

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG
2004**

Ecole doctorale de physique, chimie-physique et mathématiques

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Domaine : Biophysique

par

Hervé BELTZ

**Etude par fluorescence de l'importance
des structures primaires et secondaires
de la séquence cTAR et de la protéine
NCp7 lors du premier saut de brin de la
transcription inverse de VIH-1.**

Soutenue le 5 novembre 2004 devant la commission d'examen :

Dr. Jean-Claude BROCHON

Dr. Matteo NEGRONI

Dr. Guy ZUBER

Pr. Yves MELY

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de thèse

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG
2004**

Ecole doctorale de physique, chimie-physique et mathématiques

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Domaine : Biophysique

par

Hervé BELTZ

**Etude par fluorescence de l'importance
des structures primaires et secondaires
de la séquence cTAR et de la protéine
NCp7 lors du premier saut de brin de la
transcription inverse de VIH-1.**

Soutenue le 5 novembre 2004 devant la commission d'examen :

Dr. Jean-Claude BROCHON

Dr. Matteo NEGRONI

Dr. Guy ZUBER

Pr. Yves MELY

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de thèse

A mon épouse Christelle,

A mes Parents,

A mes Grand-mères,

A mes beaux-parents.

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Moléculaires et Cellulaires, UMR 7034 du CNRS, dirigé par le Dr. Ken Takeda à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg que je remercie de m'avoir accueilli dans son unité.

Je remercie le Dr. Guy Zuber, le Dr. Matteo Negroni, ainsi que le Dr. Jean-Claude Brochon de l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

Je remercie le Pr. Yves Mély de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir suivi pendant trois ans.

Merci à Hugues pour tes conseils et ta patience. Merci de ton aide pour les « manips » ainsi que pour l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie particulièrement Emma pour son soutien et les discussions devant un coca, David pour son amour de la gastronomie alsacienne mais aussi son soutien au Racing cette année sans commentaire sur les résultats, Serena pour ton aide et tes conseils pas toujours scientifiques : sans toi je n'aurais jamais appris à « manipuler » aussi vite, Nathalie ma voisine j'espère que je n'ai pas été trop envahissant, Caroline merci pour tes discussions surtout vestimentaires et d'aménagement d'intérieur. Merci à Nick courage tu y arrivera si tu veux on fait le point !!! Je remercie également tous les autres membres du « zoo » passés et présents : Vasy, Jean-Pierre, Andrey, Raja, Lionel...

Merci aux étudiants de l'aile pharmacologie tout particulièrement Moussa et Mamadou vous m'avez apporté la joie, la bonne humeur et le soleil d'Afrique.

Merci à Emmanuel pour ta bonne humeur et les expériences en FCS, même si cela n'a pas toujours été facile.

Merci à Denis pour de longues polémiques sur la sécurité informatique mais pas que cela !!!

Merci à Marlyse pour ton aide précieuse.

Merci à Nicole pour son aide, son soutien et surtout son moral à toute épreuve.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenus et supportés pendant trois ans : Estelle, Yves, Jean-Phi, Catherine, Agnès et Antoine ...Merci aussi à Axel et Véro.

Je voudrais remercier l'ensemble de ma famille et particulièrement mes deux grand-mères « Mémé et Mamama ». « Sech jetz fertig met dam studiera. »

Je voudrais également remercier mes beaux-parents pour leur soutien moral durant mes études et l'intérêt qu'ils ont porté à la science.

Je voudrais remercier mes parents pour le soutien financier mais aussi et surtout moral depuis le début de ma thèse mais aussi depuis le début de ma scolarité. Pour tout cela merci.

Enfin, je voudrais te remercier toi Christelle tu as été là tous les jours toutes les heures pour me soutenir merci du fond du cœur.

ABREVIATIONS

ADA	Azodicarbonamide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
CA	protéine de capsid
CCHC	Motif CysX ₂ CysX ₄ HisX ₄ His où X=Acide aminé
CKR	Récepteur de chimiokine
DABCYL	4-(4'-diméthylaminophénylazo)acide benzoïque
DIBA	2,2'-Dithiobis[benzamide]
DIS	Dimerization Initiation Site
DLS	Dimer Linkage Structure
DTNB	acide 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoïque
Env	gène des protéines d'enveloppe
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
Fl	5/6-carboxyfluorescéine
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Gag	gène des protéines de structure
IN	intégrase
kb	kilobase
LTR	Long Terminal Repeat
MA	protéine de matrice
MEM	Maximum d'Entropie
NCp	protéine de la nucléocapside
NOBA	Nitrobenziamide
nt	nucléotide
Pol	gène des protéines de enzymatiques
PBS	Primer Binding Site
PPT	PolyPurine Tract
PR	protéase
R	séquence redondante située aux deux extrémités de l'ARN génomique

Rh6G	5/6-carboxyrhodamine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase H	Ribonucléase H
RRE	Rev Response Element
RT	rétrotranscriptase ou transcriptase inverse
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SD	major Splice Donor site
SU	protéine de Surface
TAC	Convertisseur temps-amplitude
TAR	Trans-Acting Responsive element
cTAR	séquence complémentaire de TAR
Tat	TransActivator of Transcription
TM	protéine transmembranaire
TMR	5/6-carboxytétramethylrhodamine
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U3	séquence unique située en 3' de l'ARN génomique
U5	séquence unique située en 5' de l'ARN génomique
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine

Table des matières

Table des matières	- 1 -
Introduction Générale	- 5 -
Introduction Bibliographique	- 9 -
I) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)	- 11 -
A) La famille des rétrovirus	- 11 -
1) Découverte et définition générale	- 11 -
2) Classification des rétrovirus	- 11 -
a) Les <i>Oncovirinae</i> (Oncovirus)	- 11 -
b) Les <i>Spumavirinae</i> (Spumavirus)	- 12 -
c) Les <i>Lentivirinae</i> (Lentivirus)	- 12 -
B) Caractéristiques du virus VIH-1	- 12 -
1) Découverte et démographie	- 12 -
2) Structure de VIH-1	- 14 -
3) Organisation du génome du virus	- 16 -
a) Les régions non codantes	- 16 -
b) Les régions codantes	- 17 -
4) Cycle de réplication du virus	- 21 -
a) Fixation et entrée du virus dans la cellule hôte	- 22 -
b) Le désassemblage ou « uncoating » et la transcription inverse	- 22 -
c) Intégration du génome viral	- 29 -
d) Expression du génome viral	- 30 -
e) Encapsidation, assemblage des virions, bourgeonnement et maturation	- 31 -
5) Les thérapies actuelles et futures	- 34 -
a) Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase	- 35 -
b) Les inhibiteurs de la protéase	- 35 -
c) Trithérapie	- 36 -
d) L'inhibiteur de fusion	- 36 -
e) La thérapie immunitaire à l'interleukine-2 (IL-2)	- 37 -
f) L'hydroxyurée (Hydrea®)	- 37 -
g) Autres cibles de traitements	- 37 -
h) Les inhibiteurs de la NCp7	- 38 -
i) Un vaccin anti-VIH/SIDA ?	- 41 -
C) Caractéristiques de la protéine de la nucléocapside de VIH-1 (NCp7)	- 42 -

1) Aspects structuraux et relation structure/activité _____	- 42 -
2) Rôle de la protéine dans le cycle viral _____	- 45 -
a) Le rôle histone _____	- 45 -
b) Le rôle dans l'encapsidation du génome viral. _____	- 45 -
c) Rôle dans la dimérisation de l'ARN génomique _____	- 47 -
d) Rôle dans la transcription inverse. _____	- 48 -
3) Travaux préliminaires effectués au sein du laboratoire _____	- 53 -
II) Objectifs de la thèse _____	- 55 -
<i>Matériels et méthodes _____</i>	- 57 -
I) Préparation des solutions mères de protéines _____	- 59 -
A) Mise en solution _____	- 59 -
B) Formation des doigts de zinc _____	- 59 -
C) Fluorescence du tryptophane et utilisation dans le titrage indirect _____	- 59 -
1) Principes _____	- 60 -
2) Mesures et corrections _____	- 61 -
a) Correction de l'effet d'écran _____	- 62 -
b) Correction de la fluorescence du tampon _____	- 62 -
II) Préparations des solutions mères d'oligonucléotide _____	- 63 -
A) Oligonucléotides doublement marqués _____	- 63 -
B) Mise en solution _____	- 67 -
III) Mesures spectroscopiques à l'état stationnaire _____	- 67 -
A) Spectroscopie d'absorption UV-Visible _____	- 67 -
1) Principe et appareillage _____	- 67 -
2) Mesure et analyse des courbes de fusion _____	- 68 -
B) Spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire _____	- 70 -
IV) Mesures spectroscopiques résolues en temps _____	- 71 -
A) Principes _____	- 71 -
B) Méthodes d'analyse des données _____	- 75 -
V) Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) _____	- 77 -
<i>Résultats et discussions _____</i>	- 83 -
<i>Importance de la structure secondaire de cTAR lors du premier saut de brin de la transcription inverse de VIH-1. (Publications 1 et 2) _____</i>	- 85 -
<i>Publication 1 _____</i>	- 91 -
<i>Publication 2 _____</i>	- 93 -

<i>Etude par FCS de l'interaction entre la NCp7 et cTAR.</i>	- 95 -
I) Résultats	- 97 -
II) Discussion	- 102 -
<i>Importance de la structure primaire de NCp7 lors du premier saut de brin de la transcription inverse de VIH-1. (Publication 3)</i>	- 105 -
<i>Publication 3</i>	- 109 -
<i>Description des propriétés spectroscopiques de la 8-vinyl-déoxyadénosine, un analogue fluorescent alternatif à la 2-aminopurine. (Publication 4)</i>	- 111 -
<i>Publication 4</i>	- 117 -
<i>Conclusions et perspectives</i>	- 119 -
<i>Annexes</i>	- 125 -
<i>Mise en évidence de la dimérisation de VPR.</i>	- 127 -
<i>Etude par spectroscopie de fluorescence résolue en temps et par FCS biphotonique de l'interaction de la NCp7 avec des oligonucléotides en tige-boucle.</i>	- 131 -
<i>Revue de la 8ème Conférence « Methods and Applications of Fluorescence: spectroscopy, Imaging and Probes Prague »</i>	- 133 -
<i>Photonics Europe 2004: Metrology, Sensing and Biophotonics, Proceedings of SPIE</i>	- 135 -
<i>Références</i>	- 137 -

Introduction Générale

« L'épidémie mondiale de sida ne montre aucun signe de fléchissement ; le nombre d'infections et de décès dus au VIH est plus élevé que jamais. »

(Extrait du communiqué de presse ONUSIDA du 25 novembre 2003)

En vingt ans, le SIDA sera devenu une vraie pandémie. Rien que pour l'année 2003 entre 2.5 et 3.5 millions de personnes sont mortes de cette maladie à travers le monde.

NOMBRE DE DÉCÈS DUS AU SIDA CHEZ L'ADULTE ET L'ENFANT EN 2003 – ESTIMATIONS



Même si l'Europe semble être moins touchée que les autres continents par le virus, il y a une recrudescence du virus dans les pays de l'Europe de l'est particulièrement en Ukraine, Estonie et Lettonie puisqu'on estime à 280 000 le nombre de nouveau cas pour l'année 2003.

On observe également une recrudescence des cas de SIDA ces dernières années dans les pays de l'est asiatique où le virus était rare. Mais le continent africain et surtout la partie

subsaharienne restent les pays les plus touchés par le SIDA. Dans tous les pays du monde, la lutte contre le virus est une priorité de santé publique. Même si à l'heure actuelle, la recherche médicale a beaucoup avancé et qu'un certain nombre de médicaments sont à disposition des malades, le fléau semble loin d'être enrayé, d'autant plus que beaucoup de pays pauvres ont difficilement accès à ces médicaments. L'autre grand souci des traitements actuels est la résistance des virus. Il faut pour cela soit améliorer les traitements à notre disposition soit ouvrir la voie à d'autres thérapies. C'est dans cette dernière voie que se situe notre étude.

Introduction Bibliographique

I) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)

A) La famille des rétrovirus

1) Découverte et définition générale

Les premiers rétrovirus ont été observés au début du siècle dernier : Le virus de la leucémie aviaire en 1908 (Ellerman, et al., 1908) et le virus du sarcome de Rous en 1911 (Rous, 1911). Ce n'est que dans la fin des années 1950 que l'on a pu observer des rétrovirus provoquant des tumeurs chez les mammifères tel que le Virus de la Leucémie Murine de Moloney (**MuLV**) (Gross, 1957). Suite à ces découvertes, c'est en 1980 que l'on découvrit le premier rétrovirus humain : **HTLV-I** pour **H**uman **T**-Cell **L**eukemia **V**irus **I** (Poisez, et al., 1980) suivi en 1983 par la découverte du VIH (Barre-Sinoussi, et al., 1983; Gallo, et al., 1983).

Les rétrovirus ont un ARN bicaténaire et une enveloppe membranaire d'environ 120 nm de diamètre. La membrane extérieure est constituée par la membrane de la cellule hôte formée d'une bicouche lipidique alors qu'autour de l'ARN se trouve une capsidie protéinique de forme polyédrique. Tous les rétrovirus ont en commun le fait que leur génome doit être transcrit en ADN par une ADN polymérase ADN/ARN dépendante (synthétisant l'ADN sur une matrice qui est l'ARN génomique), appelée aussi Transcriptase Inverse (**TI** ou **RT**). L'ADN proviral ainsi synthétisé s'insère dans l'ADN de la cellule hôte par ses deux extrémités appelées **LTR** (**L**ong **T**erminal **R**epeat ou **séquences terminales redondantes**). De là, l'information génétique virale est exprimée, comme celles des gènes cellulaires, par l'appareil de transcription de la cellule. Leur enzymologie particulière (transcriptase inverse) et leur lien avec les oncogènes en font un sujet d'étude intéressant en cancérologie.

2) Classification des rétrovirus

Les rétrovirus comprennent trois sous-familles :

a) Les *Oncovirinae* (Oncovirus)

Cette sous-famille est la plus importante des trois puisqu'on la trouve chez les insectes, les sangsues, les reptiles, les oiseaux et les mammifères où ils peuvent induire des tumeurs très variées comme des sarcomes (tumeurs du tissu conjonctif), des carcinomes (tumeurs des tissus épithéliaux), des lymphomes et des leucémies. C'est ce dernier type de tumeur qui est le plus fréquent dans les pathologies rétrovirales. Enfin c'est en 1980 que Robert Gallo a isolé le rétrovirus humain impliqué dans le développement de la leucémie à lymphocytes T : HTLV-1. Il a isolé un second virus HTLV-2, sans qu'une pathologie lui ait encore été attribuée avec certitude.

b) Les *Spumavirinae* (Spumavirus)

Ces virus ont été découverts par hasard au début des années 1950 chez plusieurs espèces animales : singes, bovins, chats, hamsters ... On les a également isolés chez l'homme en 1970. Les cellules infectées *in vitro* présentent des lésions qui ressemblent à de l'écume (spuma = mousse). Ces virus sont non pathogènes.

c) Les *Lentivirinae* (Lentivirus)

Ce sont des virus cytopathogènes. Ces virus ont d'abord été isolés chez l'animal et sont responsables de maladies à évolution lente (lentus = lent). C'est à cette sous-famille qu'appartiennent les virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 et VIH-2.

Le VIH engendre une infection caractérisée par une phase de latence clinique très longue (pouvant atteindre dix ans). Cependant, dès la primo-infection et jusqu'aux stades avancés de la maladie, le virus est présent en permanence et le patient reste infectieux.

B) Caractéristiques du virus VIH-1

1) Découverte et démographie

Les premiers cas de SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquis) qui ne portait pas encore ce nom, ont été décrits aux Etats-Unis en 1981. Ce syndrome se caractérise par une baisse considérable des défenses immunitaires des malades. Divers agents pathogènes (bactéries, virus, parasites...), normalement peu infectieux, profitent de cet état

pour proliférer et provoquer des affections gravissimes et jusqu'alors rares par exemple des pneumonies à *Pneumocystis carinii* ou des cancers appelés " sarcome de Kaposi ".

En 1982, les médecins français commencent à se mobiliser lors de l'apparition en France de cas similaires. A cette époque et depuis la première description de cette maladie chez des homosexuels, un certain nombre de recherches avaient d'ores et déjà été entreprises au niveau mondial. Cet agent pathogène sera observé par la suite chez des hémophiles transfusés, ce qui renforce la thèse que l'agent responsable est un virus.

Cette même année, après avoir essayé en vain d'assimiler ce supposé virus à tous ceux connus jusqu'alors, Willy Rozenbaum, clinicien français travaillant alors à l'Hôpital Bichat, est certain de se trouver devant un virus d'un tout nouveau genre. L'institut Pasteur se lance donc dans l'aventure fin 1982. C'est en janvier 1983 que W. Rozenbaum envoie la première biopsie ganglionnaire d'un patient atteint de " lymphadénopathie généralisée ", c'est-à-dire le stade de " pré-Sida " (avant l'apparition d'une immunodéficience profonde). C. Dauguet fut le premier à visualiser ce virus sous son microscope.

C'est ainsi que fût publiée en mai 1983 dans la revue Science (Barre-Sinoussi, et al., 1983), la première description du virus responsable du Sida, que l'équipe du Pr. Montagnier à l'Institut Pasteur avait appelé à l'époque "Lymphadenopathy Associated Virus " ou LAV. L'analyse des protéines du virus entreprise dès 1983 montrera également que le LAV était totalement différent des " candidats " américains, les virus HTLV-1 et HTLV-2. Quelques mois plus tard aux Etats-Unis, l'équipe du Pr. Gallo (Gallo, et al., 1983) va mettre au jour une autre souche qu'ils baptiseront HTLV-3. Ces deux virus nouvellement découverts porteront que bien plus tard le nom de VIH. En effet, c'est en 1986 que l'OMS décide de nommer VIH le virus responsable du SIDA chez l'Homme.

Dans les pays occidentaux et en Afrique centrale, l'espèce virale est appelée VIH-1 alors qu'en Afrique occidentale c'est le VIH-2 qui n'a que 40% d'homologie avec le premier. VIH est divisé en 3 groupes : M, N et O. A l'intérieur du groupe M on peut dégager 9 sous-types : A, B, C, D, F, G, H, J, K. Ces différents sous-types peuvent être corrélés à des zones géographiques (Figure 1).

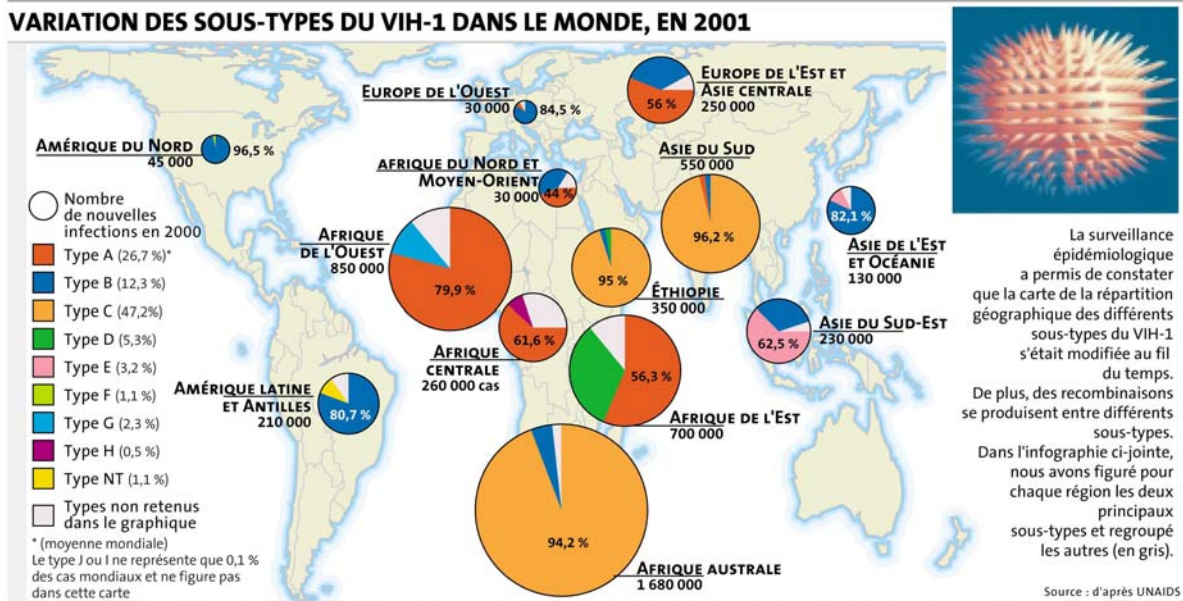


Figure 1 : Répartition géographique des sous-types du VIH-1 (« Le Monde » 21 mai 2003)

Deux mécanismes rentrent en jeu pour expliquer une telle variabilité du VIH :

1- la reverse transcriptase a un taux d'erreur très élevé, de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} . Ceci correspond à une à deux mutations par cycle de réplication

2- le taux de renouvellement du virus est très élevé, ce qui donne de 10^8 à 10^9 virions synthétisés par jour.

2) Structure de VIH-1

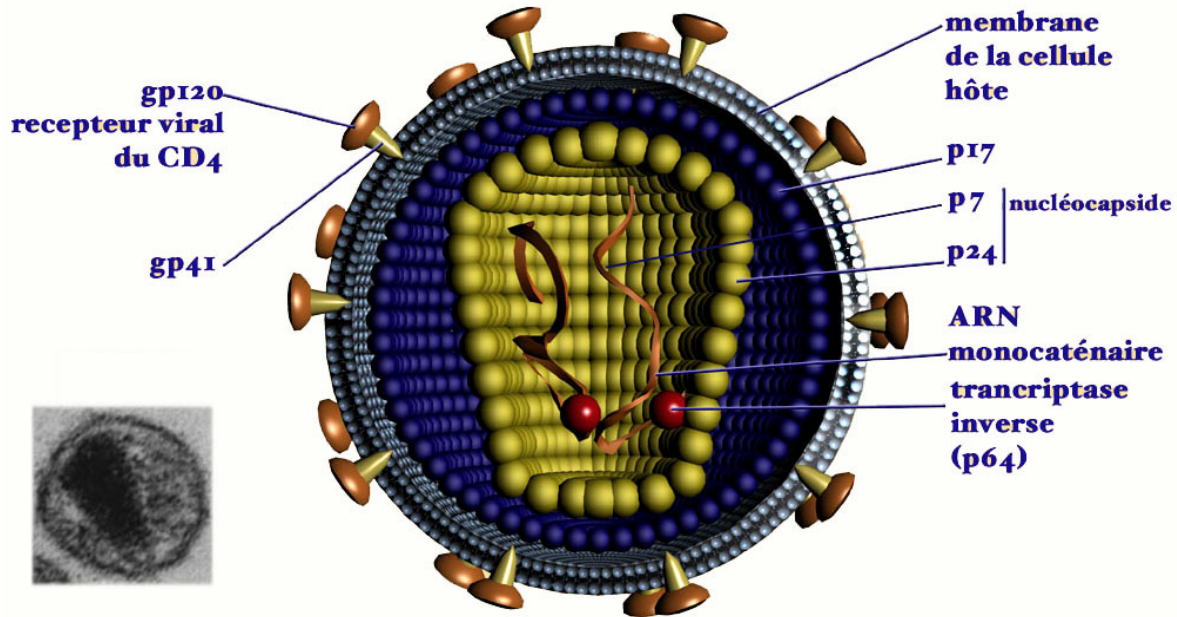


Figure 2 : Structure du virion VIH-1 (en insert en bas à gauche la structure du virus vue par microscopie électronique)

La morphologie et la structure du virus VIH-1 ont été établies par microscopie électronique (Gelderblom, et al., 1987). Les particules virales mûres sont grossièrement sphériques et la capsid a une forme conique (Figure 2). On distingue une enveloppe externe dans laquelle sont incluses des spicules formés par l'association de deux glycoprotéines :

- La gp120 qui se fixe au récepteur cellulaire.
- La gp41, liée à la gp120, qui est responsable de la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire.

La membrane interne est tapissée par la protéine de la matrice. Au centre, la capsid est formée par l'assemblage de la protéine CA p24. Elle contient des enzymes et le génome viral :

- Les enzymes présentes sont la RT, l'intégrase, la protéase. Une cinquantaine de molécules de chaque enzyme est présente dans chaque virion.

- Le génome est diploïde formé de 2 ARN (+) monocaténares identiques d'environ 10 kB et de polarité positive. Les deux ARN sont étroitement associés à des protéines de la nucléocapside NCp7, qui les réunissent (Coffin, et al., 1997), les protègent de l'activité des enzymes cellulaires et interviennent dans l'assemblage des virions.

3) Organisation du génome du virus

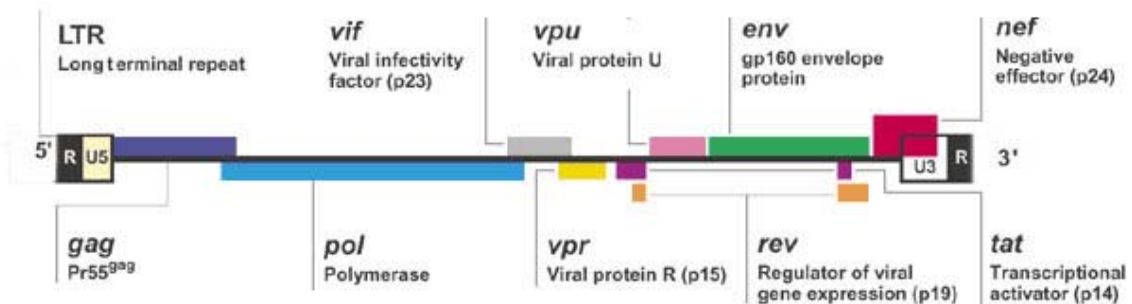


Figure 3 : Schéma général du génome de VIH-1 (adapté de (Greene, et al., 2002)).

Le génome de VIH-1 (Figure 3) présente des parties codantes et parties non codantes.

a) Les régions non codantes

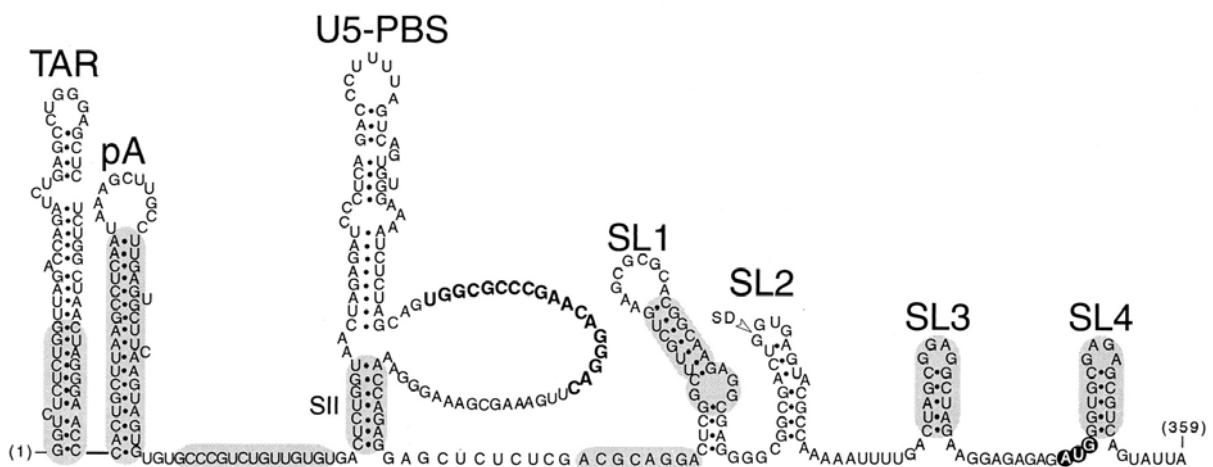


Figure 4 : Structure de la région 5' non codante (Clever, et al., 2002).

- La première de ces régions est la région **R (Redondance)** qui s'étend sur 97 nucléotides. Elle inclut les tige-boucles **TAR (Trans-Acting Response element)** et le signal de polyadénylation (**poly(A)** ou **p(A)**) (Baudin, et al., 1993) (Figure 4). Sa redondance fait qu'elle se trouve à l'identique aux deux extrémités de l'ARN génomique. La séquence TAR intervient par liaison avec la protéine Tat dans la régulation de l'expression de l'ADN proviral (Peterlin, et al., 1986). Elle intervient aussi dans l'assemblage du virus (Clever, et al., 1999; Helga-Maria, et al., 1999). De plus, elle intervient dans les étapes initiales de la transcription inverse (comme décrit dans cette étude) (Harrich, et al., 1996).

- La deuxième de ces régions est appelée U5. Lors de la transcription inverse, elle est la première à être transcrite. Après U5, on trouve la tige boucle **PBS (Primer Binding Site)**. Elle permet l'initiation de la transcription inverse par complémentarité avec l'anticodon de l'ARN_t^{Lys,3} (Prats, et al., 1988).

- La fin de la région non codante est appelé **DLS (Dimer Linkage Structure** ou région leader). Elle contient les différentes tige-boucles (SL1 à SL4) indispensables à la dimérisation de l'ARN viral. Elles sont également impliquées dans l'encapsidation ainsi que dans l'épissage de l'ARN génomique (SD ou **Splicing Donor**).

- A proximité de l'extrémité 3', on trouve la séquence **PPT (Poly Purine Tract)**. C'est une région riche en purine et par sa résistance à l'activité de dégradation de la RNase H (Ribonucléase H), elle sert d'amorce à la synthèse du brin (+) d'ADN. Il existe à 4000 nucléotides de cette séquence PPT, la séquence PPT_c indispensable à la rétrotranscription.

- La région U3 qui se trouve à l'extrémité 3' contient les séquences nécessaires à l'intégration du provirus. Elle contient également les séquences nécessaires à la régulation de la transcription par les protéines de la cellule.

b) Les régions codantes

Le génome de 10 kb code pour 16 protéines distinctes.

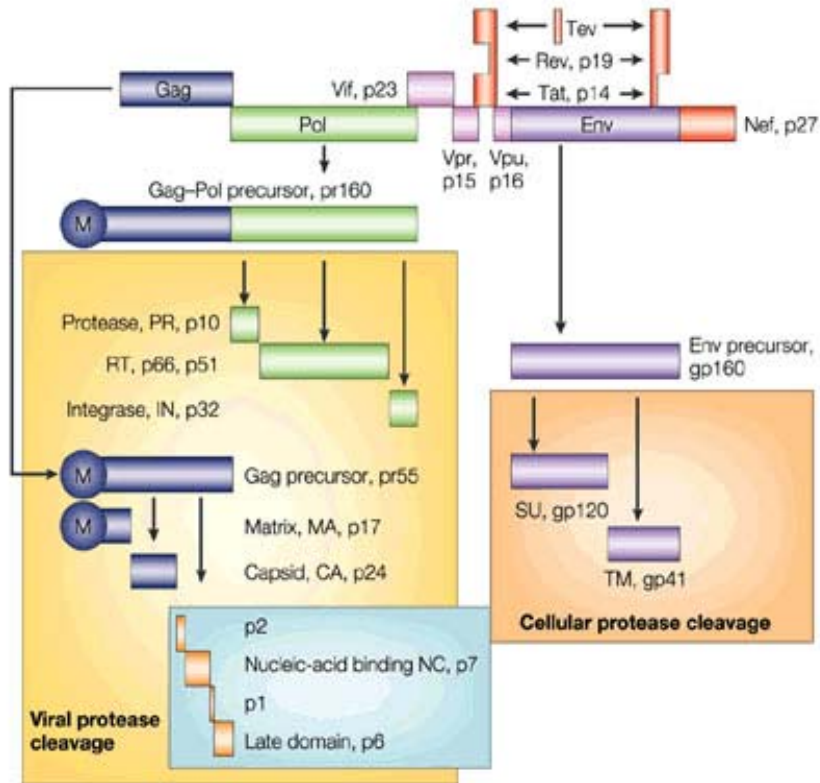


Figure 5 : Protéines issus des gènes Gag, Pol et env (Peterlin, et al., 2003).

