure 6A). Stau1^{ΔNt88}-YFP was expressed at the expected molecular weight and at similar levels to those of Stau1⁵⁵-YFP (Figure 6B). As shown in Figure 6C, the specific BRET ratio when Stau1^{ΔNt88}-YFP and CA-p1-Rluc were co-expressed, was comparable [105.7 (+/- 18.1 S.D.)% of CA-p1/Stau1⁵⁵ corrected BRET ratio] to that obtained with wild type Stau1⁵⁵-YFP at similar total YFP/Rluc ratio. As a negative control, no specific BRET was detected when Stau1^{F135A}-YFP was used [1.3 (+/- 22.1 S.D.)% of CA-p1/Stau1⁵⁵ corrected BRET ratio]. These results show that, although Stau1^{ΔNt88} is unable to stimulate pr55^{Gag} multimerization, it still interacts with pr55^{Gag}. This suggests that Stau1 association to pr55^{Gag} is not sufficient to influence on HIV-1 assembly and that Stau1 N-terminus contains a regulatory element that is important for its function during this process.

The region encompassing amino acids 26 to 37 of Stau1⁵⁵ is important for its function in pr55^{Gag} multimerization

To better define the region within Stau1⁵⁵ N-terminus that is involved in the regulation of pr55^{Gag} multimerization, we designed two additional Stau1 deletion mutants, Stau1^{ΔN125}-HA and Stau1^{ΔN137}-HA (Figure 3), and tested them in the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assay in live 293T cells (Figure 4A). These mutants were both expressed at similar levels to those of Stau1⁵⁵-HA and Stau1^{ΔN188}-HA (Figure 7A). As expected and shown in Figure 7B, Stau1⁵⁵-HA overexpression led to a 2-fold increase in the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio whereas Stau1^{ΔN188}-HA overexpression had little effect on the BRET ratio. Although Stau1^{ΔN125}-HA and Stau1^{ΔN137}-HA differed by only 12 amino acids, their respective influence in pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio were completely opposite. Indeed, Stau1^{ΔN126}-HA behaved like Stau1⁵⁵-HA, and Stau1^{ΔN137}-HA like Stau1^{ΔN188}-HA, suggesting that the Stau1 sequence located between amino acids 26 and 37 is important for Stau1 function during HIV-1 assembly.

To confirm these results, we performed pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET dose-response experiments in 293T cells. In this assay, constant amounts of pr55^{Gag}-Rluc and pr55^{Gag}-YFP were coexpressed (constant total YFP/Rluc ratio) with increasing amounts of different Stau1-HA proteins (Figures 7C, D). This assay allowed us to determine the dependency of pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio on Stau1 cellular levels. Forty hours posttransfection, cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-CA antibodies. Figure 7C show that the levels of wild type and mutant Stau1-HA proteins progressively increased in the cell in a similar manner. As shown in Figure 7D, increasing amounts of Stau1⁵⁵-HA and Stau1^{ΔN125}-HA led to a comparable concomitant increase of pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio up to 2.16-2.34-fold. In contrast, Stau1^{ΔN137}-HA and Stau1^{ΔN188}-HA had no effect on pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio except at high Stau1 expression levels where the BRET ratio slightly increased by 1.34-1.47-fold. These results show that Stau1 sequence located between amino acids 26 to 37, contain determinants that are important for Stau1-mediated influence in pr55^{Gag} multimerization. Moreover, these data clearly demonstrate that Stau1 acts on pr55^{Gag} multimerization in a dose-dependent manner.

Discussion

We previously reported that Stau1 participates in HIV-1 assembly by influencing pr55^{Gag} multimerization (10). However, very little is known about the molecular mechanisms underlying this process. In this report, we show that, in addition to pr55^{Gag}-binding via its dsRBD3 (10, 11), Stau1 effect in pr55^{Gag} multimerization depends on 12 amino acids located within its N-terminus. Moreover we show that Stau1/pr55^{Gag} interaction is mediated by both NC zinc fingers suggesting that Stau1 influences processes that depend on these NC sub-domains.

HIV-1 Gag mutants whose both zinc fingers are disrupted failed to interact with Stau1 as seen in BRET and co-immunoprecipitation assays (Figure 2). This suggests that Stau1 directly makes contact with these structures although we do not rule out the possibility that these combined mutations affect the structure of other sub-domains of NC and potentially the Stau1-binding motif. Interestingly, viruses that harbour these mutations do not encapsidate Stau1 (40). Although, this phenotype was attributed to the loss of HIV-1 genomic RNA packaging and to Stau1 RNA-binding activity, this strongly suggests, that Stau1 encapsidation into HIV-1 requires its interaction with pr55^{Gag}.

Pr55^{Gag} zinc fingers are known to play important roles during several steps of HIV-1 life cycle such as reverse transcription and HIV-1 genomic RNA packaging (2, 8, 18, 22). However, their participation during pr55^{Gag} multimerization is less obvious. Indeed, it is generally believed that the basic amino acids of NC are more important than zinc fingers during this process and recruit, towards the assembly complexes, RNA that serves as a scaffold for multimerizing pr55^{Gag} molecules (9, 14, 27). Thus, it seems contradictory that Stau1 influence HIV-1 assembly through its binding to NC zinc fingers. However, some reports consider the first zinc finger also important for assembly since it is generally

included in the minimal domain of pr55^{Gag} required for multimerization (called I domain). Furthermore, some studies reported the loss of assembly and particle production when both zinc fingers were disrupted (18, 32). It is possible that the loss of only one zinc finger can be compensated by the intact one and would explain why single mutation within these motifs have no major effects on HIV-1 assembly. This would also be in agreement with the fact that mutations in both zinc fingers are required for the loss of Stau1-binding to pr55^{Gag}. Hence, we propose that Stau1 influences steps of assembly that are controlled by NC zinc fingers. Moreover, we do not exclude the possibility that Stau1 also participates to early steps of HIV-1 life cycle through this interaction.

We identified the first 88 amino acids of Stau1 as a regulatory motif of its activity during HIV-1 assembly. Indeed, Stau1^{Δ88}-HA mutant was still able to interact with pr55^{Gag} but failed to enhance pr55^{Gag} multimerization as seen by BRET and fractionation assays. These results strongly suggest that Stau1-binding to pr55^{Gag} is not sufficient to influence HIV-1 assembly. In addition, this strongly suggests that the observed increase in the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio upon Stau1⁵⁵-HA overexpression unlikely resulted from non-specific changes in the proximity of *Rluc* and YFP tags due to Stau1 recruitment towards assembly complexes. Moreover, this Stau1 loss of function is likely not a consequence of effects on the overall structure of Stau1. Indeed, Stau1^{Δ88}-HA mutant retained its activity in homo-dimerization, translational control of repressed mRNAs, ribosome-binding and membrane association (unpublished data). Consequently, we think that this sequence confers highly specific functions to Stau1, especially during HIV-1 assembly.

Further characterization led to the delimitation of Stau1 regulatory motif to the sequence encompassing amino acids 26 to 37. How does the 26-37 sequence control Stau1 activity? It is likely that Stau1, through this sequence and its pr55^{Gag}-binding activity, links to pr55^{Gag} complexes other host factors that are also crucial for assembly such as ABCE1 for instance. ABCE1 is an NC-associated protein that is important for the transition

between specific pr55^{Gag} assembly intermediates (17, 64). ABCE1/pr55^{Gag} interaction depends on NC basic amino acids rather than on zinc fingers (32). Since Stau1 associates with NC zinc fingers, the functional relationship between Stau1 and ABCE1 is not obvious. However, the disruption of both NC zinc fingers resulted in the loss of ABCE1/pr55^{Gag} association by 80% (32), similarly to the % of loss observed for Stau1/NC interaction (Figure 2C). Thus, it will be important to elucidate if Stau1 and ABCE1 functions during HIV-1 assembly are linked and if their respective acquisitions by assembly intermediates are simultaneous or sequential.

This 12 amino acids sequence (MRGGAYPPRYFY) that we identified contains several consensus motifs that could explain its importance for Stau1 action during HIV-1 assembly. First, this sequence harbours 3 tyrosines that could potentially be phosphorylated. Our unpublished results show that Stau1 is indeed phosphorylated but the residues within Stau1 that are modified remain to be identified. It is known that xenopus Stau1 orthologue is phosphorylated and this might control its important function in the localization of Vg1 and VegT1 mRNAs that are crucial during the embryonic development (4, 61). An RGG motif is also present within the 26-37 sequence and represents a potential site of arginine methylation (5). This posttranslational modification is very common among RNA-binding proteins such as hnRNPs and RNA helicase A, and is known to regulate their cellular proteome, function and localization (45, 46, 52, 54). Then, it is conceivable that Stau1 posttranslational modifications control the recruitment of protein partners and modulate Stau1 function during HIV-1 assembly. Hence, Stau1 pattern of posttranslational modifications has to be fully elucidated in order to understand the molecular mechanisms that control Stau1 function not only during HIV-1 life cycle but also in the cell in general.

Furthermore, the 26-37 amino acids sequence harbours two potential ESCRT targeting domains that are PPXY (PPRY in Stau1; Figure 3) and YPXnL (YPPFPVPL; only first Y in 26-37)(39). PPXY motif constitutes in most retroviruses (except HIV-1) the

Gag domain indispensable for budding and release, and recruits ubiquitin ligase (6, 23, 39). Subsequent ubiquitination allows the targeting of the PPXY-containing protein towards the ESCRT machinery located to the multivesicular bodies. On the other hand, YPX(n)L domain, also present in some retroviruses (including HIV-1), recruits AIP1/ALIX protein that target also the cargo to the ESCRT (39, 56, 59). Although Stau1^{Δ88}-HA seems to be able to associate with membrane as efficiently as Stau1⁵⁵-HA (data not shown), it is conceivable that these signals control the localization of Stau1 at specific membrane compartments that supports HIV-1 assembly such as multivesicular bodies.

Finally, these results highlight that Stau1 is a modular protein where its third double-stranded RNA binding domain (dsRBD3) interacts with pr55^{Gag} (11) whereas the N-terminus controls its activity during HIV-1 assembly. This is supported by the fact that the N-terminally truncated mutant, Stau1^{Δ88}-HA still associated with HIV-1 Gag (Figure 6) but failed to enhance its multimerization (Figures 4, 5). Strikingly, *Drosophila* Stau1 orthologue, dStau, has also been shown to function as a modular protein where each domain has specific roles (37). For instance, dStau transports *bicoid* and *oskar* messenger RNAs in the oocyte (55). The third dsRBD is involved in dStau association to these RNAs whereas its second dsRBD is important for RNA transport and anchoring *per se* (37).

In this study, we provide new important information about how Stau1 influences pr55^{Gag} multimerization during HIV-1 assembly. The elucidation of Stau1 N-terminus proteome and pattern of posttranslational modifications will help to better understand how assembling HIV-1 takes advantage of Stau1-containing host machineries.

Aknowledgements

We thank Louise Cournoyer for technical assistance, Dr. Éric Cohen for HxBRU PR- provirus and Dr. Michel Bouvier for anti-Na-K ATPase. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to LDG and grants from the Canadian Institutes of Health Research to LDG and AJM.

References

1. **Accola, M. A., S. Hoglund, and H. G. Gottlinger.** 1998. A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly. *J Virol* **72**:2072-8.
2. **Aldovini, A., and R. A. Young.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**:1920-6.
3. **Alfadhli, A., T. C. Dhenub, A. Still, and E. Barklis.** 2005. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. *J Virol* **79**:14498-506.
4. **Allison, R., K. Czaplinski, A. Git, E. Adegbenro, F. Stennard, E. Houlston, and N. Standart.** 2004. Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *Rna* **10**:1751-63.
5. **Bedford, M. T., and S. Richard.** 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**:263-72.
6. **Blot, V., F. Perugi, B. Gay, M. C. Prevost, L. Briant, F. Tangy, H. Abriel, O. Staub, M. C. Dokhelar, and C. Pique.** 2004. Ned4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci* **117**:2357-67.
7. **Borsetti, A., A. Ohagen, and H. G. Gottlinger.** 1998. The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J Virol* **72**:9313-7.
8. **Buckman, J. S., W. J. Bosche, and R. J. Gorelick.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zn(2+) fingers are required for

- efficient reverse transcription, initial integration processes, and protection of newly synthesized viral DNA. *J Virol* **77**:1469-80.
9. **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.
 10. **Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Fréchina, C., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L.** 2006. The host protein Staufen1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55^{Gag} multimerization. Submitted.
 11. **Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland.** 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* **24**:2637-48.
 12. **Chu, H. H., Y. F. Chang, and C. T. Wang.** 2006. Mutations in the alpha-helix Directly C-terminal to the Major Homology Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Disrupt Gag Multimerization and Markedly Impair Virus Particle Production. *J Biomed Sci*.
 13. **Cimarelli, A., and J. L. Darlix.** 2002. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* **59**:1166-84.
 14. **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.
 15. **Derdowski, A., L. Ding, and P. Spearman.** 2004. A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* **78**:1230-42.
 16. **Dong, X., H. Li, A. Derdowski, L. Ding, A. Burnett, X. Chen, T. R. Peters, T. S. Dermody, E. Woodruff, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2005. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**:663-74.
 17. **Dooher, J. E., and J. R. Lingappa.** 2004. Conservation of a stepwise, energy-sensitive pathway involving HP68 for assembly of primate lentivirus capsids in cells. *J Virol* **78**:1645-56.
 18. **Dorfman, T., J. Luban, S. P. Goff, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger.** 1993. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **67**:6159-69.
 19. **Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers.** 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**:4797-812.
 20. **Freed, E. O.** 2004. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol* **12**:170-7.

21. **Ganser-Pornillos, B. K., U. K. von Schwedler, K. M. Stray, C. Aiken, and W. I. Sundquist.** 2004. Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J Virol* **78**:2545-52.
22. **Gorelick, R. J., S. M. Nigida, Jr., J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur, L. E. Henderson, and A. Rein.** 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol* **64**:3207-11.
23. **Gottwein, E., J. Bodem, B. Muller, A. Schmechel, H. Zentgraf, and H. G. Krausslich.** 2003. The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J Virol* **77**:9474-85.
24. **Greene, W. C., and B. M. Peterlin.** 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**:673-80.
25. **Grigorov, B., F. Arcanger, P. Roingeard, J. L. Darlix, and D. Muriaux.** 2006. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* **359**:848-62.
26. **Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa.** 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**:513-25.
27. **Khorchid, A., R. Halwani, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2002. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* **76**:4131-7.
28. **Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat.** 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**:195-208.
29. **Lee, Y. M., B. Liu, and X. F. Yu.** 1999. Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol* **73**:5654-62.
30. **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.
31. **Liang, C., J. Hu, R. S. Russell, A. Roldan, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 2002. Characterization of a putative alpha-helix across the capsid-SP1 boundary that is critical for the multimerization of human immunodeficiency virus type 1 gag. *J Virol* **76**:11729-37.
32. **Lingappa, J. R., J. E. Doohar, M. A. Newman, P. K. Kiser, and K. C. Klein.** 2006. Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem* **281**:3773-84.
33. **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.

34. **Martel, C., P. Macchi, L. Furic, M. A. Kiebler, and L. Desgroseillers.** 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* **393**:245-54.
35. **McGrath, C. F., J. S. Buckman, T. D. Gagliardi, W. J. Bosche, L. V. Coren, and R. J. Gorelick.** 2003. Human cellular nucleic acid-binding protein Zn²⁺ fingers support replication of human immunodeficiency virus type 1 when they are substituted in the nucleocapsid protein. *J Virol* **77**:8524-31.
36. **Melamed, D., M. Mark-Danieli, M. Kenan-Eichler, O. Kraus, A. Castiel, N. Laham, T. Pupko, F. Glaser, N. Ben-Tal, and E. Bacharach.** 2004. The conserved carboxy terminus of the capsid domain of human immunodeficiency virus type 1 gag protein is important for virion assembly and release. *J Virol* **78**:9675-88.
37. **Micklethwait, D. R., J. Adams, S. Grunert, and D. St Johnston.** 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* **19**:1366-77.
38. **Morellet, N., S. Druillenec, C. Lenoir, S. Bouaziz, and B. P. Roques.** 2005. Helical structure determined by NMR of the HIV-1 (345-392)Gag sequence, surrounding p2: implications for particle assembly and RNA packaging. *Protein Sci* **14**:375-86.
39. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:395-425.
40. **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. *J Virol* **74**:5441-51.
41. **Nermut, M. V., W. H. Zhang, G. Francis, F. Ciampor, Y. Morikawa, and I. M. Jones.** 2003. Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* **305**:219-27.
42. **Newman, J. L., E. W. Butcher, D. T. Patel, Y. Mikhaylenko, and M. F. Summers.** 2004. Flexibility in the P2 domain of the HIV-1 Gag polyprotein. *Protein Sci* **13**:2101-7.
43. **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.
44. **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.
45. **Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, K. P. Rucknagel, A. Schierhorn, B. Moritz, S. Huttelmaier, N. Flach, L. Handoko, and E. Wahle.** 2006. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem* **281**:11115-25.