Dans l'ARN génomique, on distingue trois gènes codants (Gag, Pol et Env) pour des protéines structurales (Figure 5):

- Le gène **Gag** (**Group-specific Antigen**) est traduit en un précurseur polyprotéique Pr55^{Gag}. Le clivage de ce précurseur libère les protéines structurales de la capside (CAp24), de la nucléocapside (NCp7, p1, p2 et p6) et de la matrice (MAp17).
- L'expression du gène **Pol** (**Polymérase**) se fait par décalage du cadre de lecture (Jacks, et al., 1985) qui donnera le précurseur Gag-Pol (ou Pr160^{Gag-Pol}). Ce précurseur permettra la libération des protéines enzymatiques comme la protéase (PRp12), l'intégrase (INp32) et la transcriptase inverse (RTp66/p51).
- La traduction du gène **Env** (**Enveloppe**) donnera les glycoprotéines de surface gp120 et les glycoprotéines transmembranaires gp41 par l'intermédiaire du précurseur polyprotéique gp160.

A coté de ces trois gènes, nous avons un certain nombre d'autres gènes codant pour les protéines dites « accessoires » (Figure 5).

- Le gène **Tat** code pour la protéine Tat (**T**rans**a**ctivator of **T**ranscription).

Cette protéine par sa fixation sur la séquence Tar va permettre l'amplification de la transcription des ARN_m (détaillé dans le chapitre I-B-4-d).

- La protéine **Rev** issue du gène Rev (**R**egulatory of **V**irion **E**xpression) permet la régulation de l'exportation du noyau des ARN viraux.

Après sa synthèse dans le cytoplasme, la protéine va être transportée dans le noyau. Ce transport se fait par l'intermédiaire de la liaison de la NLS (**N**uclear **L**ocalisation **S**ignal) de la protéine avec le facteur d'importation nucléaire importine β (Imp-β) (Truant, et al., 1999). Ensuite, la protéine va se fixer sur la tige-boucle **RRE** (**R**ev **R**esponse **E**lement) localisée dans le gène Env (Malim, et al., 1989) en libérant Imp-β. Le complexe va sortir du noyau par un processus similaire à celui de l'entrée à la différence que le « transporteur » est la Crm1 (Fornerod, et al., 1997; Fukuda, et al., 1997; Stade, et al., 1997). Ce complexe ADN/protéine va être dissocié par la RanBP1 (Bischoff, et al., 1997; Fornerod, et al., 1997; Izaurralde, et al., 1997). L'ARN viral se trouve ainsi exporté à l'extérieur du noyau à l'aide de Rev.

- La protéine **Nef** (**N**egative regulatory **F**actor) codée par le gène du même nom a plusieurs rôles :

- Elle induit une régulation négative de l'expression des CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) de la cellule infectée (Cohen, et al., 1999; Collins, et al., 1999; Collins, et al., 1998). Cette régulation contribue en partie à l'augmentation de l'infectivité virale (Lama, et al., 1999; Ross, et al., 1999).
- Cette augmentation peut aussi être induite par une phosphorylation des sérines de la protéine de la matrice virale (MA) (Swingler, et al., 1997). Car cette phosphorylation induit la dissociation de MA de la membrane et permet sa translocation dans le noyau (Bukrinskaya, et al., 1996).

- Le gène **Vif** (**V**iral **I**nfectivity **F**actor) codant pour la protéine Vif a été identifié par (Fisher, et al., 1987).

Vif sera intégrée dans le virion et associée à la nucléocapside. A ce stade elle va inhiber l'intégration de la protéine APOBEC3G dans le virus (Kao, et al., 2003; Mariani, et al., 2003). Puis Vif envoie la protéine APOBEC3G dans la voie d'ubiquitination. Ceci aura pour effet la dégradation d'APOBEC3G par les protéasomes. APOBEC3G par son activité antivirale constitue une défense naturelle très efficace contre les rétrovirus HIV-1, HIV-2 et SIV. Vif est indispensable à l'infectivité du virus. Après de multiples controverses, il est actuellement défini qu'un virus ayant une carence en Vif pourra entrer dans la cellule hôte. Par contre, le cycle répliatif sera bloqué au moment de l'intégration.

- Le gène **Vpu** (**V**iral **P**rotein **U**) code pour la protéine Vpu.

Cette protéine permet de diminuer l'expression des récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées. Ce sont essentiellement les CD4 néosynthétisés dans le réticulum endoplasmique, complexés avec le gp160 qui sont la cible de Vpu (Chen, et al., 1996). L'interaction de Vpu se fait directement avec la partie C-terminale du domaine cytoplasmique de CD4 (Bour, et al., 1995; Margottin, et al., 1996). A la suite de cette étape, Vpu recrute un composant du complexe E3 ubiquitin ligase du réticulum endoplasmique membranaire appelé β TrCP (Margottin, et al., 1998). Cette interaction entraîne l'ubiquitination du CD4 qui se retrouvera de ce fait détruit dans le protéasome (Schubert, et al., 1998).

Vpu facilite également le bourgeonnement des particules virales à la surface de la cellule hôte (Klimkait, et al., 1990). Les mécanismes entrant en jeu sont encore peu connus et donnent lieu à beaucoup de controverses. A l'heure actuelle, il est établi que se serait l'interaction de la Vpu avec le CD4 (Bour, et al., 1999) mais aussi l'intégrité du domaine transmembranaire de Vpu (Paul, et al., 1998; Schubert, et al., 1996) qui seraient à l'origine de cet effet.

- La protéine **Vpr** (**V**iral **P**rotein **R**) codée par le gène Vpr est indispensable à l'infection de cellules qui ne se divisent pas tels que les macrophages (Bukrinsky, et al., 1999; Popov, et al., 1998a; Popov, et al., 1998b). Dans ce cas, Vpr est étroitement

reliée au **PIC** (viral **Pré-Integration Complexe**). En effet, elle présente une affinité forte pour les pores nucléaires ce qui permettra au PIC de passer le pore.

Vpr permet aussi de bloquer le cycle cellulaire en phase G2 (Hrimech, et al., 1999; Poon, et al., 1998). Dans ce cas, Vpr arrête le cycle cellulaire en phase G2 en empêchant l'activation de la cyclinB/p34^{cdc2} kinase (Emerman, 1996). Deux facteurs cellulaires sont impliqués dans cette fonction : MOV34 et RAD23. Cet arrêt du cycle cellulaire induira l'apoptose de la cellule. Mais le mécanisme exact du blocage n'est pas connu.

4) Cycle de réplication du virus

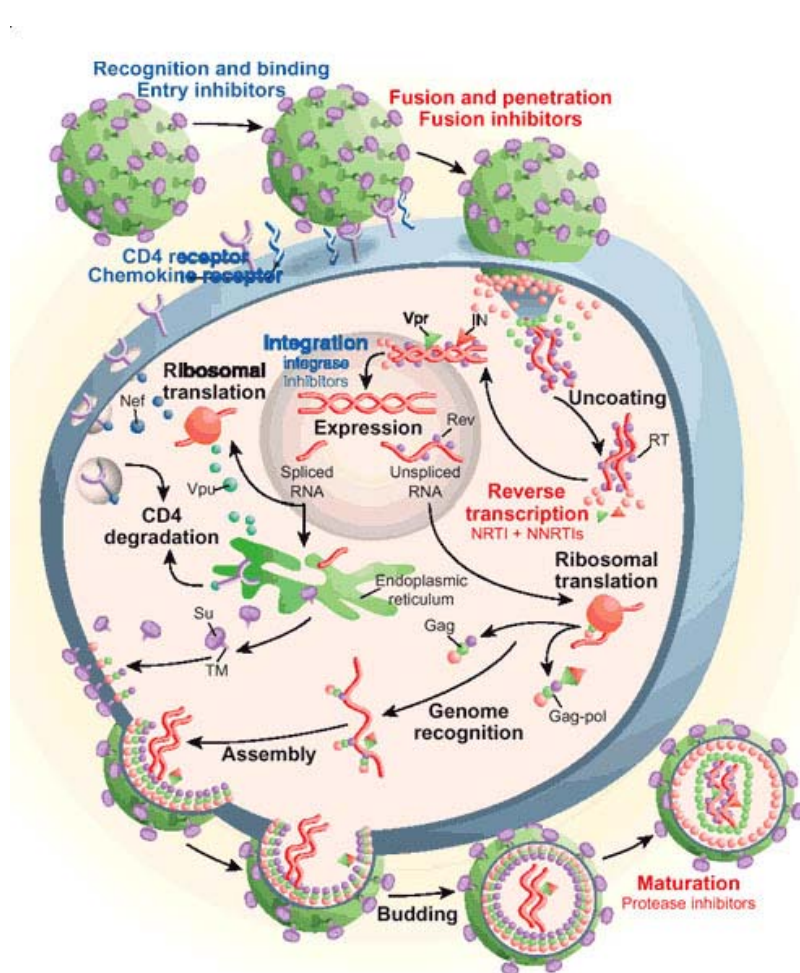


Figure 6 : Cycle réplcatif de VIH-1 (Pomerantz, et al., 2003).

La réplication du virus (Figure 6) peut se décrire en deux étapes :

- L'étape « pré-intégrative » commence à l'entrée du virus dans la cellule hôte et finira par l'intégration de l'ADN du virus dans le génome de la cellule hôte.

- L'étape « post-intégrative » continue après l'étape précédente et se finit par le bourgeonnement et la maturation du virus. Cette étape commence par une phase de latence plus ou moins longue.

a) Fixation et entrée du virus dans la cellule hôte

La fixation du virus sur la cellule hôte se fait via des protéines membranaires. La protéine CD4 de la membrane cellulaire interagit avec la protéine membranaire gp120 du virus HIV. Cependant, cette interaction n'est observée que pour HIV car MLV et HTLV utilisent d'autres récepteurs respectivement CAT-1 et GLUT-1. Le CD4 est majoritairement présent dans les lymphocytes T4 (Maddon, et al., 1986), les monocytes et les macrophages. Cependant, l'utilisation du seul récepteur CD4 pour la fixation du virus ne suffit pas à expliquer le tropisme des différentes souches étudiées.

En effet, dans les lymphocytes T4 (infectés par des souches de HIV-1 dites à tropisme T), on observe la présence d'un corécepteur membranaire CXCR4 (récepteur à chimiokines) nécessaire pour l'entrée du VIH dans les cellules et pour une infection efficace (Feng, et al., 1996).

Pour les monocytes et les macrophages (infectés par des souches de HIV-1 dites à tropisme M), il y a présence d'un autre corécepteur membranaire CCR5 nécessaire pour l'entrée du VIH dans les cellules et pour une infection efficace (Alkhatib, et al., 1996; Deng, et al., 1996; Doranz, et al., 1996; Dragic, et al., 1996).

Après la reconnaissance cellulaire, suit une série de changements conformationnels initiés par le CD4 qui permettront la fusion des membranes cellulaires et virales (Sattentau, 1998). C'est la pénétration de la protéine gp41 dans la membrane de la cellule hôte qui aboutira à la fusion des deux membranes (Wyatt, et al., 1998).

b) Le désassemblage ou « uncoating » et la transcription inverse

Le désassemblage permet de déverser le matériel génétique viral dans la cellule hôte, sous une forme complexée par déstabilisation de la capsid. Cette étape est facilitée par la cyclophiline A (Braaten, et al., 1996; Luban, 1996) qui est incorporée dans le virus par interaction avec la capsid (Gamble, et al., 1996; Luban, et al., 1993a; Thali, et al., 1994). Les complexes sont aptes à subir la transcription inverse. Plusieurs protéines (MA, Nef, Vif et la NCp7) en plus de la RT (Berthoux, et al., 1997) interviennent dans cette étape. Le rôle de la NCp7 dans les différentes étapes de la rétrotranscription sera décrit dans le chapitre I-C-2-d.

Cette transcription inverse qui permet la conversion de l'ARN génomique dimérique en un double brin d'ADN débute bien avant la fixation du virus sur la cellule (Huang, et al., 1997b).

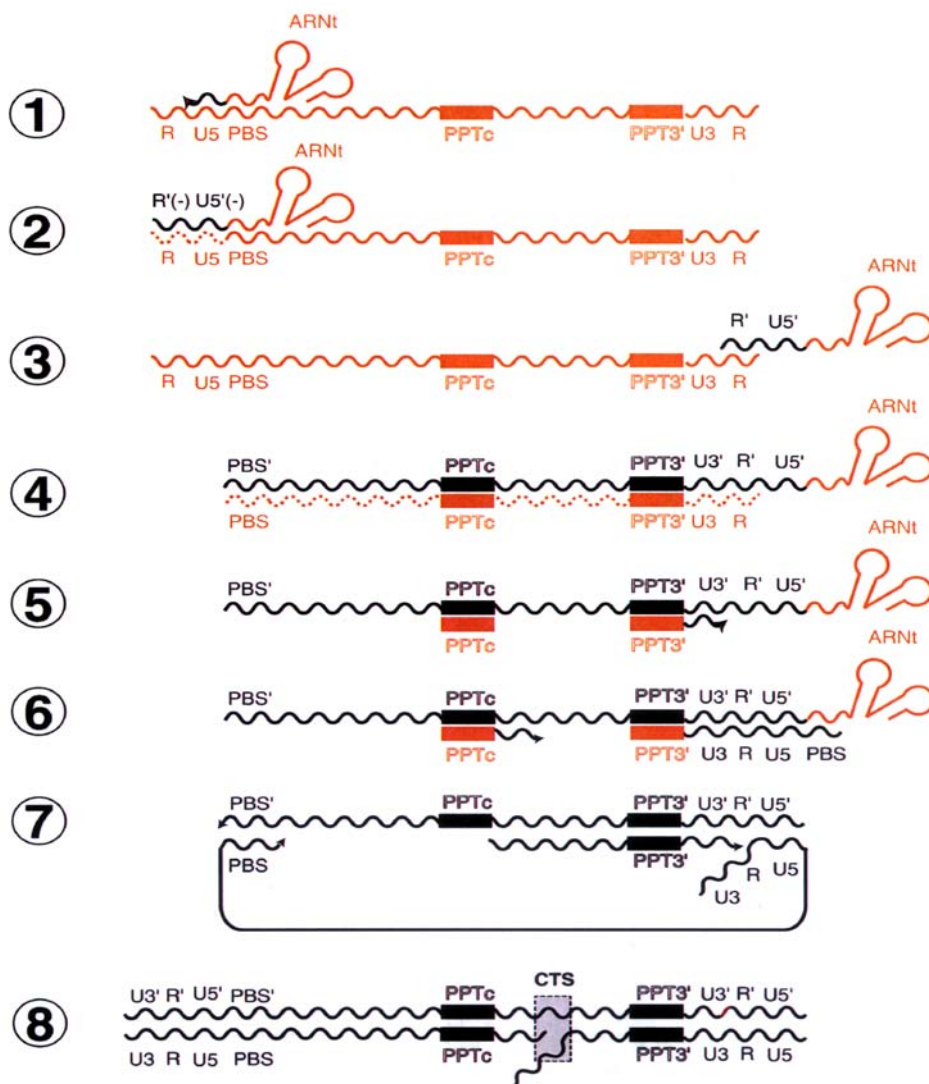


Figure 7 : Les différentes étapes de la rétrotranscription de l'ARN génomique de VIH-1.

Elle est initiée par l'hybridation des 18 nucléotides de la région PBS (voir chapitre I-B-3-a) aux 18 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARN_t^{Lys,3} (Figure 7) (Ratner, et al., 1985) qui est d'origine cellulaire et encapsidé sélectivement par le virion. Cette séquence complémentaire à PBS (anti-PBS) se trouve dans le bras TΨC de l'ARN_t^{Lys,3} (Figure 8).

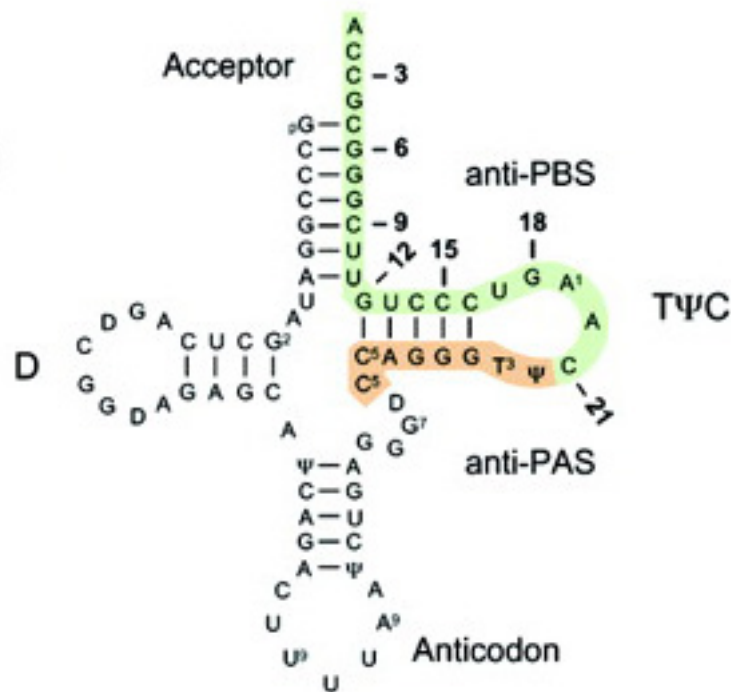


Figure 8 : Structure secondaire de l'ARN_t^{Lys,3} (adaptée de (Huthoff, et al., 2003)).

La formation de ce complexe ARN/ARN (Figure 9) ne suffit pas à amorcer la rétrotranscription.

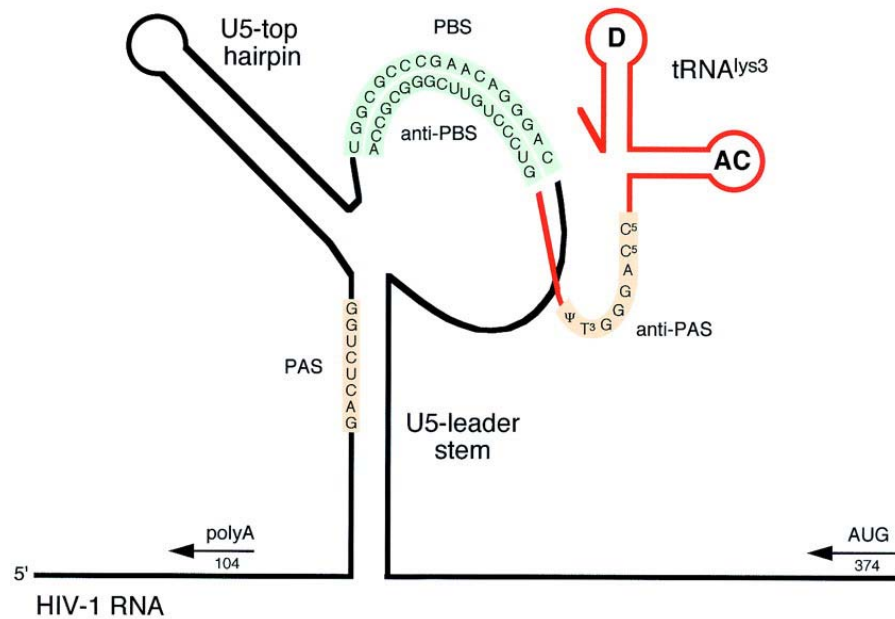


Figure 9 : Hybridation entre PBS et l'ARN_t^{Lys,3} (adaptée de (Beerens, et al., 2002)).

Il faudra pour cela des interactions inter-moléculaires supplémentaires. Il a été montré récemment qu'une partie de l'ARN_t^{Lys,3} formé de 8 bases doit s'apparier avec une séquence se trouvant sur l'ARN génomique appelé PAS (Primer Activation Signal) (Figure 9) (Huthoff, et al., 2003). Cette séquence complémentaire à PAS (anti-PAS) comme l'anti-PBS se trouve elle aussi dans le bras TΨC de l'ARN_t^{Lys,3}. Ce nouveau complexe sera donc capable à lui seul d'initier la transcription inverse.

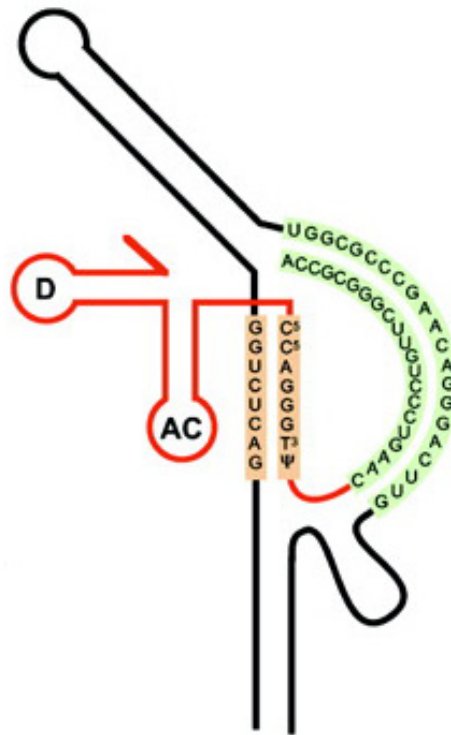


Figure 10 : Activation du Primer (Huthoff, et al., 2003).

Ce complexe forme une structure très compacte grâce à des interactions additionnelles mettant en jeu la région riche en adénine en 5' de PBS, mais aussi la boucle de l'anti-codon de l'ARN_t^{Lys,3} (Isel, et al., 1996; Isel, et al., 1993; Tisne, et al., 2000). La RT n'est pas capable de reconnaître directement ce complexe, mais toutes ces interactions additionnelles vont favoriser la liaison de la RT avec le complexe en supprimant en grande partie l'opposition stérique entre la RT et le génome viral (Isel, et al., 1999). En effet, la structure tridimensionnelle de ce complexe lié à la RT indique une parfaite adaptation entre le site de fixation de la RT et le complexe nucléotidique (Isel, et al., 1999). Ce nouveau complexe ARN/ARN/Protéine forme le complexe d'initiation de la synthèse du brin (-) d'ADN. La synthèse du brin commence de la séquence PBS en direction 5' (étape 1 de la Figure 7). Arrivées à l'extrémité 5', le brin d'ADN ainsi formé est appelé : ADN (-) strong stop.

Puis la matrice ARN correspondante au brin nouvellement synthétisé va être hydrolysée par l'activité RNase H de la RT (étape 2 de la Figure 7). Le brin d'ADN ainsi

libéré de sa matrice ARN va tout d'abord être transféré à l'extrémité 3' de l'ARN viral puis va s'apparier avec la partie complémentaire se trouvant à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. Cette complémentarité est due aux régions R (Kim, et al., 1997; Wu, et al., 1995). Cette étape est appelée premier saut de brin (étape 3 de la Figure 7). Il a été montré que seule la tige-boucle TAR contenue dans la région R serait indispensable au saut de brin (Berkhout, et al., 2001). Il a été montré que se serait la partie haute de TAR qui entre en jeu dans ce mécanisme. En effet, une mutation de la boucle empêche le premier saut de brin de s'effectuer. Par conséquent, le saut passe vraisemblablement par la formation d'un complexe intermédiaire appelé complexe boucle-boucle (Berkhout, et al., 2001). Dans ce complexe, les deux séquences TAR et cTAR sont reliées par l'autocomplémentarité des bases contenues dans la boucle (Chang, et al., 1997). Pour compléter le saut, le complexe boucle-boucle se dissocie pour former alors un duplex étendu entre TAR et cTAR (Berkhout, et al., 2001). A contrario, la tige-boucle poly(A) aussi contenue dans la région R ne joue qu'un rôle mineur dans le saut de brin (Berkhout, et al., 2001). Nous noterons que le saut de brin est facilité par la présence de la protéine de la nucléocapside de VIH-1 : NCp7 (Darlix, et al., 1993; You, et al., 1994) ce que nous décrirons dans le chapitre I-C-2-d. Notons également que ce saut ferait aussi intervenir d'autres interactions entre l'ARN_t^{Lys,3} et la séquence U3 (Brule, et al., 2000).

Après cette étape, la RT va compléter la synthèse du brin (-) (étape 4 de la Figure 7) en direction 5' de l'ARN viral. Par la suite, la matrice ARN est complètement dégradée à l'exception de la région PPT riche en purine (étape 4 de la Figure 7). Cette région sert d'amorce à la synthèse du brin (+) (Charneau, et al., 1992; Pullen, et al., 1990; Resnick, et al., 1984). Elle a lieu à partir de la séquence PPT en direction 3' du brin (-) (étape 5 de la Figure 7). Cette séquence nouvellement synthétisée va tout d'abord être transférée à l'extrémité 5' de l'ADN viral puis va s'hybrider à cette extrémité par l'intermédiaire des séquences PBS (Hu, et al., 1990b; Peliska, et al., 1992) présente à la fois sur le brin (-) et sur le brin (+). Cette étape (l'étape 7 de la Figure 7) est appelée deuxième saut de brin. Elle est également facilitée par la présence de la NCp7 (Johnson, et al., 2000). En parallèle à cette étape, le brin (+) est allongé jusqu'à une région au centre du génome appelé PPT_c. A partir de ce point, il va déplacer une partie du brin synthétisé (étape 6 de la Figure 7). Ce déplacement a lieu sur une dizaine de nucléotides et est contrôlé par la séquence de terminaison centrale (CTS). Cette dernière permet la dissociation de la RT (Charneau, et al., 1994).

Le résultat de la transcription inverse est un double brin d'ADN possédant à ces deux extrémités une séquence identique. Ces séquences (LTR) sont indispensables à l'intégration

du génome viral dans le génome de la cellule infectée. Le double brin d'ADN possède également au centre plus précisément au niveau du CTS un « DNA flap »

Durant la rétrotranscription, le génome subit un certain nombre de mutations. En effet, la RT n'a pas d'activité correctrice (« proof-reading ») c'est-à-dire qu'elle n'est pas capable de corriger les nombreuses erreurs durant la rétrotranscription, environ une base par cycle de réplication.

La recombinaison est un phénomène assurant le mélange de matériel génétique entre les chromosomes. L'ARN existe dans le virus sous forme de deux brins et la RT est capable de sauter d'une matrice ARN à une autre pendant la rétrotranscription. Si les deux brins d'ARN sont différents cela entraîne une recombinaison génétique (Hu, et al., 1990a; Hu, et al., 1990b). Elle est importante pour la diversité génétique des rétrovirus et notamment de VIH. Avec le manque d'action correctrice de la RT, elles sont les deux sources majeures de mutation du génome viral durant la rétrotranscription. Pour que la recombinaison ait lieu, il faut que les deux brins d'ARN soient co-encapsidés (Stuhlmann, et al., 1992). Elle est fortement dépendante de l'activité RNaseH de la RT (DeStefano, et al., 1994; Peliska, et al., 1992).

Il a été récemment décrit que la région R contenant TAR est un point chaud de la recombinaison (Moumen, et al., 2001). C'est-à-dire une région susceptible de faciliter considérablement la recombinaison. Ce phénomène aurait lieu durant la rétrotranscription et surtout durant les deux sauts de brin, il peut y avoir un saut d'une matrice ARN à une autre (Moumen, et al., 2001; van Wamel, et al., 1998). Ce phénomène serait facilité par la présence de la NCp7 (Negroni, et al., 2000).

Une des caractéristiques de VIH est de pouvoir infecter des cellules non différenciées donc quiescentes, comme les macrophages. Pour ce faire le virus a développé un mécanisme particulier permettant au complexe de pré-intégration de passer la barrière nucléaire. Après ou au cours de la rétrotranscription, l'ADN viral synthétisé ainsi que les protéines associées comme la protéase, l'intégrase, la rétrotranscriptase, la NCp7, des protéines de la capsid ainsi que Vpr (Bukrinsky, et al., 1993; Miller, et al., 1997), forment un complexe appelé complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe contient également une protéine cellulaire : la HMG-I(Y) (High Mobility Group) (Farnet, et al., 1997) indispensable à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule infectée. Pour pénétrer dans le noyau, le complexe utilise la machinerie cellulaire d'import (Bukrinsky, et al., 1999). Vpr en interagissant avec les nucléoporines (Fouchier, et al., 1998) et l'importine α (Popov, et al., 1998b) est également

impliqué dans le transport du génome viral (Zennou, et al., 2000). Il a été également montré que le DNA flap synthétisé durant la rétrotranscription est un signal pour le transport du génome viral (Zennou, et al., 2000).

c) Intégration du génome viral

En premier lieu, IN serait capable de faciliter le transport des PIC dans le noyau (Bushman, 2002).

L'intégration, catalysée par l'intégrase (IN), va permettre d'intégrer dans le génome de la cellule hôte l'ADN proviral qui vient d'être synthétisé. IN est constituée de trois domaines. Le domaine N-terminal présente un doigt de zinc de structure différente de celui de la NCp7 puisqu'il présente un motif HHCC (Cai, et al., 1997). Le domaine central du résidu 50 au résidu 235 (Dyda, et al., 1994) est le domaine catalytique de l'IN. Le troisième domaine C-terminal (Eijkelenboom, et al., 1999; Lodi, et al., 1995) est indispensable à la multimérisation de la protéine. Dans un premier temps, IN reconnaît les extrémités de chaque LTR. La séquence reconnue est d'environ 20 paires de base (Sherman, et al., 1990). IN va ensuite exciser les nucléotides adjacents aux dinucléotides CA hautement conservés dans les parties U5 et U3 de la séquence LTR (Engelman, et al., 1991; Vink, et al., 1991). Cette réaction a lieu en milieu aqueux et le groupe hydroxyle laissé aux extrémités permettra l'insertion dans l'ADN de la cellule par une réaction de *trans*-estérification, l'ADN cellulaire aura été au préalable clivé par l'intégrase. En plus des facteurs viraux, l'intégration nécessite des cofacteurs comme la HMG-I(Y) (Hindmarsh, et al., 1999) et la protéine Ini 1 (Intégrase Interactor 1) (Kalpana, et al., 1994).

Il a également été montré que NCp7 stimulerait l'intégration (Carteau, et al., 1999; Poljak, et al., 2003). La protéine de la nucléocapside agit par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, elle stimule l'intégration (Carteau, et al., 1999) en facilitant l'ouverture des extrémités de séquences nucléotidiques (Azoulay, et al., 2003; Beltz, et al., 2003; Bernacchi, et al., 2002; Tsuchihashi, et al., 1994). Ces extrémités ouvertes sont alors plus aptes à fixer l'ADN du virus. D'autre part comme la NCp7 recouvre entièrement l'ADN viral par son activité histone (décrit dans le chapitre I-C-2-a), elle va masquer les sites de liaison non spécifiques de IN avec l'ADN et va donc stabiliser la liaison de IN aux extrémités de l'ADN viral (Carteau, et al., 1999; Poljak, et al., 2003). Enfin, les parties basiques de la NCp7 sont

capable d'interagir avec le doigt de zinc de IN et donc de stabiliser le complexe IN/ADN. A l'instar d'autres protéines décrites ci-dessus la NCp7 agit comme un cofacteur de IN.

d) Expression du génome viral

Après intégration du génome proviral dans le génome de la cellule hôte, elle va entrer dans une phase de latence plus ou moins longue. Ce n'est qu'après cette phase que débutera l'expression du génome. A partir d'une seule séquence d'ADN intégré, le virus pourra exprimer l'ensemble des protéines nécessaires à sa multiplication. On peut distinguer dans l'étape d'expression du génome deux phases : une phase précoce et une phase tardive.

- la phase précoce

Cette phase est largement régulée par la protéine Tat. Dans un premier lieu, la transcription a lieu de manière classique. En l'absence de Tat, l'ARN polymérase II cellulaire (ARNpolIII) se fixe au niveau du promoteur situé dans le LTR. C'est dans cette région que l'on retrouve la séquence TAR caractérisée par une structure secondaire en tige-boucle. L'ARNpolIII étant peu processive, le taux de transcription est faible car en l'absence de Tat le domaine C-terminal de l'ARNpolIII est hypophosphorylé. Malgré cela, l'activité est suffisante à la synthèse d'une quantité minimale d'ARN viral. Il sera, après épissage multiple, traduit et donnera une quantité suffisante de protéines Tat, Nef et Rev. Synthétisées dans le cytoplasme, les protéines Tat et Rev vont migrer dans le noyau. Tat permettra la transactivation (amplification) de l'expression du génome. Elle a lieu par interaction de la séquence TAR avec la protéine Tat (Peterlin, et al., 1986). La protéine se fixe sur TAR au niveau de la boucle interne (Dingwall, et al., 1990; Dingwall, et al., 1989; Feng, et al., 1988) par reconnaissance des deux paires de bases entourant cette dernière. En effet, une mutation dans la boucle interne fait baisser considérablement la transactivation (Cordingley, et al., 1990; Dingwall, et al., 1990). Cette liaison facilite l'interaction de Tat avec la protéine **TAK** (**Tat-Associated Kinase**) qui a été récemment identifié comme étant la protéine **CDK9** (**Cyclin-Dependent Kinase**) (Gold, et al., 1998). Mais pour transactiver, il faut encore que la cyclin T1 interagisse avec la boucle apicale de TAR (Bieniasz, et al., 1998) mais seul le G³⁴ est indispensable à cette interaction

puisqu'il forme une paire de base avec le C³⁰ (Richter, et al., 2002). Ce complexe ainsi formé, appelé P-TEFb (positive transcription elongation factor) va augmenter le degré de phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARNpolIII (Dahmus, 1995). Ceci aura pour effet d'activer la transcription (Karn, 1999; Wu-Baer, et al., 1995). La dissociation de ce complexe se fera par son interaction avec PCAF (p300/CREB binding protein-associated factor) ceci par acétylation de la Lys⁵⁰ de Tat. Par conséquent, PCAF entre en compétition avec la liaison de Tat sur Tar (Bres, et al., 2002; Deng, et al., 2000; Dorr, et al., 2002; Kiernan, et al., 1999).

- La phase tardive

Cette phase est en grande partie régulée par la protéine Rev. Dans la phase précédente, il y a surtout synthèse d'ARN_m multi-épissés alors que dans la phase tardive, il y a surtout synthèse d'ARN_m non-épissés ou mono-épissés (Malim, et al., 1993; Malim, et al., 1989).

Les ARN_m non-épissés vont permettre par traduction la synthèse des précurseurs Pr55^{Gag} (gène Gag) et Pr160^{Gag-Pol} (gènes Gag et Pol). Le clivage de ces précurseurs libère les protéines structurales de la capsid (Cap24), de la nucléocapsid (NCp7 et p6), de la matrice (MAp17) mais aussi les protéines enzymatiques comme la protéase (PRp12), l'intégrase (INp32) et la transcriptase inverse (RTp66/p51).

Les ARN_m mono-épissés donneront le précurseur polyprotéique gp160 qui par clivage donnera les glycoprotéines gp120 et gp41 (Freed, et al., 1990).

e) Encapsidation, assemblage des virions, bourgeonnement et maturation

D'un point de vue génétique, la séquence de l'ARN génomique et subgénomique indispensable à l'encapsidation est appelée séquence Ψ (Figure 11) (Aldovini, et al., 1990; Lever, et al., 1989; Luban, et al., 1991). Elle présente quatre tige-boucles caractéristiques (SL1, SL2, SL3 et SL4) (Figure 11).

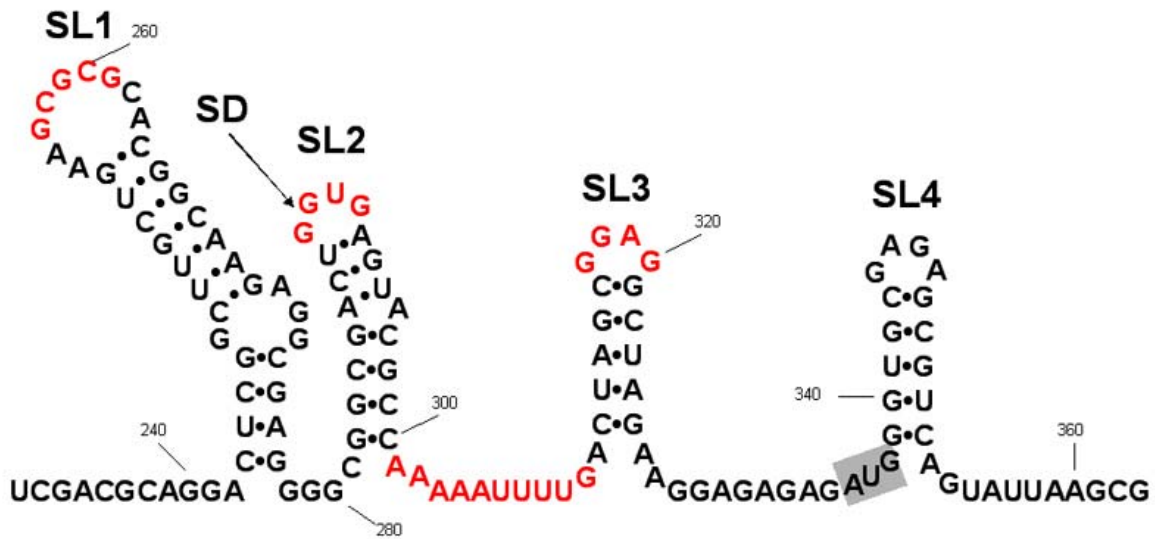


Figure 11 : Séquence Ψ de l'ARN génomique de VIH-1

L'ARN génomique est présent sous la forme d'un dimère et la structure qui est le point d'ancrage du dimère s'appelle DLS (Dimer linkage structure) (Bender, et al., 1976; Darlix, et al., 1990; Kung, et al., 1975). SL1 (ou DIS) est le site majeur d'initiation de la dimérisation de l'ARN génomique (Figure 11) (Laughrea, et al., 1994; Muriaux, et al., 1995; Skripkin, et al., 1994). Il a été montré *in vivo* que la mutation de cette séquence serait délétère pour la dimérisation (Clever, et al., 1996; Muriaux, et al., 1995; Paillart, et al., 1994). SL1 présente une séquence auto-complémentaire GCGCGC à l'extrémité de sa boucle indispensable à la dimérisation (Paillart, et al., 1996b). La dimérisation ainsi que l'encapsidation ont lieu en synergie (Aldovini, et al., 1990).

La boucle SL2 dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par RMN (Amarasinghe, et al., 2000a; Amarasinghe, et al., 2000b) possède en son sein le signal majeur donneur d'épissage (SD) (Figure 11).

Parmi ces quatre tige-boucles, la SL3 apparaît comme le site majeur d'encapsidation (Figure 11). Sa structure tridimensionnelle complexée ou non avec la NCp7 a été obtenue par RMN (De Guzman, et al., 1998; Pappalardo, et al., 1998). Si SL3 est suffisante pour l'encapsidation il apparaît que les autres tige-boucles soient également importantes pour ce mécanisme.

Enfin, le codon d'initiation du gène gag fait parti de la boucle SL4.

Il a également été montré que la séquence TAR intervenait dans l'encapsidation (McBride, et al., 1997) c'est essentiellement la structure secondaire de la tige qui serait impliquée dans ce phénomène (Helga-Maria, et al., 1999).

Le précurseur Pr55^{Gag} par son domaine NC permet l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN génomique. Ceci sera décrit plus en détail dans les chapitres I-C-2-b et c.

Les polyprotéines Gag et Gag-Pol interviennent dans l'encapsidation de l'ARN_t^{Lys,3} (Mak, et al., 1997). C'est essentiellement la domaine RT qui participe à cette encapsidation (Khorchid, et al., 2000). La liaison entre les polyprotéines et l'ARN_t^{Lys,3} se fait par une forme tronquée de la lysyl-ARN_t synthétase cellulaire encapsidée dans les particules virales (Cen, et al., 2001).

Une fois le génome dimérisé et encapsidé, il faut également recruter les protéines nécessaires au fonctionnement du futur virion. Pour ce faire, Gag joue un rôle central dans le recrutement des protéines (Haseltine, 1991; Luban, et al., 1993b). L'assemblage est assuré par la multimérisation de Gag et des autres protéines virales. C'est plus précisément le domaine CA de Gag qui permet les interactions Gag/Gag et Gag/Gag-Pol (Huang, et al., 1997a; Zuber, et al., 2000). Ce domaine serait également impliqué dans l'interaction avec la cyclophiline A (Luban, et al., 1993a) qui augmente l'infectivité virale (Franke, et al., 1994). D'autre part, le domaine p6 de Gag permet le recrutement de Vpr (Paxton, et al., 1993). Les protéines Tsg101 et HP68 sont également incorporées dans ce complexe. Ces complexes vont alors se diriger vers des endosomes de grande taille nommés MultiVesicular Bodies (MVB) (Demirov, et al., 2002; VerPlank, et al., 2001). Ces vésicules permettent à des protéines de sortir du cytoplasme (Raiborg, et al., 2003). Ces vésicules permettent la formation des nouveaux virions qui bourgeonnent au niveau des « lipid rafts » de la membrane cellulaire (Nguyen, et al., 2000; Simons, et al., 1997). Nous noterons également qu'Env est clivée au niveau de l'appareil de Golgi de la cellule pour donner gp41 et gp120 qui vont être recrutés par la matrice du virion (Cosson, 1996).

Les particules virales sont encore immatures (Figure 12A): la maturation des précurseurs s'achève par action de la protéase virale sur la protéine Gag pr55 (Kohl, et al., 1988). On observe par microscopie électronique (Figure 12B) que la maturation des particules virales se caractérise par la concentration du génome et des protéines associées au centre du virion (cône caractéristique dense aux électrons) (Coffin, et al., 1997).

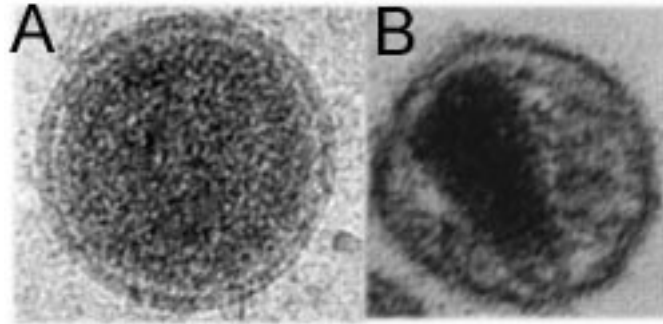


Figure 12 : (A) Particule virale immature (B) Particule virale après maturation

5) Les thérapies actuelles et futures

Après de nombreuses années de lutte contre le sida, nous pouvons désormais nous considérer en meilleure position pour freiner l'évolution de l'infection et améliorer de manière significative la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH. Ces résultats encourageants sont dus à l'application des thérapies antirétrovirales. Les objectifs des thérapies antirétrovirales sont les suivants :

- maintenir en santé aussi longtemps que possible les personnes vivant avec le VIH ;
- améliorer la qualité de vie de ces personnes ;
- réduire la morbidité et la mortalité causées par le VIH ;
- réduire la toxicité médicamenteuse ;
- prévenir la résistance du virus aux médicaments ;
- maintenir la suppression de la charge virale plasmatique ;
- améliorer la fonction immunitaire ;
- conserver des options thérapeutiques pour le futur ;
- prévenir la transmission du VIH de la mère à l'enfant.

L'utilisation d'une combinaison d'antirétroviraux supprime la réplication du VIH et maintient la charge virale sous le seuil de détection ce qui diminue le risque d'émergence de souches de VIH résistantes et retarde la progression de l'infection. La clé du succès thérapeutique réside dans l'observance thérapeutique, puisqu'une diminution de la posologie ou encore l'arrêt, si bref soit-il, d'un ou de plusieurs des médicaments antirétroviraux peut favoriser l'émergence de souches virales résistantes.

a) Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase

La réplication active du VIH cause des dommages au système immunitaire et favorise la progression de l'infection vers le sida. Dans le cycle réplcatif du virus, la rétrotranscription joue un rôle central et très important. Elle est une cible privilégiée pour la thérapie contre le VIH. Dans ce cas c'est essentiellement la RT qui est visée.

Il y a trois classes de médicaments contre le VIH qui prennent pour cible la transcriptase inverse.

Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) qui comprennent l'AZT (zidovudine, *Rétrovir*[®]), la ddI (didanosine, *Videx*[®]), le 3TC (lamivudine, *Epivir*[®]), le d4T (stavudine, *Zerit*[®]), l'abacavir (*Ziagen*[®]) et la ddC (zalcitabine, *Hivid*[®]). Les analogues nucléosidiques sont des composés, utilisés dans les traitements contre le VIH, qui ressemblent aux désoxynucléosides naturels. Entre autres, l' AZT comme le d4T sont des analogues de la thymidine et la ddC comme le 3TC sont des analogues de la cytidine. Pour être actifs les analogues nucléosidiques doivent être phosphorylés par la cellule. Sous forme triphosphorylée, ils s'incorporent à la chaîne d'ADN en formation lors de la transcription inverse de l'ARN du virus et en bloquent l'étape finale. C'est donc un inhibiteur compétitif

Les analogues non-nucléosidiques ou INNTI ne sont pas des analogues compétitifs des nucléosides et ne rentrent pas en compétition avec l'ARN génomique au niveau du site actif de la RT. Ils modifient la structure de ce site catalytique pour inactiver la RT. Parmi les INNTI, les plus souvent utilisés sont l'Efavirenz (*Sustiva*[®]) et la nevirapine (*Viramune*[®]). Il existe également dans la classe des INNTI : le Delavirdine (*Rescriptor*[®]) mais il ne peut être prescrit que par autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Malgré un mécanisme différent, l'action sur le cours de l'infection est le même que celui de l'INTI

La troisième classe d'antirétroviraux actuellement utilisée est celle des inhibiteurs nucléotidiques. Tenofovir (*Viread*[®]) est le seul médicament de cette classe prescrit sur ordonnance. Ces inhibiteurs sont très similaires aux analogues nucléosidiques sauf qu'ils sont déjà activés. Ces médicaments une fois incorporés dans le corps entrent directement en action ce qui contraste avec les autres classes de médicaments antirétroviraux.

b) Les inhibiteurs de la protéase

En bloquant la protéase, les inhibiteurs empêchent une cellule infectée de produire de nouvelles particules virales. L'antiprotéase est un pseudopeptide (nature chimique et structure proche du peptide) analogue structural de la séquence peptidique du site de clivage reconnu par la protéase. Elle bloque de façon sélective et réversible l'activité protéolytique de la protéase. Cette dernière est indispensable à la production de virus matures et donc fonctionnels. Les inhibiteurs de protéase agissent en empêchant le clivage des polyprotéines gag et gag-pol. Le grand avantage de ce médicament est sa sélectivité pour la protéase virale. En effet la protéine virale est différente de celles contenues dans les cellules normales du corps humain.

Les inhibiteurs de protéase actuellement disponibles sont l'indinavir (*Crixivan*[®]), le ritonavir (*Nordir*[®]), le nelfinavir (*Viracept*[®]), le saquinavir (prescrit sous deux formes *Invirase*[®], *Fortovase*[®]), lopinavir/ritonavir (*Kaletra*[®]). L'amprenavir (*Agenerase*[®]) est un inhibiteur de protéase qui peut uniquement être prescrit aux personnes qui suivent leur deuxième traitement. Atazanavir et tipranavir sont des inhibiteurs de protéase expérimentaux qui ne sont accessibles qu'en participant aux essais thérapeutiques.

c) Trithérapie

C'est l'association de trois médicaments antiviraux. Dans le cas du traitement du VIH, une trithérapie consiste à associer par exemple un ou deux inhibiteurs de transcriptase inverse, à un ou deux inhibiteurs de protéase afin d'utiliser les avantages des uns et des autres tout en essayant de supprimer leurs inconvénients. La trithérapie permet également de baisser la probabilité d'émergence de virus résistants.

d) L'inhibiteur de fusion

L'inhibiteur de fusion T-20 (Pentafuside[®] ou Fuzéon[®]) (Lambert, et al., 1996) est une molécule capable d'empêcher la fusion entre l'enveloppe du virus VIH et la membrane cellulaire. La fusion se fait d'une part entre le complexe de deux glycoprotéines de l'enveloppe virale (gp 120/gp 41) et de l'autre, les récepteurs des cellules cibles (CD4 et co-récepteurs CCR5 ou CXCR4). Le T20 est un polypeptide de 36 acides aminés. Il se fixe sur la gp 41 et bloque donc son activité fusiogène. Ce médicament est utilisé en complément de la

trithérapie, il permet de baisser de façon significative la charge virale dans le sang des patients.

e) La thérapie immunitaire à l'interleukine-2 (IL-2)

L'infection par le VIH entraîne une profonde dérégulation de l'IL-2. Elle est une substance messagère importante pour la fonction et la prolifération des cellules lymphatiques. L'interleukine-2 en association avec un traitement antirétroviral semble être une méthode supplémentaire et fiable pour la thérapie immunomodulatoire de l'infection par le VIH (Bani, et al., 1997; Gougeon, et al., 2001; Levy, et al., 2003). En pratique, ce traitement est peu utilisé car il n'a pas d'autorisation de mise sur le marché. Il n'est accessible que dans le cadre d'une ATU. D'autre part, l'efficacité du traitement dépend fortement du niveau initial de CD4 c'est pour cela qu'il est utilisé en association avec d'autres traitements qui contrôlent le niveau viral. De plus, ce traitement présente d'énormes problèmes de tolérance.

f) L'hydroxyurée (Hydrea[®])

L'hydroxyurée, un médicament contre le cancer, est utilisée de temps en temps en association avec d'autres agents antirétroviraux de la catégorie des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (Sherman, et al., 1999). Elle n'entrave pas directement la reproduction du virus, mais agit contre une enzyme appartenant à la cellule cible appelée ribonucléotide-réductase, qui aide aussi à la conversion de l'ARN en ADN mais a également pour effet d'empêcher les cellules sanguines de se diviser et, par conséquent, d'augmenter en nombre. L'association de l'hydroxyurée aux analogues nucléosidiques pourrait donc retarder la production de VIH et réduire le taux de charge virale. Mais, ce type de traitement a été arrêté depuis peu pour des problèmes de toxicité hématologique.

g) Autres cibles de traitements

La protéine Tat (O'Brien, et al., 1996), la protéine Rev (Dayton, et al., 2000; Lisiewicz, et al., 2000) mais aussi l'intégrase (Schols, et al., 1997) sont des cibles potentielles pour un traitement. Pour l'instant les deux grandes classes d'inhibiteur de l'intégrase sont des catéchols contenant des groupements aromatiques hydroxylés et des

diketoacides contenant des groupements aromatiques (Dayam, et al., 2003). Les inhibiteurs de Tat et de Rev posent encore d'énormes problèmes de sélectivité ce qui augmente considérablement leur cytotoxicité (Baba, 2004).

h) Les inhibiteurs de la NCp7

Ayant un certain nombre de rôles clés dans le cycle viral, la protéine NCp7 serait une cible potentielle pour une nouvelle thérapie contre le SIDA. A l'heure actuelle, deux approches sont étudiées. La première consiste en une interaction directe avec la protéine alors que la deuxième consiste à entrer en compétition avec la protéine. En effet, ces molécules sont essentiellement des facteurs capables d'éjecter le zinc et ceci d'une façon plus ou moins spécifique à la protéine.

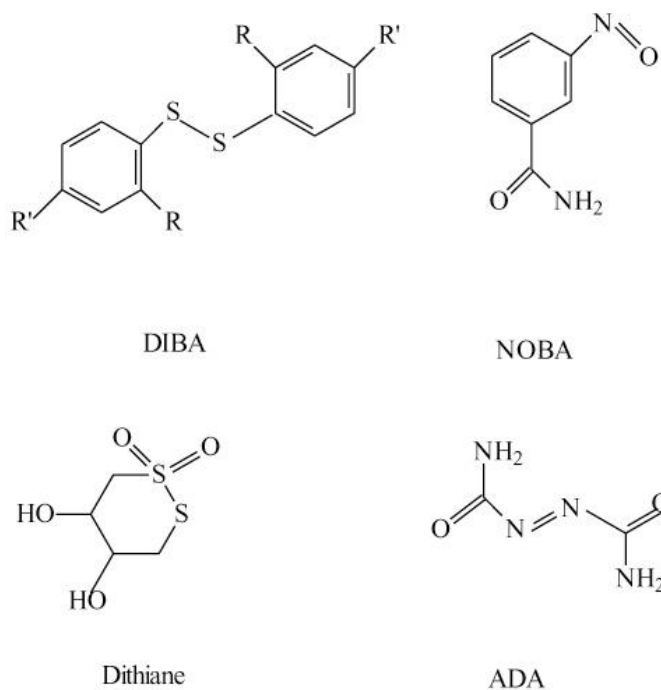


Figure 13 : Structures chimiques des principaux éjecteurs de zinc

(Rice, et al., 1993) est le premier à présenter une molécule capable d'éjecter le zinc structurant les doigts de la NCp7. Cette molécule est le 3-nitrosobenzamide (NOBA) (Figure 13). Il va dans le cas de la NCp7 modifier les résidus cystéine ce qui aura pour effet d'éjecter le zinc. La protéine s'en trouve inactivée. On notera que ce produit est également utilisé comme un ligand de la PARP (poly(ADP-ribose) polymerase).

Cette molécule sera le point de départ de la synthèse d'autres molécules éjecteurs de zinc.

La première est le disulfide benzamide (DIBA) (Figure 13) (Rice, et al., 1995). Elle existe sous deux composants le 2.2'-Dithio-bis-[4'-(sulfamoyl)benzanilide] (DIBA-1) et le 2.2'-Dithio-bis-(5-acetylamino)benzanilide (DIBA-2). Leur mode d'action est le même que celui du NOBA.

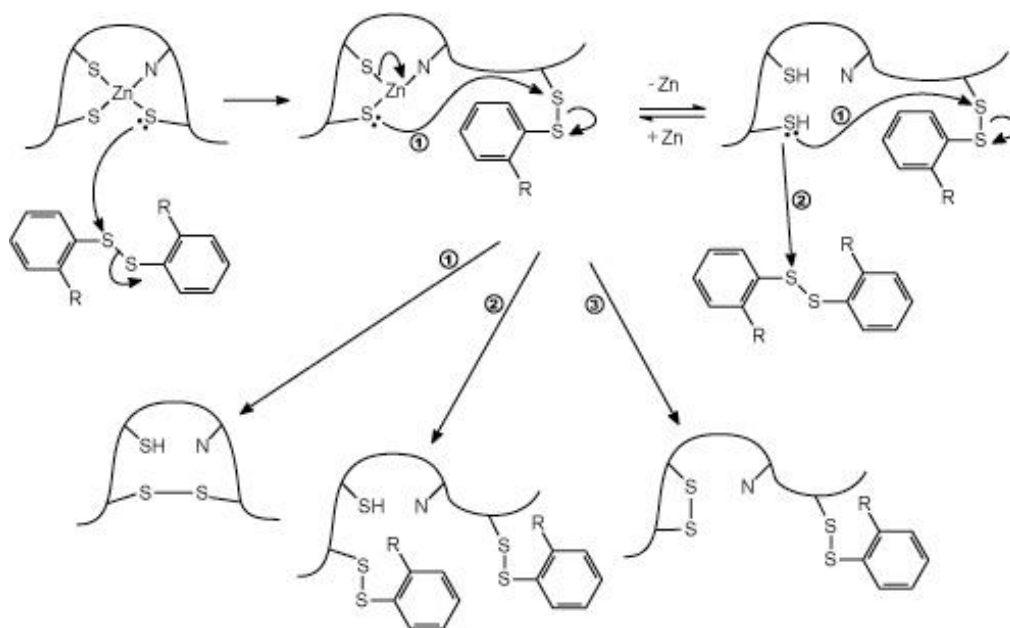


Figure 14 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de la NCp7 de la famille des DIBA.

Tous les inhibiteurs de la NCp7 décrits précédemment agissent de manière stoechiométrique et principalement par une attaque électrophile du groupement thiol (SH) (Figure 14). Par formation de ponts disulfures entre les différentes cystéines du zinc les inhibiteurs permettent l'éjection du zinc (Yu, et al., 1995). Mais l'action n'est pas de même ampleur sur les deux doigts. L'effet de l'inhibiteur est plus important sur le doigt C-terminal que sur le doigt N-terminal ceci est dû à un encombrement stérique plus important pour le doigt N-terminal (Maynard, et al., 1998; Tummino, et al., 1996). Mais le facteur stérique n'est pas la seule explication puisqu'il a été montré que la Cys⁴⁹ est plus sensible à ces molécules (Maynard, et al., 1998). En effet, la Cys⁴⁹ a une réactivité plus grande que les autres. Une fois que le zinc est éjecté la protéine est déstructurée et devient donc inactive dans le cycle réplicatif. Il y a arrêt de ce cycle.

Mais le grand désavantage du NOBA est sa faible spécificité. Il interagit avec toutes les molécules ayant des groupements thiols. Le DIBA ne pose pas ce genre de problème mais reste sensible aux agents réducteurs contenus dans la cellule.

Dans le souci d'améliorer l'action du DIBA et de réduire un tel inconvénient, des dérivés aminés ou carboxy-amide des disulfides benzamides ont été synthétisés (Rice, et al., 1996). Le premier de ces dérivés est le dithiane (Figure 13) et il a un effet éjecteur de zinc (Mayasundari, et al., 2003; Rice, et al., 1997a). Parmi ces molécules, le (1,2-dithiane-4,5-diol, 1,1-dioxyde,cis) est celui présentant la toxicité la plus faible. Le composé est très sélectif pour la protéine de la nucléocapside et le cycle présent dans la molécule évite la réduction des ponts disulfures. Le deuxième de ces dérivés est l'azodicarbonamide (ADA) (Figure 13) qui inhibe également l'infection du VIH-1 (Rice, et al., 1997b). Ils sont encore actuellement en essai clinique de phase I/II en Europe et donnent des premiers résultats encourageants (Goebel, et al., 2001; Vandeveld, et al., 1996) mais qui demandent à être confirmés. Il peut être considéré à l'heure actuelle comme le premier éjecteur de zinc en essai clinique. Les troisièmes de ces dérivés sont des molécules comme la cystamine et la cysteamine qui auraient aussi une activité antirétrovirale liée à l'éjection du zinc (McDonnell, et al., 1997).

L'étape suivante a été de modifier les DIBA pour obtenir d'autres antirétroviraux. Le benzisothiazolone (BITA) est issu de la cyclisation du DIBA et présente une activité antirétrovirale (Domagala, et al., 1997; Sharmeen, et al., 2001; Tummino, et al., 1997). Le BITA issu du DIBA-4 est actuellement en essai clinique aux Etats-Unis. D'autres dérivés comme le pyridinioalkanoyl thiol ester (PATE) présente aussi une activité anti-HIV.

Il a été également montré que des complexes du cobalt III sont capables d'éjecter le zinc de la NCp7 (Louie, et al., 1998). Ces complexes se lient de façon covalente à l'histidine d'un des doigts de zinc. Mais à nouveau l'énorme désavantage d'un tel complexe est sa faible spécificité pour le zinc de la NCp7.

D'autre part, des molécules capables d'entrer en compétition avec la NCp7 ont été étudiées. Cette compétition se fait essentiellement lors de l'interaction de la protéine avec le génome viral. Le fait d'entrer en compétition avec la NCp7 est une méthode plus sélective que l'utilisation de molécules qui interagissent directement sur la protéine. Cet inhibiteur de la NCp7 utilisant cette voie est le peptide RB2121 (Druillennec, et al., 1999) qui par sa structure tridimensionnelle est capable de mimer une partie de la protéine NCp7. Il a été montré que les Phe¹⁶ et le Trp³⁷ de la NCp7 sont spatialement proches et que l'Arg²⁶ et l'Arg³² ont une orientation bien définie (Demene, et al., 1994; Morellet, et al., 1994; Morellet, et al.,

1992). C'est sur ces observations qu'est basée la construction du RB2121. Le motif du peptide utilisé est (Phe-Cys-DTrp-Arg-Cys-Lys). En particulier, c'est le Phe¹, D-Trp³, Arg⁴ et Lys⁶ qui sont capable de mimer leurs analogues respectifs Phe¹⁶, Trp³⁷, Arg³² et Arg²⁶ dans la NCp7. Le RB2121 va inhiber par compétition la reconnaissance de l'ARN et de l'ARN_t par la NCp7. Il va inhiber la formation du complexe d'initiation de la rétrotranscription. De plus, RB2121 est capable d'inhiber la reconnaissance entre la RT et la NCp7. Mais la grande difficulté au regard des autres approches (antirétroviraux et antiprotéases) est que la NCp7 est présente à une forte concentration. Ceci fait que le RB2121 n'est actif qu'à haute concentration.

D'autre part, il existe une molécule capable de déstabiliser l'ADN. L'actinomycine D (Davis, et al., 1998; Guo, et al., 1998) provoque des changements conformationnels du brin ADN (-) strong stop et empêche l'action de la NCp7.

i) Un vaccin anti-VIH/SIDA ?

Il y a un consensus, parmi les scientifiques : la découverte d'un vaccin anti-VIH/sida est un but atteignable. Mais à l'heure actuelle, l'approche la plus fructueuse pour les autres maladies – les vaccins vivants atténués (notamment dans le cas du VIH sans la protéine nef (Connor, et al., 1998; Ruprecht, et al., 1996a; Ruprecht, et al., 1996b; Ruprecht, et al., 1996c)) – sont peu susceptibles de servir à la fabrication d'un vaccin anti-VIH et donne des résultats peu concluants (Whitney, et al., 2004). L'approche vaccinale reste très limitée par l'importance des mutations génétiques du virus.

Mais des chercheurs français ont proposé, sous la houlette de l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS), de booster le système immunitaire en l'exposant à un cocktail inoffensif ressemblant au VIH (fragments d'ADN capables de produire certaines protéines virales) (Katlama, 2003). Cette stratégie vaccinale permet une **restauration immunitaire**.