46. **Passos, D. O., A. J. Quaresma, and J. Kobarg.** 2006. The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* **346**:517-25.
47. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**:443-55.
48. **Perlman, M., and M. D. Resh.** 2006. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* **7**:731-45.
49. **Provitera, P., A. Goff, A. Harenberg, F. Bouamr, C. Carter, and S. Scarlata.** 2001. Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* **40**:5565-72.
50. **Resh, M. D.** 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* **7**:84-91.
51. **Rudner, L., S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott.** 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* **79**:4055-65.
52. **Shen, E. C., M. F. Henry, V. H. Weiss, S. R. Valentini, P. A. Silver, and M. S. Lee.** 1998. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* **12**:679-91.
53. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785-801.
54. **Smith, W. A., B. T. Schurter, F. Wong-Staal, and M. David.** 2004. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem* **279**:22795-8.
55. **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.
56. **Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689-99.
57. **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.
58. **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.
59. **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. Cimbara, 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.

60. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2220-30.
61. **Yoon, Y. J., and K. L. Mowry.** 2004. Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development* **131**:3035-45.
62. **Zabransky, A., E. Hunter, and M. Sakalian.** 2002. Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association. *Virology* **294**:141-50.
63. **Zhang, Y., H. Qian, Z. Love, and E. Barklis.** 1998. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* **72**:1782-9.
64. **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.

Figure legends

Figure 1: Design and expression of NC mutants used for the fine mapping of Stau1/NC interaction.

(A) Schematic representation of pr55^{Gag} with emphasis on the sequence of NC and its two zinc fingers. Several point mutations were introduced in the basic region or in the zinc fingers of NC-p1-YFP fusion protein to generate four mutants. (B) 293T cells were transfected with YFP, NC-p1-YFP and mutated NC-p1-YFP expressors. 48 hours posttransfection, cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting using anti-GFP antibodies.

Figure 2: NC zinc fingers mediate Stau1/pr55^{Gag} interaction.

(A) Schematic representation of the Stau1/NC-p1 BRET assay. In this interaction assay, Stau1⁵⁵-Rluc fusion protein is used as an energy donor whereas wild type or mutated NC-p1-YFP are energy acceptors. When the two fusion proteins are in close proximity (<100Å), light energy is transferred from the Stau1⁵⁵-Rluc to NC-p1-YFP which in turn emits measurable fluorescence. This can be quantified by the calculation of the BRET ratio which allows detecting Stau1/NC-p1 interactions. (B) 293T cells were transfected with constant amounts of pCMV-Stau1⁵⁵-Rluc and increasing amounts of wild type or mutated NC-p1-YFP expressors. 48 hours posttransfection, cells were collected and BRET ratios determined. BRET ratios are plotted in function of their corresponding total YFP/Rluc ratio which allows us to compare BRET ratios at the same relative expression levels of fusion proteins. (C) BRET ratios were compared at identical total YFP/Rluc ratio and corrected by subtracting the background BRET ratio calculated for unfused YFP and Stau1⁵⁵-Rluc coexpression (see Materials and methods). The corrected BRET ratio for Stau1⁵⁵-Rluc and wild type NC-p1-YFP coexpression was arbitrarily set to 100%. These results were representative of four independent experiments. (D) 293T cells were cotransfected with Stau1⁵⁵-HA and pr55^{Gag}-YFP or pr55^{Gag} C15-49S-YFP expressors. 20 hours posttransfection,

lysates were prepared and analyzed by Western blotting using anti-GFP and anti-HA antibodies. (E) Cell lysates were submitted to immunoprecipitation using anti-HA antibodies. Immune complexes were analyzed for their content of YFP-fused proteins and Stau1-HA using anti-GFP and anti-HA antibodies, respectively. *: immunoglobulin non-specific signals.

Figure 3: Schematic representation of HA-tagged Stau1⁵⁵ expressors.

Stau1 double-stranded RNA-binding domains (dsRBD) and tubulin-binding domain (TBD) are represented as grey and black boxes, respectively. The 12 amino acids regulatory sequence within Stau1 N-terminus that is identified in this study, is indicated in the dotted box.

Figure 4: The N-terminus of Stau1 is required for the modulation of pr55^{Gag} multimerization in live cells.

(A) Schematic representation of the pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assay. In this interaction assay, pr55^{Gag}-Rluc fusion protein is used as an energy donor whereas pr55^{Gag}-YFP is an energy acceptor. This assay is used as a sensor of pr55^{Gag} multimerization. (B) 293T cells were transfected with constant amounts of pCMV-pr55^{Gag}-Rluc and increasing amounts of pCMV-pr55^{Gag}-YFP as described in Material and methods section. A third plasmid expressing Stau1⁵⁵-HA or Stau1^{ΔN188}-HA was included in the transfection procedure. Rluc activity as well as transmitted and total YFP activities was measured. BRET ratios were plotted in function of their corresponding total YFP/Rluc ratio which allows us to compare BRET ratios at the same relative expression levels of pr55^{Gag} fusion proteins. (C) Cells corresponding to the four last points of each curve from Figure 4B were lysed. Cell lysates were analyzed by Western blotting for their content in overexpressed Stau1 proteins. *: Non-specific labelling. (D) BRET ratios were compared at comparable total YFP/Rluc ratio. The BRET ratio corresponding to the pr55^{Gag} fusions expressed alone was arbitrarily

set to 1. The BRET induction levels were then determined and are shown in the graph. These results are representative of 4 experiments.

Figure 5: Stau1^{ΔN188}-HA does not affect the multimerization of membrane-associated pr55^{Gag}.

(A) Schematic representation of the experimental procedure. 293T cells were transfected with pr55^{Gag}-Rluc, pr55^{Gag}-YFP and Stau1-HA expressors. 48 hours posttransfection, cytoplasmic extracts were prepared and subjected to the membrane flotation assay. (B) pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET ratio was determined in each collected fraction. BRET ratios in fractions 1, 3, 4, 5 and 6 were omitted because Rluc activity in these fractions was too low to provide a reliable BRET ratio. (C) Schematic representation of the experimental procedure. 293T cells were transfected with HxBRU PR- provirus and Stau1-HA expressors. 24 hours posttransfection, cytoplasmic extracts were prepared and subjected to the membrane flotation assay. Membrane fractions were collected and treated with 0.5% Triton X-100 during 5 minutes at room temperature in order to solubilize membranes. Resulting samples were subjected to ultracentrifugation at 100,000xg during 1 hour. (D) Resulting supernatants (S100; S) and pellets (P100; P) were analyzed by Western blotting using anti-CA, anti-Na-K ATPase and anti-HA antibodies.

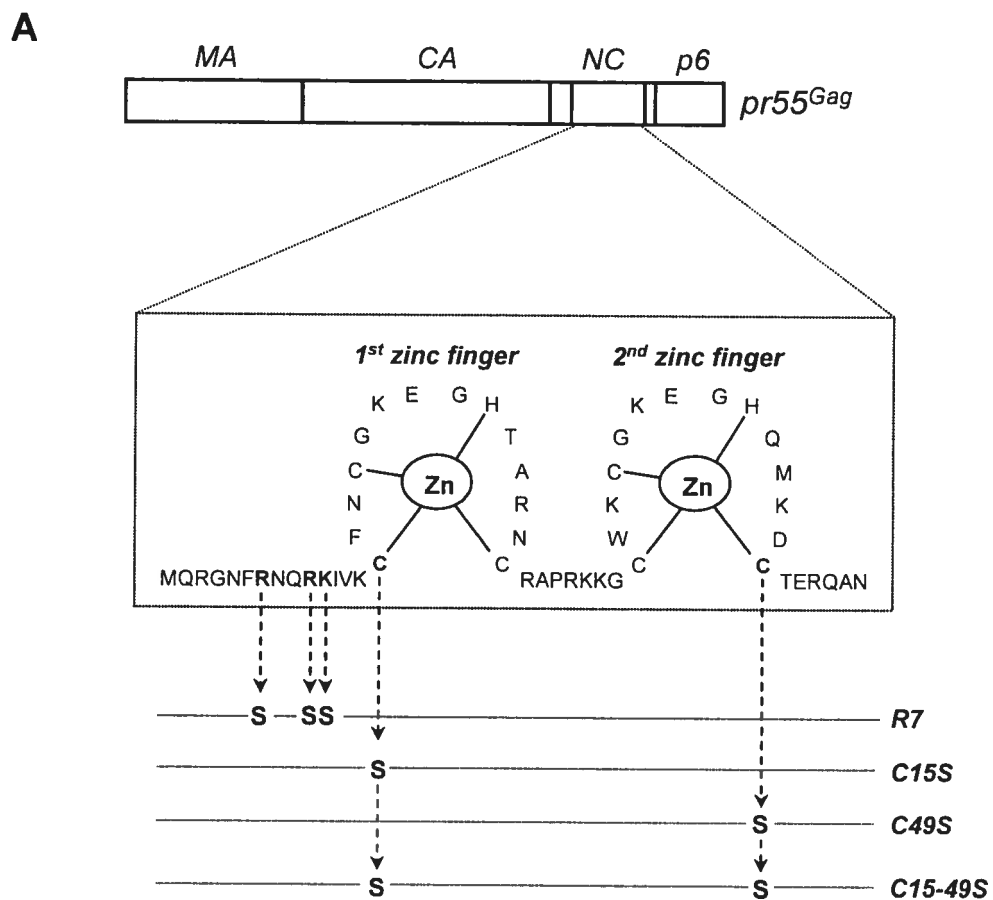
Figure 6: Stau1^{ΔN188} interacts with HIV-1 Gag in live cells.

(A) Schematic representation of the Stau1/CA-p1 BRET assay. In this interaction assay, CA-p1-Rluc fusion protein was used as an energy donor whereas Stau1⁵⁵-YFP, Stau1^{ΔN188}-YFP or Stau1^{F135A}-YFP are energy acceptors. (B) 293T cells were cotransfected with CMV-CA-p1-Rluc and Stau1-YFP expressors. 48 hours posttransfection, Stau1⁵⁵-YFP and Stau1^{ΔN188}-YFP contents in the cells were analyzed by Western blotting using anti-GFP antibodies. (C) Live transfected cells were used for CA-p1/Stau1 BRET assays. BRET ratios were compared at identical total YFP/Rluc ratio and corrected by subtracting the background BRET ratio calculated for unfused YFP and CA-p1-Rluc coexpression (see

Materials and methods). The corrected BRET ratio between CA-p1-Rluc and Stau1⁵⁵-YFP was arbitrarily set to 100%. These results are representative of two experiments.

Figure 7: Identification of the region encompassing amino acids 26 to 37 within Stau1⁵⁵ as a regulatory sequence of HIV-1 assembly.

(A, B) 293T cells were transfected as described in Figure 4B but included additional Stau1⁵⁵-HA deletion mutants (shown in Figure 3). (A) For each condition, an aliquot of the cells (providing equivalent total YFP/Rluc ratio) was used for Western blot analysis using anti-HA and anti-CA antibodies. Anti-GAPDH antibody was used as a loading control. (B) Another aliquot of the cells was used for BRET assays. Calculated BRET ratios were plotted as a function of the corresponding total YFP/Rluc ratio. (C, D) Dose response pr55^{Gag}/pr55^{Gag} BRET assays. 293T cells were transfected with fixed amounts of pCMV-pr55^{Gag}-Rluc and pCMV-pr55^{Gag}-YFP and increasing amounts of different Stau1-HA expressors. (C) 48 hours later, half of the cells were lysed and analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-GAPDH antibodies. (D) The other half of the cells was used for BRET assays. BRET ratio is plotted as a function of the corresponding amount of transfected Stau1-HA expressor. *: Non-specific labelling.