Cette avancée est à prendre avec beaucoup de réserves. En effet, il s'agit d'un vaccin thérapeutique et en aucun cas d'un vaccin classique, dit préventif. De plus, les résultats mesurés aujourd'hui devront être confirmés dans la durée et auprès d'un plus grand nombre de patients.

D'autre part, l'inactivation de la NCp7 est aussi un bon moyen de créer des vaccins. Pour cela, deux voies sont possibles.

En premier lieu, des mutations chimiques de la NCp7 ont été utilisées pour inactiver des virus de SIV (Arthur, et al., 1998). L'inactivation de la NCp7 se fait par le 2-aldrihiol qui modifie de façon covalente les doigts de zinc. Notons, que l'effet du 2-aldrihiol est irréversible (Chertova, et al., 2003) ce qui en fait un bon candidat pour des essais in vivo. Mais les virus ainsi inactivés préservent la fonctionnalité de leurs protéines de surface (Arthur, et al., 1998; Rossio, et al., 1998). En effet, ces virus pourraient être ensuite injectés à des macaques pour provoquer une réponse immunitaire. Cette méthode ouvre la voie à une nouvelle méthode de vaccination mais elle reste limitée par le taux de mutation du virus.

En deuxième lieu, de l'ADN codant pour une nucléocapside mutante de SIV a été injecté à des macaques infectés. Ceci provoque l'expression d'un virus non infectieux et surtout une réponse immunitaire protectrice (Gorelick, et al., 1999a). Cet ADN reste capable de compléter toutes les étapes d'un cycle viral. Cette dernière approche semble être efficace et provoque une bonne réponse immunitaire des macaques envers un virus pathogène (Gorelick, et al., 2000a; Gorelick, et al., 2000b).

En vingt ans de nombreux progrès ont été réalisés dans la thérapie du SIDA mais à l'heure actuelle beaucoup de souches virales deviennent résistantes aux médicaments actuels. C'est pour cela que la recherche est sans cesse en quête de nouvelles cibles (comme celles décrites ci-dessus). Ceci permet de donner un espoir supplémentaire d'une thérapie et d'un traitement différent pour les personnes résistantes et nouvellement infectées.

C) Caractéristiques de la protéine de la nucléocapside de VIH-1 (NCp7)

1) Aspects structuraux et relation structure/activité

La NCp7 est issue de la maturation du précurseur de Gag (Pr55^{Gag}). Le clivage permet aussi la libération des protéines p1, p2, p6, MAp17 et CAp24 (chapitre I-B-3-b). En fait, le clivage va donner en premier lieu la NCp15 qui sera alors à son tour clivée pour donner en particulier la NCp7 mais aussi la p6, la p2 et la p1 (Veronese, et al., 1987).

Dans cette étude, la protéine NCp7 utilisée est issue de l'isolat BH10 (sous type A) (Figure 15).

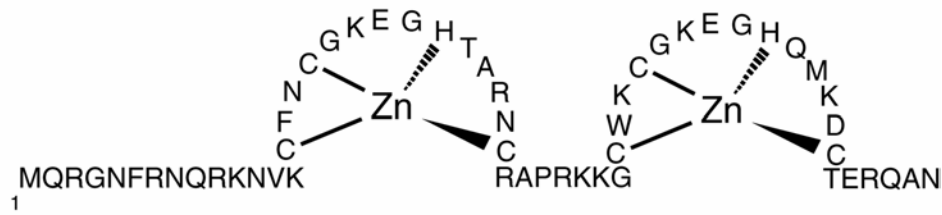


Figure 15 : Structure primaire de la NCp7

Elle est caractérisée par deux doigts de zinc de motif CCHC (Berg, 1986) (Figure 15). Plus précisément, le motif est défini par $-\text{Cys-X}_2\text{-Cys-X}_4\text{-His-X}_4\text{-Cys-}$ où les X représentent des acides aminés différents de Cys ou His. La particularité de ce motif est de lier le zinc avec une affinité de l'ordre de 10^{-13} M (Mely, et al., 1996). Cette liaison se fait avec une stoechiométrie de 1 :1. La capacité de la protéine à lier les ions métalliques a été montrée par différentes techniques spectroscopiques. Les différences d'absorbance UV du cobalt ainsi que la variation du déplacement chimique du Cadmium lorsqu'ils sont libres en solution ou complexés dans le motif CCHC ont permis de montrer la tétracoordination du zinc dans le motif CCHC (De Rocquigny, et al., 1991; Fitzgerald, et al., 1991; Green, et al., 1989). La fixation du zinc permet de structurer le doigt de zinc. En effet, il induit la transition d'une structure aléatoire dans la forme apo (sans zinc) vers une structure repliée fortement contrainte et stabilisée par des liaisons hydrogènes dans sa forme holo (liée au zinc) (Morellet, et al., 1992; Omichinski, et al., 1991; Summers, et al., 1992) (Figure 16).

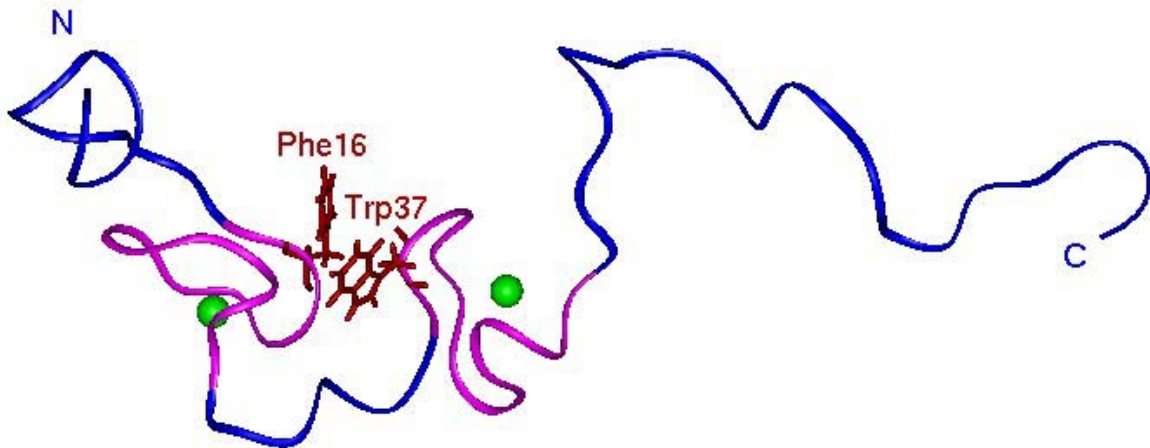


Figure 16 : Structure en 3D de la NCp7 (en vert les ions zinc) montrant la proximité de Phe¹⁶ et de Trp³⁷ (Morellet, et al., 1992).

En comparant les séquences de plusieurs protéines de la nucléocapside de différents rétrovirus, on observe qu'à l'exception du spumavirus, elles possèdent toutes des doigts de zinc de motif CCHC (Covey, 1986; Maurer, et al., 1988) et de structure similaire. Notons qu'elles n'en possèdent pas toujours deux.

Le motif $-Cys-X_2-Cys-X_4-His-X_4-Cys-$ a été étudié par mutation. Il en ressort que la structure des doigts est importante pour son activité biologique. En effet, si on mute une des histidines par une cystéine, ce qui modifie la longueur de la liaison entre le peptide et le zinc, on observe une baisse de l'activité biologique de la protéine (Demene, et al., 1994; Gorelick, et al., 1999b; Tanchou, et al., 1998). Par ailleurs, une mutation des résidus Phe¹⁶ ou Trp³⁷ rend également le virus non infectieux (Dorfman, et al., 1993). De plus, ces deux résidus se trouvent être spatialement très proches l'un de l'autre (Mely, et al., 1994; Morellet, et al., 1992) (Figure 16), ce qui a une importance sur l'activité biologique de la NCp7 (Morellet, et al., 1994). L'importance du Pro³¹ a été également étudiée. En effet, se trouvant dans le linker entre les deux doigts, il joue un rôle critique dans le rapprochement des deux doigts (Mely, et al., 1994; Morellet, et al., 1994). Cette proximité entre les doigts a été tout d'abord contestée (Summers, et al., 1992), mais finalement la structure proposée en 1998 (Lee, et al., 1998) par cette même équipe s'avère être très proche de celle proposée en 1994 par une équipe française (Morellet, et al., 1994). La position des doigts semble également très importante. En effet, si on inverse la position des deux doigts ou que l'on remplace le premier doigt par le deuxième le virus devient non infectieux (Gorelick, et al., 1993). Par contre, si on remplace le deuxième

doigt par le premier doigt l'infectivité revient à un niveau normal après un certain temps (Gorelick, et al., 1993).

Les chaînes latérales de la protéine sont basiques et très flexibles, elles possèdent un tryptophane en position 61 qui peut servir de sonde fluorescente spécifique aux chaînes latérales.

2) Rôle de la protéine dans le cycle viral

a) Le rôle histone

Il y a environ 2000 copies de la protéine NCp7 qui sont reliées à l'ARN viral dimérique (Darlix, et al., 1990). Par sa liaison, la protéine joue un rôle dans la condensation de l'ARN viral (Berthoux, et al., 1997; Craven, et al., 1996; Krishnamoorthy, et al., 2003). Il apparaît que non seulement les doigts de zinc mais encore les chaînes terminales de la protéine jouent un rôle dans la condensation de l'ARN. Cette liaison avec l'ARN fait que la protéine joue également un rôle dans la structuration du cœur du virus.

En dernier lieu, cette liaison permettra à la protéine de protéger l'ARN contre les attaques des RNases (Buckman, et al., 2003; Coffin, 1985). Le niveau de protection est fortement dépendant de la présence des deux doigts de zinc ainsi que de celle des chaînes latérales basiques (Krishnamoorthy, et al., 2002; Lapadat-Tapolsky, et al., 1993).

b) Le rôle dans l'encapsidation du génome viral.

L'ARN génomique du rétrovirus est en premier lieu le porteur de l'information génétique mais il a également un rôle structural dans la formation de la capsid (Muriaux, et al., 2001). Comme dit précédemment, la séquence Ψ formée des quatre tige-boucles SL1 à SL4 est nécessaire à l'encapsidation.

La boucle SL1 ou DIS (Dimerisation Initiation Site) est le site majeur d'initiation de la dimérisation de l'ARN génomique (Figure 12). Ses propriétés et caractéristiques sont développées dans la partie suivante.

Pour l'encapsidation du génome viral seule la polyprotéine Pr55^{Gag} est nécessaire (Gheysen, et al., 1989; Green, et al., 1989). De plus, la Pr160^{Gag-Pol} n'entre pas en jeu car même avec une protéase inactivée le virus est capable d'encapsider l'ARN génomique (Fu, et

al., 1994). Ce sont des domaines bien particuliers de la Pr55^{Gag} qui entrent en jeu dans l'encapsidation (Jowett, et al., 1992) : les domaines p1 et p2 de Pr55^{Gag} (Campbell, et al., 1995; Carriere, et al., 1995; Krausslich, et al., 1995). Ces domaines influent directement sur l'assemblage des protéines du virion et donc sur l'infectivité du virus. Mais le domaine NC de Pr55^{Gag} ne suffit pas à la spécificité de l'encapsidation. Alors que Pr55^{Gag} fixe préférentiellement l'ARN de VIH, le domaine NC fixe également des ADN de nature hétérologue avec une forte affinité (Bacharach, et al., 1998). En remplaçant le domaine entourant NC et p6 par une protéine fixatrice d'ARN, on ne change en rien la production de virions (Zhang, et al., 1997). Cette spécificité serait donc due à l'environnement de la Pr55^{Gag}. Il a été également montré que les domaines p6, CA et p2 jouent également un rôle dans ce processus (Geigenmuller, et al., 1996; Kaye, et al., 1998; Zhang, et al., 1997).

La protéine NCp7 présente une forte affinité pour les tige-boucles SL1, SL3 et SL4 (Berkowitz, et al., 1994; Clever, et al., 1995). Elle est le médiateur de la reconnaissance de l'ARN viral parmi l'ensemble des acides nucléiques cellulaires. Les tige-boucles SL1, SL3 et SL4 ont chacune une affinité plus faible pour la NCp7 que ne peut avoir l'ensemble de la séquence Ψ , suggérant que le site reconnu par la protéine est réparti sur les quatre tige-boucles (Clever, et al., 1997).

Les doigts de zinc sont nécessaires à l'encapsidation (Aldovini, et al., 1990; Gorelick, et al., 1990) mais n'ont pas la même importance. En général, toute mutation entraînant la déstructuration des doigts aura pour effet de diminuer l'encapsidation de l'ARN génomique au profit d'autres ARN notamment les ARN ribosomiques (Gorelick, et al., 1990; Muriaux, et al., 2002). Mais le doigt à l'extrémité N-terminale joue un rôle plus important que l'autre doigt puisqu'il reconnaît l'ARN viral (Poon, et al., 1996; Schmalzbauer, et al., 1996). Une mutation de ce doigt a pour effet de faire baisser considérablement l'affinité de la NCp7 pour la séquence SL3 (Tanchou, et al., 1998).

SL3 et SL2 sont les sites majeurs de liaison avec la NCp7 alors que SL4 ne semble pas directement impliquée dans cette liaison (Yu, et al., 2003) car elle présente une faible affinité pour la NCp7 (Amarasinghe, et al., 2001). Les résidus Phe¹⁶ et Trp³⁷ de la NCp7 s'empilent sur les bases G₂₉₀ et G₂₉₂ de la boucle (Amarasinghe, et al., 2000a). SL4 doit certainement jouer un rôle différent dans la séquence Ψ car elle présente une boucle GAGA qui semble impliquée dans des interactions ARN/ARN (Amarasinghe, et al., 2001; Kerwood, et al., 2001). Par conséquent, la boucle SL4 pourrait être impliquée dans la dimérisation.

Pour SL1, dont la partie haute est impliquée dans la dimérisation, la boucle interne est le site de liaison de la NCp7 (Lawrence, et al., 2003). En effet, toute mutation de cette boucle a pour effet de baisser l'affinité de SL1 pour NCp7.

c) Rôle dans la dimérisation de l'ARN génomique

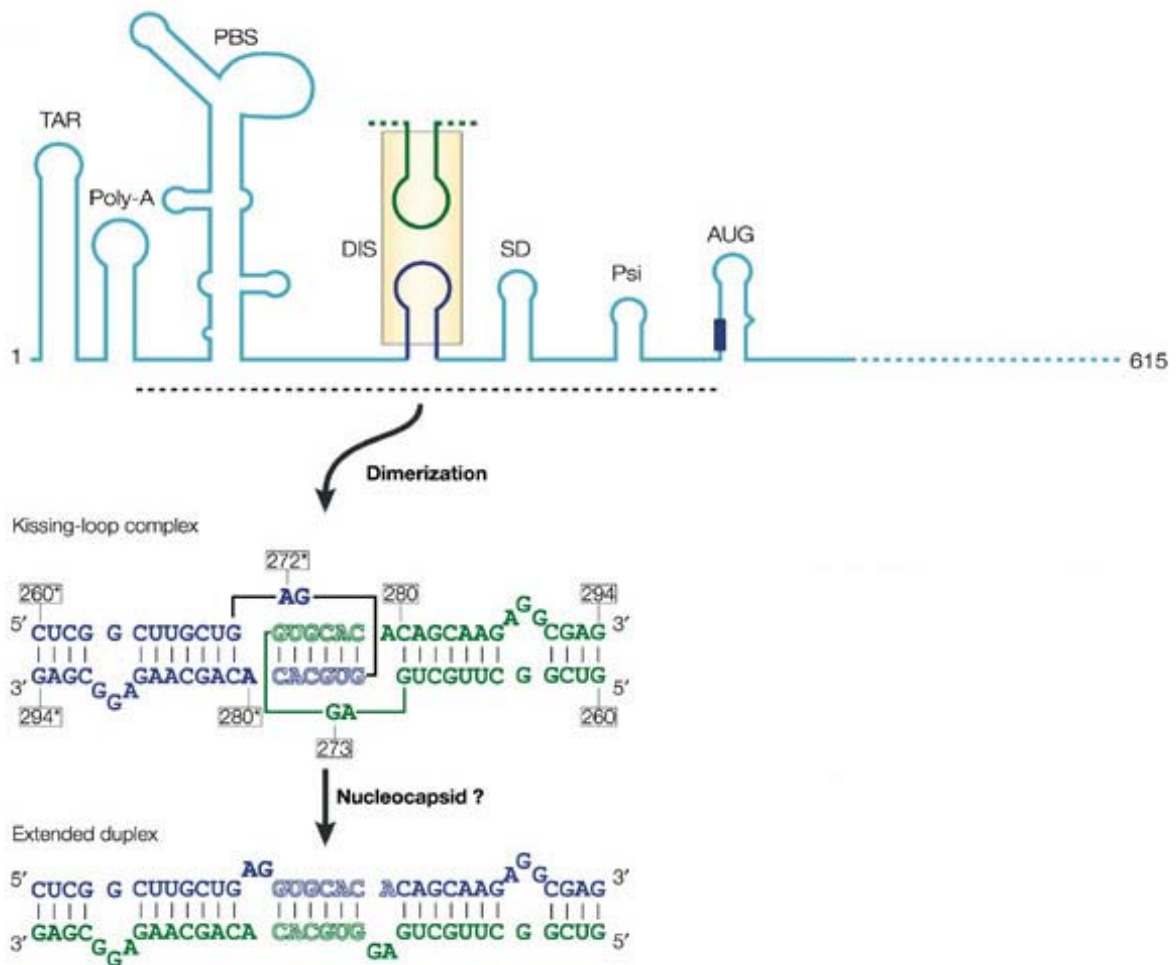


Figure 17 : Localisation du DIS, formation du complexe boucle-boucle et du duplex étendu. (Muriaux, et al., 1995; Skripkin, et al., 1994)

La dimérisation comme l'encapsidation est fortement stimulée par la NCp7 (Darlix, et al., 1990). Il a été récemment montré qu'en présence de chlorure de magnésium, l'activité de la NCp7 dans la dimérisation est favorisée par la protonation de la première adénine de la boucle de DIS (Mihailescu, et al., 2004).

L'auto-complémentarité des boucles permet la formation d'un complexe boucle-boucle (Figure 17) (Paillart, et al., 1996b; Rist, et al., 2002; Windbichler, et al., 2003) qui a

été caractérisé par cristallographie (Ennifar, et al., 2001). Expérimentalement, ce complexe a été obtenu par incubation à 37°C alors qu'une incubation à 55°C, nous donne un duplex étendu également caractérisé par cristallographie (Ennifar, et al., 1999). Ce même duplex peut être obtenu à 37°C en présence de la NCp7 (Figure 17) (Muriaux, et al., 1996a; Takahashi, et al., 2000). Dans ce cas, le duplex étendu étant plus stable que le complexe boucle-boucle, c'est par son rôle chaperon qu'elle favorise ce réarrangement structural. La dimérisation du génome semble passer par un complexe boucle-boucle de SL1 (Haddrick, et al., 1996).

La NCp7 est capable de catalyser la réaction *in vitro* même en l'absence de doigt de zinc, ce qui suggère un rôle limité des doigts de zinc même si l'activité de la protéine baisse d'un facteur 10 (De Rocquigny, et al., 1992; Feng, et al., 1996; Takahashi, et al., 2001; Takahashi, et al., 2000). Par contre, les chaînes terminales sont indispensables à cette activité. De même, la boucle interne de DIS est indispensable à la dimérisation ainsi qu'à la formation du duplex étendu. En effet, NCp7 n'est pas capable de promouvoir le duplex étendu lorsqu'il y a délétion de la boucle interne (Takahashi, et al., 2000). Par contre, *in vivo*, cette même délétion a un effet bien moins prononcé puisqu'elle ne fait que baisser le niveau de dimères dans le virion (Paillart, et al., 1996a; Paillart, et al., 1994; Paillart, et al., 1996b; Shen, et al., 2000). En fait, il n'y aurait pas de formation de duplex étendu *in vivo* car la séquence DIS est incluse dans l'ensemble du génome ce qui ne facilite pas la formation du duplex (Paillart, et al., 2004). En conclusion, la boucle interne aurait deux rôles :

- Déstabilisation de la partie supérieure de la séquence DIS (Takahashi, et al., 2001).
- Site de fixation de la NCp7 sur DIS (Damgaard, et al., 1998).

Nous notons également qu'il a été récemment montré que la tige-boucle TAR aidée de la NCp7 serait aussi un site de dimérisation complémentaire à DIS (Andersen, et al., 2004; Hoglund, et al., 1997).

d) Rôle dans la transcription inverse.

La protéine NCp7 présente une activité chaperonne (Herschlag, 1995; Herschlag, et al., 1994; Rein, et al., 1998). Cette activité permet à une molécule d'aider une autre molécule à atteindre sa conformation fonctionnelle et native (Cristofari, et al., 2002). Dans un cadre plus général, l'activité chaperonne est indispensable dans des fonctions comme le maintien

des extrémités des chromosomes, la transcription de l'ADN, l'exportation, l'épissage et la modification des préARN ainsi que la traduction et la dégradation des ARNm. Dans le cas de la NCp7, l'activité chaperonne s'exerce sur des acides nucléiques. De manière générale, les protéines chaperonnes des acides nucléiques peuvent être classées en deux sous-types :

- Le premier type comprend les protéines chaperonnes agissant comme un ligand ou un cofacteur. De ce fait, elles reconnaissent d'une façon spécifique les ARN dont la conformation est instable. Les protéines se lient directement à l'ARN et le réarrangent dans une conformation stable (Weeks, 1997). Ce sont essentiellement des protéines impliquées dans l'épissage des ARN et la maturation.
- Le second type comprend les protéines chaperonnes qui ne sont pas spécifiques d'un ARN. Ces protéines se lient à l'ARN et permettent un réarrangement de la séquence nucléotidique dans la bonne conformation. Dans certains cas, les protéines après avoir ouvert la séquence nucléotidique facilitent son hybridation avec sa séquence complémentaire. C'est dans ce sous-type que se trouve la hnRNP, la protéine ribosomale S12 et la protéine de la nucléocapside des rétrovirus (Portman, et al., 1994).

Pour faciliter la compréhension du rôle chaperon, il sera subdivisé en deux étapes qui sont dans le cas général indissociables. Dans un premier temps, la NCp7 va favoriser la déstabilisation intramoléculaire des séquences nucléotidiques auxquelles elle se lie. Ces séquences une fois ouvertes, la protéine va favoriser leur hybridation avec leurs séquences complémentaires. Cette hybridation quelle soit mixte (ADN/ARN) ou non (ADN/ADN, ARN/ARN) se fera dans la conformation thermodynamique la plus stable. Cette activité peut être mimée expérimentalement en l'absence de la NCp7 dans une solution fortement saline en chauffant brutalement et refroidissant par étape (Herschlag, 1995; Herschlag, et al., 1994). L'efficacité de cette activité chaperonne est fortement dépendante du rapport de concentration entre la NCp7 et l'acide nucléique. Le rapport optimal est obtenu entre 5 et 7 nucléotides par NCp7 (Bernacchi, et al., 2002; Dib-Hajj, et al., 1993; Karpel, et al., 1987; Mely, et al., 1996; You, et al., 1993).

Par cette activité chaperonne, la NCp7 intervient dans la rétrotranscription. Lors de la phase d'initiation, l'ARN_t^{Lys,3} se lie à la séquence PBS (Barat, et al., 1989). Dans une

première étape, NCp7 va favoriser la déstabilisation intramoléculaire de PBS et de l'ARN_t^{Lys,3} plus précisément du bras TΨC (Tisne, et al., 2001). Puis elle favorise l'hybridation des 18 nucléotides de la région PBS aux 18 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARN_t^{Lys,3} (chapitre I-B-4-b). Dans le cas de la déstabilisation des séquences nucléotidiques la présence des doigts de zinc de NCp7 est indispensable (Tisne, et al., 2004). Par contre, l'hybridation ne requière pas les doigts de zinc mais les parties basiques C et N-terminales (De Rocquigny, et al., 1992; Hargittai, et al., 2001; Tisne, et al., 2004). La liaison des doigts de zinc avec le bras TΨC se fait par les mêmes mécanismes que pour SL2 et SL3. Cette liaison permet par l'intermédiaire de résidus aromatiques tel que le Trp³⁷ de déstabiliser le bras TΨC. D'autre part, si le bras est déjà partiellement ouvert la NCp7 déplace l'équilibre vers des formes ouvertes du bras. Ce complexe ARN/ARN formé par la NCp7 est l'amorce à partir de laquelle débute la rétrotranscription.

Les doigts de zinc semblent indispensables à la formation du complexe d'initiation de la rétrotranscription. En effet, le mutant (SSHS)₂NC (où les cystéines constituant des doigts de zinc sont remplacées par des sérines induisant une déstructuration des doigts de zinc puisqu'ils ne lient plus le zinc) est capable de former ce complexe mais avec un rendement bien plus faible qu'avec la NCp7 native (Hargittai, et al., 2001). Les doigts de zinc sont indispensables à la déstabilisation de l'ARN_t^{Lys,3} mais semblent moins importants pour l'hybridation intermoléculaire de l'ARN_t^{Lys,3} avec PBS (Hargittai, et al., 2004). Par conséquent, les doigts de zinc ainsi que les chaînes terminales ne jouent pas le même rôle dans l'activité chaperonne.

La NCp7 intervient également lors du premier saut de brin qui est lui également facilité par la présence de la NCp7 (Allain, et al., 1994; Lapadat-Tapolsky, et al., 1993; Lapadat-Tapolsky, et al., 1995; You, et al., 1994). L'activité chaperonne de la NCp7 facilite à la fois la déstabilisation intramoléculaire et l'hybridation intermoléculaire de la région R. En effet, il a été montré que la NCp7 est capable de déstabiliser l'extrémité de la séquence cTAR afin de permettre son ouverture partielle (Azoulay, et al., 2003; Bernacchi, et al., 2002). L'ouverture se fait essentiellement par une réduction de la coopérativité entre les bases et de la barrière énergétique afin de faire tendre l'équilibre vers les formes ouvertes (Lapadat-Tapolsky, et al., 1995; Tsuchihashi, et al., 1994; Williams, et al., 2001). Mais l'ouverture reste imparfaite et demande obligatoirement pour optimiser cette déstabilisation, la présence de son complémentaire (Hong, et al., 2003). Ceci indique également que la déstabilisation de TAR ainsi que l'hybridation avec son complémentaire sont étroitement liées. Les doigts de zinc

sont indispensables à l'activité chaperonne de la NCp7 lors du saut de brin. Dans un premier temps afin de déstabiliser TAR, la NCp7 doit tout d'abord se lier à la tige-boucle. Cette étape est fortement dépendante des doigts de zinc car une mutation déstabilisant l'architecture de l'un ou l'autre des doigts de zinc altère considérablement la capacité de la NCp7 à se lier à TAR (Lee, et al., 2003). Cependant, les doigts de zinc de la NCp7 ne jouent pas un rôle équivalent dans l'activité chaperonne : le premier doigt semblant le plus important (Guo, et al., 2002). La position des doigts semble également jouer un rôle important dans l'activité chaperonne ce qui confirme les effets vus sur l'activité biologique (Guo, et al., 2002; Urbaneja, et al., 1999).

La présence de la NCp7 est également indispensable à l'hybridation de TAR et de son complémentaire. En effet, des expériences de suivi cinétique de l'hybridation indiquent que la constante de vitesse est augmentée d'un facteur 160 en présence de NCp7 (You, et al., 1994). Comme pour la déstabilisation, les deux doigts de zinc n'ont pas le même rôle. En effet, il apparaît que le doigt N-terminal jouerait essentiellement un rôle dans la déstabilisation alors que le doigt C-terminal jouerait un rôle plus important dans l'hybridation en augmentant la constante de vitesse (Guo, et al., 2000; Heath, et al., 2003). L'activité chaperonne de la NCp7 est dépendante de la complémentarité entre les séquences mises en jeu. En effet, quand la complémentarité entre les deux séquences à hybrider est faible (inférieure à 13 sur 28 bases) la protéine défavorise l'hybridation en faisant baisser la constante de vitesse d'hybridation. Par contre pour une complémentarité moyenne d'au moins 13 bases complémentaire sur 28 entre les deux séquences, la protéine n'a aucun effet c'est dire qu'elle ne favorise pas ni ne défavorise l'hybridation. Cependant, lorsque la complémentarité entre les séquences est importante (soit largement supérieure à 13 bases sur 28) la NCp7 favorise l'hybridation en d'augmentant la constante de vitesse d'hybridation entre les deux séquences (Golinelli, et al., 2003). Par conséquent, NCp7 favorise les structures les plus stables ce qui est parfaitement en adéquation avec son rôle chaperon.

Au vu de sa stabilité, la séquence TAR présente dans la région R à l'extrémité 3' peut être un facteur de dissociation de la RT (Baudin, et al., 1993). Cette dissociation induira des pauses dans la rétrotranscription. La NCp7 sera capable d'éviter cette dissociation donc d'augmenter la vitesse de la transcription inverse (Ji, et al., 1996; Kim, et al., 1994; Rodriguez-Rodriguez, et al., 1995; Wu, et al., 1994).

Le brin ADN nouvellement synthétisé présente lui une séquence complémentaire à TAR appelé cTAR. Tout comme son complémentaire ARN, sa structure est très stable ce qui

favorise la réaction d'auto-amorçage. L'auto-amorçage consiste en un repliement de l'ADN(-) strong-stop et à l'élongation du brin d'ADN sur lui-même. Si on déstabilise cette séquence par des mutations, on favorise le transfert de brin au détriment de l'auto-amorçage (self-priming) (Guo, et al., 1997).

La NCp7 est capable d'inhiber cette réaction (Driscoll, et al., 2001; Driscoll, et al., 2000; Guo, et al., 1997) (Figure 18) et ceci d'autant plus que TAR est en présence de cTAR (Hong, et al., 2003).

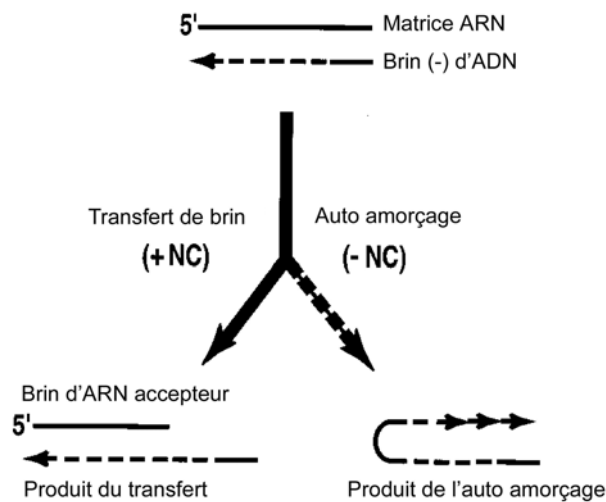


Figure 18 : Compétition entre le transfert de brin et l'auto-amorçage adaptée de (Guo, et al., 1997).

Donc, la NCp7 favorise la formation de l'hétérodimère ARN/ADN au dépend de l'homodimère ADN/ADN dû à l'auto-amorçage (Driscoll, et al., 2001; Driscoll, et al., 2000).