B

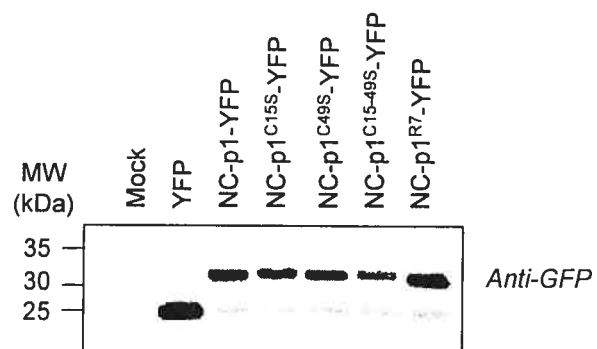


Figure 1

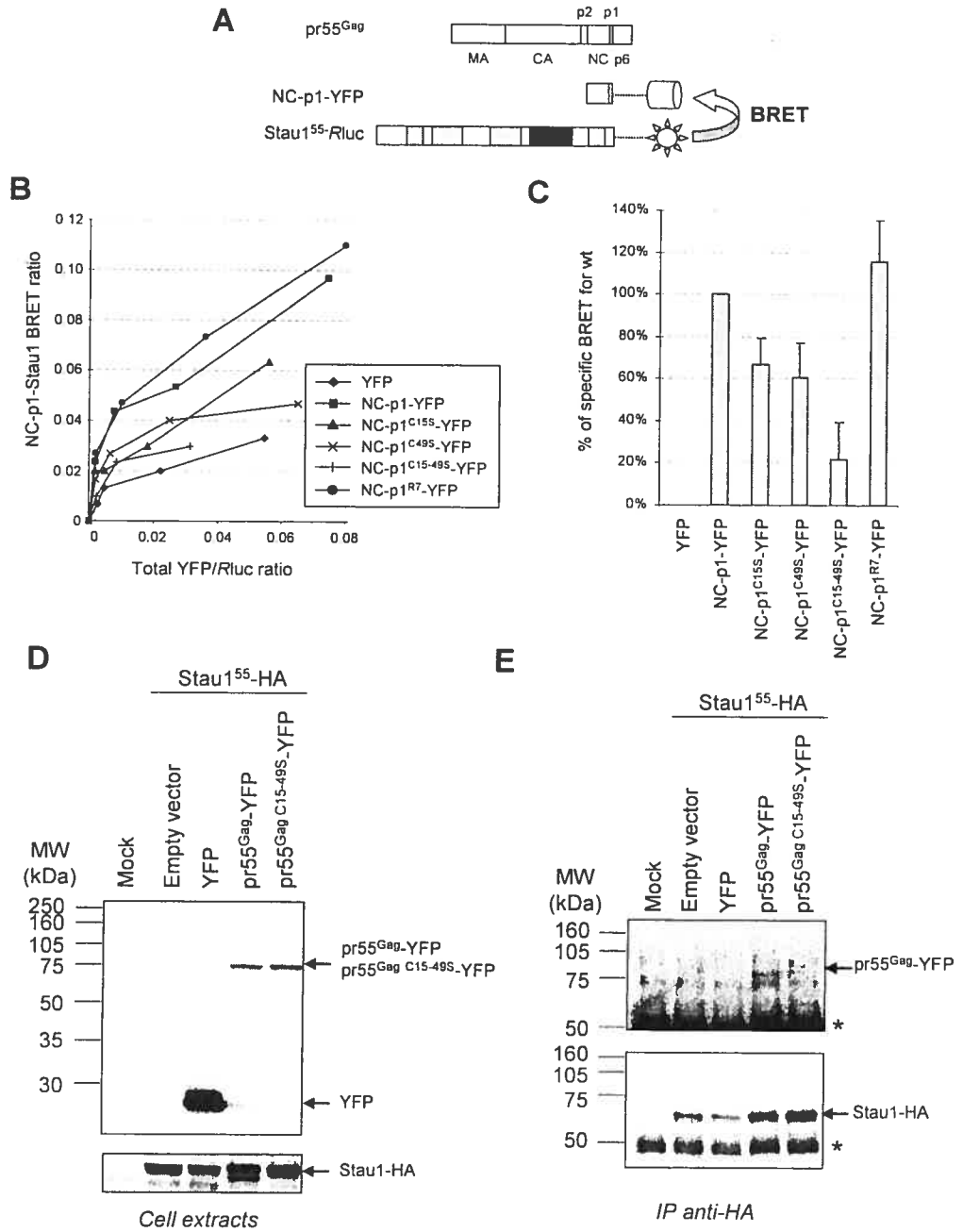


Figure 2

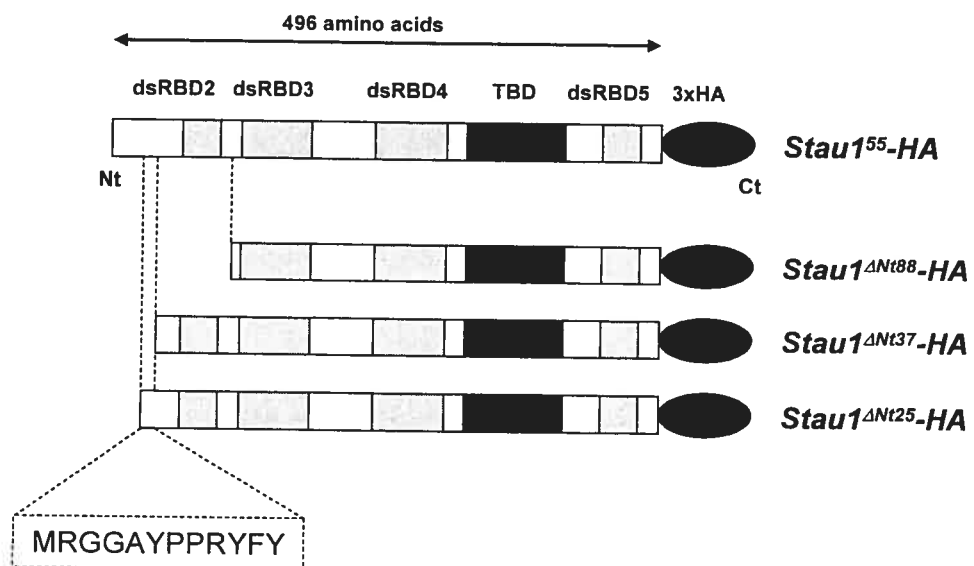


Figure 3

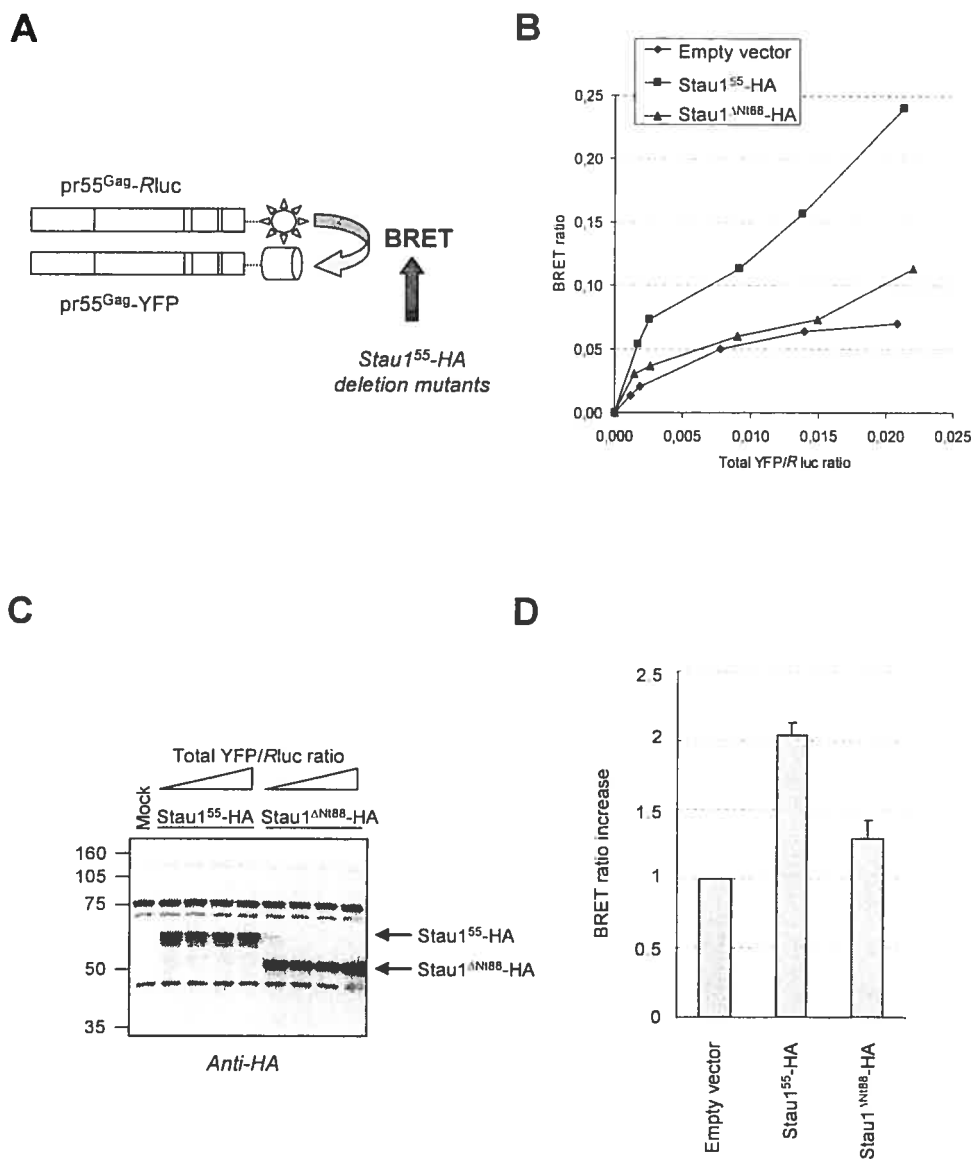


Figure 4

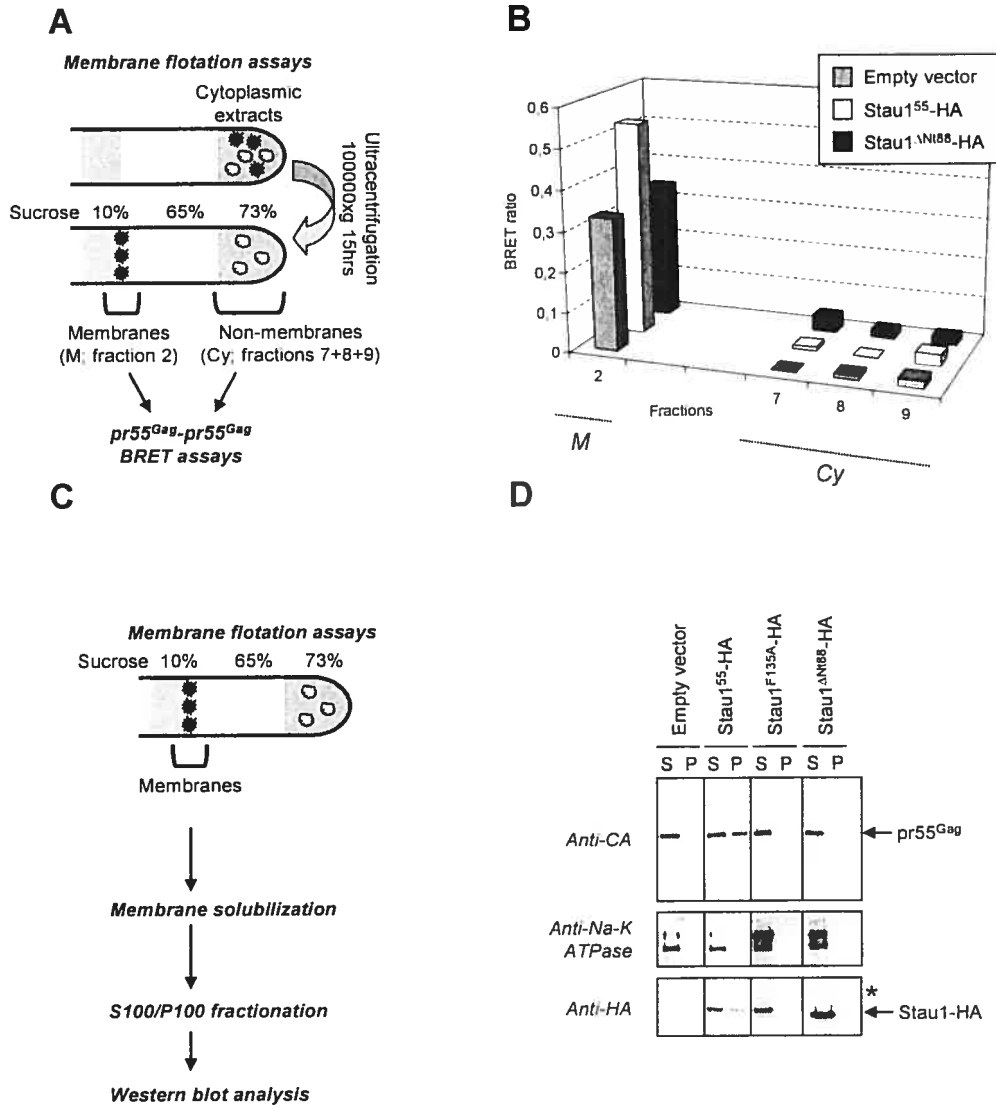


Figure 5

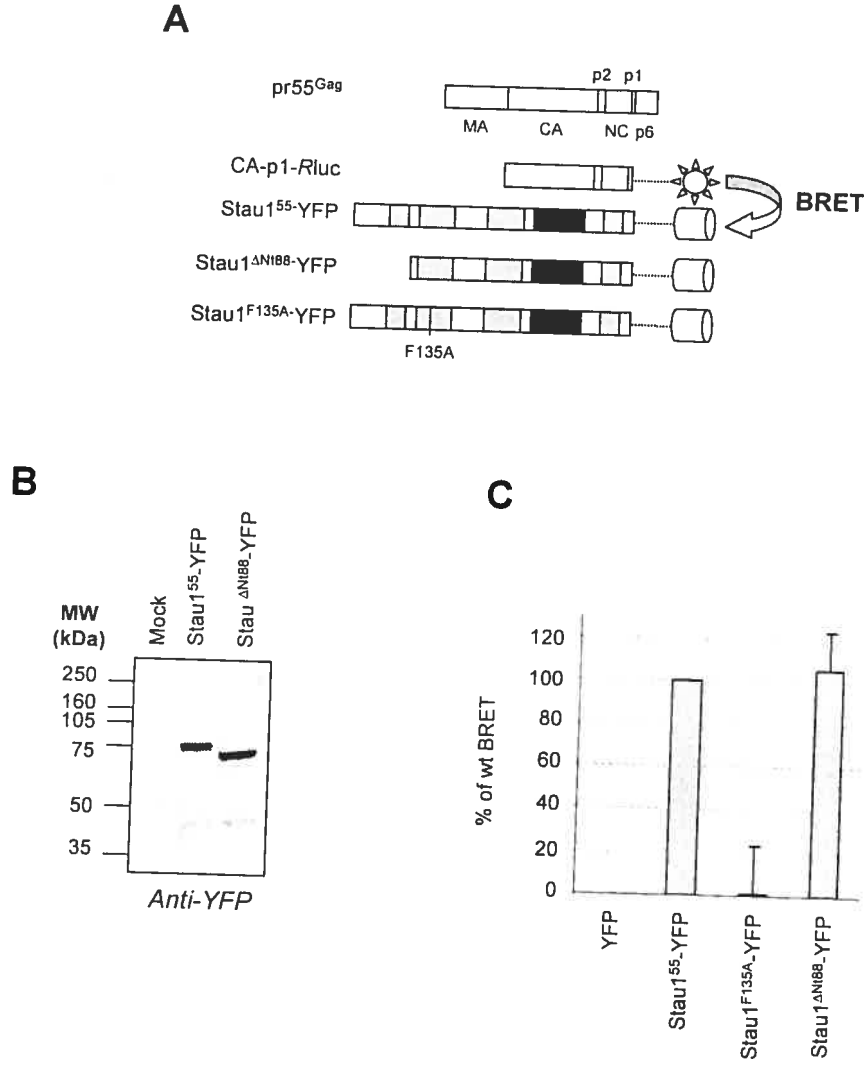


Figure 6

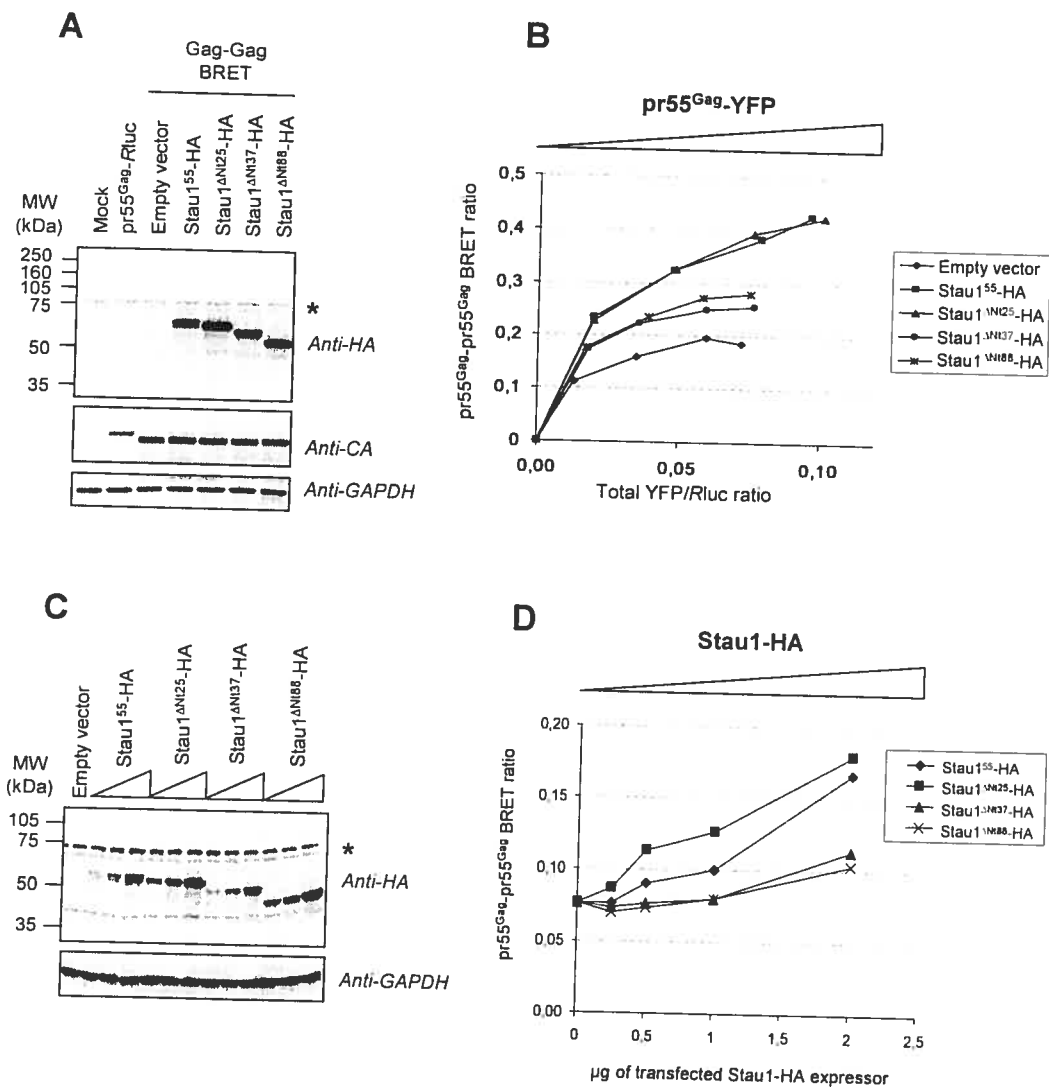


Figure 7

DISCUSSION

Beaucoup de points de discussion ont déjà été abordés dans les 3 articles de cette thèse et seront donc seulement approfondis dans cette section ou tout simplement omis.

1 Les niveaux de Stau1 influencent l'infectivité du VIH-1 néosynthétisé

L'article 1 montre que la déplétion de Stau1 par ARN interférence provoque une diminution de 2 fois des virus néosynthétisés. Il est à noter que nous avons obtenu des résultats similaires suite à la déplétion cellulaire de Stau1 par l'utilisation d'ARN anti-sens (Mouland *et al.*, données non publiées). Bien que l'effet sur l'infectivité montré dans l'article 1 soit reproductible, il n'est pas énorme (moins d'un log). Cependant, ces virus moins infectieux contiennent plus d'ARNg que normalement (Abrahamyan *et al.*, en révision). Une étude récente a montré que des virus qui encapsidaient plus d'ARNg suite à certaines mutations dans NC, étaient par conséquent plus infectieux [315]. Ainsi, il est possible que l'effet sur l'infectivité virale de la déplétion cellulaire de Stau1 soit en fait sous-estimé étant donné que les virus contiennent plus d'ARNg. Par ailleurs, nous sommes, à l'heure actuelle, techniquement incapables d'abolir complètement l'expression cellulaire de Stau1. Ainsi, même dans des conditions où Stau1 est déplété à 80% dans la cellule, il n'est pas exclu que le 20% restant soit suffisant pour assumer ses fonctions lors de la production virale. Il faudrait donc générer des lignées de cellules T invalidées pour le gène codant pour Stau1 et effectuer des cinétiques de réplication virale dans ces cellules. Ce type d'expérience nous permettrait de déterminer à quel point la production et l'infectivité du VIH-1 dépendent de Stau1 lors de la réplication virale. De plus, on pourrait évaluer si Stau1 représente une bonne cible antivirale en étudiant la vitesse d'apparition de virus révertants.

Si aucun révertant n'est généré, cela montrera que le virus montre peu d'adaptabilité face à la détérioration de machineries cellulaires qu'il parasite. Les parties suivantes de la discussion exposeront entre autres des hypothèses quant à la cause de l'effet de Stau1 sur l'infectivité du VIH-1.

2 Par quoi se traduit l'influence de Stau1 sur la multimérisation de pr55^{Gag}?

Nous avons mis en évidence le rôle de Stau1 dans l'assemblage du VIH-1 dans les articles 2 et 3 surtout grâce à des essais BRET. Bien que cette technique représente un des seuls outils développés à ce jour permettant d'étudier directement la multimérisation de pr55^{Gag} dans les cellules vivantes, elle n'est pas effectuée dans des conditions d'expression provirale, davantage physiologiques pour le virus. Par ailleurs, on ignore par quoi les variations du ratio BRET observées se traduisent concrètement lors de l'assemblage normal du virus, si ce n'est par des changements dans la densité des complexes d'assemblage membranaires (Voir l'article 2).

Tout d'abord, l'influence de Stau1 sur l'assemblage du VIH-1 pourrait se traduire par des changements dans la quantité de particules relâchées dans le milieu extracellulaire. Nous sommes actuellement en train d'effectuer des expériences visant à vérifier cette hypothèse. Par ailleurs, via des analyses utilisant la microscopie électronique à transmission et à balayage, nous avons montré qu'aussi bien la surexpression que la déplétion de Stau1 dans la cellule productrice induisent de gros défauts de morphogénèse des virus néosynthétisés (Abrahamyan *et al.*, en révision). Ce phénotype pourrait résulter du « sur-assemblage » provoqué par les changements de niveaux de Stau1 tel que montré dans l'article 2. Il faudrait déterminer si Stau1 influence positivement le nombre de pr55^{Gag} par particule relâchée ainsi que leur diamètre, des conséquences éventuelles d'un « sur-

empilement » de pr55^{Gag}. Vu que l'infectivité d'une population de virus dépend de l'homogénéité de taille de cette dernière [316], il est possible que l'influence de Stau1 sur l'infectivité virale soit une conséquence de son effet sur la multimérisation de pr55^{Gag}.

3 Par quels moyens Stau1 influence-t-il la multimérisation de pr55^{Gag}?

Les résultats montrés dans les articles 2 et 3 suggèrent fortement que Stau1 influence la multimérisation de pr55^{Gag}. Cependant, on ne sait encore pas vraiment comment Stau1 contrôle ce processus au niveau moléculaire. Il faut en effet réaliser que les connaissances scientifiques concernant les interactions virus-hôte en général en sont juste à leur genèse et que l'on sait très peu de choses concernant les mécanismes moléculaires contrôlant leurs fonctions. Dans le cas de Stau1, on peut émettre plusieurs hypothèses qui ont été discutées pour la plupart dans les trois articles de cette thèse.

Via son interaction avec NC, Stau1 pourrait moduler les étapes de la multimérisation de pr55^{Gag} qui dépendent de ce domaine. Pour vraiment confirmer cette hypothèse, il faudrait effectuer des essais BRET entre des protéines pr55^{Gag} fusionnées à Rluc et YFP dont les deux doigts de zinc sont détruits et qui, en conséquence, ne s'associent plus avec Stau1. Si notre hypothèse est vraie, la sur-expression et la déplétion de Stau dans la cellule ne devraient pas avoir d'effet notable sur l'interaction entre ces 2 protéines de fusion. Par ailleurs, l'ARN est un co-facteur d'assemblage important puisqu'on pense qu'il sert de charpente sur laquelle pr55^{Gag} peut augmenter sa concentration locale et donc homo-multimériser [137-139]. Ceci est possible grâce aux acides aminés basiques de NC qui recrutent non spécifiquement l'ARN vers les complexes d'assemblage. Cependant, considérant que Stau1 est une protéine qui lie l'ARN, on peut imaginer que le recrutement de Stau1 par pr55^{Gag} représenterait pour le virus une autre

source d'ARN cellulaire et expliquerait pourquoi la surexpression de Stau1 favorise l'assemblage. Cependant cette hypothèse, bien que valable et vérifiable expérimentalement, n'est pas compatible avec le fait que des mutants de Stau1 tronqués dans leur extrémité N-terminale sont incapables d'influencer l'assemblage alors qu'ils interagissent encore avec l'ARN et pr55^{Gag} (Article 3).

Stau1 existe dans la cellule au sein d'un gros complexe protéique dont la taille est supérieure à 10 MDa [294]. Ainsi, il ne faut pas imaginer que Stau1 assume des fonctions « en solo » dans la cellule. Il ne fait aucun doute pour moi que les différentes fonctions de Stau1 dépendent de l'identité de ses ligands. Ainsi, il est possible que l'interaction directe Stau1-pr55^{Gag} permette le recrutement de partenaires de Stau1 potentiellement importants pour l'assemblage ou d'autres étapes du cycle viral. Par exemple, RHA est présent dans le même complexe que Stau1 [294, 295]. Par ailleurs, RHA s'associe avec pr55^{Gag} via le domaine NC, est également encapsidé dans le VIH-1 [46] et semble jouer un rôle non seulement dans la régulation de la traduction de l'ARN viral, tout comme Stau1, mais également dans la rétrotranscription [46, 87]. Étant partenaires protéiques dans la cellule, on ignore si RHA et Stau1 sont encapsidés au sein du même complexe et quelle est leur interdépendance lors de leurs fonctions durant le cycle viral. Il est également imaginable, tel que discuté dans l'article 3, que la fonction et le recrutement de Stau1 par pr55^{Gag} soient reliés à ceux de ABCE1/HP68, une protéine cruciale lors de l'assemblage [117, 119, 141]. Dans le même ordre d'idée, il est possible que le patron de modifications posttraductionnelles de Stau1 influence son action lors de l'infection virale. C'est pourquoi il est impératif de les identifier et de déterminer si des mutants ponctuels « non-modifiés » sont capables ou non d'influencer le cycle de réplication du VIH-1.

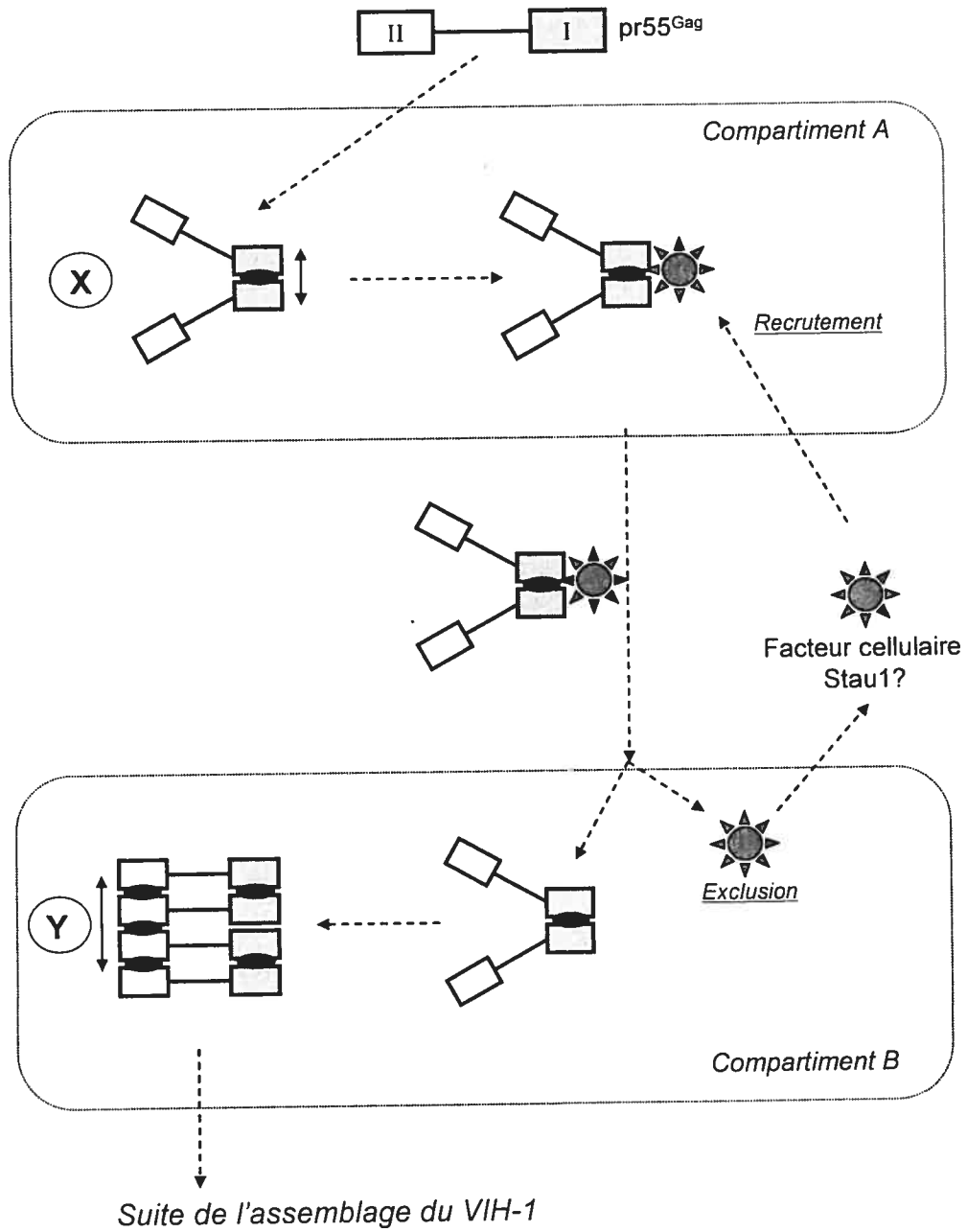
Plutôt que d'agir sur la multimérisation de pr55^{Gag} en tant que telle, Stau1 pourrait l'influencer plus indirectement en participant à la régulation spatio-temporelle de l'assemblage. En effet, Stau1 pourrait contrôler la transition entre deux étapes de

l'assemblage. Prenons un exemple simple et purement hypothétique illustré dans la figure 1: Considérons 2 étapes de la multimérisation de pr55^{Gag} médiées par ses domaines fonctionnels I et II. L'intermédiaire d'assemblage X (dont la multimérisation a été médiée par le domaine I) se trouve dans un compartiment cellulaire A au sein duquel il recrute des facteurs de l'hôte. Pour poursuivre l'assemblage et générer l'intermédiaire Y via la formation de contacts intermoléculaires II-II, X doit être transporté du compartiment A au compartiment B. Ce processus serait médié par les facteurs cellulaires acquis dans A par l'intermédiaire X via des déterminants uniques à sa structure quaternaire. Cependant, une fois Y généré, ces facteurs de l'hôte pourraient être relâchés pour laisser la place à de nouveaux facteurs régulant la poursuite de l'assemblage. On peut facilement imaginer que Stau1, qui est une protéine trafiquant entre différents compartiments cellulaires, participe à une de ces transitions. Sans provoquer de changements drastiques dans la localisation cellulaire de pr55^{Gag} à l'état basal (en tout cas, dans les cellules 293T), Stau1 pourrait tout simplement influencer « subtilement » soit la localisation de pr55^{Gag} au sein de microdomaines membranaires (tels que les barges lipidiques ou les MVB), soit la durée de certaines transitions durant l'assemblage, des hypothèses que nous n'avons jamais vérifiées expérimentalement. C'est pourquoi il serait intéressant d'évaluer l'influence de Stau1 sur les cinétiques d'assemblage et de relâche du VIH-1 en effectuant le même type d'expériences qu'illustrées dans les figures 14 et 15 de l'introduction [115, 126] ainsi que divers essais de fractionnement (essais de flottaison, purification de barges lipidiques...) à partir de cellules dans lesquelles l'assemblage du VIH-1 aura été synchronisé.

Par ailleurs, nous avons démontré dans l'article 2 que la fraction de Stau1 associée aux membranes interagissait avec pr55^{Gag} et semblait participer à l'assemblage du VIH-1. Nous ignorons à l'heure actuelle à quel compartiment membranaire exactement Stau1 est associé puisque l'essai de flottaison utilisé dans l'article 2 ne nous permet pas de discriminer la membrane plasmique des organelles membranaires tels que les MVB,

Figure 1 : Un modèle hypothétique de la régulation spatio-temporelle de l'assemblage du VIH-1.

Pr55^{Gag} est composé entre autre de deux domaines de multimérisation I (rectangle gris) et II (rectangle blanc). Au cours de l'assemblage pr55^{Gag} est localisé dans le compartiment cellulaire A ou s'effectue des contacts inter-moléculaires I-I (intermédiaire d'assemblage X). Cette structure quaternaire permet le recrutement d'un facteur cellulaire (étoile grise). Ce dernier transporte X du compartiment A vers le compartiment B. Une fois localisé, les contacts intermoléculaires II-II s'effectuent générant ainsi l'intermédiaire d'assemblage Y. Afin que la suite de l'assemblage se poursuive, le facteur cellulaire recruté par X est exclu du complexe d'assemblage afin de laisser la place à d'autres facteurs.



l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (données non montrées). Il serait donc intéressant d'identifier ce compartiment membranaire contenant Stau1 grâce à l'utilisation de techniques de fractionnement permettant de séparer avec une bonne résolution les différents types de membranes [168]. Par exemple, la présence éventuelle de Stau1 au sein des MVB dans les cellules de type I (telles que les cellules T ou 293T) représenterait un argument de plus en faveur de la thèse affirmant que l'assemblage du VIH-1 dépend de ce compartiment dans ce type cellulaire.

Les causes du phénotype de « sur-assemblage » décrit dans les articles 2 et 3 pourraient éventuellement être identifiées grâce à la caractérisation du protéome de pr55^{Gag} suivant la surexpression ou la déplétion de Stau1 (Figure 2B). En effet, il faudrait dans ces deux cas, identifier les facteurs cellulaires qui sont acquis ou perdus par pr55^{Gag} et qui représenteraient des candidats idéaux en tant que co-facteurs d'assemblage cruciaux. Par ailleurs, il faudrait faire également une analyse protéomique du mutant Stau1^{ΔN188} (ou Stau1^{ΔN137}), incapable de stimuler l'assemblage afin d'identifier les facteurs cellulaires qui sont recrutés et utilisés par les complexes d'assemblage par l'intermédiaire de Stau1 (Figure 2A). Par la suite, on pourrait dépléter, par l'utilisation de l'ARN interférence, plusieurs protéines composant le complexe actif contenant Stau1 (plutôt que Stau1 seulement) et observer comment ceci affecte l'assemblage et la réplication virale (voir section 4).

4 Les effets paradoxaux des variations des niveaux de Stau1 sur l'assemblage du VIH-1

L'article 2 montre qu'aussi bien la surexpression que la déplétion de Stau1 dans la cellule mènent à une augmentation de la multimérisation de pr55^{Gag}. Ce résultat semble paradoxal puisqu'on s'attend en général à ce que ces deux approches mènent à des

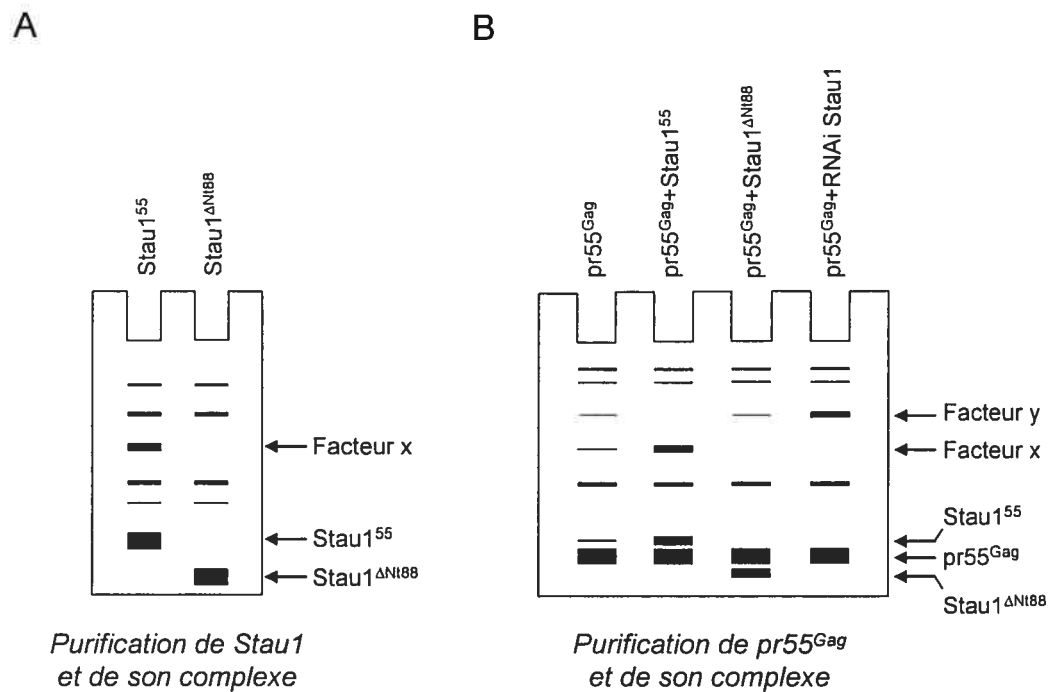


Figure 2 : Une approche expérimentale possible pour identifier de nouveaux cofacteurs d'assemblage.