Avant le deuxième saut de brin a lieu le clivage d'une partie de l' $\text{ARN}_t^{\text{Lys},3}$ (jusqu'au méthyle A) par la RNase H. Cette partie représente la partie non appariée à la séquence PBS. Il restera après ce premier clivage que la partie de l' $\text{ARN}_t^{\text{Lys},3}$ complémentaire et appariée à la séquence PBS. Le brin restant ne pouvant pas être directement clivé, la NCp7 va favoriser la déstabilisation de l'hybride entre l'ADN « strong-stop » (+) et le fragment amorce de l' $\text{ARN}_t^{\text{Lys},3}$ restant après le premier clivage (Wu, et al., 1999). La séquence PBS(+) sera libéré de sa séquence complémentaire va se structurer en une tige-boucle stable (Johnson, et al., 2000). PBS doit donc être tout d'abord déstabilisé pour être ensuite hybridé à sa séquence complémentaire en 3' du brin (-) d'ADN (deuxième saut de brin). La protéine par son activité

chaperonne facilite la déstabilisation intramoléculaire ainsi que l'hybridation intermoléculaire de la séquence PBS (Egele, et al., 2004). A partir de là, la RT poursuit la synthèse de l'ADN (+) pour former le dimère d'ADN.

3) Travaux préliminaires effectués au sein du laboratoire

Les expériences ainsi que les conclusions décrites dans cette partie sont les travaux fondateurs de la thèse.

Tout d'abord, la séquence TAR ainsi que sa séquence complémentaire ADN cTAR ont une place centrale dans le premier saut de brin. La NCp7 par son activité chaperonne favorise le premier saut de brin (Guo, et al., 1997; Kim, et al., 1997). Les structures tridimensionnelles de la partie haute de TAR ainsi que celle de cette même partie liée à la protéine Tat ont été déterminées par RMN (Aboul-ela, et al., 1996; Puglisi, et al., 1992).

Des expériences en absorption UV au laboratoire nous ont montré que le recouvrement total de cTAR par NCp7 s'effectue pour un rapport de nucléotides par protéine de 5 à 7. Cette concentration saturante de NCp7 entraîne en moyenne la fusion d'environ 7 à 8 paires des bases par cTAR. Des mesures effectuées sur cTAR et sur un mutant cTARC12 (Figure 19) suggèrent que le peptide est capable de fondre la structure secondaire de cTAR sur l'ensemble de la tige. Dans le cas de TAR ARN, la NCp7 n'est capable de fondre qu'une seule paire de base en moyenne par oligonucléotide (Bernacchi, et al., 2002). Cette différence s'explique par la forte stabilité de la tige-boucle ARN par rapport à sa complémentaire ADN. La NCp7 adactyle (dépourvue de doigt de zinc) n'est pas capable de déstabiliser cTAR ce qui suggère que la déstabilisation moléculaire est induite par les deux doigts de zinc.

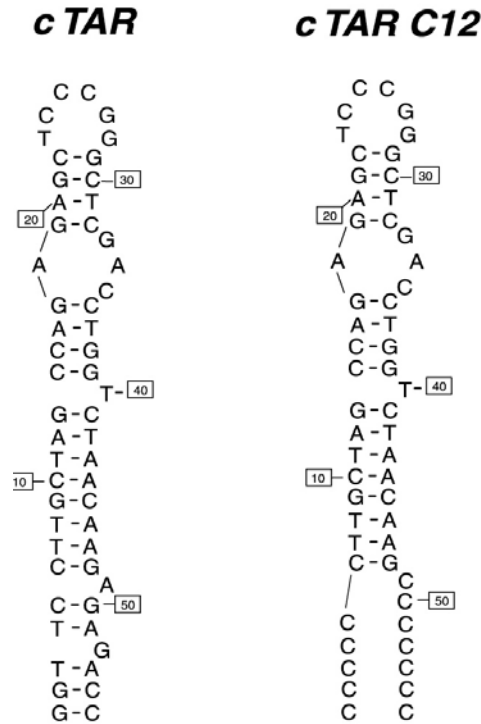


Figure 19 : Structure secondaire de cTAR et du mutant cTARC12 (Baudin, et al., 1993; Bernacchi, et al., 2002).

Par ailleurs, la spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire a montré que l'intensité de fluorescence des séquences cTAR doublement marquées à 20°C est fortement inhibée dû à la proximité spatiale des deux sondes aux extrémités. Par contre, sous l'effet de la température qui fond la structure secondaire, les sondes sont séparées et la fluorescence est restaurée. L'addition de la NCp7 induit également une augmentation significative de fluorescence, mais moindre que celle observée en température. De ce fait, la NCp7 est capable d'ouvrir partiellement la séquence cTAR. L'augmentation de fluorescence induite par la NCp7 est fortement dépendante de la concentration en peptide. Elle est maximale pour un rapport de 5 nucléotides par protéine. Dans ces conditions, l'augmentation est de 25% à 30% pour cTAR, mais elle est inférieure à 10% pour TAR (Bernacchi, et al., 2002), confirment que la tige-boucle ARN est plus difficile à ouvrir que la tige-boucle ADN.

Par l'utilisation en simultanée de la spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire et de la spectroscopie de fluorescence résolue en temps sur des séquences cTAR doublement marquées, il a été observé qu'en absence de protéine environ 80% de la séquence entière cTAR sont présentes dans un état « noir » (non fluorescent) où les sondes fluorescentes sont

très proches l'une de l'autre. Ces espèces représentent des séquences où l'extrémité de la tige est fermée. Les 20% restant se distribuent en trois espèces de durées de vie comprises entre 0,12 et 3,85ns, qui correspondent à des espèces où soit le segment terminal, soit les deux segments terminaux, soit l'oligonucléotide entier est ouvert (Ce modèle évoluera par la suite) (Figure 20). Ces dernières suggèrent un mécanisme de fraying c'est-à-dire une succession d'ouverture et de fermeture des extrémités 3' et 5' de la séquence cTAR. L'ajout de la protéine NCp7 fait baisser d'une façon considérable la proportion d'espèce noire mais ne change pas la valeur des durées de vie observées en l'absence de celle-ci. Ceci indique que la NCp7 déplace l'équilibre vers les formes ouvertes de cTAR sans générer de formes nouvelles (Figure 20) (Bernacchi, et al., 2002; Hong, et al., 2003).

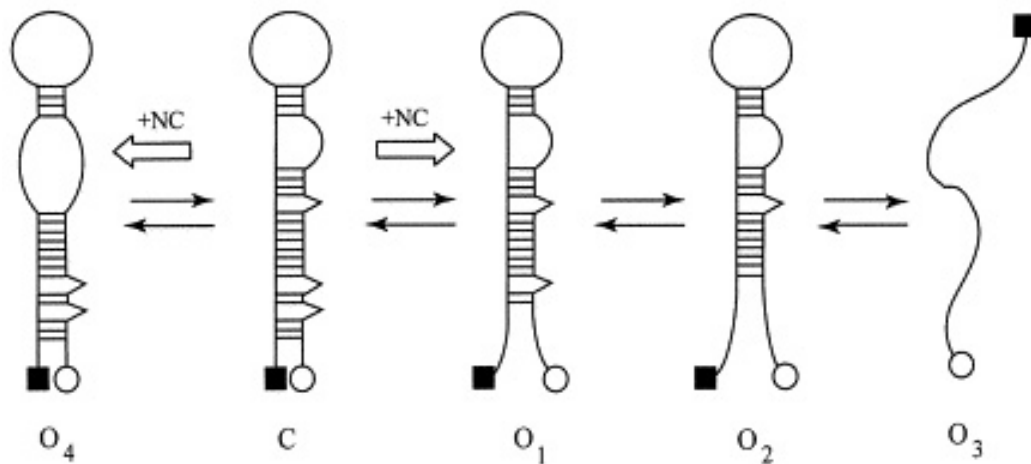


Figure 20 : Premier modèle proposé pour la fusion de cTAR par la NCp7 (Bernacchi, et al., 2002).

Des expériences faites en parallèle par spectroscopie à corrélation de fluorescence confortent cette hypothèse et précisent que la NCp7 est capable de favoriser le fraying par augmentation de la constante cinétique d'ouverture (Azoulay, et al., 2003).

II) Objectifs de la thèse

Dans le contexte actuel de lutte contre le sida, tout espoir en une nouvelle voie dans la thérapie antivirale serait la bienvenue. Or la protéine NCp7 par son faible taux de mutation, sa forte dépendance au zinc et son rôle important dans le cycle viral apparaît comme une cible potentielle intéressante qui permettrait le développement d'une thérapie contre le SIDA. Pour

cela deux voies s'offrent à nous : l'une est d'attaquer directement la protéine (Voir le chapitre I-B-5-h) et l'autre est d'inhiber la liaison entre la NCp7 et cTAR afin de supprimer le premier saut de brin. Pour ce faire, il faut connaître les interactions qui entrent en jeu dans cette liaison. C'est dans cette optique que se situe notre étude. En essayant d'expliquer plus particulièrement l'importance de la structure secondaire de cTAR et de la structure primaire de NCp7 dans le premier saut de brin, nous pourrions mieux comprendre le mécanisme de cette interaction ADN/Protéine.

Dans la suite des travaux effectués au sein de notre laboratoire qui ont permis de mettre en évidence une partie du mécanisme moléculaire intervenant lors du premier saut de brin, il est apparu indispensable d'étudier dans un premier temps l'importance de la structure secondaire de cTAR. Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'importance de la structure secondaire de la partie basse de la tige de cTAR et surtout des deux bulges terminaux. Elle a également permis de mettre en évidence l'importance de la boucle interne et de la boucle apicale dans le mécanisme moléculaire du premier saut de brin.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'importance de la structure primaire de la protéine NCp7. Notre étude a porté notamment sur le rôle des doigts de zinc, du linker et des chaînes terminales de la protéine dans le mécanisme de déstabilisation de cTAR.

Ces différentes études ont été menées à l'aide de différentes techniques comme la spectroscopie d'absorption, la spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire ainsi que résolue en temps et la spectroscopie à corrélation de fluorescence.

En parallèle, afin d'affiner notre étude, nous avons développé en collaboration avec l'équipe du Pr. A Burger une nouvelle sonde fluorescente. Ce fluorophore, la 8-vinyl-déoxyadénosine (8vdA), est un analogue de l'adénine et de ce fait une sonde intrinsèque à la séquence nucléotidique. Elle pourra être utilisée au même titre que la 2-aminopurine (2-AP).

Matériels et méthodes

I) Préparation des solutions mères de protéines

A) Mise en solution

Les différents mutants de la protéine NCp7 ainsi que la protéine native sont synthétisés en phase solide par les équipes du Pr B. Roques et du Dr D. Ficheux (De Rocquigny, et al., 1991).

Pour éviter l'oxydation des cystéines, les protéines sont stockées sous forme lyophilisée. Par la suite, elles sont dissoutes dans une solution de Tampon Hepes dégazé 50mM à pH=7.5. La solution ainsi obtenue étant sensible à l'oxydation, elle est transférée dans une cuve anaérobie. Cette dernière permet à la fois de mesurer l'absorbance de notre solution mais encore de la conserver le temps de la mesure sous atmosphère saturée en argon. L'absorbance à 280 nm nous permet de déterminer la concentration de notre peptide. Le coefficient d'extinction molaire de la protéine à 280nm (ϵ_{280nm}) dépend du nombre de tryptophane (Trp) ainsi que du nombre de tyrosine (Tyr) présents dans la séquence. Le coefficient d'extinction molaire peut être calculé par l'équation suivante :

$$\epsilon_{280nm} = n_{Trp} * 5700 + n_{Tyr} * 1300 \quad (1)$$

n_{Trp} : nombre de Tryptophane

n_{Tyr} : nombre de Tyrosine

5700 et 1300 étant respectivement le coefficient d'extinction molaire à 280 nm du Trp et de la Tyr .

B) Formation des doigts de zinc

Par la suite, on ajoute un excès de zinc égal à 1.2 fois la concentration en protéine par doigt de zinc, ce qui induira le repliement des doigts de zinc. Afin de vérifier que cette liaison a bien eu lieu, on compare la fluorescence de la protéine ayant liée le zinc (forme holo) à celle sans zinc (forme apo) où nous avons supprimé le zinc par addition d'un excès d'EDTA. Les rapports sont comparés à ceux publiés par (Mely, et al., 1996; Mely, et al., 1994). Ces solutions ainsi préparées sont stockées congelées à -20°C.

C) Fluorescence du tryptophane et utilisation dans le titrage indirect

1) Principes

La fluorescence du tryptophane est due au noyau indole constituant sa chaîne latérale (Figure 21).

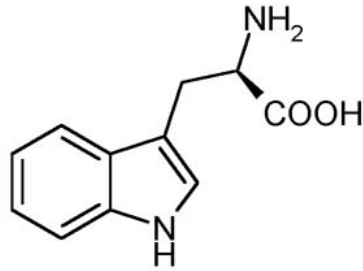


Figure 21 : Structure chimique du tryptophane

Le spectre d'absorption de l'indole dans l'UV proche présente une bande large et structurée, correspondant à deux transitions : ${}^1A \rightarrow {}^1L_a$ et ${}^1A \rightarrow {}^1L_b$ où 1L_a et 1L_b sont les deux états électroniques excités de plus basse énergie et 1A indique l'état singulet fondamental (Eftink, 1991; Valeur, et al., 1977). Le pic caractéristique à 280 nm est dû principalement à l'état 1L_b , alors que l'état 1L_a est le seul impliqué au-delà de 300 nm. Les deux états excités sont caractérisés par des énergies très proches, mais leurs dipôles de transition sont perpendiculaires (Callis, 1997; Valeur, et al., 1977). Les dipôles de transition sont schématisés dans la Figure 22.

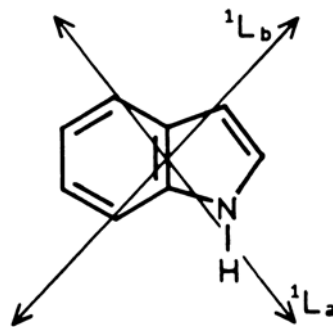


Figure 22 : Les deux dipôles de transitions électroniques du Trp (Lackowicz, 1999).

Dans une protéine, la photophysique du tryptophane est plus complexe. En premier lieu, le spectre d'absorption n'est plus dû uniquement aux résidus Trp ($\epsilon_{280} = 5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mais différents chromophores peuvent contribuer à l'absorbance des protéines entre 230 et 300 nm (Strickland, 1974; Wetlaufer, 1962). C'est le cas notamment des résidus tyrosine ($\epsilon_{274} = 1300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), histidine ($\epsilon_{244} = 3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), et phénylalanine ($\epsilon_{250} = 200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et des ponts disulfure ($\epsilon_{250} = 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Par ailleurs, à pH alcalin la tyrosine s'ionise en tyrosinate ($\text{pK}_a = 10.9$) et présente deux bandes d'absorption ($\epsilon_{240} = 11800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{295} = 2400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les processus non radiatifs provoquant la dépopulation de l'état excité du résidu tryptophane dans les protéines sont analogues à ceux identifiés pour le tryptophane en solution. Cependant, leur efficacité dans la matrice protéique est modifiée selon l'environnement local du fluorophore.

Les titrages au cours desquels des concentrations croissantes d'acides nucléiques sont ajoutées à une concentration fixe de peptide sont appelés titrages indirects. La solution tampon pour ce type d'expérience est composée de 25 mM Tris, 30 mM NaCl et 0.2 mM MgCl_2 . Le pH de la solution est ajusté à 7.5 à 20°C.

Après introduction du tampon dans un tube *low binding* (faible rétention de surface), un aliquot de la protéine de la solution stock est ajouté pour obtenir une concentration d'environ 1.5 μM . La concentration de la protéine ainsi que la présence d'éventuels contaminants absorbant dans le domaine de longueur d'onde utilisé sont vérifiées par l'enregistrement d'un spectre d'absorption entre 230 et 400 nm. Par la suite le spectre d'émission de la protéine est enregistré entre 300-500 nm. Bien que le maximum d'absorption des peptides se situe à 280 nm, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm afin d'exciter de manière sélective les résidus tryptophane et de diminuer, lors du titrage, l'effet d'écran provoqué par l'absorption des acides nucléiques. Chaque ajout d'acide nucléique est réalisé dans la cuve en quartz directement.

2) Mesures et corrections

Après chaque formation de complexe protéine-acide nucléique, on mesure un spectre d'absorption de 230 à 400 nm.

On corrigera l'intensité de fluorescence par différents facteurs :

a) Correction de l'effet d'écran

Cette correction permet de tenir compte de la lumière absorbée sur le trajet du faisceau d'excitation par des molécules qui absorbent à la longueur d'onde d'excitation ainsi que de la lumière absorbée sur le trajet du faisceau d'émission par des molécules qui absorbent à la longueur d'onde d'émission (Pigault, et al., 1984)

$$f = \frac{(A_p + A_s + A_r / 2)(1 - 10^{-A_p})}{A_p (1 - 10^{-(A_p + A_s + A_r / 2)})} \quad (2)$$

où A_p et A_s sont respectivement les absorbances de la protéine et des molécules écrans à la longueur d'onde d'excitation et A_r est l'absorbance des molécules écrans qui absorbent à la longueur d'onde d'émission.

b) Correction de la fluorescence du tampon

L'intensité de fluorescence mesurée est également corrigée de la fluorescence résiduelle I_{tp} de la solution tampon.

Pour analyser les courbes de titration, nous avons utilisé le modèle de Scatchard : liaison protéine / ADN à n sites équivalents. On peut représenter la liaison par :



K est la constante d'affinité de la réaction. Dans la mesure où les concentrations de protéine libre et liée sont mesurables, on pourra définir un nombre moyen de protéines liées par oligonucléotide :

$$\nu = \frac{[\text{protéine / ADN}]}{[\text{ADN}]_t} \quad (4)$$

de plus $[\text{protéine}]_t = [\text{protéine}] + [\text{protéine / ADN}]$

On en déduit que :

$$v = \frac{nK[\text{protéine}]}{1 + K[\text{protéine}]} \quad (5)$$

n étant le nombre de site de liaison de la protéine. Au cours d'un titrage de fluorescence, les concentrations en protéine libre et en protéine liée sont reliées à l'intensité de fluorescence mesurée, I_f , suivant l'équation :

$$I_f = I_0 \frac{[\text{protéine}]_f}{[\text{protéine}]_t} + I_p \frac{[\text{protéine / ADN}]_f}{[\text{protéine}]_t} \quad (6)$$

où I_p est l'intensité de fluorescence du plateau lorsque la protéine est entièrement liée à l'oligonucléotide et I_0 est l'intensité de la protéine non liée à l'oligonucléotide. En se servant des équations (5) et (6), on obtient :

$$I_f = I_0 - \frac{(I_0 - I_p)}{[\text{protéine}]_f} \times \frac{(1 + K([\text{protéine}]_f + n[\text{ADN}]_f)) - \sqrt{(1 + K([\text{protéine}]_f + n[\text{ADN}]_f))^2 - 4nK^2[\text{protéine}]_f[\text{ADN}]_f}}{2K} \quad (7)$$

On ajuste les points expérimentaux à ce modèle pour déduire K .

II) Préparations des solutions mères d'oligonucléotide

A) Oligonucléotides doublement marqués

Dans le but de déterminer un mécanisme moléculaire de la déstabilisation de cTAR par NCp7, nous avons utilisé différents marquages situés aux extrémités des tige-boucles. Les deux chromophores sont fixés par l'intermédiaire d'un bras espaceur à chaque extrémité de la tige-boucle (Li, et al., 2000a; Li, et al., 2000b; Li, et al., 2000c; Sokol, et al., 1998; Tyagi, et al., 1996). Dans le premier couple de chromophore, nous avons une 5/6-carboxyrhodamine (Rh6G) à l'extrémité 5' et l'acide 4-(4'-diméthylaminophenylazo) benzoïque (DABCYL) à l'extrémité 3' de la tige-boucle. La Rh6G est un fluorophore alors que le DABCYL est un inhibiteur de fluorescence adapté à la Rh6G. Dans le deuxième couple de chromophore, on

oppose une 5/6-carboxytertraméthylrhodamine (TMR) en 5' à une 5/6-carboxyfluorescéine (Fl) en 3'. A l'état fermé, les deux chromophores sont en contact étroit.

Dans ce cas, il y a de fortes modifications du spectre d'absorption par rapport au spectre du mélange équimolaire des espèces simplement marquées. Ces modifications sont compatibles avec la théorie de l'exciton (Kasha, 1991). Ces modifications sont également associée à une forte inhibition de l'émission de fluorescence par rapport à l'intensité de fluorescence du mélange équimolaire des espèces simplement marquées (Bernacchi, et al., 2001). Ces derniers indiquent la formation d'un hétérodimère intramoléculaire entre les deux sondes (Bernacchi, et al., 2001) qui permet un couplage fort entre les dipôles de transition des chromophores. L'hétérodimère est de type H, c'est-à-dire que les moments dipolaires sont parallèles entre eux et perpendiculaires à l'axe qui rejoint les deux chromophores. L'énergie U du couplage fort entre moments dipolaires est fortement dépendante de la distance entre les deux chromophores ainsi que de leur orientation respective.

On définit l'énergie U par l'équation :

$$U = \frac{\mu_A \mu_B}{4\pi\epsilon_0 n^2 R^3} \kappa \quad (8)$$

où

R est la distance entre les moments dipolaires de transition

ϵ_0 est la permittivité dans le vide

n est l'indice de réfraction du milieu (pour l'eau : 1.33)

μ_x est l'intensité du moment dipolaire x

κ est un facteur d'orientation défini par l'équation :

$$\kappa = \cos \theta_{AB} - 3 \cos \theta_{AR} \cos \theta_{BR} \quad (9)$$

où

θ_{AB} est l'angle entre les deux moments dipolaires A et B

θ_{AR} et θ_{BR} sont les angles respectivement entre le moment dipolaire A et le vecteur distance R et entre le moment dipolaire B et le vecteur distance R .

Dans notre cas (hétérodimère de type H) $\kappa=1$

Le couplage entre les chromophores induit un décalage spectral, $\Delta\lambda$, dans les spectres d'absorption. Ce décalage est relié à l'énergie U par $U = hc/\Delta\lambda$, où h est la constante de Planck et c la vitesse de la lumière. L'énergie U est fortement dépendante de la distance entre les chromophores, l'absorbance de l'hétérodimère peut être utilisé comme un outil pour suivre des modifications à très courte distance (moins de 15 Å).

Dans ce cas où nous dépassons cette distance, nous avons un transfert non radiatif du donneur vers l'accepteur (FRET) (Forster, 1949). Ce transfert est du à un couplage dipôle-dipôle de type faible sans émission de photon. Il est adapté pour des distances interchromophores R de 15 à 100 Å. C'est en 1949 que Förster a déterminé la vitesse du transfert k_T définie par l'équation suivante :

$$k_T = 8.71 \times 10^{23} \frac{\kappa^2 \phi_D}{R^6 \tau_D} n^{-4} J_{AD} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (10)$$

Φ_D et τ_D représentent respectivement le rendement quantique et la durée de vie du donneur. n représente l'indice de réfraction du milieu et κ^2 représente un facteur géométrique caractérisant l'orientation des moments dipolaires des deux chromophores. Du à la difficulté de déterminer ce facteur pour des chromophores en solution nous avons supposé qu'il est égal à $2/3$. Dans ce cas, le donneur et l'accepteur sont libres de prendre toutes les orientations possibles durant la durée de vie de l'état excité du donneur. J_{AD} représente l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Il peut être défini par :

$$J_{AD} = \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (11)$$

où $\varepsilon_A(\lambda)$ représente l'absorption molaire de l'accepteur. $f_D(\lambda)$ représente l'intensité de fluorescence du donneur.

R_0 est appelé distance critique de Förster. Elle peut être calculée par l'équation suivante :

$$R_0 = (8.79 \times 10^{23} n^{-4} \phi_D \kappa^2 J_{AD})^{\frac{1}{6}} \quad (12)$$

R_0 est respectivement de 20 et 60 Å pour les couples Rh6G/DABCYL et FI/TMR (Bernacchi, et al., 2002).

Par la suite, on peut définir l'efficacité du transfert E par l'équation :

$$E = \frac{k_T}{k_T + \frac{1}{\tau_D}} \quad (13)$$

En se servant des équations (11) et (13), on obtient :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (14)$$

Ceci redéfinit R_0 comme étant la distance pour laquelle nous avons la moitié de l'efficacité de transfert de nos couples de chromophores.

En pratique, E est proportionnelle au rapport de l'intensité de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur (F_{DA}) à l'intensité de fluorescence du donneur en l'absence de l'accepteur (F_D), soit :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (15)$$

On peut appliquer cette relation aux durées de vie :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (16)$$

Après avoir déterminé E , on pourra en se servant de l'équation (14) et connaissant R_0 déterminer la distance interchromophore R . Ces distances nous ont permis d'attribuer, pour les expériences de fluorescence résolue en temps, une conformation pour chaque durée de vie mesurée pour cTAR.

B) Mise en solution

Les séquences ont été synthétisées par IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Allemagne). Pour la synthèse et le marquage des oligonucléotides, un support spécial est utilisé pour l'extrémité 3' où le chromophore est déjà lié de façon covalente au premier acide nucléique de la synthèse. Pour l'extrémité 5', le chromophore sera ajouté en fin de synthèse. Ces chromophores sont reliés aux acides nucléiques par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

Les oligonucléotides sont délivrés sous forme lyophilisée. Ils sont dilués dans l'eau Milli-Q afin d'obtenir des solutions stocks de concentration proche de 50µM et conservés à -20°C. Dans la majeure partie des expériences effectuées lors de cette thèse, les oligonucléotides sont dilués dans un tampon Tris 25mM à pH 7.5, 30mM NaCl et 0.2mM MgCl₂. Il a été montré par (Lapadat-Tapolsky, et al., 1995) que ces conditions salines sont adéquates pour l'étude de la déstabilisation de cTAR par NCp7.

III) Mesures spectroscopiques à l'état stationnaire

A) Spectroscopie d'absorption UV-Visible

1) Principe et appareillage

Nous avons mesuré les spectres d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 400 (Varian) à double faisceau avec une bande passante de 2 nm. La mesure de la ligne de base s'effectue en comparant la cuve référence à la cuve de mesure ne contenant que du tampon. Dans certains cas, l'absorbance mesurée est corrigée par l'absorbance due à la diffusion de la lumière selon l'équation (Shih, et al., 1972) :

$$\log DO_d(\lambda) = A \log \lambda + B \quad (17)$$

où $DO_d(\lambda)$ représente l'absorbance due à la diffusion de la lumière à la longueur d'onde λ . A et B sont déduits de la courbe où seul le phénomène de diffusion est présent et

ceci par ajustement de l'équation (17) avec les points expérimentaux. La correction se fait par :

$$DO_{corr.}(\lambda) = DO_{mes}(\lambda) - DO_d(\lambda) \quad (18)$$

2) Mesure et analyse des courbes de fusion

En dehors des mesures de concentration, la spectroscopie d'absorption nous a permis de déterminer les caractéristiques thermodynamiques de cTAR et de ses différents mutants. Par suivi de l'absorbance en fonction de la température nous avons pu déduire les courbes de fusion de la séquence nucléotidique étudiée. Dans le cas des séquences cTAR marquées (c.f. II), l'absorbance UV-Visible présente deux bandes exploitables. La première est la bande dans l'UV due à l'absorption des bases nucléotidiques. La deuxième dépend du marquage et est due à l'absorption des sondes se trouvant aux extrémités des séquences tige-boucles. Dans le cas des courbes de fusion, ces bandes peuvent nous apporter des informations sur les caractéristiques thermodynamiques.

Pour la bande UV et plus précisément l'absorbance à 260 nm, les propriétés thermodynamiques peuvent être attribuées à l'ensemble de la séquence. En effet, l'absorbance de l'oligonucléotide est une somme de l'absorbance de chaque nucléotide plus l'effet dû à leurs interactions. La dépendance conformationnelle de l'absorbance permet de savoir si l'oligonucléotide se trouve être en simple brin ou double brin (Bloomfield, et al., 2000). Dans un oligonucléotide en double brin, le dipôle de transition d'une base induit un dipôle opposé sur la base voisine. Il en résulte sur cette dernière, un dipôle moindre que dans le cas d'un oligonucléotide simple brin où l'empilement est moindre. Comme le coefficient d'extinction molaire est proportionnel au carré du dipôle de transition, l'absorbance est donc plus petite dans le cas de bases appariées que dans le cas de bases désappariées. L'hypochromisme h_0 résultant est directement proportionnel au nombre de paires de bases dans l'oligonucléotide. Pour analyser, les courbes de fusion nous avons utilisé un modèle à deux états (tige-boucle en simple brin contre tige-boucle en double brin). Nous avons ajusté les points expérimentaux par l'équation suivante :

$$A(T) = \frac{A_{\min}(T) + A_{\max}(T) \times \exp\left(\frac{-\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_f}\right)\right)}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_f}\right)\right)} \quad (19)$$

$$\text{avec } A_{\min}(T) = A_{\min}^0 + T \times A_{\min}^1$$

$$A_{\max}(T) = A_{\max}^0 + T \times A_{\max}^1$$

où A_{\min} et A_{\max} représente respectivement l'absorbance pré-transitionnelle et post-transitionnelle (LeBlanc, et al., 1991; Vallone, et al., 1999). T_f représente la température de fusion de l'oligonucléotide. ΔH^0 est l'enthalpie de fusion de notre séquence et R la constante des gaz parfaits.

$$\Delta G_T^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (20)$$

À $T=T_f$, le système est à l'équilibre c'est-à-dire qu'il y a la moitié des espèces qui sont en simple brin et l'autre moitié en double brin. Dans ce cas, l'énergie libre $\Delta G_{T_f}^0$ est nulle et en remplaçant dans l'équation (20), nous pouvons déduire l'entropie ΔS^0 par l'équation suivante:

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0}{T_f} \quad (21)$$

Après avoir déterminé l'enthalpie ΔH^0 et l'entropie ΔS^0 , on pourra en remplaçant dans l'équation (20) déterminer l'énergie libre à la température T, ΔG_T^0 . En fait, ΔH^0 et ΔS^0 déterminées dans des expériences de fusion en température de l'ADN dépendent fortement de la variation de capacité calorifique ΔC_p . Il a été montré que ΔC_p dépend fortement de la structure secondaire de la séquence étudiée qui varie considérablement durant les expériences de fusion de l'ADN (Rouzina, et al., 1999a; Rouzina, et al., 1999b). Par conséquent, les valeurs ΔH^0 et ΔS^0 ne pourront pas être exploitées pour caractériser la fusion de l'ADN. Par

contre, le ΔG_T^0 est exploitable car les effets de ΔC_p sur l'enthalpie et sur l'entropie se compensent.

D'une manière similaire, on peut suivre l'absorbance dans la bande visible et ajuster les points expérimentaux avec l'équation (19). Dans ce cas par la formation de l'hétérodimère nous sommes limités aux courtes distances. Ceci nous permettra de suivre plus précisément la fusion des paires de bases terminales.

B) Spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire

Les mesures de fluorescence à l'état stationnaire ont été effectuées avec les spectrofluorimètres SLM 48000S (Aminco), FluoroMax-3 (Jobin Yvon) et Fluorolog (Jobin Yvon), tous trois équipés d'un porte-cuve thermostaté.