(A) Identification de partenaires de Stau1 interagissant avec ses 88 premiers acides aminés. Exemple schématique et hypothétique de résultats possibles suite à l'analyse du contenu protéique du complexe contenant Stau1 ou Stau1^{ΔN188}. Suite à la purification de Stau1 et de son complexes, les protéines purifiées seraient séparées sur un gel d'acrylamide dénaturant puis détectées via une coloration à l'argent. Chaque bande dessinée correspond à une protéine. La comparaison des deux patrons permettrait l'identification de protéines interagissant avec les 88 premiers acides aminés de Stau1 (facteur x). (B) Identifications de nouveaux cofacteurs d'assemblage dont l'acquisition (facteur x, le même que dans (A)) ou l'exclusion (facteur y) par pr55^{Gag} dépend de Stau1. Ce serait possible par la même approche comparative que dans (A) mais suite à la purification des complexes contenant pr55^{Gag}, issus de cellules où Stau1 est déplété ou surexprimé.

phénotypes opposés, comme c'est le cas pour l'effet de Stau1 sur la régulation de la traduction et de la dégradation de ses ligands d'ARN [99, 298]. Pourtant, cette observation troublante a également été observée en ce qui concerne l'infectivité (Article 1) et la morphogénèse des virus ainsi que leur capacité d'encapsulation de l'ARNg et de Stau1 [276](Abrahamyan *et al.*, soumis).

Comment expliquer cette similarité de phénotype paradoxale? Si l'on considère Stau1 comme un facteur cellulaire qui favorise l'assemblage et l'encapsulation d'ARNg, on s'attendrait à ce que sa déplétion affecte négativement ces processus. Or, c'est exactement l'inverse qui est observé. On ne dispose pas, à l'heure actuelle, d'informations nous permettant d'expliquer ces résultats. On peut cependant supposer que, lorsque l'expression de Stau1 est diminuée, la stoechiométrie de Stau1 par rapport aux autres protéines présentes au sein du même complexe, est complètement bouleversée. Si l'on considère qu'il y a une certaine redondance fonctionnelle entre Stau1 et certaines de ces protéines vis-à-vis de l'assemblage par exemple, il est possible qu'un de ces facteurs compense la baisse des niveaux de Stau1, et ce, d'une manière éventuellement excessive, expliquant ainsi l'effet positif sur la multimérisation de pr55^{Gag} suite à la déplétion de Stau1. Dans un même ordre de pensée, la déplétion de Stau1 dans la cellule « libère » probablement des sites de liaison sur NC qui pourraient alors recruter d'autres co-facteurs d'assemblage qui seraient bien plus efficaces que Stau1 dans leur capacité à stimuler la multimérisation de pr55^{Gag}. L'analyse protéomique des partenaires de pr55^{Gag} dans ces conditions permettrait d'identifier ces facteurs (Figure 2B).

Inversement, l'interprétation des données sous un autre angle de vue donne naissance à une autre hypothèse qui n'est pas discutée dans l'article 2 et qui considère Stau1 comme un facteur qui limite plutôt l'assemblage. En effet, si une diminution des niveaux de Stau1 dans la cellule promeut un « sur-assemblage », il est possible que Stau1 représente une barrière lors de l'assemblage que pr55^{Gag} doit franchir afin de compléter la

formation de nouvelles capsides virales. Ainsi, la présence de Stau1 au sein des complexes permettrait d'éviter que la machinerie d'assemblage ne « s'emballe », ceci pouvant potentiellement mener à des morphologies virales aberrantes délétères pour l'infectivité. Par ailleurs, il est possible que le recrutement de Stau1 par les complexes d'assemblage permette l'exclusion de certains co-facteurs favorisant la multimérisation. Dans ce cas, en absence de Stau1, pr55^{Gag} ne serait pas en mesure de se « débarrasser » de ces derniers (protéine z dans la figure 2) et la multimérisation ne serait plus contrôlée. Ceci pourrait mener à l'encapsidation imprévue de facteurs cellulaires normalement exclus des complexes d'assemblage. Considérant Stau1 comme un facteur régulant négativement l'assemblage, on pourrait expliquer l'effet provoqué par la surexpression de Stau1 par l'inhibition des fonctions virales de la protéine Stau1 endogène ce qui induirait ainsi les mêmes phénotype que ceux provoqués par sa déplétion.

Finalement, on ne peut pas exclure que la surexpression et la déplétion de Stau1 mènent à des phénotypes similaires par l'intermédiaire de mécanismes distincts et indépendants qui favorisent la multimérisation de pr55^{Gag}. Par exemple, la surexpression de Stau1 provoquerait une augmentation du recrutement d'ARN « échafaudage » par pr55^{Gag} tandis que la déplétion de Stau1 nuirait à l'exclusion d'ABCE1 des complexes d'assemblage.

Afin de déterminer quelle est exactement l'influence de Stau1 sur l'assemblage, il faudrait, tel que discuté plus haut, élaborer des expériences impliquant la destruction complète du complexe contenant Stau1 et influençant l'assemblage, par un ciblage multiple utilisant l'ARN interférence. Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent clairement que des variations des niveaux cellulaires de Stau1 affectent significativement l'assemblage, l'encapsidation d'ARNg et l'infectivité du VIH-1.

5 Le mode de liaison de Stau1 à l'ARN génomique

Au début de mon doctorat, nous savions que Stau1 était dans le même complexe que l'ARNg dans les cellules productrices de VIH-1 [276]. Ceci suggérait fortement que Stau1 pouvait lier directement et spécifiquement un motif dans l'ARNg. C'est pourquoi j'ai tenté d'identifier ce site de liaison via des essais *in vitro* de retard sur gel (« gel shift assays ») impliquant la région « 5' leader » de l'ARNg. Cependant, ces expériences montraient clairement que la protéine Stau1 recombinante ne possédait aucune spécificité de liaison à l'ARNg *in vitro* (Données non publiées). Ainsi, dans nos études de l'association Stau1/ARNg, nous avons finalement favorisé le choix d'approches expérimentales impliquant un contexte cellulaire plutôt qu'*in vitro*.

Dans l'article 1, nous avons montré que Stau1 s'associait sélectivement à l'ARNg mais pas aux ARN viraux mono-épissés (4kb) et multi-épissés (1,8kb). Cependant le site de liaison de Stau1 dans l'ARNg reste à ce jour non identifié. À ce moment-là, cette étude représentait la première preuve qu'*in vivo* Stau1 possède une spécificité de liaison vis-à-vis de l'ARN. Depuis, beaucoup d'avancées scientifiques à ce sujet ont été faites et on a identifié différents ARN présents dans les complexes contenant Stau1. Dans le cas de l'ARNm *Arf1*, on a même identifié un domaine minimal de liaison à Stau1, appelé SBS (pour « Staufen1-binding site »)[298]. Lorsque la caractérisation du SBS et de ses déterminants au sein de plusieurs ligands ARN de Stau1 sera complétée, nous serons en mesure d'identifier le SBS dans l'ARNg du VIH-1. À cette fin, nous pourrions également exprimer dans les cellules des séquences d'intérêt de l'ARNg dans le contexte d'un ARNm normalement non lié par Stau1 puis effectuer des immunoprécipitations dirigées contre les complexes contenant Stau1. La présence ou non de ces ARNm de fusion dans les complexes immuns nous permettrait d'identifier le site de liaison de Stau1 dans l'ARNg.

Notre groupe a démontré que Stau1 était capable de lier l'élément TAR, une structure présente à l'extrémité 5' de toutes les espèces d'ARN du VIH-1 [99]. Dans ce cas, comment Stau1 peut-il ne s'associer qu'avec l'ARNg et non avec les ARN viraux épissés. Il a été montré qu'*in vitro*, TAR peut homo-dimériser et pourrait donc assister le DIS dans sa fonction de dimérisation de l'ARNg [222]. Ainsi, il n'est pas exclu que Stau1 lie l'ARNg seulement lorsque ce dernier est sous forme de dimère. Ce type de liaison n'est pas inconcevable puisque chez la drosophile, dStau s'associe à des dimères d'ARN *bicoid* [226]. En outre, une étude a montré que cet orthologue de Stau1 pouvait être recruté par un dimère d'ARN *bicoid* chimère contenant le DIS du VIH-1 à la place de son domaine de dimérisation [299]. Bien que cette expérience ait été effectuée afin de prouver que dStau est recruté par *bicoid* via la dimérisation d'ARN en tant que telle plutôt que par sa liaison à une séquence précise, ces résultats suggèrent que dStau (et donc peut-être son orthologue humain) pourrait lier spécifiquement un dimère de DIS.

Plus simplement, il est possible que la sélectivité de liaison de Stau1 vis-à-vis de l'ARNg soit conférée par son interaction avec le domaine NC de pr55^{Gag}. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'association Stau1/pr55^{Gag} dépend des 2 doigts de zinc du domaine NC (Article 3), des motifs permettant l'encapsidation spécifique du génome viral dans le VIH-1 [134-136]. De plus, on ignore 1) si l'interaction Stau1/ARNg est directe et 2) si cette dernière requière la présence de pr55^{Gag}. Ainsi, il faudrait effectuer des expériences d'immunoprécipitation dirigée contre Stau1 suivies d'amplification par RT-PCR de l'ARNg (voir article 1) dans le contexte d'un provirus codant pour une polyprotéine pr55^{Gag} mutée (telle que pr55^{Gag} C15-49S) qui ne peut plus interagir spécifiquement avec Stau1 et l'ARNg.

Tel que discuté dans l'article 1, il est également possible que l'association de Stau1 à l'ARNg dépende d'une structure tertiaire spécifique identifiés *in vitro*, telle que le BMH (voir section 5.6.4.3)[245, 246]. Il a été proposé que la présence ou non de ce type de

structure au sein de l'ARNg régulerait sa traduction, sa dimérisation et son encapsidation. Cependant, le fait que des essais d'attaques chimiques effectuées *in vivo* ne soient pas en mesure de détecter les structures tertiaires identifiées *in vitro* [248], suggère que ces dernières n'existent pas ou que l'ARNg n'adopte ces conformations que très transitoirement.

6 Y a-t-il un lien entre l'effet de Stau1 sur l'assemblage et celui sur l'encapsidation de l'ARNg ?

On sait que les niveaux de Stau1 dans la cellule productrice de virus sont importants pour l'infectivité et la morphogénèse virales (Article 1 et Abrahamyan *et al.*, soumis)[276]. De plus, des variations dans les quantités cellulaires de Stau1 corrèlent avec des changements au niveau de la multimérisation de pr55^{Gag} et des niveaux d'encapsidation d'ARNg viral (Articles 2 et 3 et Abrahamyan *et al.*, soumis)[276]. Cependant on ignore lequel de ces 2 effets est la cause de la baisse d'infectivité observée et des défauts morphologiques associés. Par ailleurs, on ne sait pas si l'effet de Stau1 sur les niveaux d'encapsidation d'ARN est une conséquence de son influence au niveau de la multimérisation de pr55^{Gag} (et vice-versa).

La réponse à cette question sera probablement fournie grâce à des expériences futures impliquant le mutant Stau1^{ΔNt88}. En effet, à l'inverse de la forme sauvage, la surexpression de ce mutant de Stau1 est incapable de stimuler la multimérisation de pr55^{Gag} bien qu'il soit en mesure d'interagir avec cette protéine (article 3). Par ailleurs, étant donné que Stau1^{ΔNt88} possède un domaine de liaison à l'ARN (dsRBD3) intact, ce mutant est très probablement en mesure de lier l'ARN et donc l'ARN génomique viral. Il sera donc très intéressant et important de déterminer 1) si ce mutant est encapsidé dans le VIH-1, 2) si sa surexpression, comme celle de la forme sauvage induit des changements dans l'infectivité

virale, l'encapsidation d'ARNg et la morphologie des virus. En d'autres termes, l'utilisation de ce mutant nous permettra de comprendre si ces fonctions de Stau1 dans les différentes étapes du cycle viral sont génétiquement dissociables ou sont toutes interdépendantes. Dans ce dernier cas, nos résultats représenteraient les premières preuves *in vivo* de l'existence d'un lien fonctionnel entre les processus de multimérisation de pr55^{Gag} et d'encapsidation de l'ARNg dans le VIH-1.

On ignore encore quasiment tout des mécanismes moléculaires régissant l'encapsidation spécifique mais limitée de seulement deux copies d'ARNg par le virus. L'existence d'un lien fonctionnel entre l'encapsidation de l'ARNg et la multimérisation de pr55^{Gag} constituerait une solution idéale pour le VIH-1 afin de palier à ces contraintes stoechiométriques puisque l'on peut imaginer que chaque molécule d'ARNg encapsidée serait sélectionnée par un intermédiaire d'assemblage spécifique plutôt que par des monomères de pr55^{Gag}. Considérant que Stau1, via son association avec pr55^{Gag} et l'ARNg, influence la multimérisation de pr55^{Gag} et l'encapsidation de l'ARNg, ce facteur de l'hôte représente un candidat idéal en tant que régulateur de la stoechiométrie de l'ARNg dans le VIH-1.

7 Pourquoi Stau1 est-il encapsidé dans le VIH-1?

Le rôle de Stau1 dans les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1 est clair. Cependant, une fois le virus relâché, Stau1 est présent dans le ce dernier [276]. Étant donné qu'il a été montré que Stau1 interagissait avec l'ARNg dans le virus [276] et était détecté au sein de noyaux viraux purifiés (Mouland *et al.*, données non publiées), on peut imaginer que Stau1 est présent au sein du complexe RNP à l'intérieur du noyau viral. Les fonctions assumées par Stau1 que nous avons identifiées ne requièrent a priori pas son encapsidation. Même s'il est connu que le virus encapside beaucoup de facteurs cellulaires en son sein

[24-26], il est aussi clair qu'il a évolué pour exclure au cours de son assemblage les facteurs dont il n'a plus besoin. Par exemple, ABCE1, via son association avec pr55^{Gag}, est indispensable lors de l'assemblage du VIH-1. Cependant ce facteur de l'hôte est exclu des complexes d'assemblage avant la fin du processus et n'est donc pas encapsidé dans le VIH-1 [117, 119]. Pourquoi n'en est-il pas de même avec Stau1 ?

L'ARN est un élément structural des rétrovirus. En effet, la déplétion de l'ARN présent dans le virus par des traitements à l'ARNase bouleverse la structure de ce dernier [23]. D'ailleurs, MLV, suite à des mutations qui affecte l'encapsidation d'ARNg, compense cette perte en incorporant des ARN cellulaires de sorte que la quantité d'ARN dans le virus est toujours à peu près constante [22, 23]. Considérant que Stau1 est une protéine qui lie l'ARN, on pourrait émettre l'hypothèse que Stau1 a un rôle structural dans le virus en maintenant par exemple la structure de l'ARN ou du RNP en tant que telle. Cette hypothèse est supportée par le fait que la déplétion de Stau1 dans la cellule bouleverse la stabilité du noyau viral (Mouland *et al.*, données non publiées). Cependant, on sait que des variations de niveaux de Stau1 dans le virus n'affectent pas la stabilité du dimère d'ARNg (Abrahamyan *et al.*, soumis).

On sait grâce à des analyses par microscopie électronique qu'il y a une corrélation entre l'augmentation des niveaux de Stau1 au sein du VIH-1 et des aberrations au niveau de la morphologie du virion (Abrahamyan *et al.*, soumis). Cependant, on ignore si ce phénotype est effectivement la conséquence d'une augmentation de la concentration intravirale de Stau1 ou de problèmes survenus lors de la formation de la particule dans la cellule. De plus, tel que mentionné plus haut, même si on déplete Stau1 dans la cellule, on est incapable de diminuer ses niveaux dans le virus (Abrahamyan *et al.*, soumis). Il serait donc très intéressant de regarder la morphologie de virus dépourvus de Stau1 (qui seraient issus de cellules invalidées pour le gène codant pour cette protéine).

Il est possible que VIH-1 encapside Stau1 à des fins d'utilisation durant les étapes précoces de son cycle. Par exemple, il a été montré que RHA était également encapsidée

[46]. Par ailleurs, bien que l'on en ignore le mécanisme, RHA assiste la rétrotranscription suite à l'entrée du virus dans la cellule hôte et influence donc l'infektivité virale de cette manière [46]. Par ailleurs, on sait que Stau1 et RHA sont dans le même complexe [294, 295]. Ainsi, il est possible que la présence de Stau1 au sein du RTC soit importante, au même titre que celle de RHA, pour le bon déroulement de la rétrotranscription. On sait que, tout du moins *in vitro*, Stau1 n'influence pas significativement (en tout cas par rapport à NC ou à Tat) certaines étapes de la rétrotranscription telles que les transferts de brin [317]. Cependant, il n'est pas exclu, qu'*in vivo*, Stau1 participe au contrôle spatio-temporel des étapes précoces. En effet, tout comme pour l'assemblage, chaque étape précoce du cycle viral s'effectue à un moment bien précis et probablement dans un compartiment cellulaire spécifique. À titre d'exemple, la rétrotranscription ne doit pas commencer tant que la décapsidation n'a pas commencé et IN doit rester inactive tant que la rétrotranscription n'est pas achevée et que le PIC n'est pas localisé dans le noyau de la cellule.

Ainsi, vu que Stau1 est une protéine qui est mobile dans la cellule via le cytosquelette, et qui est capable de transiter dans le noyau, on peut facilement imaginer que Stau1 participe au voyage intracellulaire du RTC et du PIC vers le site d'intégration du provirus. NC est un des constituants du PIC et du RTC et garderait Stau1 dans ces complexes pendant tous ces processus.

Ces hypothèses, selon moi, mériteraient vraiment d'être testées dans un futur proche. Il faudrait premièrement réussir à générer des virus ne contenant pas Stau1 tel que discuté plus haut, infecter des cellules avec ces derniers puis déterminer si cette déplétion intra-virale affecte, par exemple, la localisation du PIC dans la cellule, l'intégration chromosomique ou la synthèse d'ADN double-brin viral. On pourrait également infecter des cellules, ayant été préalablement soumis à l'ARN interférence pour l'expression de Stau1, avec des virus contenant ou non Stau1. Ce type d'expériences permettrait d'évaluer, lors des étapes précoces du VIH-1, la contribution des protéines Stau1 de la cellule hôte par

rapport à celles encapsidées. Dans le cas de RHA, cette double déplétion de RHA résultait en un effet additif sur la baisse de l'infectivité montrant ainsi qu'aussi bien la protéine d'origine virale que celle présente dans la cellule hôte influençaient l'infectivité [46].

8 Un lien entre Stau1 et l'immunité innée?

Très récemment, Kozak *et al.* ont montré, suite à l'analyse protéomique du complexe contenant APOBEC3G (pour « apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 3G ») que Stau1 (ainsi que plusieurs autres protéines liant l'ARN) était présent dans ce complexe [318]. APOBEC3G, identifié au départ comme une cytidine déaminase, a fait l'objet durant les quatre dernières années de beaucoup d'études afin d'élucider son rôle dans l'immunité innée de la cellule vis-à-vis de l'infection rétrovirale [278]. En effet, lorsque la protéine virale Vif est absente, APOBEC3G est encapsidé dans le VIH-1 via son association avec le domaine NC de pr55^{Gag} d'une manière probablement ARN-dépendante [265-269]. Suite à l'infection d'une nouvelle cellule hôte par ce virus, APOBEC3G, présent dans le virus ou la cellule, catalyse la déamination des cytosines du brin (-) d'ADN néosynthétisé lors de la rétrotranscription. Ceci fait que les cytosines (C) du brin (-) sont édités en uraciles (U). Lors de la synthèse du brin (+), RT considère l'uracile comme une thymine et incorpore donc une adénine dans l'ADN néosynthétisé au lieu d'une guanine. L'édition catalysée par APOBEC3G résulte donc en des mutations G→A dans le brin (+) de l'ADN viral. Le provirus résultant est « hyper-muté » et en conséquence, déficient. Alternativement, on pense que les mutations C→U présentes dans le brin (-) d'ADN pourrait induire leur dégradation possiblement par UNG (pour « uracil DNA glycosylase ») [278]. Le VIH-1 a développé des mécanismes afin de contrer cette activité antivirale de APOBEC3G. En effet, la protéine virale Vif lie APOBEC3G ce qui résulte en l'exclusion de APOBEC3G du virus néosynthétisé. Par ailleurs, Vif induit la dégradation d'APOBEC3G en le ciblant vers le protéasome [319-322]. Ainsi, on peut émettre

l'hypothèse que Stau1, via son interaction avec APOBEC3G et le domaine NC de pr55^{Gag}, pourrait éventuellement influencer l'association d'APOBEC3G avec pr55^{Gag}, son encapsidation ainsi que son activité antivirale lors des étapes précoces du cycle virale.

Par ailleurs, dans des cellules non humaines, il est connu que la réplication du VIH-1 est restreinte très tôt suite à l'entrée du virus. Ceci est dû au fait que le VIH-1 contient des déterminants d'origine virale (comme CA) ou cellulaire (comme la cyclophiline A) qui constitue une « permission d'entrée » dans un hôte d'une espèce bien spécifique [44]. Par exemple, si le VIH-1 infecte certaines lignées cellulaires de primates, CA est reconnue comme intrus par la protéine TRIM5 α de primates qui induit son élimination. En revanche, la substitution de CA du VIH-1 par la protéine CA du virus d'immunodéficience simienne confère aux capsides arrivantes un « laissez-passer » vis-à-vis de TRIM5 α . Inversement, le SIV ne réussit pas à compléter ces étapes précoces dans des cellules humaines puisqu'il est contrôlé par la protéine TRIM5 α humaine [44, 323-326]. Par ailleurs, l'origine (humaine ou non) de la cyclophiline A présente dans le VIH-1 confère également à la capside une identité [260]. Afin de tester si la protéine Stau1 présente dans le VIH-1 peut conférer au virus certaines de ces propriétés, on pourrait déterminer dans des cellules non-humaines et humaines le potentiel infectieux de particules de VIH-1 dans lesquelles on aurait forcé l'encapsidation d'orthologues murins ou simiens de Stau1.

À mon avis, l'implication éventuelle de Stau1 dans le contournement de l'immunité innée par le VIH-1 mérite vraiment d'être considérée et étudiée.

9 L'utilisation d'essais BRET pr55^{Gag}-pr55^{Gag} dans l'identification d'inhibiteurs de l'assemblage du VIH-1.

Vu que le processus d'assemblage est finement régulé et représente une étape critique de la production virale, son médiateur, pr55^{Gag}, représente selon moi une cible de choix dans le développement de composés anti-viraux. En effet, les composés PA-457

(appelé aussi DSB) et CAP-1 lient pr55^{Gag} et inhibent plutôt la formation du noyau viral que la multimérisation en interférant respectivement avec la protéolyse de la jonction CA-p2 et avec les interactions intermoléculaires CA-CA médiées par leur extrémité N-terminale [14-16, 316]. À ce jour, un seul inhibiteur de la multimérisation de pr55^{Gag} a été identifié. Ce dernier, appelé CAI, consiste en un peptide de 12 acides aminés qui altère l'interface de dimérisation dans l'extrémité C-terminale de CA [327, 328]. Cependant, son activité inhibitrice n'a été démontré que dans des essais d'assemblage effectués *in vitro* et aucune donnée *in vivo* n'a été publiée.

Dans les articles 2 et 3, nous avons utilisé les techniques de BRET comme méthode de détection de la multimérisation de pr55^{Gag}, l'étape-clé de l'assemblage du VIH-1. Cet essai est rapide, peu dispendieux, ne requiert que très peu de manipulations, permet un échantillonnage énorme et peut être utilisé dans les cellules vivantes. Grâce à cet essai, on pourrait cribler de banques de composés pour leur capacité à diminuer le ratio BRET pr55^{Gag}-pr55^{Gag} et donc à inhiber l'assemblage. Suite à leur identification, l'action de ces composés sur l'assemblage pourrait assez facilement et rapidement être validée dans des expériences de production virale et de cinétique de répllication. En utilisant le même essai, il serait très intéressant de cribler des banques de gènes ou d'épingles à cheveux d'ARN (« short hairpin RNA ») médiant l'ARN interférence [329], afin d'identifier les protéines cellulaires qui modulent positivement ou négativement la multimérisation de pr55^{Gag}, représentant des cibles antivirales potentielles.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les études exposées et discutées dans cette thèse mettent en lumière le rôle de Staufen1 dans le cycle de réplication du VIH-1. En effet, nous avons montré que 1) l'infectivité du VIH-1 dépend des niveaux d'expression de Stau1 dans la cellule productrice, et que 2) Stau1 participe à l'assemblage du VIH-1 via son recrutement spécifique au sein de complexes contenant pr55^{Gag} et l'ARN génomique viral. À ma connaissance, Stau1 est le seul facteur de l'hôte identifié dont l'influence sur la multimérisation de pr55^{Gag} a été démontrée dans des cellules vivantes.

L'élucidation des mécanismes moléculaires régissant l'activité du complexe protéique contenant Stau1 vis-à-vis de la réplication virale, nous permettra de comprendre si ce complexe représente une nouvelle cible antivirale potentielle et efficace à long terme. Par ailleurs, comprendre comment le VIH-1 parasite à son avantage des machineries cellulaires représente selon moi un intérêt fondamental énorme puisque ce type de recherche ouvre la porte sur une meilleure compréhension de nombreux processus cellulaires complexes.

BIBLIOGRAPHIE

1. UNAIDS (2006). 2006 Report on the global AIDS epidemic.
2. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
3. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
4. Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H. (1997). *Retroviruses* (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
5. Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debysse, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* 31, 98-105.
6. Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004). Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. *AIDS Rev* 6, 199-207.
7. Greene, W.C., and Peterlin, B.M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-680.
8. Cimarelli, A., and Darlix, J.L. (2002). Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* 59, 1166-1184.
9. Resh, M.D. (2005). Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* 7, 84-91.
10. Piacenti, F.J. (2006). An update and review of antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy* 26, 1111-1133.
11. Temesgen, Z., Warnke, D., and Kasten, M.J. (2006). Current status of antiretroviral therapy. *Expert Opin Pharmacother* 7, 1541-1554.
12. Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M., and Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4, 1302-1307.
13. Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C., and Miller, M.D. (2000).

- Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287, 646-650.
14. Zhou, J., Huang, L., Hachey, D.L., Chen, C.H., and Aiken, C. (2005). Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral Gag protein in immature HIV-1 particles. *J Biol Chem* 280, 42149-42155.
 15. Zhou, J., Yuan, X., Dismuke, D., Forshey, B.M., Lundquist, C., Lee, K.H., Aiken, C., and Chen, C.H. (2004). Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by specific targeting of the final step of virion maturation. *J Virol* 78, 922-929.
 16. Li, F., Zoumplis, D., Matallana, C., Kilgore, N.R., Reddick, M., Yunus, A.S., Adamson, C.S., Salzwedel, K., Martin, D.E., Allaway, G.P., Freed, E.O., and Wild, C.T. (2006). Determinants of activity of the HIV-1 maturation inhibitor PA-457. *Virology*.
 17. Freed, E.O. (2004). HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol* 12, 170-177.
 18. Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* 22, 1707-1715.
 19. Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., and Krausslich, H.G. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2641-2646.
 20. Graham, D.R., Chertova, E., Hilburn, J.M., Arthur, L.O., and Hildreth, J.E. (2003). Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol* 77, 8237-8248.
 21. Joshi, A., Nagashima, K., and Freed, E.O. (2006). Mutation of dileucine-like motifs in the human immunodeficiency virus type 1 capsid disrupts virus assembly, gag-gag interactions, gag-membrane binding, and virion maturation. *J Virol* 80, 7939-7951.
 22. Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Harvin, D., and Rein, A. (2002). Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *J Virol* 76, 11405-11413.
 23. Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., and Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5246-5251.
 24. Cantin, R., Methot, S., and Tremblay, M.J. (2005). Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* 79, 6577-6587.

25. Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Jr., Sowder, R.C., 2nd, Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J., Nagashima, K., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lifson, J.D., and Ott, D.E. (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80, 9039-9052.
26. Ott, D.E., Coren, L.V., Johnson, D.G., Kane, B.P., Sowder, R.C., 2nd, Kim, Y.D., Fisher, R.J., Zhou, X.Z., Lu, K.P., and Henderson, L.E. (2000). Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 266, 42-51.
27. Kleiman, L., Halwani, R., and Javanbakht, H. (2004). The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res* 2, 163-175.
28. McClure, M.O., Marsh, M., and Weiss, R.A. (1988). Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *Embo J* 7, 513-518.
29. Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G., and Engleman, E.G. (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* 49, 659-668.
30. Vidricaire, G., Imbeault, M., and Tremblay, M.J. (2004). Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol* 78, 11904-11915.
31. Popik, W., Alce, T.M., and Au, W.C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* 76, 4709-4722.
32. Manes, S., del Real, G., Lacalle, R.A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E., and Martinez, A.C. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* 1, 190-196.
33. Jolly, C., and Sattentau, Q.J. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* 79, 12088-12094.
34. Bounou, S., Leclerc, J.E., and Tremblay, M.J. (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, 1004-1014.
35. Fortin, J.F., Cantin, R., and Tremblay, M.J. (1998). T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* 72, 2105-2112.

36. Fortin, J.F., Cantin, R., Lamontagne, G., and Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* *71*, 3588-3596.
37. Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587-597.
38. Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* *16*, 135-144.
39. Pandori, M.W., Fitch, N.J., Craig, H.M., Richman, D.D., Spina, C.A., and Guatelli, J.C. (1996). Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* *70*, 4283-4290.
40. Forshey, B.M., and Aiken, C. (2003). Disassembly of human immunodeficiency virus type 1 cores in vitro reveals association of Nef with the subviral ribonucleoprotein complex. *J Virol* *77*, 4409-4414.
41. Campbell, E.M., Nunez, R., and Hope, T.J. (2004). Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* *78*, 5745-5755.
42. Forshey, B.M., von Schwedler, U., Sundquist, W.I., and Aiken, C. (2002). Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* *76*, 5667-5677.
43. Dismuke, D.J., and Aiken, C. (2006). Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol* *80*, 3712-3720.
44. Sokolskaja, E., and Luban, J. (2006). Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1. *Curr Opin Microbiol* *9*, 404-408.
45. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* *101*, 173-185.
46. Roy, B.B., Hu, J., Guo, X., Russell, R.S., Guo, F., Kleiman, L., and Liang, C. (2006). Association of RNA helicase a with human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Biol Chem* *281*, 12625-12635.
47. Hamamoto, S., Nishitsuji, H., Amagasa, T., Kannagi, M., and Masuda, T. (2006). Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol* *80*, 5670-5677.

48. Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., and Stevenson, M. (1998). Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* 188, 2113-2125.
49. McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159, 441-452.
50. Gally, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9825-9830.
51. Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669.
52. von Schwedler, U., Kornbluth, R.S., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6992-6996.
53. Haffar, O.K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S.G., and Bukrinsky, M. (2000). Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* 299, 359-368.
54. Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J.D., Fouchier, R.A., Jenkins, Y., Meyer, B.E., Wu, L.I., Emerman, M., and Malim, M.H. (2001). HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* 7, 1025-1035.
55. Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17, 909-917.
56. Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7311-7315.
57. de Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavrois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D., and Greene, W.C. (2001). Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294, 1105-1108.

58. Ao, Z., Yao, X., and Cohen, E.A. (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, 3170-3177.
59. Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., and Charneau, P. (2006). Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. *Retrovirology* 3, 38.
60. Maertens, G., Cherepanov, P., Debyser, Z., Engelborghs, Y., and Engelman, A. (2004). Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Biol Chem* 279, 33421-33429.
61. Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z., and Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278, 33528-33539.
62. Fassati, A., Gorlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L., and Mingot, J.M. (2003). Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *Embo J* 22, 3675-3685.
63. Zielske, S.P., and Stevenson, M. (2005). Importin 7 may be dispensable for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus infection of primary macrophages. *J Virol* 79, 11541-11546.
64. Limon, A., Nakajima, N., Lu, R., Ghory, H.Z., and Engelman, A. (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, 12078-12086.
65. Dvorin, J.D., Bell, P., Maul, G.G., Yamashita, M., Emerman, M., and Malim, M.H. (2002). Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 76, 12087-12096.
66. Thomas, J.A., Gagliardi, T.D., Alvord, W.G., Lubomirski, M., Bosche, W.J., and Gorelick, R.J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* 353, 41-51.
67. Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.
68. Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., and Poeschla, E.M. (2004). Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 279, 55570-55577.

69. Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* *11*, 1287-1289.
70. Vandekerckhove, L., Christ, F., Van Maele, B., De Rijck, J., Gijssbers, R., Van den Haute, C., Witvrouw, M., and Debyser, Z. (2006). Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J Virol* *80*, 1886-1896.
71. Mansharamani, M., Graham, D.R., Monie, D., Lee, K.K., Hildreth, J.E., Siliciano, R.F., and Wilson, K.L. (2003). Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* *77*, 13084-13092.
72. Lee, M.S., and Craigie, R. (1994). Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9823-9827.
73. Harris, D., and Engelman, A. (2000). Both the structure and DNA binding function of the barrier-to-autointegration factor contribute to reconstitution of HIV type 1 integration in vitro. *J Biol Chem* *275*, 39671-39677.
74. Jacque, J.M., and Stevenson, M. (2006). The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature* *441*, 641-645.
75. Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R., and Goff, S.P. (1994). Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* *266*, 2002-2006.
76. Maroun, M., Delelis, O., Coadou, G., Bader, T., Segeral, E., Mbemba, G., Petit, C., Sonigo, P., Rain, J.C., Mouscadet, J.F., Benarous, R., and Emiliani, S. (2006). Inhibition of early steps of HIV-1 replication by SNF5/Ini1. *J Biol Chem* *281*, 22736-22743.
77. Lau, A., Swinbank, K.M., Ahmed, P.S., Taylor, D.L., Jackson, S.P., Smith, G.C., and O'Connor, M.J. (2005). Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase. *Nat Cell Biol* *7*, 493-500.
78. Nunnari, G., Argyris, E., Fang, J., Mehlman, K.E., Pomerantz, R.J., and Daniel, R. (2005). Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology* *335*, 177-184.
79. Daniel, R., Kao, G., Taganov, K., Greger, J.G., Favorova, O., Merkel, G., Yen, T.J., Katz, R.A., and Skalka, A.M. (2003). Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4778-4783.