La source d'excitation du SLM 48000S est une lampe à xénon de puissance 450W. La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée par un monochromateur simple réseau à deux fentes réglables. La fluorescence des solutions contenues dans des cuves en quartz est détectée à 90° au niveau du centre de la cuve. Un monochromateur d'émission à fentes réglables permet de sélectionner la longueur d'onde d'émission. L'instabilité du faisceau d'excitation due aux fluctuations de la lampe est corrigée à l'aide d'un compteur quantique. Celui-ci est constitué d'une solution de rhodamine B concentrée dans de l'éthylène glycol (3 g/l). Son rendement quantique et son maximum d'émission (630 nm) sont indépendants de la longueur d'onde d'excitation dans l'intervalle 220-600 nm, et de ce fait, le signal émis est simplement proportionnel aux flux de photons de la lumière incidente d'excitation. L'intensité, $I_{\text{référence}}$ émise par la rhodamine passe au travers d'un filtre passe haut (≥ 630 nm) puis est mesurée par un photomultiplicateur. En mesurant la fluorescence sous forme d'un rapport $I_{\text{échantillon}}/I_{\text{référence}}$, les mesures sont rendues indépendantes des variations de l'intensité d'excitation au cours du temps. Les réponses du monochromateur et du photomultiplicateur à l'émission en fonction de la longueur d'onde sont corrigées par des facteurs déterminés par le constructeur. La largeur des fentes d'entrée et de sortie de chaque monochromateur ainsi que l'amplification du signal d'émission sont réglées afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

Le FluoroMax-3 et le Fluorolog sont des appareils à comptage de photons de domaine de réponse linéaire (< 3 Mcps). La correction de l'instabilité du faisceau d'excitation est faite

à l'aide d'une photodiode calibrée. Ces appareils sont plus rapides et plus sensibles que le SLM 48000S ce qui permet de travailler avec des fentes plus étroites. Pour ces deux appareils, il n'y a pas de réglage possible de l'amplification du signal d'émission.

Afin d'optimiser la mesure du signal de fluorescence, un certain nombre de précautions ont été prises lors de la préparation de l'échantillon. Des travaux précédents (Vuilleumier, et al., 1997) ont permis de déterminer les caractéristiques de l'adsorption de NCp7 sur les parois de la cuve. Afin de réduire celle-ci, les peptides sont mis en solution et transvasés dans des cuves en quartz à l'aide de tubes Eppendorf et de pointes possédant une faible rétention (*Low Binding*). En effet, l'adsorption constitue une limitation majeure pour les études de la protéine à des concentrations inférieures au micromolaire.

IV) Mesures spectroscopiques résolues en temps

Les deux techniques principales de mesure du déclin de fluorescence d'un échantillon sont la technique de phase et de modulation (Gratton, et al., 1983; Lakowicz, et al., 1985), et la technique impulsionnelle selon la méthode du comptage de photon unique (Badea, et al., 1971; Ware, 1971). Dans la première technique, l'échantillon est excité à l'aide d'un faisceau de lumière continue dont l'intensité est modulée sinusoïdalement en fonction du temps. Cette méthode n'a pas été utilisée lors de cette étude. Dans le deuxième cas, l'échantillon est excité avec une source de lumière pulsée et le temps durant lequel la molécule est à l'état excité est mesuré directement. Les deux méthodes permettent des mesures dans des échelles de temps de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde, selon les sources et les détecteurs employés.

A) Principes

La technique du photoélectron unique (PEU) consiste à exciter le fluorophore dans des conditions où l'on ne détecte qu'un seul photon de fluorescence (moins de 5 photons de fluorescence détectés pour 100 impulsions d'excitation). L'intervalle de temps mesuré entre l'impulsion initiale et la détection du photon correspond au temps passé par une molécule à l'état excité.

La source d'excitation est constituée par un laser à saphir dopé au titane $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ (Tsunami Spectra Physics) à modes bloqués (Figure 23). La cavité du laser est purgée à l'azote de manière à éviter l'absorption due à la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère et

assurer ainsi un bon gain. Le pompage est assuré par un laser continu solide Nd :YO₄ modèle Millennia X (Spectra-Physics) émettant à 532 nm avec une puissance de sortie de 7 à 9 W. Le laser Ti:Saphir émet dans un intervalle de longueur d'onde allant de 720 à 1080 nm, en délivrant des impulsions de largeur temporelle de 1 ps. La fréquence de répétition naturelle du laser est de 82 MHz. Cette fréquence est par la suite ramenée à 4 MHz à l'aide d'un sélecteur d'impulsions (*pulse picker*) combinant un modèle 3980 et 3985 (Spectra Physics). A la sortie de ce sélecteur, un système de cristaux non linéaires en accord de phase angulaire (GST) permet de multiplier la fréquence optique du faisceau laser. En effet, le faisceau de sortie est focalisé dans un premier temps sur un cristal LBO (lithium borate) permettant la génération du second harmonique, $\lambda/2$. Par la suite, après un passage par une ligne de retard optique, les faisceaux fondamental et doublé subissent une deuxième focalisation sur un cristal BBO (β baryum borate) permettant la génération du troisième harmonique, $\lambda/3$. Ce faisceau est prélevé pour être dirigé vers un moniteur de puissance UV. De même une partie de faisceau de longueur d'onde $\lambda/2$ est envoyée vers une photodiode rapide Hamamatsu de type S5533 (PhD) connectée à une voie du discriminateur rapide Tennelec TC 454; ceci génère le signal de départ (*Start*) au convertisseur temps-amplitude TAC, modèle 566 (ORTEC). Une fois le signal *Start* reçu, le TAC commence à charger un condensateur avec un courant constant.

Pour l'ensemble de nos mesures, la partie restante du faisceau de longueur d'onde $\lambda/2$ (qui correspond à une longueur d'onde d'excitation de l'ordre de 480 nm) a servi de faisceau d'excitation de l'échantillon. Afin de travailler en condition de détection de photon unique, l'intensité du faisceau d'excitation est diminuée grâce à un atténuateur variable placé devant l'échantillon (E). Les photons de fluorescence émis par l'échantillon sont détectés dans une direction perpendiculaire à l'excitation par un photomultiplicateur à galette de micro canaux Hamamatsu R3809U (*microchannel plate*, PMG) couplé à un préamplificateur Phillips 6954 (A) de bande passante 2.2 GHz. Le gain du photomultiplicateur est tel qu'un seul photon génère une impulsion électrique d'anode mesurable (repère temporel). Les longueurs d'onde d'émission sont sélectionnées par un monochromateur Jobin-Yvon H10 dont la bande passante est généralement réglée entre 8 et 16 nm. A l'entrée du photomultiplicateur, un filtre passe haut (≥ 495 nm) Schott OG495 (F) est monté afin d'éliminer les photons d'excitation diffusés résiduels. Un polariseur (P) réglé à l'«angle magique» 54.7° permet de rendre le signal de fluorescence indépendant des mouvements de rotation des molécules excitées.

L'impulsion d'anode du photomultiplicateur due au premier photon de fluorescence est utilisée comme signal *Stop* par le convertisseur temps-amplitude, ce qui provoque l'arrêt du chargement du condensateur. La charge accumulée dans le TAC est proportionnelle à l'intervalle du temps entre les impulsions du démarrage (*Start*) et celui d'arrêt (*Stop*). Cette charge est alors convertie en une tension comprise entre 0 et 10 V selon la pente de conversion. L'amplitude de cette impulsion est analysée dans un analyseur multicanaux (MCA) Ortec 921 et le contenu du canal correspondant est incrémenté d'une unité. Nous utilisons 2048 canaux pour l'analyse de l'amplitude, ce qui, combiné à l'échelle de temps de 50 ns du TAC, donne une linéarité de 25.5 ps par canal. Cette valeur est déterminée par des retards calibrés sur les signaux *Start* et *Stop*. L'analyseur multicanaux est piloté par un ordinateur à l'aide d'une interface électronique gérée par le logiciel MAESTRO (Ortec).

Afin de reconstruire l'histogramme de la probabilité d'émission de fluorescence, il est nécessaire de répéter un grand nombre de fois la même mesure avec une grande vitesse de répétition. L'acquisition est généralement effectuée en régime de pré-comptage où le nombre total de photons à accumuler est fixé (typiquement 500000 événements).

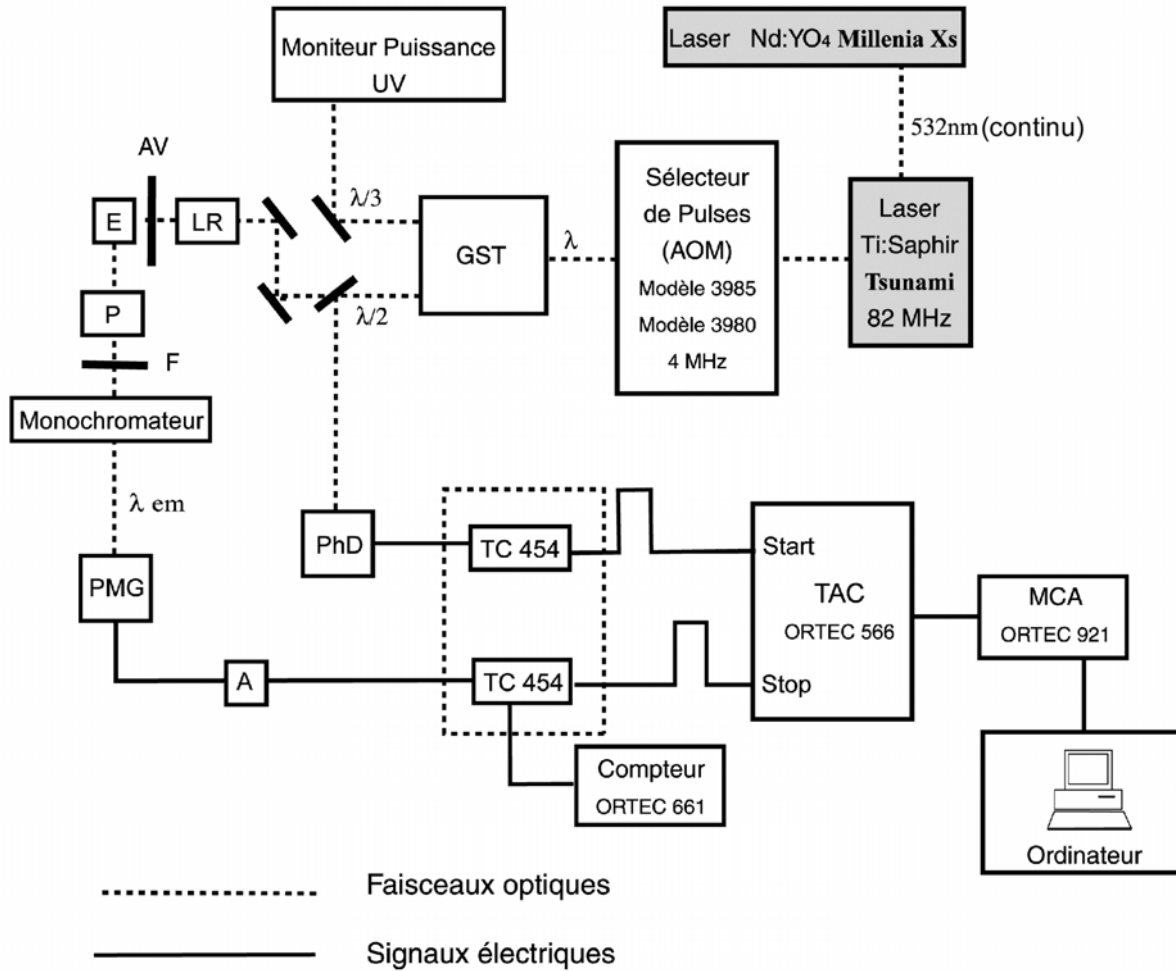


Figure 23 Schéma du dispositif de mesure de fluorescence résolue en temps selon la méthode du comptage du photon unique. **GST**: Générateur de seconde et triple harmonique, **LR**: lame rotatoire, **AV** : Atténuateur variable **P**: polariseur, **PhD**: Photodiode rapide, **E**: Echantillon, **F**: filtre, **PMG**: Photomultiplicateur à galettes de microcanaux Hamamatsu, **A**: préamplificateur d'impulsions Phillips, **TC 454**: Discriminateurs rapides (Tennelec), **TAC**: convertisseur temps-amplitude (Ortec), **MCA**: Analyseur multicanaux (Ortec).

La fonction de réponse instrumentale $E(t)$ est constituée par le produit de convolution (noté $*$) de la forme temporelle de l'impulsion lumineuse incidente $N(t)$ et de la réponse de l'instrument $H(t)$ (Wahl, 1975) :

$$E(t) = N(t) * H(t) = \int_0^t N(t')H(t-t')dt' \quad (22)$$

La fonction $N(t)$ dépend des propriétés et du mode de fonctionnement de la source lumineuse. Elle est négligeable dans notre cas étant donné que l'impulsion temporelle est de 1 ps. Quant à la fonction $H(t)$, elle dépend essentiellement des modules électroniques (Wahl, 1975). Dans notre configuration il est important d'observer que la contribution majeure est apportée par le tube photomultiplicateur à galettes de microcanaux (Hamamatsu R3809), caractérisé par une dispersion du temps de transit des photoélectrons entre la photocathode et l'anode, typiquement de 30 ps.

Pour évaluer $E(t)$, on enregistre la réponse instrumentale à la longueur d'onde d'excitation avec un réflecteur d'aluminium poli. La largeur à mi-hauteur du maximum (FWHM en anglais) de la fonction de réponse mesurée avec notre appareil est inférieure à 50 ps.

Les paramètres optiques que nous avons utilisés pour l'ensemble des mesures effectuées avec cet appareillage sont résumés ici:

- longueur d'excitation: 480 nm,
- longueur d'onde d'émission : 525 nm pour la Fl, et 550 nm pour la Rh6G
- taux de répétition des impulsions d'excitation : 4 MHz,
- linéarité temporelle: 25.5 ps pour une acquisition dans 2048 canaux,
- nombre total de coups par déclin : 5×10^5 ,
- taux de comptage maximum : 6 kHz (de manière à satisfaire pleinement la condition de photoélectron unique),
- fentes du photomultiplicateur d'émission : 8 à 16 nm,
- pour chaque échantillon, trois fichiers sont enregistrés.

B) Méthodes d'analyse des données

Le déclin de fluorescence mesuré $I(t)$ est le produit de convolution de la loi théorique d'émission de fluorescence de l'échantillon $i(t)$ et de la fonction de réponse instrumentale effective $E(t)$:

$$I(t) = E(t) * i(t) \quad (23)$$

Plusieurs méthodes d'analyse des déclin de fluorescence existent. Parmi les plus répandues on compte la méthode de reconvolution itérative (Grinvald, et al., 1974), la méthode de reconvolution itérative à statistique de Poisson composé (Lami, et al., 1992; Vix, et al., 1995), la méthode d'analyse globale (Eisenfeld, et al., 1979; Janssens, et al., 1990), la méthode de transfert d'énergie (Bajzer, et al., 1993) et la méthode de maximisation de l'entropie (**MEM**) (Livesey, et al., 1987) que nous avons utilisé au cours de ce travail.

L'avantage de la dernière méthode réside dans sa démarche sans *a priori* qui diffère des autres méthodes utilisant la statistique des moindres carrés, pour lesquelles les résultats peuvent dépendre du choix des conditions initiales.

Dans l'analyse effectuée par MEM, on suppose que la loi de la fluorescence correspond à la relation :

$$I(t) = \int_0^{\infty} \alpha(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (24)$$

où $\alpha(\tau)$ correspond à la distribution des durées de vie de fluorescence. Le but de cette méthode repose sur la recherche de $\alpha(\tau)$ à partir du déclin expérimental $I(t)$ (équation (24)). En pratique, on suppose au départ que la distribution $\alpha(\tau)$ est constituée par une fonction $m(\tau)$ de 200 valeurs discrètes τ_j régulièrement espacées sur une échelle logarithmique dans un intervalle de temps donné (par exemple 0.01-10 ns). Le degré de structure de la distribution $\alpha(\tau)$ est défini par la fonction d'entropie de Skilling-Jaynes (Jaynes, 1983):

$$S(\alpha(\tau)) = \int_0^{\infty} [\alpha(\tau) - m(\tau) - \alpha(\tau) \log[\alpha(\tau)/m(\tau)]] d\tau \quad (25)$$

A partir des hypothèses initiales ($\alpha(\tau) = m(\tau) = \text{constante}$, $S = 0$), la distribution est progressivement structurée en maximisant la fonction $S(\alpha(\tau))$.

De manière simultanée, un ajustement est réalisé selon le test statistique du χ^2_r selon :

$$\chi^2_r = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \frac{(i(t_n) - I(t_n))^2}{\sigma_n^2} \quad (26)$$

où σ_n^2 est la variance du $n^{\text{ième}}$ canal de la courbe du déclin de fluorescence estimé selon une statistique de Poisson et N est le nombre de canaux. L'analyse du déclin de fluorescence est considérée satisfaisante quand la valeur de χ^2_r tend vers 1. Par ailleurs, la répartition aléatoire des résidus d'ajustement ainsi que l'auto-corrélation des résidus centrés sur zéro, représentent un contrôle additionnel pour valider la qualité de la mesure (O'Connor, et al., 1984).

V) Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

Le principe de la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy) est basé sur l'analyse des fluctuations temporelles (Figure 24B) de l'intensité de fluorescence mesurée dans un volume focal fini (Figure 24A). La durée et l'amplitude de ces fluctuations sont quantifiées par l'application d'un traitement mathématique nommé autocorrélation $G(\tau)$.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (27)$$

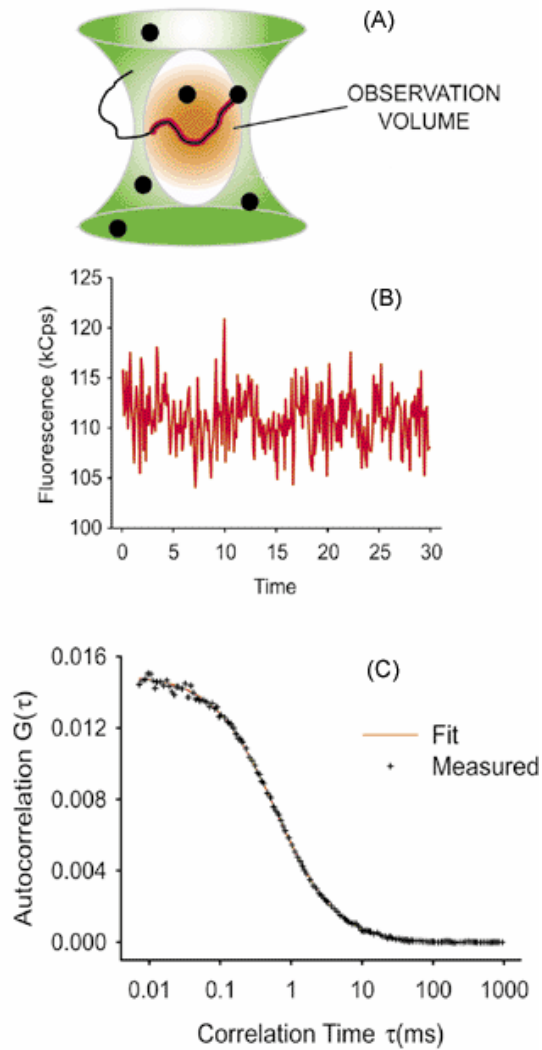


Figure 24 : (A) Schéma du volume focal d'observation (B) Enregistrement des fluctuations de fluorescence (C) Courbe d'autocorrélation.

L'origine principale des fluctuations est due aux mouvements browniens de diffusion des particules entrant et sortant du volume d'observation. Ces fluctuations sont aussi corrélées à tout processus réactif (changements conformationnels, réactions chimiques ou photophysiques) susceptible de jouer sur l'intensité de fluorescence pendant la durée de traversée des molécules dans le volume de mesure. Dans notre cas, ces changements conformationnels sont dus au « fraying » des extrémités de cTAR qui génère un mécanisme rapide d'ouverture et de fermeture des extrémités de cTAR.

La génération du volume de mesure est obtenue à l'aide d'une excitation biphotonique. Celle-ci est réalisée par focalisation d'un faisceau laser impulsif femtoseconde produit par un laser pulsé Titane Sapphire (Tsunami, Spectra-Physics). La focalisation du faisceau au niveau de l'échantillon est assurée par un objectif Olympus 60x monté sur un microscope inversé Olympus IX70. Le signal de fluorescence est collecté au travers de ce même objectif puis dirigé vers l'entrée d'une photodiode à avalanche couplée à un corrélateur ALV-5000E (ALV, Allemagne) permettant le calcul en temps réel des courbes de corrélation.

La calibration du système est effectuée à l'aide d'une solution de 5 carboxytétraméthylrhodamine (TMR) à 50 nM afin de déterminer les dimensions du volume focal. Celui-ci est de l'ordre de 0,25 fL (Clamme, et al., 2003).

Les fluctuations de fluorescence sont analysées par une fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ (Figure 24C) qui est ajustée par l'équation (28). Ce modèle tient compte de la diffusion en 3 dimensions dans le volume observé et de l'état triplet, état non fluorescent, dans lequel peut passer la molécule après avoir été excitée (Azoulay, et al., 2003; Hess, et al., 2002).

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{da}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_{da}}\right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 + \left(\frac{f_t}{1-f_t}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right)\right) \quad (28)$$

Cette analyse permet d'extraire plusieurs paramètres :

N = nombre moyen apparent de molécules fluorescentes dans le volume focal

τ_{da} = temps de diffusion apparent

S = rapport entre le grand et le petit axe du volume d'excitation

f_t = fraction de fluorophores dans l'état triplet

τ_t = temps de l'état triplet

Pour déterminer le temps de réaction de fraying τ_r de la séquence on peut réécrire l'équation (28) sous la forme (Hess, et al., 2002):

$$G(\tau) = G_D(\tau) \times \left(1 + \left(\frac{f_t}{1-f_t-f_c}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right) + \left(\frac{f_c}{1-f_c-f_t}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right)\right) \quad (29)$$

$G_D(\tau)$ est la fonction d'autocorrélation résultant de la diffusion des molécules fluorescentes à travers le volume focal et f_c représente la fraction des molécules sous la forme fermée. En utilisant, cTAR simplement marqué, l'unique source de fluctuation de fluorescence pour cette molécule est la diffusion à travers le volume focal. Si $G_{SM}(\tau)$ et $G_{DM}(\tau)$ représentent respectivement la fonction d'autocorrélation de la séquence simplement marquée et la fonction d'autocorrélation de la séquence doublement marquée alors :

$$G_{SM}(\tau) = G_D(\tau) \quad (30)$$

$$G_{DM}(\tau) = G(\tau) \quad (31)$$

Si nous faisons le rapport entre la fonction d'autocorrélation de l'espèce doublement marquée $G_{DM}(\tau)$ et la fonction d'autocorrélation de l'espèce simplement marquée (Bonnet, et al., 1998)

$$G^*(\tau) = \frac{G_{DM}(\tau)}{G_{SM}(\tau)} = 1 + \left(\frac{f_t}{1 - f_t - f_c} \right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right) + \left(\frac{f_c}{1 - f_c - f_t} \right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) \quad (32)$$

τ_t étant négligeable devant τ_r , on peut réécrire l'équation (32) sous la forme :

$$G^*(\tau) = A + B \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) \quad (33)$$

avec

$$A = 1$$

$$B = \frac{f_c}{1 - f_c - f_t}$$

On ajustera le modèle aux points expérimentaux.

Après avoir déterminé τ_r , on pourra en déduire la constante cinétique d'ouverture et de fermeture de la tige boucle respectivement k_{op} et k_{cl} par les équations :

$$\tau_r^{-1} = k_{op} + k_{cl} \quad (34)$$

ce qui donnera :

$$k_{op} = \tau_r^{-1} \frac{K_d}{1 + K_d} \quad (35)$$

$$k_{cl} = \tau_r^{-1} \frac{1}{1 + K_d}$$

où K_d est la constante d'équilibre de dissociation de la tige-boucle déterminée par les mesures de fluorescence résolue en temps.

Ces deux constantes (k_{op} et k_{cl}) nous permettent de caractériser le mouvement de fraying c'est-à-dire d'ouverture et fermeture des extrémités de la tige-boucle (Azoulay, et al., 2003; Bonnet, et al., 1998).

Résultats et discussions

Importance de la structure
secondaire de cTAR lors du
premier saut de brin de la
transcription inverse de VIH-1.
(Publications 1 et 2)

La séquence cTAR intervient comme décrit précédemment dans différentes étapes du cycle viral notamment la rétrotranscription. Cette tige boucle est déstabilisée lors du premier saut de brin à l'aide de la protéine NCp7. C'est par son activité chaperonne que la protéine permet une déstabilisation intramoléculaire de cTAR ainsi qu'une hybridation intermoléculaire de cette même séquence avec son complémentaire TAR ARN.

La première partie de ce travail (Beltz, et al., 2003; Beltz, et al., 2004) s'est portée sur la structure secondaire de cTAR. Cette séquence est constituée par une structure en tige-boucle ayant un certain nombre de singularités (Baudin, et al., 1993) (Figure 19). Elle est caractérisée par 21 appariements qui confèrent à cette séquence une grande stabilité. On décrit la séquence cTAR comme une juxtaposition de cinq segments double brins, chacun d'eux étant séparé par des bulges.

Au sommet de cTAR se trouve une boucle de six nucléotides. Dans sa partie basse (inférieure au bulge en T⁴⁰), on observe deux bulges un en position 4 (en face du A⁵²) et un autre en position 7 (en face du A⁴⁹). La séquence cTAR présente également une boucle interne qui entre en jeu dans le mécanisme de transactivation en interagissant avec Tat.

Dans des travaux ultérieurs faits au laboratoire (Azoulay, et al., 2003; Bernacchi, et al., 2002), il a été montré que la NCp7 est capable de déstabiliser cette structure secondaire mais sans connaître le rôle de chaque élément de la tige-boucle. L'objectif de notre étude est d'expliquer l'importance et le rôle des bulges ainsi que des boucles dans le mécanisme de déstabilisation. En effet, nous avons utilisé des mutants de la séquence native de cTAR (Figure 1 de la publication 1 et 2) pour lesquels nous avons supprimé ou substitué l'un ou l'autre des bulges ou des boucles. Nous avons aussi utilisé des séquences présentant deux mutations de la structure secondaire. Toutes les mesures effectuées ont été comparées à la séquence cTAR native.

Pour effectuer cette étude, nous avons marqué ces séquences aux extrémités 3' et 5' par des couples 3'Fl/5'TMR et 3'DABCYL/5'Rh6G (décrits au chapitre Matériels et méthodes II-A). Pour cette analyse, nous avons utilisé l'absorption UV-Visible, la spectroscopie à l'état stationnaire ainsi que résolue en temps mais aussi la spectroscopie à corrélation de fluorescence.

Dans un premier temps, des mesures de courbes de fusion nous indiquent que la température de fusion ainsi que le $\Delta G^{37^\circ\text{C}}$ de (14-39)cTAR (Figure 1 de la publication 2) sont

plus grands que celui de cTAR. Par conséquent, la partie haute de cTAR est plus stable que l'ensemble de la séquence native (tableau 1 de la publication 1 et 2). La partie basse de cTAR agit en fait comme une structure déstabilisante. Cet effet est certainement dû à la présence des deux bulges. En effet, la stabilité de cTAR comme d'autres tige-boucles (LeBlanc, et al., 1991; Longfellow, et al., 1990; Znosko, et al., 2002) dépend fortement de la présence ou non de l'un ou l'autre bulge. L'augmentation du $\Delta G^{37^\circ\text{C}}$ observée pour la fermeture d'un bulge soit 2.9 kcal/mol est plus grande que celle observée pour fermeture du deuxième soit 1.9 kcal/mol. Bien que moins marqué ceci s'observe également pour les températures de fusion puisque l'on observe une augmentation de 8 à 9°C pour la fermeture d'un bulge et une augmentation de 6 à 7°C pour la fermeture du deuxième bulge. Par conséquent, l'ouverture d'un bulge facilite considérablement l'ouverture du deuxième bulge. Ceci met en évidence la coopérativité entre les deux bulges (Woodson, et al., 1987) ce qui se voit par l'énergie libre ou les températures de fusion. D'autre part, la fermeture de la boucle interne augmente considérablement la stabilité de la séquence. Cette boucle est un élément déstabilisant majeur de la partie haute de cTAR. Cette stabilité peut être attribué à G³³ puisque sa substitution par un A fait baisser le $\Delta G^{37^\circ\text{C}}$ et cette valeur se trouve très proche de la valeur théorique au contraire de la valeur observée pour (14-39)cTAR. Mais la substitution de C³⁵ par un A fait également baisser la stabilité d'une façon significative puisque le C³⁵ se trouvant lui-même à coté d'un C³⁶ on peut observer un échange de la paire de base ¹³G- C³⁵ vers la paire de base ¹³G- C³⁶ (Ke, et al., 1995; Zhu, et al., 1999). La substitution de la boucle apicale ne change que très peu la stabilité de la séquence.

NCp7 n'est pas capable d'ouvrir le mutant cTAR 1,2 (Figure 1 de la publication 1). De plus, NCp7 ouvre plus facilement les mutants cTAR 1 et cTAR 2 que le mutant cTAR 1,2. Par ailleurs, NCp7 ouvre plus facilement le mutant cTAR 1 que le mutant cTAR 2. Par conséquent, le bulge G en position 52 (supprimé dans cTAR 2) a un rôle plus important dans la déstabilisation que le bulge A en position 49 (supprimé dans cTAR 1). Dans la cas de cTAR 1,2, la NCp7 est incapable d'ouvrir un double brin de 11 paires de bases consécutives ce qui a été déjà montré sur la tige-boucle poly(A) (signal de polyadénylation) (Berkhout, et al., 2001).

D'autre part, la délétion de la boucle interne réduit considérablement l'affinité de NCp7 sur cTAR (tableau 2 de la publication 2). Cette faible affinité va considérablement réduire l'effet déstabilisant de la NCp7 sur la séquence cTAR. Au contraire, la substitution de la boucle par du HEGL (Hexaéthylèneglycol) n'a pas d'effet sur la déstabilisation de NCp7.

Par conséquent, la boucle interne aurait un rôle beaucoup plus important dans la déstabilisation que la boucle apicale. Cette boucle interne serait un site d'initiation de la déstabilisation de cTAR par NCp7.

D'autre part, la substitution du G ou C de la boucle interne par un A ne change en rien l'affinité de la protéine. L'effet déstabilisant pour le mutant A³⁵(14-39)cTAR est au niveau de la séquence native alors que le mutant A³³(14-39)cTAR présente un niveau de déstabilisation plus élevé que celui de cTAR. Par conséquent, en plus de l'importance de la présence du bulge pour la déstabilisation, la composition nucléotidique apparaît tout aussi importante.

Les expériences par spectroscopie à corrélation de fluorescence indiquent que la séquence présente un « fraying » même en l'absence de la NCp7 (Azoulay, et al., 2003). La fermeture de l'un ou l'autre ou des deux bulges augmente la constante cinétique de fermeture (k_{cl}) (Tableau 4 de la publication 1). k_{cl} est relié à la probabilité de collision des extrémités de la tige-boucle. La présence des bulges doit très certainement retarder la fermeture en faisant baisser cette probabilité pour obtenir la conformation la plus stable. D'autre part, la fermeture de l'un ou l'autre ou des deux bulges augmente la constante cinétique d'ouverture (k_{op}) (Tableau 4 de la publication 1). La fermeture des bulges fait que le fraying se réduit aux paires de base terminales ce qui augmente considérablement k_{op} .

L'ajout de la NCp7 corrobore les résultats obtenus avec les autres techniques spectroscopiques. En effet, l'adjonction de la NCp7 aura pour effet d'augmenter les constantes cinétiques du mécanisme de fraying. Cette augmentation sera réduite pour la fermeture d'un bulge mais le sera encore plus pour la fermeture des deux. Par conséquent, NCp7 aura pour effet d'augmenter le mécanisme de fraying.

Ces conclusions nous ont permis d'élaborer un modèle du mécanisme de déstabilisation de cTAR par NCp7 (Figure 5 de la publication 1).

Dans un premier temps et à 20°C, l'existence du mécanisme de fraying fait que la séquence cTAR est ouverte sur 3 à 5 paires de base (étape 1) (Azoulay, et al., 2003). Puis il a été démontré que la protéine NCp7 est plus affine pour des séquences simples brins que pour des séquences doubles brins. Par conséquent, les extrémités impliquées dans le mécanisme de fraying sont un site d'initiation pour la fixation de la NCp7 (étape 2) (Urbaneja, et al., 2002; Vuilleumier, et al., 1999). La protéine ainsi fixée pourra déstabiliser les paires de bases voisines. Par un mécanisme de glissement le long de cTAR (Tisne, et al., 2001) et par la coopérativité de la liaison entre les protéines (Mely, et al., 1995), la NCp7 va faciliter la fixation d'autres protéines (étape 3). En raison de l'effet déstabilisant de la partie inférieure de

cTAR et de la forte stabilité de sa partie haute, la fusion de la séquence pourra s'étendre jusqu'au bulge en T⁴⁰. Cette ouverture limitée est confirmée par le calcul de distances interchromophores qui sont en parfaite adéquation avec une ouverture dans les environs de T⁴⁰ (étape 4). Arrivé à cette étape de la fusion de la séquence cTAR deux chemins sont possibles. Le premier est la fusion complète de cTAR (étape 5'). Cette étape est minoritaire car si nous nous référons à la spectroscopie résolue en temps, l'espèce complètement ouverte est peu peuplée (tableau 3 de la publication 1). Le deuxième chemin possible est la fermeture de la séquence (étape 5). Cette étape est possible quand les segments simples brins sont entièrement recouverts par la protéine. Dans ce cas, la charge négative des groupements phosphates de la séquence est neutralisée par la charge positive de la NCp7 (Stoylov, et al., 1997; Williams, et al., 2001). Ceci est confirmé par l'augmentation de la constante de fermeture k_{cl} observée dans les mesures de FCS (tableau 4 de la publication 1). Cette étape se continue par une fermeture complète de la tige boucle et une éjection de la protéine (étape 6). Cette étape finale fait entrer en jeu le même mécanisme (la coopérativité de bases nucléotidiques) que lors de l'ouverture.

Ce mécanisme explique un mécanisme d'ouverture ayant comme site d'initiation les deux simples brins des extrémités. Mais dans la publication 2, nous avons montré que la boucle interne pourrait être aussi un site initiation. Par un mécanisme similaire, la NCp7 serait capable de faciliter l'ouverture de la séquence par le haut, plus précisément par la boucle interne de cTAR servant d'ordinaire à la fixation de la protéine Tat.

Publication 1

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Hervé Beltz, Joel Azoulay, Serena Bernacchi, Jean-Pierre Clamme, Damien Ficheux, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix and Yves Mély

Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 cTAR DNA on its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7

Journal of Molecular Biology, 328, 95-108

Pages 95-108 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00244-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00244-4)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Publication 2

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Hervé Beltz, Etienne Piémont, Emmanuel Schaub, Damien Ficheux, Bernard Roques,
Jean-Luc Darlix and Yves Mély

**Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid
Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7**

Journal of Molecular Biology, 338, 711-723

Pages 711-723 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.019>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Etude par FCS de l'interaction entre la NCp7 et cTAR.

I) Résultats

Par des mesures de FCS, nous avons essayé d'affiner la caractérisation de l'interaction entre la protéine NCp7 et la séquence cTAR. Dans ces expériences, nous avons utilisé les mêmes mutants de la partie haute de cTAR ainsi que les mêmes fluorophores que ceux décrits dans la publication 2. Comme indiqué dans la partie matériels et méthodes, la FCS permet la mesure des fluctuations de fluorescence induites par le passage de molécules fluorescentes dans le volume focal (d'environ 0.25 fl). L'analyse de ce signal de fluorescence permettra de déterminer les causes des fluctuations. La courbe d'autocorrélation (Figure 25) de la séquence simplement marquée Rh6G-5'-(14-39) cTAR peut être ajusté par l'équation (28).

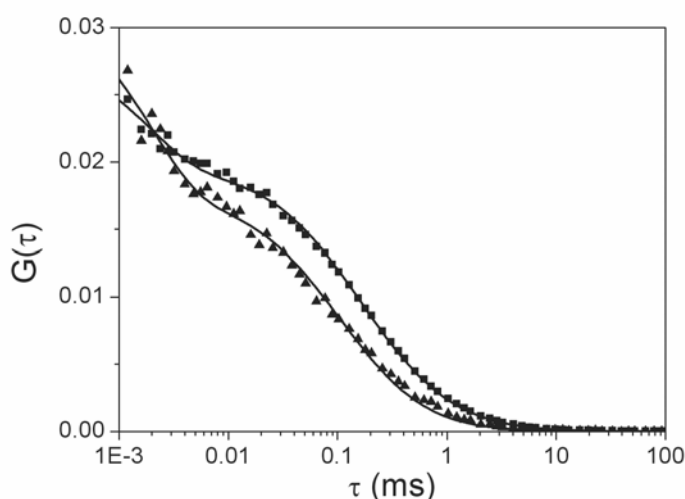


Figure 25 : Courbe de Rh6G-5'-(14-39)cTAR en absence de NCp7 (▲) et en présence de NCp7 (■). L'ajustement de la courbe expérimentale est représenté par la courbe en trait plein.

Le nombre N de molécules fluorescentes déterminé par la courbe d'autocorrélation est dans notre cas en parfaite adéquation avec la mesure de concentration faite par spectroscopie d'absorption. Le coefficient de diffusion D_{exp} est lui aussi en parfaite adéquation avec le coefficient de diffusion théorique D_{th} déduit du modèle en bâtonnet par l'équation:

$$D_{\text{th}} = \frac{k_b T}{3\eta\pi} \frac{1}{L} \left(\ln \frac{L}{l} + \gamma \right) \quad (36)$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T est la température en K, η est la viscosité de la solution et γ est un facteur de correction dû aux extrémités, il est d'environ 0.39 (Kovacic, et al., 1977). D'autre part, en admettant que la hauteur d'une paire de bases est d'environ 3.4 Å, L (la longueur de notre séquence d'ADN) est $n * 3.4 = 44.2$ Å avec n est nombre de paires de bases dans (14-39) cTAR soit 13. Le diamètre hydrodynamique, l , de notre séquence d'ADN est compris entre 20.5 et 28 Å (Tirado, et al., 1979). Pour tous les mutants de cTAR, on observe une très bonne adéquation entre les valeurs expérimentales et théoriques de N et de D (Tableau 1).

Le coefficient de diffusion expérimental peut être par l'équation :

$$D_{\text{exp}} = \frac{\omega_0^2}{8\tau_d} \quad (37)$$

où ω_0 est la taille du petit axe du volume focal pour lequel l'intensité de fluorescence est égale à $1/e^2$ et τ_d le temps de diffusion de l'espèce observée. Du fait de la difficulté à déterminer ω_0 nous avons déterminé D_{exp} à l'aide d'une référence la Carboxytétraméthylrhodamine (TMR) par l'équation :

$$D_{\text{exp}} = \frac{D_{\text{TMR}} \times \tau_{da(\text{TMR})}}{\tau_{da(\text{oligo})}} \quad (38)$$

où $\tau_{da(\text{TMR})}$ et $\tau_{da(\text{oligo})}$ sont respectivement les temps de diffusion apparent de la TMR et de l'oligonucléotide étudié et D_{TMR} est le coefficient de diffusion de la TMR ($2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

	<i>r</i>	$D_{exp} (cm^2.s^{-1}) \times 10^7$	$D_{th} (cm^2.s^{-1}) \times 10^7$	N_{+NC}/N_{-NC}
(14-39)cTAR	-	9.0 ± 0.2	$8.2-11^b$	
	5	6.3 ± 0.4	$4.6-6.7^a$	1.2 ± 0.4
$\Delta B(14-39)cTAR$	-	6.9 ± 0.2	$7.8-11^b$	
	5	7.1 ± 0.1	$7.8-9.7^b$	0.6 ± 0.1
$\Delta L(14-39)cTAR$	-	9.2 ± 0.5	$7.4-11^b$	
	5	7.1 ± 0.1	$5.1-7.9^a$	1.0 ± 0.1
(19-32)cTAR	-	9.5 ± 0.2	$4.1-9.7^b$	
	5	8.1 ± 0.4	$8.3-11^b$	0.5 ± 0.2
$A^{35}(14-39)cTAR$	-	7.7 ± 0.4	$8.2-11^b$	
	5	6.0 ± 0.1	$4.6-6.7^a$	1.0 ± 0.1
$A^{33}(14-39)cTAR$	-	7.9 ± 0.1	$8.2-11^b$	
	5	5.6 ± 0.4	$4.6-6.7^a$	1.1 ± 0.3

Tableau 1 : Paramètres de FCS de l'interaction des mutants de cTAR avec la NCp7. ^a Calculé selon le modèle de Stokes-Einstein et ^b calculé selon le modèle du bâtonnet.

L'ajout de la protéine NCp7 sur (14-39) cTAR laisse N inchangé et induit une baisse significative du coefficient de diffusion, ce qui indique que la protéine se lie à la séquence cTAR. Pour calculer D_{th} dans le cas de l'ajout de NCp7, on admet que la protéine a une dimension d'environ 10 à 25 Å (Ramboarina, et al., 2002) et que l'ADN est saturé en protéine. Dans ce cas, la largeur est du même ordre de grandeur que la longueur et donc le modèle du bâtonnet n'est plus valable. Nous utiliserons un modèle sphérique défini par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D_{th} = \frac{k_b T}{6\eta\pi r} \quad (39)$$

On observe à nouveau une très bonne adéquation entre les valeurs théoriques et expérimentales de D pour la séquence (14-39)cTAR, $A^{33}(14-39)cTAR$, $A^{35}(14-39)cTAR$, et $\Delta L(14-39)cTAR$. Nous observons également pour les mêmes mutants aucune modification de

N. Par contre, pour les mutants $\Delta B(14-39)cTAR$ et $(19-32)cTAR$ nous observons que l'ajout de NCp7 divise N par un facteur 2. Ceci suggère que la protéine induit la formation de dimères. Ces derniers peuvent exister sous deux formes :

- Un complexe boucle-boucle où le dimère relie deux mêmes séquences par autocomplémentarité partielle des boucles.
- Un duplexe étendu où le dimère est formé par autocomplémentarité partielle de l'ensemble de la séquence.

Mais la FCS ne nous permet pas de discriminer l'une ou l'autre conformation. Pour obtenir cette discrimination, nous faisons un mélange équimolaire de $\Delta B(14-39)cTAR$ ou $(19-32)cTAR$ doublement marqué et non marqué. Dans ce mélange, statistiquement on trouvera 25% de dimère non marqué, 25% de dimère possédant les deux brins doublement marqués et 50% de dimère possédant l'un des brin non marqué et l'autre doublement marqué (Figure 26).

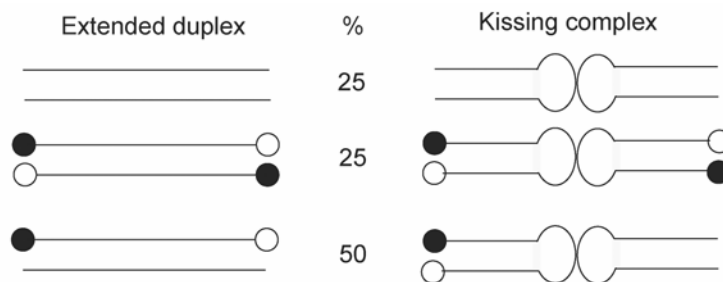


Figure 26: Composition théorique du mélange de mutants doublement marqués et non marqués formant un dimère.

Dans le cas du duplexe étendu, le Rh6G est dans 50% des cas loin de son « quencher » le DABCYL ce qui devrait se traduire par une augmentation significative de l'intensité de fluorescence. Dans l'autre cas, on ne devrait voir qu'un changement infime de l'intensité de fluorescence. Dans notre cas, on observe une augmentation très limitée de l'intensité de fluorescence pour les espèces $\Delta B(14-39)cTAR$ et $(19-32)cTAR$ (Figure 27). On peut émettre l'hypothèse que le dimère induit par NCp7 est un complexe boucle-boucle.

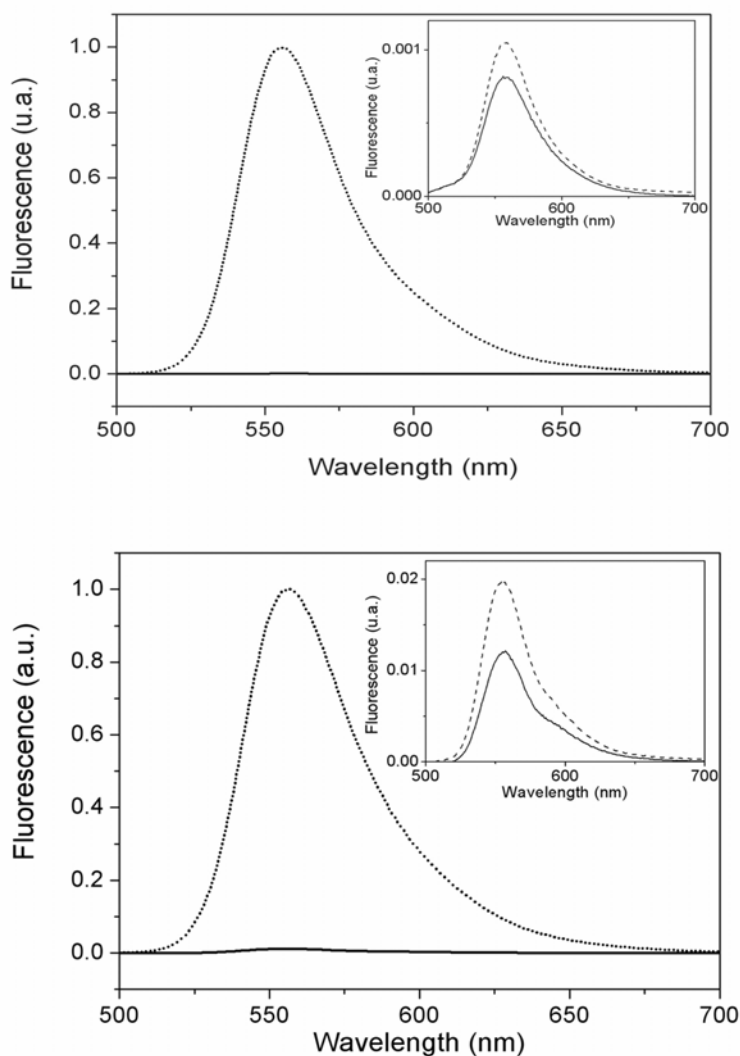


Figure 27 : Spectre du haut : En insert, émission de fluorescence du mélange de Rh6G-5'- Δ B(14-39)cTAR-3'-DABCYL avec du Δ B(14-39)cTAR non marqué en absence de NCp7 (trait plein) et en présence de NCp7 (tiret). En comparaison, le même mélange avec du Rh6G-5'- Δ B(14-39)cTAR et l'espèce non marquée en présence de NCp7 (pointillé). Spectre bas : En insert, émission de fluorescence du mélange de Rh6G-5'-(19-32)cTAR-3'-DABCYL avec du (19-32)cTAR non marqué en absence de NCp7 (trait plein) et en présence de NCp7 (tiret). En comparaison, le même mélange avec du Rh6G-5'-(19-32)cTAR et l'espèce non marquée en présence de NCp7 (pointillé).

II) Discussion

Les D_{th} pour $\Delta B(14-39)cTAR$ et $(19-32)cTAR$ en présence de NCp7 sont calculés non plus sur le modèle de la sphère mais sur le modèle du bâtonnet. En effet, la largeur devient beaucoup plus petite que la longueur dans ce cas. On observe une très bonne adéquation entre les valeurs théoriques et expérimentales. La diffusion lente indique que la protéine reste liée malgré la formation du dimère (Lee, et al., 2003). Par son activité chaperonne, la NCp7 réarrange la séquence dans son état thermodynamique le plus stable (Cristofari, et al., 2002; Rein, et al., 1998). Donc pour ces deux mutants, le complexe boucle-boucle serait la conformation la plus stable. Or il a été montré que la NCp7 était capable de favoriser la transition entre le complexe boucle-boucle et le duplex étendu (Huthoff, et al., 2002; Laughrea, et al., 1996; Muriaux, et al., 1996b; Rist, et al., 2002; Takahashi, et al., 2001; Takahashi, et al., 2000; Theilleux-Delalande, et al., 2000). Dans un premier temps, on explique ceci par une autocomplémentarité partielle des séquences (Figure 28).

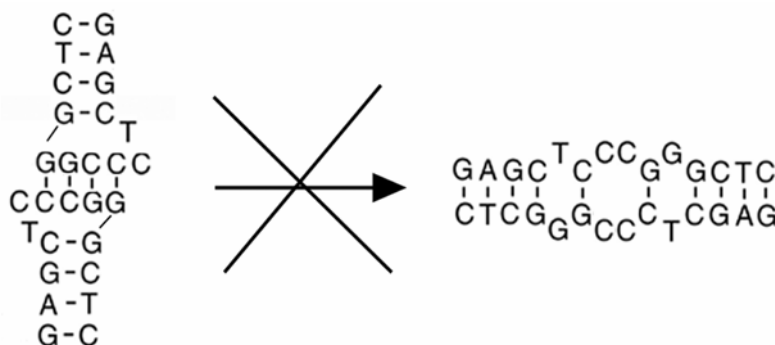


Figure 28 : Structure du complexe boucle-boucle et du duplex étendu de $(19-32)cTAR$.

Dans le cas de $(19-32)cTAR$, le complexe boucle-boucle inclut la séquence autocomplémentaire $^{25}CCGG^{28}$ qui forme quatre paires de base et quatre paires de base pour chaque monomère intramoléculaire (Figure 28). Le complexe inclut donc 12 paires de base. De l'autre côté, le duplex étendu inclut dix paires de base. Au vu des ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que le complexe boucle-boucle soit plus stable et donc favorisé par rapport au duplex étendu.

Pour le dérivé (14-39)cTAR, la forme observée est le monomère recouvert par la NCp7 (Tableau 1). Cependant, le complexe boucle-boucle pourrait être une étape intermédiaire pour tous les mutants à l'exception de $\Delta L(14-39)cTAR$. Il a été montré que NCp7 est capable d'ouvrir partiellement la partie haute de cTAR (Beltz, et al., 2004). La protéine serait alors à même d'ouvrir le complexe boucle-boucle pour le dissocier en forme monomère (Figure 29).

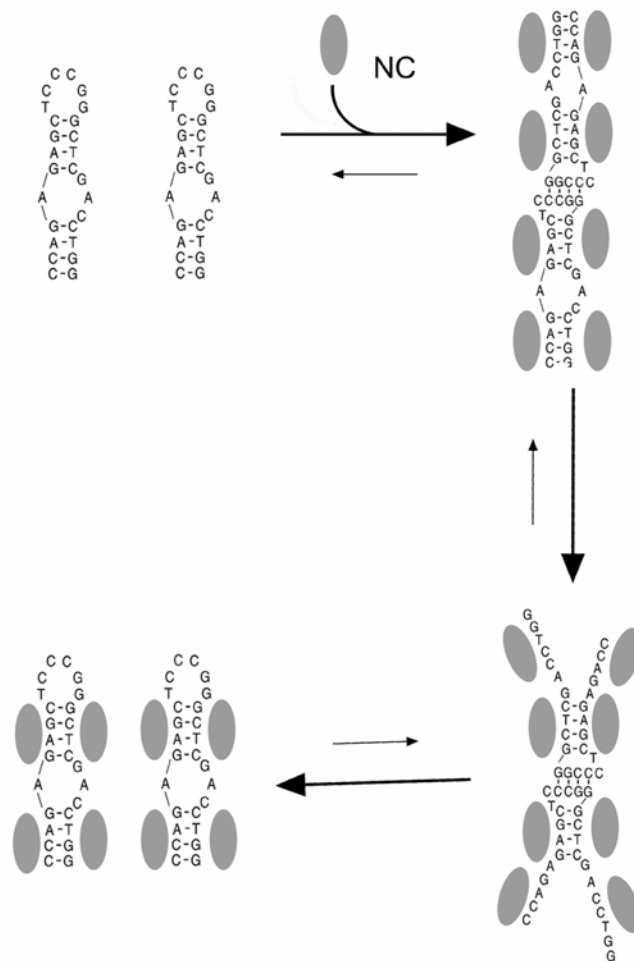


Figure 29 : Mécanisme proposé pour l'interaction de NCp7 avec (14-39)cTAR. Dans une première étape, la protéine facilite la formation du complexe boucle-boucle. Par la suite, les bulges internes étant des sites d'initiation de l'ouverture des séquences, il y a une déstabilisation du complexe et enfin dissociation en monomères recouverts par la NCp7. (La représentation des protéines reste schématique).

L'activation de la formation de cet homodimère par la NCp7 traduit son activité chaperonne. Il a été montré que durant la rétrotranscription, il y a formation d'un complexe boucle-boucle entre cTAR ADN et TAR ARN (Andersen, et al., 2004; Berkhout, et al., 2001; Williams, et al., 2001). Il a été également montré que NCp7 était capable de promouvoir la formation d'un homodimère par complexe boucle-boucle sur la séquence PBS (Egele, et al., 2004). Donc, NCp7 est non seulement capable de faciliter la transition entre le complexe boucle-boucle et le duplex étendu mais il est aussi capable de faciliter la formation du complexe.

Importance de la structure
primaire de NCp7 lors du
premier saut de brin de la
transcription inverse de VIH-
1. (Publication 3)

La deuxième partie de ce travail s'est portée sur l'influence de la structure primaire de la NCp7 dans la déstabilisation de cTAR. NCp7 possède deux doigts de zinc de motif CCHC hautement conservé relié par 7 acides aminés. Aux extrémités N et C-terminales, la protéine présente des chaînes latérales. Chacune de ces parties a une fonction plus ou moins importante dans la déstabilisation de cTAR par la NCp7. Par conséquent, le but de cette étude est de déterminer et quantifier l'importance de chaque composante envers l'activité chaperonne de NCp7.

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé un certain nombre de mutants de la protéine NCp7 (Figure 2 de la publication 3) ainsi que des séquences cTAR marquées aux extrémités 3' et 5' soit par un couple 3'Fl/5'TMR soit par un couple 3'DABCYL/5'Rh6G. Pour la protéine, nous avons utilisé la fluorescence naturelle dû en grande partie à l'acide aminé tryptophane (décrit dans le chapitre Matériels et méthodes I-C). Pour cette analyse, nous avons utilisé des techniques comme l'absorption UV-Visible, la spectroscopie à l'état stationnaire ainsi que résolue en temps mais aussi la spectroscopie à corrélation de fluorescence. Ces techniques ainsi que ces stratégies de marquage nous ont permis de suivre à la fois la liaison de la protéine sur cTAR et la déstabilisation de cTAR.

En premier lieu nous avons déterminé l'importance des chaînes latérales. En comparant les résultats (Tableaux 1,2 et 3 de la publication 3) obtenus pour la NC(1-55) et NC(12-55), il apparaît que la chaîne latérale N-terminale stabilise fortement la liaison avec cTAR sans pour autant augmenter l'effet déstabilisant. D'autre part, en comparant les résultats obtenus sur NC(1-72), NC(13-64) et NC(12-55), nous pouvons conclure que la chaîne latérale C-terminale présente que dans le précurseur de la NCp7 ne joue qu'un rôle mineur dans la liaison et la déstabilisation.

En deuxième lieu, nous avons mis en évidence le rôle des doigts de zinc en particulier l'effet de leur présence, de leur position et de leur structure. En utilisant des mutants dédigitalisés ou ayant les deux doigts non structurés respectivement NC(13-61)_{dd} et (SSHS)₂NC(1-55), nous avons pu mettre en évidence que la présence des deux doigts est indispensable à la déstabilisation de cTAR même si les deux mutants possèdent une forte affinité pour cTAR. Cette dernière est certainement due à la taille ou la déstructuration des mutants qui permet plus d'interactions électrostatiques avec l'ADN. De plus, les résultats obtenus par des mutants ne possédant que l'un ou l'autre doigt (NC(35-50) et NC(14-29)) conforte que la présence des deux doigts est indispensable au bon fonctionnement de la protéine. D'autre part, la déstructuration de l'un au l'autre doigt par mutation d'une His en

Cys n'a pas le même effet. L'effet sur la liaison et sur la déstabilisation de cTAR sera plus grand pour la mutation dans le premier doigt que dans deuxième doigt. Par conséquent, la structure du premier doigt est indispensable au fonctionnement de la NCp7 au contraire du deuxième doigt. En plus, la position des doigts ne semble pas indispensable pour la liaison mais l'est pour la déstabilisation. On notera également que le deuxième doigt n'est pas capable de substituer le premier doigt pour la déstabilisation mais l'est pour la liaison. En conclusion, le premier doigt semble jouer un rôle plus important dans la déstabilisation que le deuxième. Cette conclusion conforte les résultats obtenus sur poly(ϵ A) (Urbaneja, et al., 1999) et sur l'efficacité de tels mutants dans le transfert de brin (Guo, et al., 2002). C'est en particulier sa plateforme hydrophobique formé de la Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴ et Ala²⁵ (précédemment décrit par (De Guzman, et al., 1998) qui joue un rôle important dans ce doigt de zinc.

En troisième lieu, nous avons déterminé l'importance de la proximité des deux doigts par mutation de la L-Pro³¹ en D-Pro³¹ qui supprime la proximité entre les deux doigts. Elle n'apparaît pas indispensable pour la déstabilisation. Par contre, elle augmente la constante d'affinité ceci étant certainement du au changement structural induit par la D-Proline qui permet de faire plus facilement des liaisons avec l'ADN.

En quatrième et dernier lieu, nous montrons l'importance du Trp³⁷ déjà décrit pour des interactions avec d'autres séquences (Amarasinghe, et al., 2000a; Amarasinghe, et al., 2000b; De Guzman, et al., 1998; Morellet, et al., 1998; Vuilleumier, et al., 1999). En effet, l'inversion du Trp³⁷ avec la Phe¹⁶ qui n'interfère que très peu sur la constante d'affinité et le niveau de déstabilisation, nous permet de conclure que l'activité chaperonne n'est que peu dépendante de la nature de l'acide aminé aromatique. Par contre, la substitution de ce même tryptophane par un acide aminé non aromatique : Leu inhibe considérablement la liaison ainsi que l'effet déstabilisant. Par conséquent, la présence d'un acide aminé aromatique tel que le Trp³⁷ est indispensable à l'activité chaperonne de la NCp7. Ceci conforte des conclusions similaires obtenues par des expériences au niveau cellulaire (Dorfman, et al., 1993).

Publication 3

Structural determinants of HIV-1 nucleocapsid protein for cTAR DNA binding and destabilization

Hervé Beltz^{1, #}, Céline Clauss^{1, #}, Etienne Piémont¹, Damien Ficheux², Robert J. Gorelick³, Bernard Roques⁴, Jean-Luc Darlix⁵, Hugues de Rocquigny¹ and Yves Mély^{1, *}

¹Laboratoire de Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, UMR 7034 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg 1, 74, Route du Rhin, 67401 ILLKIRCH Cedex, France.

²IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 LYON Cedex 07, France

³AIDS Vaccine Program, SAIC Frederick, Inc. National Cancer Institute at Frederick, Frederick, MD 21702, USA

⁴Département de Pharmacochimie Moléculaire et Structurale, INSERM U266, Faculté de Pharmacie, 4, Avenue de l'Observatoire, 75270 PARIS Cedex 06, France.

⁵LaboRétro, Unité de Virologie Humaine INSERM #412, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 LYON, France

HB and CC equally contributed to this work.

* Corresponding author

Tel : +33 (0)3 90 24 42 63 Fax : +33 (0)3 90 24 43 12

e-mail:mely@pharma.u-strasbg.fr

Running title: Structural determinants of NC destabilizing activity

Abstract

The nucleocapsid protein (NC) of HIV-1 is formed of two highly conserved CCHC zinc fingers flanked by small basic domains. NC is required for the two obligatory strand transfers in viral DNA synthesis through its nucleic acid chaperoning properties. The first DNA strand transfer relies on NC's ability to bind and destabilize the secondary structure of cTAR DNA and to promote its annealing to TAR RNA. To further investigate NC chaperone properties, our aim was to identify the NC structural determinants for cTAR binding and destabilization by means of fluorescence spectroscopy using a series of NC mutants. NC destabilization properties were found to be supported by the two fingers in their proper context. The strict requirement of the native proximal finger suggests that its hydrophobic platform (Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴ and Ala²⁵) is crucial for binding and destabilization. In contrast, only partial folding of the distal finger is required, probably for presenting the Trp³⁷ residue in an appropriate orientation. Also, Trp³⁷ and the hydrophobic residues of the proximal finger appear to be essential for the propagation of the melting from the cTAR ends up to the middle of the stem. Finally, the N-terminal basic domain contributes to cTAR binding but not to its destabilization.

Introduction

The nucleocapsid protein (NC) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a small basic nucleic acid-binding protein generated by the proteolytic cleavage of the Gag precursor (1-3). Protease-directed cleavage of Gag first generates NCp15, next NCp7 (1-71) and ultimately NCp7 composed of 55 amino acids, containing two highly conserved CCHC zinc fingers that coordinate zinc ions with high affinity (4). The two zinc fingers are connected by a short and flexible basic linker and are flanked by poorly folded N- and C-terminal basic domains (5-9). In their zinc-bound form, the fingers exhibit similar folding and are in close proximity (4-6,10-12).