80. Dehart, J.L., Andersen, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., An, D.S., Blackett, J., Kim, B., and Planelles, V. (2005). The ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related protein is dispensable for retroviral integration. *J Virol* *79*, 1389-1396.
81. Ariumi, Y., Turelli, P., Masutani, M., and Trono, D. (2005). DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* *79*, 2973-2978.
82. Purcell, D.F., and Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* *67*, 6365-6378.
83. Cochrane, A.W., McNally, M.T., and Mouland, A.J. (2006). The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology* *3*, 18.
84. Powell, D.M., Amaral, M.C., Wu, J.Y., Maniatis, T., and Greene, W.C. (1997). HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 973-978.
85. Berro, R., Kehn, K., de la Fuente, C., Pumfery, A., Adair, R., Wade, J., Colberg-Poley, A.M., Hiscott, J., and Kashanchi, F. (2006). Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32. *J Virol* *80*, 3189-3204.
86. Strebel, K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* *17 Suppl 4*, S25-34.
87. Hartman, T.R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D.R., and Boris-Lawrie, K. (2006). RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 509-516.
88. Sanchez-Velar, N., Udofia, E.B., Yu, Z., and Zapp, M.L. (2004). hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev* *18*, 23-34.
89. Yu, Z., Sanchez-Velar, N., Catrina, I.E., Kittler, E.L., Udofia, E.B., and Zapp, M.L. (2005). The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4027-4032.
90. Yedavalli, V.S., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L., and Jeang, K.T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* *119*, 381-392.
91. Fang, J., Kubota, S., Yang, B., Zhou, N., Zhang, H., Godbout, R., and Pomerantz, R.J. (2004). A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular cofactor of Rev. *Virology* *330*, 471-480.

92. Modem, S., Badri, K.R., Holland, T.C., and Reddy, T.R. (2005). Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Res* 33, 873-879.
93. Li, J., Liu, Y., Kim, B.O., and He, J.J. (2002). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol* 76, 8374-8382.
94. Soros, V.B., Carvajal, H.V., Richard, S., and Cochrane, A.W. (2001). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *J Virol* 75, 8203-8215.
95. Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M., and Siliciano, R.F. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75, 181-191.
96. Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L., and Sonenberg, N. (2003). The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77, 3939-3949.
97. Dorin, D., Bonnet, M.C., Bannwarth, S., Gatignol, A., Meurs, E.F., and Vaquero, C. (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, 4440-4448.
98. Svitkin, Y.V., Pause, A., and Sonenberg, N. (1994). La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* 68, 7001-7007.
99. Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 4797-4812.
100. Fujii, R., Okamoto, M., Aratani, S., Oishi, T., Ohshima, T., Taira, K., Baba, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2001). A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* 276, 5445-5451.
101. Perales, C., Carrasco, L., and Gonzalez, M.E. (2005). Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochim Biophys Acta* 1743, 169-175.
102. Dulude, D., Baril, M., and Brakier-Gingras, L. (2002). Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 30, 5094-5102.

103. Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S.M., and Mak, J. (2001). Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 75, 1834-1841.
104. Dulude, D., Berchiche, Y.A., Gendron, K., Brakier-Gingras, L., and Heveker, N. (2006). Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 345, 127-136.
105. Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* 396, 219-226.
106. Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12966-12971.
107. Briggs, J.A., Simon, M.N., Gross, I., Krausslich, H.G., Fuller, S.D., Vogt, V.M., and Johnson, M.C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11, 672-675.
108. Wilk, T., Gross, I., Gowen, B.E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R., Krausslich, H.G., Boulanger, P., and Fuller, S.D. (2001). Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75, 759-771.
109. Ako-Adjei, D., Johnson, M.C., and Vogt, V.M. (2005). The retroviral capsid domain dictates virion size, morphology, and coassembly of gag into virus-like particles. *J Virol* 79, 13463-13472.
110. Ott, D.E., Coren, L.V., Chertova, E.N., Gagliardi, T.D., Nagashima, K., Sowder, R.C., 2nd, Poon, D.T., and Gorelick, R.J. (2003). Elimination of protease activity restores efficient virion production to a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid deletion mutant. *J Virol* 77, 5547-5556.
111. von Schwedler, U.K., Stemmler, T.L., Klishko, V.Y., Li, S., Albertine, K.H., Davis, D.R., and Sundquist, W.I. (1998). Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *Embo J* 17, 1555-1568.
112. Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32.
113. Tritel, M., and Resh, M.D. (2001). The late stage of human immunodeficiency virus type 1 assembly is an energy-dependent process. *J Virol* 75, 5473-5481.
114. Lingappa, J.R., Hill, R.L., Wong, M.L., and Hegde, R.S. (1997). A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system. *J Cell Biol* 136, 567-581.

115. Tritel, M., and Resh, M.D. (2000). Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* *74*, 5845-5855.
116. Doohar, J.E., and Lingappa, J.R. (2004). Cell-free systems for capsid assembly of primate lentiviruses from three different lineages. *J Med Primatol* *33*, 272-280.
117. Doohar, J.E., and Lingappa, J.R. (2004). Conservation of a stepwise, energy-sensitive pathway involving HP68 for assembly of primate lentivirus capsids in cells. *J Virol* *78*, 1645-1656.
118. Singh, A.R., Hill, R.L., and Lingappa, J.R. (2001). Effect of mutations in Gag on assembly of immature human immunodeficiency virus type 1 capsids in a cell-free system. *Virology* *279*, 257-270.
119. Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C., and Lingappa, J.R. (2002). Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* *415*, 88-92.
120. Rudner, L., Nydegger, S., Coren, L.V., Nagashima, K., Thali, M., and Ott, D.E. (2005). Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* *79*, 4055-4065.
121. Lee, Y.M., and Yu, X.F. (1998). Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD4+ T cells. *Virology* *243*, 78-93.
122. Lee, Y.M., Liu, B., and Yu, X.F. (1999). Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol* *73*, 5654-5662.
123. Nermut, M.V., Zhang, W.H., Francis, G., Ciampor, F., Morikawa, Y., and Jones, I.M. (2003). Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* *305*, 219-227.
124. Sandefur, S., Varthakavi, V., and Spearman, P. (1998). The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol* *72*, 2723-2732.
125. Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V., and Spearman, P. (2000). Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* *74*, 7238-7249.
126. Perlman, M., and Resh, M.D. (2006). Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* *7*, 731-745.

127. Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P., and Thali, M. (2003). HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4, 902-910.
128. Poole, E., Strappe, P., Mok, H.P., Hicks, R., and Lever, A.M. (2005). HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* 6, 741-755.
129. Zabransky, A., Hunter, E., and Sakalian, M. (2002). Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association. *Virology* 294, 141-150.
130. McGrath, C.F., Buckman, J.S., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Coren, L.V., and Gorelick, R.J. (2003). Human cellular nucleic acid-binding protein Zn²⁺ fingers support replication of human immunodeficiency virus type 1 when they are substituted in the nucleocapsid protein. *J Virol* 77, 8524-8531.
131. Zhang, Y., Qian, H., Love, Z., and Barklis, E. (1998). Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* 72, 1782-1789.
132. Accola, M.A., Strack, B., and Gottlinger, H.G. (2000). Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J Virol* 74, 5395-5402.
133. Alfadhli, A., Dhenub, T.C., Still, A., and Barklis, E. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. *J Virol* 79, 14498-14506.
134. Aldovini, A., and Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* 64, 1920-1926.
135. Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A., and Gottlinger, H.G. (1993). Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* 67, 6159-6169.
136. Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Jr., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Henderson, L.E., and Rein, A. (1990). Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol* 64, 3207-3211.
137. Khorchid, A., Halwani, R., Wainberg, M.A., and Kleiman, L. (2002). Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* 76, 4131-4137.
138. Cimarelli, A., Sandin, S., Hoglund, S., and Luban, J. (2000). Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* 74, 3046-3057.

139. Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P., and Luban, J. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* 73, 8527-8540.
140. Huseby, D., Barklis, R.L., Alfadhli, A., and Barklis, E. (2005). Assembly of human immunodeficiency virus precursor gag proteins. *J Biol Chem* 280, 17664-17670.
141. Lingappa, J.R., Dooher, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K., and Klein, K.C. (2006). Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem* 281, 3773-3784.
142. Gitti, R.K., Lee, B.M., Walker, J., Summers, M.F., Yoo, S., and Sundquist, W.I. (1996). Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273, 231-235.
143. Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278, 849-853.
144. Momany, C., Kovari, L.C., Prongay, A.J., Keller, W., Gitti, R.K., Lee, B.M., Gorbalenya, A.E., Tong, L., McClure, J., Ehrlich, L.S., Summers, M.F., Carter, C., and Rossmann, M.G. (1996). Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nat Struct Biol* 3, 763-770.
145. Li, S., Hill, C.P., Sundquist, W.I., and Finch, J.T. (2000). Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407, 409-413.
146. Mayo, K., Huseby, D., McDermott, J., Arvidson, B., Finlay, L., and Barklis, E. (2003). Retrovirus capsid protein assembly arrangements. *J Mol Biol* 325, 225-237.
147. Ganser, B.K., Li, S., Klishko, V.Y., Finch, J.T., and Sundquist, W.I. (1999). Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* 283, 80-83.
148. Ehrlich, L.S., Agresta, B.E., and Carter, C.A. (1992). Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J Virol* 66, 4874-4883.
149. Ehrlich, L.S., Liu, T., Scarlata, S., Chu, B., and Carter, C.A. (2001). HIV-1 capsid protein forms spherical (immature-like) and tubular (mature-like) particles in vitro: structure switching by pH-induced conformational changes. *Biophys J* 81, 586-594.
150. Borsetti, A., Ohagen, A., and Gottlinger, H.G. (1998). The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J Virol* 72, 9313-9317.

151. Provitera, P., Goff, A., Harenberg, A., Bouamr, F., Carter, C., and Scarlata, S. (2001). Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* *40*, 5565-5572.
152. Ebbets-Reed, D., Scarlata, S., and Carter, C.A. (1996). The major homology region of the HIV-1 gag precursor influences membrane affinity. *Biochemistry* *35*, 14268-14275.
153. Ganser-Pornillos, B.K., von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Aiken, C., and Sundquist, W.I. (2004). Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J Virol* *78*, 2545-2552.
154. von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Garrus, J.E., and Sundquist, W.I. (2003). Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol* *77*, 5439-5450.
155. Chu, H.H., Chang, Y.F., and Wang, C.T. (2006). Mutations in the alpha-helix Directly C-terminal to the Major Homology Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Disrupt Gag Multimerization and Markedly Impair Virus Particle Production. *J Biomed Sci*.
156. Melamed, D., Mark-Danieli, M., Kenan-Eichler, M., Kraus, O., Castiel, A., Laham, N., Pupko, T., Glaser, F., Ben-Tal, N., and Bacharach, E. (2004). The conserved carboxy terminus of the capsid domain of human immunodeficiency virus type 1 gag protein is important for virion assembly and release. *J Virol* *78*, 9675-9688.
157. Accola, M.A., Hoglund, S., and Gottlinger, H.G. (1998). A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly. *J Virol* *72*, 2072-2078.
158. Liang, C., Hu, J., Russell, R.S., Roldan, A., Kleiman, L., and Wainberg, M.A. (2002). Characterization of a putative alpha-helix across the capsid-SP1 boundary that is critical for the multimerization of human immunodeficiency virus type 1 gag. *J Virol* *76*, 11729-11737.
159. Newman, J.L., Butcher, E.W., Patel, D.T., Mikhaylenko, Y., and Summers, M.F. (2004). Flexibility in the P2 domain of the HIV-1 Gag polyprotein. *Protein Sci* *13*, 2101-2107.
160. Morellet, N., Druillennec, S., Lenoir, C., Bouaziz, S., and Roques, B.P. (2005). Helical structure determined by NMR of the HIV-1 (345-392)Gag sequence, surrounding p2: implications for particle assembly and RNA packaging. *Protein Sci* *14*, 375-386.

161. Morikawa, Y., Hockley, D.J., Nermut, M.V., and Jones, I.M. (2000). Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J Virol* *74*, 16-23.
162. Morikawa, Y., Zhang, W.H., Hockley, D.J., Nermut, M.V., and Jones, I.M. (1998). Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. *J Virol* *72*, 7659-7663.
163. Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., and Summers, M.F. (2004). Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 517-522.
164. Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* *3*, 718-729.
165. Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* *162*, 443-455.
166. Ono, A., and Freed, E.O. (2004). Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* *78*, 1552-1563.
167. Dong, X., Li, H., Derdowski, A., Ding, L., Burnett, A., Chen, X., Peters, T.R., Dermody, T.S., Woodruff, E., Wang, J.J., and Spearman, P. (2005). AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* *120*, 663-674.
168. Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.L., and Muriaux, D. (2006). Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* *359*, 848-862.
169. Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* *4*, 785-801.
170. Ono, A., and Freed, E.O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13925-13930.
171. Nguyen, D.H., and Hildreth, J.E. (2000). Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* *74*, 3264-3272.
172. Lindwasser, O.W., and Resh, M.D. (2001). Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* *75*, 7913-7924.

173. Neil, S.J., Eastman, S.W., Jouvenet, N., and Bieniasz, P.D. (2006). HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2, e39.
174. Harila, K., Prior, I., Sjoberg, M., Salminen, A., Hinkula, J., and Suomalainen, M. (2006). Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. *J Virol* 80, 3765-3772.
175. Murray, J.L., Mavrikakis, M., McDonald, N.J., Yilla, M., Sheng, J., Bellini, W.J., Zhao, L., Le Doux, J.M., Shaw, M.W., Luo, C.C., Lippincott-Schwartz, J., Sanchez, A., Rubin, D.H., and Hodge, T.W. (2005). Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol* 79, 11742-11751.
176. Alroy, I., Tuvia, S., Greener, T., Gordon, D., Barr, H.M., Taglicht, D., Mandil-Levin, R., Ben-Avraham, D., Konforty, D., Nir, A., Levius, O., Bicoviski, V., Dori, M., Cohen, S., Yaar, L., Erez, O., Propheta-Meirani, O., Koskas, M., Caspi-Bachar, E., Alchanati, I., Sela-Brown, A., Moskowicz, H., Tessmer, U., Schubert, U., and Reiss, Y. (2005). The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1478-1483.
177. Freed, E.O. (2006). HIV-1 Gag: flipped out for PI(4,5)P(2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11101-11102.
178. Guo, X., Roldan, A., Hu, J., Wainberg, M.A., and Liang, C. (2005). Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 79, 1803-1812.
179. Ono, A., Waheed, A.A., Joshi, A., and Freed, E.O. (2005). Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay. *J Virol* 79, 14131-14140.
180. Ono, A., Demirov, D., and Freed, E.O. (2000). Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J Virol* 74, 5142-5150.
181. Ono, A., Ablan, S.D., Lockett, S.J., Nagashima, K., and Freed, E.O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14889-14894.
182. Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., and Summers, M.F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11364-11369.

183. Lindwasser, O.W., and Resh, M.D. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J Virol* 78, 6013-6023.
184. Levesque, K., Halvorsen, M., Abrahamyan, L., Chatel-Chaix, L., Poupon, V., Gordon, H., Desgroseillers, L., Gatignol, A., and Mouland, A.J. (2006). Trafficking of HIV-1 RNA is Mediated by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Expression and Impacts on Viral Assembly. *Traffic*.
185. Derdowski, A., Ding, L., and Spearman, P. (2004). A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* 78, 1230-1242.
186. Ono, A., Orenstein, J.M., and Freed, E.O. (2000). Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* 74, 2855-2866.
187. Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M.D. (2000). Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* 74, 8670-8679.
188. Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Cohen, E.A., and Haseltine, W.A. (1993). Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7381-7385.
189. Varthakavi, V., Smith, R.M., Bour, S.P., Strebel, K., and Spearman, P. (2003). Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15154-15159.
190. Cartier, C., Hemonnot, B., Gay, B., Bardy, M., Sanchiz, C., Devaux, C., and Briant, L. (2003). Active cAMP-dependent protein kinase incorporated within highly purified HIV-1 particles is required for viral infectivity and interacts with viral capsid protein. *J Biol Chem* 278, 35211-35219.
191. Muller, B., Patschinsky, T., and Krausslich, H.G. (2002). The late-domain-containing protein p6 is the predominant phosphoprotein of human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 76, 1015-1024.
192. Kaushik, R., and Ratner, L. (2004). Role of human immunodeficiency virus type 1 matrix phosphorylation in an early postentry step of virus replication. *J Virol* 78, 2319-2326.
193. Gottwein, E., Jager, S., Habermann, A., and Krausslich, H.G. (2006). Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect. *J Virol* 80, 6267-6275.
194. Gottwein, E., and Krausslich, H.G. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol* 79, 9134-9144.

195. Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L.O., and Henderson, L.E. (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, 2962-2968.
196. Gurer, C., Berthoux, L., and Luban, J. (2005). Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J Virol* 79, 910-917.
197. Hemonnot, B., Cartier, C., Gay, B., Rebuffat, S., Bardy, M., Devaux, C., Boyer, V., and Briant, L. (2004). The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J Biol Chem* 279, 32426-32434.
198. Shehu-Xhilaga, M., Lee, J.Y., Campbell, S., Marshall, J.A., Crowe, S.M., and Mak, J. (2002). Overexpression and incorporation of GagPol precursor does not impede packaging of HIV-1 tRNA(Lys3) but promotes intracellular budding of virus-like particles. *J Biomed Sci* 9, 697-705.
199. Liao, W.H., and Wang, C.T. (2004). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Pr160 gag-pol mutants with truncations downstream of the protease domain. *Virology* 329, 180-188.
200. Yung, E., Sorin, M., Pal, A., Craig, E., Morozov, A., Delattre, O., Kappes, J., Ott, D., and Kalpana, G.V. (2001). Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat Med* 7, 920-926.
201. Halwani, R., Khorchid, A., Cen, S., and Kleiman, L. (2003). Rapid localization of Gag/GagPol complexes to detergent-resistant membrane during the assembly of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77, 3973-3984.
202. Morita, E., and Sundquist, W.I. (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 395-425.
203. Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bannink, J.R., Krausslich, H.G., and Yewdell, J.W. (2000). Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13057-13062.
204. Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7, 1313-1319.
205. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., and Sundquist, W.I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

206. von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimborra, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G., and Sundquist, W.I. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-713.
207. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Gottlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699.
208. Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 10, 821-830.
209. Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2003). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* 77, 4794-4804.
210. Goila-Gaur, R., Demirov, D.G., Orenstein, J.M., Ono, A., and Freed, E.O. (2003). Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* 77, 6507-6519.
211. Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., and Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* 2, 461-472.
212. Russell, R.S., Liang, C., and Wainberg, M.A. (2004). Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* 1, 23.
213. Moulant, A.J., Xu, H., Cui, H., Krueger, W., Munro, T.P., Prasol, M., Mercier, J., Rekosh, D., Smith, R., Barbarese, E., Cohen, E.A., and Carson, J.H. (2001). RNA trafficking signals in human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* 21, 2133-2143.
214. Beriault, V., Clement, J.F., Levesque, K., Lebel, C., Yong, X., Chabot, B., Cohen, E.A., Cochrane, A.W., Rigby, W.F., and Moulant, A.J. (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* 279, 44141-44153.
215. Basyuk, E., Galli, T., Mougél, M., Blanchard, J.M., Sitbon, M., and Bertrand, E. (2003). Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* 5, 161-174.
216. Fu, W., Gorelick, R.J., and Rein, A. (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* 68, 5013-5018.
217. Laughrea, M., Jette, L., Mak, J., Kleiman, L., Liang, C., and Wainberg, M.A. (1997). Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J Virol* 71, 3397-3406.

218. Berkhout, B., and van Wamel, J.L. (1996). Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* *70*, 6723-6732.
219. Sakuragi, J.I., and Panganiban, A.T. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability in vivo. *J Virol* *71*, 3250-3254.
220. Russell, R.S., Hu, J., Beriault, V., Mouland, A.J., Laughrea, M., Kleiman, L., Wainberg, M.A., and Liang, C. (2003). Sequences downstream of the 5' splice donor site are required for both packaging and dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* *77*, 84-96.
221. Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A., and Shioda, T. (2003). Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* *77*, 4060-4069.
222. Andersen, E.S., Contera, S.A., Knudsen, B., Damgaard, C.K., Besenbacher, F., and Kjems, J. (2004). Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J Biol Chem* *279*, 22243-22249.
223. Hill, M.K., Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S.M., and Mak, J. (2002). Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J Virol* *76*, 11245-11253.
224. Gabus, C., Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W.K., Marc, D., Nandi, P., and Darlix, J.L. (2001). The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* *276*, 19301-19309.
225. Gabus, C., Mazroui, R., Tremblay, S., Khandjian, E.W., and Darlix, J.L. (2004). The fragile X mental retardation protein has nucleic acid chaperone properties. *Nucleic Acids Res* *32*, 2129-2137.
226. Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAU-FEN ribonucleoprotein particles. *Embo J* *16*, 1751-1758.
227. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* *63*, 4085-4087.
228. Hayashi, T., Shioda, T., Iwakura, Y., and Shibuta, H. (1992). RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* *188*, 590-599.
229. Luban, J., and Goff, S.P. (1994). Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* *68*, 3784-3793.

230. Russell, R.S., Hu, J., Laughrea, M., Wainberg, M.A., and Liang, C. (2002). Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA caused by mutations of the u5 RNA sequences. *Virology* 303, 152-163.
231. Helga-Maria, C., Hammarskjold, M.L., and Rekosh, D. (1999). An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* 73, 4127-4135.
232. D'Souza, V., and Summers, M.F. (2005). How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* 3, 643-655.
233. Lawrence, D.C., Stover, C.C., Noznitsky, J., Wu, Z., and Summers, M.F. (2003). Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol* 326, 529-542.
234. Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Chancellor, K.J., Wu, Z.R., and Summers, M.F. (2000). NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* 301, 491-511.
235. Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D., and Summers, M.F. (2001). Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J Mol Biol* 314, 961-970.
236. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N., and Summers, M.F. (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279, 384-388.
237. Roldan, A., Russell, R.S., Marchand, B., Gotte, M., Liang, C., and Wainberg, M.A. (2004). In vitro identification and characterization of an early complex linking HIV-1 genomic RNA recognition and Pr55Gag multimerization. *J Biol Chem* 279, 39886-39894.
238. Purohit, P., Dupont, S., Stevenson, M., and Green, M.R. (2001). Sequence-specific interaction between HIV-1 matrix protein and viral genomic RNA revealed by in vitro genetic selection. *Rna* 7, 576-584.
239. Dupont, S., Sharova, N., DeHoratius, C., Virbasius, C.M., Zhu, X., Bukrinskaya, A.G., Stevenson, M., and Green, M.R. (1999). A novel nuclear export activity in HIV-1 matrix protein required for viral replication. *Nature* 402, 681-685.
240. Ott, D.E., Coren, L.V., and Gagliardi, T.D. (2005). Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* 79, 13839-13847.

241. Russell, R.S., Roldan, A., Detorio, M., Hu, J., Wainberg, M.A., and Liang, C. (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, 12986-12995.
242. Sakuragi, J., Shioda, T., and Panganiban, A.T. (2001). Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of human immunodeficiency virus type 1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J Virol* 75, 2557-2565.
243. Sakuragi, J., Iwamoto, A., and Shioda, T. (2002). Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76, 959-967.
244. Paillart, J.C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. (2002). In vitro evidence for a long range pseudoknot in the 5'-untranslated and matrix coding regions of HIV-1 genomic RNA. *J Biol Chem* 277, 5995-6004.
245. Damgaard, C.K., Andersen, E.S., Knudsen, B., Gorodkin, J., and Kjems, J. (2004). RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *J Mol Biol* 336, 369-379.
246. Berkhout, B., Ooms, M., Beerens, N., Huthoff, H., Southern, E., and Verhoef, K. (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, 19967-19975.
247. Ooms, M., Huthoff, H., Russell, R., Liang, C., and Berkhout, B. (2004). A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 78, 10814-10819.
248. Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. (2004). First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem* 279, 48397-48403.
249. Scheifele, L.Z., Garbitt, R.A., Rhoads, J.D., and Parent, L.J. (2002). Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3944-3949.
250. Poon, D.T., Chertova, E.N., and Ott, D.E. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 preferentially encapsidates genomic RNAs that encode Pr55(Gag): functional linkage between translation and RNA packaging. *Virology* 293, 368-378.
251. Liang, C., Hu, J., Russell, R.S., and Wainberg, M.A. (2002). Translation of Pr55(gag) augments packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA in a cis-acting manner. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, 1117-1126.

252. Butsch, M., and Boris-Lawrie, K. (2000). Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol* 74, 11531-11537.
253. Nikolaitchik, O., Rhodes, T.D., Ott, D., and Hu, W.S. (2006). Effects of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 Gag gene on RNA packaging and recombination. *J Virol* 80, 4691-4697.
254. Shehu-Xhilaga, M., Kraeusslich, H.G., Pettit, S., Swanstrom, R., Lee, J.Y., Marshall, J.A., Crowe, S.M., and Mak, J. (2001). Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J Virol* 75, 9156-9164.
255. Liang, C., Rong, L., Cherry, E., Kleiman, L., Laughrea, M., and Wainberg, M.A. (1999). Deletion mutagenesis within the dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 results in delayed processing of the p2 peptide from precursor proteins. *J Virol* 73, 6147-6151.
256. Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wiegers, K., Grattinger, M., Muller, B., Fuller, S., and Krausslich, H.G. (2000). A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *Embo J* 19, 103-113.
257. Gross, I., Hohenberg, H., Huckhagel, C., and Krausslich, H.G. (1998). N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the in vitro assembly phenotype from tubular to spherical particles. *J Virol* 72, 4798-4810.
258. Tang, C., Ndassa, Y., and Summers, M.F. (2002). Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein. *Nat Struct Biol* 9, 537-543.
259. Bristow, R., Byrne, J., Squirell, J., Trencher, H., Carter, T., Rodgers, B., Saman, E., and Duncan, J. (1999). Human cyclophilin has a significantly higher affinity for HIV-1 recombinant p55 than p24. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20, 334-336.
260. Towers, G.J., Hatziioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Luban, J., and Bieniasz, P.D. (2003). Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* 9, 1138-1143.
261. Wilk, T., Gowen, B., and Fuller, S.D. (1999). Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol* 73, 1931-1940.
262. Liu, B., Dai, R., Tian, C.J., Dawson, L., Gorelick, R., and Yu, X.F. (1999). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol* 73, 2901-2908.

263. Ryzhova, E.V., Vos, R.M., Albright, A.V., Harrist, A.V., Harvey, T., and Gonzalez-Scarano, F. (2006). Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80, 2694-2704.
264. Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* 23, 2451-2458.
265. Douaisi, M., Dussart, S., Courcou, M., Bessou, G., Vigne, R., and Decroly, E. (2004). HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 566-573.
266. Schafer, A., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (2004). Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* 328, 163-168.
267. Alce, T.M., and Popik, W. (2004). APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 279, 34083-34086.
268. Svarovskaia, E.S., Xu, H., Mbisa, J.L., Barr, R., Gorelick, R.J., Ono, A., Freed, E.O., Hu, W.S., and Pathak, V.K. (2004). Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279, 35822-35828.
269. Cen, S., Guo, F., Niu, M., Saadatmand, J., Deflassieux, J., and Kleiman, L. (2004). The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279, 33177-33184.
270. Onafuwa-Nuga, A.A., Telesnitsky, A., and King, S.R. (2006). 7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. *Rna* 12, 542-546.
271. Kleiman, L., and Cen, S. (2004). The tRNALys packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1776-1786.
272. Cimarelli, A., and Luban, J. (1999). Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* 73, 5388-5401.
273. Gurer, C., Cimarelli, A., and Luban, J. (2002). Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions. *J Virol* 76, 4666-4670.
274. Beausejour, Y., and Tremblay, M.J. (2004). Interaction between the cytoplasmic domain of ICAM-1 and Pr55Gag leads to acquisition of host ICAM-1 by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 78, 11916-11925.

275. Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. (2004). Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24, 2637-2648.
276. Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., and Cohen, E.A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* 74, 5441-5451.
277. Gatignol, A., Laine, S., and Clerzius, G. (2005). Dual role of TRBP in HIV replication and RNA interference: viral diversion of a cellular pathway or evasion from antiviral immunity? *Retrovirology* 2, 65.
278. Cullen, B.R. (2006). Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* 80, 1067-1076.
279. Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M., and St Johnston, D. (1995). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *Embo J* 14, 3563-3571.
280. Tian, B., Bevilacqua, P.C., Diegelman-Parente, A., and Mathews, M.B. (2004). The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 1013-1023.
281. St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.
282. Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.
283. Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19, 1366-1377.
284. Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y., and Chia, W. (1997). Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90, 437-447.
285. Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C.Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.
286. Fuerstenberg, S., Peng, C.Y., Alvarez-Ortiz, P., Hor, T., and Doe, C.Q. (1998). Identification of Miranda protein domains regulating asymmetric cortical localization, cargo binding, and cortical release. *Mol Cell Neurosci* 12, 325-339.

287. Schuldt, A.J., Adams, J.H., Davidson, C.M., Micklem, D.R., Haseloff, J., St Johnston, D., and Brand, A.H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* *12*, 1847-1857.
288. Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* *19*, 2220-2230.
289. Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. (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*, 2212-2219.
290. Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. (1999). Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* *62*, 113-118.
291. Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A., and DesGroseillers, L. (2002). Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* *115*, 3285-3295.
292. Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (2000). A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* *20*, 5592-5601.
293. Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Loschi, M., Pasquini, J.M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G.L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* *16*, 405-420.
294. Villace, P., Marion, R.M., and Ortin, J. (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*, 2411-2420.
295. Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* *384*, 239-246.
296. Elvira, G., Massie, B., and DesGroseillers, L. (2006). The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* *96*, 105-117.
297. Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J* *19*, 997-1009.

298. Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upfl1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* *120*, 195-208.
299. Wagner, C., Palacios, I., Jaeger, L., St Johnston, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Brunel, C. (2001). Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J Mol Biol* *313*, 511-524.
300. Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. (1999). The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* *19*, 288-297.
301. Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G., and Kiebler, M.A. (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*, 2945-2953.
302. Kim, K.C., and Kim, H.K. (2006). Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* *397*, 48-52.
303. Tang, S.J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., and Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* *32*, 463-475.
304. Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* *43*, 513-525.
305. Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A., and Desgroseillers, L. (2006). Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* *393*, 245-254.
306. St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 363-375.
307. Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M.A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2100-2105.
308. Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* *365*, 817-824.
309. Maquat, L.E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* *118*, 1773-1776.

310. Allison, R., Czaplinski, K., Git, A., Adegbenro, E., Stennard, F., Houlston, E., and Standart, N. (2004). Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *Rna* *10*, 1751-1763.
311. Yoon, Y.J., and Mowry, K.L. (2004). *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vgl RNA and kinesin. *Development* *131*, 3035-3045.
312. Ramasamy, S., Wang, H., Quach, H.N., and Sampath, K. (2006). Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Dev Biol* *292*, 393-406.
313. Liu, J., Hu, J.Y., Wu, F., Schwartz, J.H., and Schacher, S. (2006). Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* *26*, 5204-5214.
314. Trubey, C.M., Chertova, E., Coren, L.V., Hilburn, J.M., Hixson, C.V., Nagashima, K., Lifson, J.D., and Ott, D.E. (2003). Quantitation of HLA class II protein incorporated into human immunodeficiency type 1 virions purified by anti-CD45 immunoaffinity depletion of microvesicles. *J Virol* *77*, 12699-12709.
315. Mark-Danieli, M., Laham, N., Kenan-Eichler, M., Castiel, A., Melamed, D., Landau, M., Bouvier, N.M., Evans, M.J., and Bacharach, E. (2005). Single point mutations in the zinc finger motifs of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid alter RNA binding specificities of the gag protein and enhance packaging and infectivity. *J Virol* *79*, 7756-7767.
316. Tang, C., Loeliger, E., Kinde, I., Kyere, S., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M., and Summers, M.F. (2003). Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol* *327*, 1013-1020.
317. Guo, X., Kameoka, M., Wei, X., Roques, B., Gotte, M., Liang, C., and Wainberg, M.A. (2003). Suppression of an intrinsic strand transfer activity of HIV-1 Tat protein by its second-exon sequences. *Virology* *307*, 154-163.
318. Kozak, S.L., Marin, M., Rose, K.M., Bystrom, C., and Kabat, D. (2006). The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G Binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem*.
319. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* *9*, 1404-1407.
320. Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* *113*, 803-809.

321. Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* *424*, 99-103.
322. Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., and Gabuzda, D. (2004). Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* *279*, 7792-7798.
323. Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S., and Bieniasz, P.D. (2004). Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10774-10779.
324. Keckesova, Z., Ylinen, L.M., and Towers, G.J. (2004). The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10780-10785.
325. Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* *427*, 848-853.
326. Perron, M.J., Stremlau, M., Song, B., Ulm, W., Mulligan, R.C., and Sodroski, J. (2004). TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11827-11832.
327. Ternois, F., Sticht, J., Duquerroy, S., Krausslich, H.G., and Rey, F.A. (2005). The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 678-682.
328. Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Muller, B., Dietrich, U., Werner, J., and Krausslich, H.G. (2005). A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 671-677.
329. Chang, K., Elledge, S.J., and Hannon, G.J. (2006). Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods* *3*, 707-714.

ANNEXES

Annexe I : Liste des contributions à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse

Abrahamyan, L., Clement, J.F., **Chatel-Chaix, L.**, Song, R., Ajamian, L., Nanci, A., DesGroseillers, L., Laughrea, M. and Mouland, A.J.

Expression levels of Staufen1 influence HIV-1 genomic RNA encapsidation.

Re-soumis dans "RNA"

Levesque, K.*, Halvorsen, M.*, Abrahamyan, L., **Chatel-Chaix, L.**, Poupon, V., Gordon, H., DesGroseillers, L., Gatignol, A. and Mouland A.J.

(* Contributions équivalentes)

Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly.

Traffic (2006) 7, p1177-1193

Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., **Chatel-Chaix, L.**, Mouland, A.J., and DesGroseillers, L.

Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs.

Nucleic Acids Research (2005) 33, p4797-4812.

Annexe II : Accord des coauteurs