During virus replication, NC acts as a nucleic acid chaperone, assisting the rearrangement of nucleic acid molecules into their most stable conformation notably during genomic RNA dimerization, encapsidation and replication (13,14). This chaperone activity has been investigated with both DNA and RNA substrates (15-17) and was found to be required for the two obligatory strand transfers during viral DNA synthesis (18,19). During the first strand transfer, the early product of cDNA synthesis, the minus strand strong stop DNA, (-)ssDNA, is translocated to the 3' terminus of the genomic RNA. This transfer is notably mediated by the hybridization of the complementary TAR DNA (cTAR) and TAR RNA located at the 3' ends of (-)ssDNA and genomic RNA, respectively. These two stem-loops are folded in similar stable structures limiting the minus-strand transfer reaction (20,21). Due to its chaperone ability, NC promotes this transfer by increasing the rate and extent of annealing (17,18,22-24) and by preventing non-specific self-primed cDNA synthesis by reverse transcriptase (20,24-27). The initial and rate-limiting step of minus-strand transfer is thought to be destabilization of the TAR and cTAR (Fig.1) structures upon binding of NC (13,17,18,24-26,28-33). In fact, NC activates the transient opening (fraying) of cTAR terminal base-pairs (34,35), leading to a partial melting of the cTAR ends (up to the T⁴⁰ bulge). NC also initiates the partial and transient melting of the top half of cTAR (36).

Several model assays have been developed to determine the structure-activity relationships of NC nucleic acid binding and chaperone activities (24,37). Using NC derivatives, it has been suggested that NC-destabilization properties rely mainly on the zinc fingers (29,38) while NC-promoted annealing is mainly dependent upon the basic domains flanking the zinc fingers (17,29,39). However, since most of these attempts were based on integrated assays such as promotion of strand transfer or inhibition of self-priming, they did not clearly discriminate between the destabilization and annealing components of NC chaperone activity.

This is why we wanted to identify the NC determinants promoting destabilization of cTAR. To this end, we investigated by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, the effects of various NC mutants (Fig. 2) on cTAR sequences that were labeled at their 5' and 3' ends. NC-promoted fluorescence changes in these labeled systems have previously been shown to unambiguously monitor the unwinding of cTAR secondary structure (35,36,40). In addition, binding experiments were carried out using the intrinsic fluorescence of the Trp³⁷ residue of NC to establish whether the binding and destabilization activities correlated with one another. Taken together, our data show that both the two folded fingers are required for cTAR binding and destabilization. Furthermore, the hydrophobic residues on the proximal zinc finger and the aromatic residue at position 37 in the distal finger appear to be major determinants for propagation of the initial melting of cTAR from the ends up to the middle of the stem.

Materials and Methods

Materials

The 2.1NC(1-55), 2.2NC(1-55), C⁴⁴NC(1-55) and (SSHS)₂NC(1-55) mutants were expressed from recombinant plasmids and purified as described previously (24,41). The other NC mutant proteins were synthesized using solid phase peptide synthesis (42). Lyophilized peptides were stored in their zinc-bound form at -20°C. To determine protein concentration, an extinction coefficient at 280 nm of 5,700 M⁻¹cm⁻¹ per tryptophan was used. Because recombinant mutants and synthetic proteins were derived from different HIV-1 strains (NL4-3 versus LAI), the amino acid residues at positions 1, 3, 12, 24, 26 and 38 are different but are functionally conserved at each location.

Doubly- and singly-labeled DNA oligonucleotides were synthesized at a 0.2 μmole scale by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany). For this study, we used two pairs of dyes, namely (Rh6G, DABCYL) and (TMR, Fl) respectively. The 5' termini of the oligonucleotides were labeled with either 6-carboxyrhodamine (Rh6G) or carboxytetramethylrhodamine (TMR) via an amino-linker with a six carbon spacer arm (Fig. 1). The 3' termini of the oligonucleotides were labeled with either 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid (DABCYL) or 5(and6)-carboxyfluorescein (Fl) using a special solid support with the dye already attached. Oligonucleotides were purified by reverse-phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The purity of the labeled oligonucleotides was verified by electrospray ionization mass spectrometry and found to be > 93%. Experiments were performed in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM NaCl and 0.2 mM MgCl₂ (17). An extinction coefficient at 260 nm of 521,910 M⁻¹cm⁻¹ was used for cTAR (35,40). All experiments were performed at 20°C.

Steady-state and time-resolved fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra were recorded either on an SLM 48000 or a FluoroMax spectrofluorometer equipped with a thermostated cell compartment. For binding studies, fluorescence titrations were performed by adding increasing oligonucleotide concentrations to a fixed amount of peptide in 25 mM Tris, 30 mM NaCl, 0.2 mM MgCl₂, pH 7.5. In general, the binding stoichiometry was determined at peptide concentrations of between 1.5 to 2 μM while the binding constants were determined at peptide concentrations of between 0.2 to 1.5 μM. Fluorescence intensities were corrected for dilution, buffer fluorescence and screening effects due to the oligonucleotide absorbance at the 295 nm excitation wavelength. To directly fit the fluorescence intensity, I , the Scatchard equation was rewritten as follows:

$$I = I_0 - \frac{(I_0 - I_t)}{L_t} x \frac{(1 + (L_t + nN_t)K_{app}) - \sqrt{(1 + (L_t + nN_t)K_{app})^2 - 4L_t nN_t K_{app}^2}}{2K_{app}} \quad (1)$$

where L_t and N_t designate the total concentration of peptide and oligonucleotide, respectively, I_t represents the fluorescence at the plateau when all the peptide is bound, whereas I_0 and I correspond to the fluorescence intensities of the peptide in the absence and in the presence of a given concentration of oligonucleotide. K_{app} and n correspond to the apparent binding constant and the number of peptide binding sites, respectively. The binding constant of the non fluorescent L³⁷NC(12-55) peptide was determined from competition experiments by adding increasing concentrations of this mutant peptide to a solution of 0.5 μM NC(12-55) and 0.1 μM cTAR. The displacement of NC(12-55) by L³⁷NC(12-55) yielded a fluorescence intensity increase that was fitted according to equation (2) derived from Eq 13 of (43):

$$I = \left(L_t + \frac{1}{2} \left(\frac{I_t}{I_0} - 1 \right) \left(L_t + nN_t + \frac{1}{K_{12-55}} + A_t \frac{K_{L37}}{K_{12-55}} - \sqrt{\left(L_t + nN_t + \frac{1}{K_{12-55}} + A_t \frac{K_{L37}}{K_{12-55}} \right)^2 - 4nL_t N_t} \right) \right) \frac{I_0}{L_t} \quad (2)$$

where A_t designates the total concentration of $L^{37}\text{NC}(12-55)$ while K_{L37} and K_{12-55} designate the binding constants of the $L^{37}\text{NC}(12-55)$ and $\text{NC}(12-55)$ peptides, respectively.

Time-resolved fluorescence spectroscopy measurements were performed with a time-correlated single photon counting technique as previously described (40). The excitation and emission wavelengths for FI were set at 480 and 520 nm, respectively. Time-resolved data analysis was performed by the maximum entropy method using the Pulse5 software (44). The mean lifetime $\langle \tau \rangle$ was calculated from the fluorescence lifetimes, τ_i , and the relative amplitudes, α_i , by $\langle \tau \rangle = \sum_i \alpha_i \tau_i$. The population, α_0 , of dark species in FI-5'-cTAR-3'-TMR was calculated by:

$$\alpha_0 = 1 - \frac{\langle \tau \rangle_{sl}}{\langle \tau \rangle_{dl} \times R_m} \quad (3)$$

where $\langle \tau \rangle_{sl}$ and $\langle \tau \rangle_{dl}$ are the measured mean lifetimes of the singly (FI-5'-cTAR) and doubly (FI-5'-cTAR-3'-TMR) labeled derivatives, respectively. R_m corresponds to the ratio of their steady-state fluorescence intensities. The remaining amplitudes, α_{ic} were recalculated from the measured amplitudes, α_i , according to: $\alpha_{ic} = \alpha_i (1 - \alpha_0)$.

Results

Strategy for the design of NC mutants

In previous studies, the NC(12-55) mutant encompassing the zinc fingers but lacking the N-terminal basic domain (Fig. 2) was found to efficiently destabilize the secondary structure of cTAR (34-36,40). In addition, this mutant was preferred to the native protein since it aggregates with nucleic acids only at high concentration (45). In the present study, contribution of the (1-12) basic domain in NC binding and destabilizing activities was determined by using NC(1-55) at low concentration to prevent aggregation. The respective roles of the two zinc fingers and the importance of their proper location were examined using the 2.2NC(1-55) mutant where the proximal finger was replaced by a copy of the distal finger and the 2.1NC(1-55) mutant where the two zinc fingers were interchanged (46,47). Importance of the proper folding of the two zinc fingers was investigated by substituting the highly conserved CCHC motif of either N- or C-terminal finger by a CCCC motif, in $C^{23}\text{NC}(12-55)$ and $C^{44}\text{NC}(1-55)$ mutants, respectively. This substitution modifies the length of the peptide-to-metal ion bond, leading to a change of the finger folding and surface orientation of the side chains which cause a partial loss of NC functions (47-49). To further investigate the contribution of the zinc fingers, the $(\text{SSHS})_2\text{NC}(1-55)$ peptide was used in which all cysteine residues were replaced by serines in order to prevent zinc binding (24,50). NC(35-50) representing the distal zinc finger was used to test the simultaneous requirement of both finger motifs. The role of Trp³⁷ that is critical for nucleic acid recognition and HIV-1 infectivity (51-59) was assessed by substituting it with a hydrophobic but non aromatic Leu residue in the $L^{37}\text{NC}(12-55)$ mutant. Last, importance of the nature of the aromatic amino acids was determined with the $W^{16}\text{F}^{37}\text{NC}(12-55)$ mutant in which the aromatic amino residues within the zinc fingers have been exchanged.

NC determinants for cTAR DNA binding

To identify NC determinants for cTAR binding, reverse titrations were performed by adding increasing cTAR concentrations to a fixed concentration of each NC mutant (Fig. 3). The binding was monitored by using the Trp³⁷ fluorescence decrease induced by its stacking within the oligonucleotide bases (51,54,56,57). Binding experiments were performed in a buffer containing 25 mM Tris pH 7.5, 30 mM NaCl, 0.2 mM MgCl_2 , which is adequate for the evaluation of NC destabilizing properties (34-36,40,60).

The binding stoichiometry was inferred for each NC mutant from the intersection of the initial slope of the titration with the fluorescence plateau (Fig. 3 inset). For NC(12-55), the number, n , of peptides bound to cTAR is about eight (Table 1), giving an occluded binding site, b , of about seven nucleotides per peptide, in agreement with the previously reported binding size of HIV-1 NC on nucleic acids (55,56,61). This suggests that NC(12-55) fully coats cTAR under the present ionic conditions, in agreement with a previous report on the upper half of cTAR (36). Moreover, as reported with poly(ϵ A) (55), NC(1-55) and NC(12-55) as well as most of their derivatives exhibit the same occluded binding size on cTAR (Table 1). For the C^{23} NC(12-55) and NC(35-50) mutants, the binding affinity was too low to determine the binding stoichiometry. As a consequence, we assumed that the value of b was the same as that for NC(12-55) in the first case and about 3 in the second case (62). Titrations were also performed with NC(1-72) and the fingerless NC(1-72)_{dd}. However, in both cases, strong aggregation precluded a clear determination of the binding parameters.

In a second step, the binding data (Fig. 3) were fitted to Eq. 1 to determine the apparent binding constant, K_{app} , of the various NC derivatives to cTAR. This approach is only semi-quantitative since it is based on the assumption that for a given NC derivative, binding sites are identical and independent. This is clearly not the case since NC binding depends on the oligonucleotide sequence and strandedness (56,61) and may be cooperative (63,64). Nevertheless, this approach was shown to be adequate for comparing the binding affinities of NC(12-55) to various cTAR and PBS variants (36,60). Binding constants are given in Table 1. Interestingly, the binding constant of NC(12-55) for cTAR ($1.7 \times 10^7 M^{-1}$) is close to that previously reported for the upper half of cTAR ($1.0 \times 10^7 M^{-1}$) (36), suggesting that NC binds with nearly the same affinity to both halves of cTAR. A five-fold increase in K_{app} was observed when NC(12-55) was substituted by NC(1-55), suggesting that the N-terminal (1-11) basic domain stabilizes the binding of NC to cTAR. The similarity in the K_{app} values of C^{44} NC(1-55) and NC(1-55) indicates that the native folding of the distal finger is not critical for binding. In contrast, the roughly two orders of magnitude decrease in K_{app} for C^{23} NC(12-55) with respect to NC(12-55) indicates that the native folding of the proximal finger is required for tight binding to cTAR. An even more drastic decrease in K_{app} is observed with NC(35-50) indicating that as for other oligonucleotides (55,65), both NC zinc fingers are required for high affinity binding to cTAR.

In addition, from the minor decrease in K_{app} for both 2.1NC(1-55) and 2.2NC(1-55) mutants with respect to NC(1-55), it might be concluded that the zinc finger context does not play a major role and that the second finger motif can partly substitute for the first one in cTAR binding. The affinity of the (SSH)₂NC(1-55) mutant was too high to be reliably determined and thus only a lower bound value is given. This high affinity may probably be attributed to the high flexibility of this mutant that allows for additional electrostatic interactions. The same explanation probably applies for the rather high affinity of NC(13-61)_{dd} in spite of its limited size.

Due to the absence of Trp residues in the L^{37} NC(12-53) peptide, its binding constant to cTAR was determined through a competition assay. To this end, we monitored the dissociation of a cTAR/NC(12-55) complex (formed at a nucleotide to peptide ratio of 10) by addition of increasing concentrations of L^{37} NC(12-55) (Fig. 4). Since Trp³⁷ does not participate in zinc binding (4), its substitution by Leu is expected to not alter the zinc-driven folding of the peptide and thus to not change its occluded binding size. The fitting of the competition curve with Eq. 2 yielded a K_{app} value as low as that of C^{23} NC(12-55) (Table 1) showing that Trp³⁷ plays a critical role in cTAR binding. In contrast, only a three-fold decrease in the K_{app} value accompanies peptides with permutation of the aromatic amino-acids at positions 16 and 37, indicating that in contrast to the nonaromatic Leu residue, a Phe residue can partly substitute for the Trp residue in cTAR binding.

NC determinants for cTAR DNA destabilization

The nucleic acid destabilizing property of the NC mutants was investigated by steady-state fluorescence spectroscopy using cTAR labeled at its 5' and 3' ends by Rh6G and DABCYL, respectively. As previously shown for various stem loop (SL) labeled sequences, the dyes form a nonfluorescent heterodimer when the SL is closed (34,66). In contrast, melting of the SL opens up the heterodimer and restores Rh6G fluorescence. The melting ability of a given NC mutant can thus be evaluated from $I_{+peptide}/I_{-peptide}$, the ratio of the fluorescence intensity in the presence to that in the absence of peptide (Table 1). This ratio will be equal to 25 for the complete melting of the entire population of cTAR molecules and to 1 if the peptide exhibits no melting activity. Partial melting will provide intermediate values. Since melting of cTAR by NC(12-55) has been shown to depend on the coating of the oligonucleotide by the peptide (40), the melting potencies of the various NC derivatives should be compared at similar levels of binding to cTAR. To this end, we calculate from the binding parameters (Table 1), the fraction, ν , of cTAR nucleotides coated by the peptides under the conditions used for measuring their melting ability (Table 2). Additional information was obtained by time-resolved fluorescence using cTAR labeled at its 5' and 3' ends by Fl and TMR, respectively. Though the Fl-TMR dye pair is less sensitive to destabilization than the Rh6G-DABCYL pair, the time-resolved fluorescence decay of Fl is simpler than that for Rh6G and can be used to determine the extent of melting (Fig. 1). Indeed, the three lifetime components, τ_1 - τ_3 , of Fl in TMR-5'-cTAR-3'-Fl have been associated with the melting of the terminal 3 bp segment, the lower half of cTAR, and the whole cTAR molecule, respectively (35,40). Moreover, these partly melted species were found to be in equilibrium with a population, α_0 , of closed dark species (associated with a null lifetime) representing 75 to 80% (Table 3).

As shown in Table 2, an approximately 7-fold increase of the Rh6G fluorescence intensity in 5'-Rh6G-cTAR-3'-DABCYL was measured when NC(12-55) was added at a ratio of 5 nucleotides (nt) per peptide, indicating a partial melting of cTAR (35,40). This is confirmed by the large NC(12-55)-induced decrease of α_0 (from 74% to 46%) in 5'-TMR-cTAR-3'-Fl (Table 3). Further examination of the time-resolved parameters reveals that NC(12-55) does not generate new species (as assessed by the absence of changes in the lifetime values) but shifts the equilibrium toward the partially opened species and notably those where the lower half of the cTAR stem is melted (as indicated by the large increase in the α_2 value).

Substituting NC(12-55) by the native NC protein provides similar $I_{+peptide}/I_{-peptide}$ (Table 2) and α_i (Table 3) values, indicating that the two peptides exhibit similar destabilizing activities on cTAR. This comparison is relevant in this case since the two peptides coat cTAR molecules similarly ($\nu=87\%$ for NC(12-55) and $\nu=97\%$ for NC(1-55)). This similar behavior strongly suggests that the N-terminal basic domain (residues 1 to 11) marginally contributes to NC's destabilizing activity.

To investigate the role of the zinc fingers in cTAR destabilization, the fingerless NC(13-61)_{dd} and the non structured (SSHS)₂NC(1-55) peptides were tested. These peptides did not increase the fluorescence of the doubly labeled cTAR (Table 2) in spite of their high affinity (Table 1), indicating that the folded zinc fingers are essential determinants of NC's destabilizing activity. A limited destabilization of cTAR was observed when C²³NC(12-55) was added at a concentration of 1 μ M (Table 2). This limited effect could be partially attributed to the low affinity of this mutant for cTAR (Table 1), since only about 25% of the cTAR nucleotides were coated by the peptide at this concentration (Table 2). A significant increase of the $I_{+peptide}/I_{-peptide}$ value was observed when C²³NC(12-55) concentration was increased. Nevertheless, if C²³NC(12-55) and NC(12-55) are compared at the same level of

cTAR coating (compare C²³NC(12-55) at 10 μM with NC(12-55) at 1 μM), the destabilizing activity of C²³NC(12-55) still appears less than that of NC(12-55) (Table 2). This suggests that in addition to its role in binding, the native folding of the N-terminal finger motif is required for cTAR destabilization. Time-resolved data further indicate that the smaller fluorescence increase induced by C²³NC(12-55) as compared with NC(12-55) is related to a smaller increase in the α_2 and α_3 values (Table 3). Since, in contrast, the α_1 values are identical for both peptides, it can be concluded that C²³NC(12-55) promotes the melting of the terminal base pairs but does not efficiently propagate it to upper base pairs.

In contrast, substitution of His⁴⁴ by Cys in the distal zinc finger did not modify NC destabilizing activity since C⁴⁴NC(1-55) exhibited wild type potency in melting cTAR secondary structure (Table 2). This suggests that the two zinc fingers are not functionally equivalent in destabilizing nucleic acids. In line with this conclusion, the limited fluorescence increase of Rh6G-5'-cTAR-3'-DABCYL (Table 2) and the limited decrease in the α_0 value of TMR-5'-cTAR-3'-F1 (Table 3) promoted by 2.1NC(1-55) further indicate that the two fingers cannot be exchanged for this activity. Moreover, the small α_2 value (0.11) obtained with 2.1NC(1-55) suggests that this peptide does not efficiently propagate the initial melting up to the middle of cTAR stem. Interestingly, the 2.2NC(1-55) mutant which has a redundant distal zinc finger exhibits a destabilizing activity higher than 2.1NC(1-55) but lower than NC(1-55), indicating that the distal finger can only partly substitute for the proximal finger but also plays an important role in NC's destabilizing property at its proper position. When used alone, this zinc finger was unable to melt cTAR secondary structure, even at a 30 μM concentration where about one third of cTAR is coated by this peptide. Similar results were obtained with the proximal finger (data not shown), indicating that the two fingers are required for destabilizing cTAR secondary structure. Moreover, the wild type destabilizing potency of C⁴⁴NC(1-55) further suggests that the native folding of the distal finger is probably not critical for NC's destabilizing activity.

L³⁷NC(12-55) appears to behave similarly to C²³NC(12-55) since the limited destabilization of cTAR promoted by L³⁷NC(12-55) can be due, at least in part, to its low affinity for cTAR. In addition, at a similar level of binding, the destabilizing activity of L³⁷NC(12-55) represents only 50% of the wild type activity, indicating that stacking of the Trp³⁷ aromatic ring with cTAR bases plays an important role in cTAR destabilization. Furthermore, the time-resolved parameters indicate that the Trp³⁷ to Leu mutation mainly affects the α_2 value (Table 3), suggesting that Trp³⁷ is required for propagation of the melting up to the middle of the cTAR stem. Although an aromatic amino acid seems to be required at position 37, its nature seems less important since W^{16F37}NC(12-55) with Trp³⁷ substituted by Phe has almost the same activity as NC(12-55).

Discussion

In the present study, the cTAR binding and destabilizing properties of a series of NC derivatives were examined to identify the NC structural determinants for nucleic acid binding and destabilization. Binding was monitored by the Trp³⁷ fluorescence decrease upon addition of cTAR while destabilization of cTAR secondary structure was monitored with doubly-labelled cTAR derivatives. In contrast to assays that monitor the overall NC-promoted strand transfer activity or self-priming inhibition (18,19,24,37), the present assay specifically examines the destabilizing component of NC chaperone activity. As a consequence, the inability of the fingerless NC(13-61)_{dd} peptide, the non structured (SSHS)₂NC(1-55) mutant and the isolated zinc fingers to promote cTAR destabilization indicates that both of the folded zinc fingers in their natural context are required for this activity. The inability of (SSHS)₂NC(1-55) to destabilize cTAR secondary structure is consistent with its inability to alter the cooperativity of the helix-coil transition of λ-DNA molecules (29) and may explain

its poor effect in blocking cTAR-induced self-priming and promoting minus strand transfer (24). The inefficiency of (SSHS)₂NC(1-55) in cTAR destabilization is clearly not connected with its binding ability, since this mutant binds even tighter than the native protein to cTAR at least at the low salt concentrations used in this study. As previously reported for NC(1-55) that has been chemically modified to prevent the binding of Zn²⁺ (55), (SSHS)₂NC(1-55) probably binds to cTAR mainly through electrostatic interactions that compensate for the loss of hydrophobic interactions that cannot form when the fingers are unfolded. This mutant also shows that there is no direct correlation between binding affinity and encapsidation, and infectivity since HIV-1 molecular clones with this NC mutation exhibit strong defects in viral RNA packaging and are not infectious (24). In line with previous data on poly(εA) (55), the isolated finger motifs bind weakly to cTAR, indicating that both fingers are required for proper recognition of their nucleic acid targets. Interestingly, the inability of both isolated finger motifs to destabilize cTAR, even at concentrations sufficient to significantly coat cTAR molecules suggests that the structural information required for cTAR destabilization is distributed among both finger motifs and that the two fingers act in a concerted fashion.

Data on the C²³NC(12-55) mutant indicate that the proper folding of the proximal finger motif is critical for cTAR binding. This may be related to the hydrophobic cleft formed by Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴ and Ala²⁵ thought to be crucial in nucleic acid recognition (51,53,54) but disrupted by the His²³ to Cys mutation (48). The resulting decrease in K_{app} observed with this mutation is significantly larger with cTAR than with poly(εA) (55). This difference may be attributed both to the non-specific nature of poly(εA) and the very low salt concentration used in the poly(εA) study. These two factors favor non-specific electrostatic interactions over specific nonelectrostatic interactions and may thus reduce the differences in affinity between these NC peptides. Proper folding of the proximal finger motif also appears to be required for NC destabilizing activity, suggesting that the hydrophobic platform in the folded finger may at least partly constitute the molecular basis for this activity. Both the low binding constant and the poor destabilizing activity of the C²³ NC mutant may explain its limited ability to stimulate minus-strand transfer and inhibit self-priming *in vitro* (37). However, since the same mutation affects only moderately the strand transfers *in vivo* (49), the higher concentration of the mutated NC protein in the virions, compared to that in the *in vitro* assays is probably sufficient to compensate for its lower binding and destabilizing properties.

On the other hand, changing the distal CCHC finger to CCCC has little influence on NC binding and destabilizing properties, indicating that the native folding of the distal zinc finger is less critical for both activities. It is likely that due to the plasticity of the NC molecule, the key elements in the distal finger are accessible to cTAR interactions even when the folding of this finger is sub-optimal. The significant destabilizing activity of C⁴⁴NC(1-55) is in line with the limited impacts of this mutation on viral DNA synthesis *in vivo* (47,67).

The strong binding affinity of 2.1NC(1-55) to cTAR further indicates that the position of the two finger motifs in NC is not critical for nucleic acid binding (55). However, the limited ability of 2.1NC(1-55) to destabilize cTAR suggests that the respective position of the zinc fingers is an important structural factor for this activity. In agreement with the above conclusions, data with mutant 2.2NC(1-55) suggests that the distal finger may substitute for the proximal one for binding but only partly for destabilization. Though the conclusions on the position and context of the fingers are qualitatively in line with the data on stimulation of minus strand transfer and inhibition of self-priming (37), they differ quantitatively since both 2.1NC(1-55) and 2.2NC(1-55) mutants were totally ineffective in the latter two activities. Since the proximal finger in its proper position was recently shown to play a greater role than the distal finger in the annealing of highly structured DNA and RNA oligonucleotides (68), it is likely that the 2.1NC(1-55) and 2.2NC(1-55) mutants may be unable to destabilize the more stable TAR RNA, explaining their inability to promote strand transfer.

The Trp³⁷ residue was found to be critical for cTAR binding and destabilization. As already shown for other DNA or RNA sequences (51,52,54,56,69), the strong energetic contribution of Trp³⁷ in cTAR binding is probably due to its stacking, especially with the G residues. This stacking probably destabilizes cTAR by distorting the geometry of the stacked bases in the double strand and by weakening their pairing with the complementary bases. Assuming that a similar function may be exerted by the hydrophobic platform of the proximal finger motif, one can speculate that the combined effects of the two fingers locally unwind cTAR secondary structure. Since the lower half of cTAR stem has a rather limited stability (36), this cTAR structure is probably melted by bound NC molecules acting in a coordinated manner. The dramatic effects observed with the Trp³⁷ to Leu substitution on cTAR binding and destabilization are in line with the loss of NC-promoted tRNA^{Lys,3} annealing to the genomic primer binding site observed with the same mutation (58) and may explain, at least in part, why HIV-1 carrying the Trp³⁷ to Ala mutation is not infectious (59). In contrast, both binding and destabilization activities of NC were only slightly reduced when Phe¹⁶ and Trp³⁷ were exchanged. This is in agreement with the strong conservation of aromatic residues at these positions and the limited dependence of HIV infectivity on the nature of the aromatic residue (59).

Finally, the N-terminal domain of NC stabilizes the binding of NC to cTAR but poorly contributes to cTAR destabilization. As reported earlier, this highly basic domain likely promotes the annealing step by screening the negative charges of the oligonucleotides.

In conclusion, we present here evidences showing that the NC destabilizing property is provided by the two fingers in their natural context. The proper folding of the proximal finger as well as the Trp³⁷ residue in the distal finger are required for both the binding and destabilizing properties of NC, suggesting that the hydrophobic platform composed of Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴, Ala²⁵ and Trp³⁷ is a critical determinant for nucleic acid binding and destabilization. Through the coating of cTAR by NC molecules, the hydrophobic platform of each bound NC molecule probably initiates melting of the cTAR terminus and propagates this melting up to the middle of the cTAR stem.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), Sidaction (Ensemble Contre le Sida), the European Community (TRIoH integrated project FP6-503480) and Federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health under contract No. NO1-CO-12400 with SAIC-Frederick, Inc. HB was a fellow from the Ministère de la Recherche et des Technologies. We would also like to thank Donald G. Johnson and Catherine V. Hixson of SAIC Frederick, Inc. for their assistance in preparing the recombinant nucleocapsid proteins.

References

1. Swanstrom, R. and Wills, J.W. (1997) Synthesis, assembly and processing of viral proteins In Coffin, M., Hughes, S. H. and Varmus, H. E. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 263-334.
2. Henderson, L.E., Bowers, M.A., Sowder, R.C., 2nd, Serabyn, S.A., Johnson, D.G., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Bryant, D.K. and Fenselau, C. (1992) Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences *J Virol.*, **66**, 1856-1865.
3. Mervis, R.J., Ahmad, N., Lillehoj, E.P., Raum, M.G., Salazar, F.H., Chan, H.W. and Venkatesan, S. (1988) The gag gene products of human immunodeficiency virus type

- 1: alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors *J Virol.*, **62**, 3993-4002.
4. Mely, Y., De Rocquigny, H., Morellet, N., Roques, B.P. and Gerad, D. (1996) Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy *Biochemistry.*, **35**, 5175-5182.
 5. Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1992) Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR *Embo J.*, **11**, 3059-3065.
 6. Morellet, N., de Rocquigny, H., Mely, Y., Jullian, N., Demene, H., Ottmann, M., Gerard, D., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1994) Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR *J Mol Biol.*, **235**, 287-301.
 7. Omichinski, J.G., Clore, G.M., Sakaguchi, K., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1991) Structural characterization of a 39-residue synthetic peptide containing the two zinc binding domains from the HIV-1 p7 nucleocapsid protein by CD and NMR spectroscopy *FEBS Lett.*, **292**, 25-30.
 8. South, T.L., Blake, P.R., Sowder, R.C., 3rd, Arthur, L.O., Henderson, L.E. and Summers, M.F. (1990) The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers *Biochemistry.*, **29**, 7786-7789.
 9. Surovoy, A., Dannull, J., Moelling, K. and Jung, G. (1993) Conformational and nucleic acid binding studies on the synthetic nucleocapsid protein of HIV-1 *J Mol Biol.*, **229**, 94-104.
 10. Lee, B.M., De Guzman, R.N., Turner, B.G., Tjandra, N. and Summers, M.F. (1998) Dynamical behavior of the HIV-1 nucleocapsid protein *J Mol Biol.*, **279**, 633-649.
 11. Mely, Y., Jullian, N., Morellet, N., De Rocquigny, H., Dong, C.Z., Piemont, E., Roques, B.P. and Gerard, D. (1994) Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer *Biochemistry.*, **33**, 12085-12091.
 12. Ramboarina, S., Srividya, N., Atkinson, R.A., Morellet, N., Roques, B.P., Lefevre, J.F., Mely, Y. and Kieffer, B. (2002) Effects of temperature on the dynamic behaviour of the HIV-1 nucleocapsid NCp7 and its DNA complex *J Mol Biol.*, **316**, 611-627.
 13. Rein, A., Henderson, L.E. and Levin, J.G. (1998) Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication *Trends Biochem Sci.*, **23**, 297-301.
 14. Cristofari, G. and Darlix, J.L. (2002) The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, **72**, 223-268.
 15. Tsuchihashi, Z. and Brown, P.O. (1994) DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein *J Virol.*, **68**, 5863-5870.
 16. Urbaneja, M.A., Wu, M., Casas-Finet, J.R. and Karpel, R.L. (2002) HIV-1 nucleocapsid protein as a nucleic acid chaperone: spectroscopic study of its helix-destabilizing properties, structural binding specificity, and annealing activity *J. Mol. Biol.*, **318**, 749-764.
 17. Lapadat-Tapolsky, M., Pernelle, C., Borie, C. and Darlix, J.L. (1995) Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1 *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2434-2441.
 18. You, J.C. and McHenry, C.S. (1994) Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription *J Biol Chem.*, **269**, 31491-31495.

19. Darlix, J.L., Vincent, A., Gabus, C., de Rocquigny, H. and Roques, B. (1993) Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA *C R Acad Sci III.*, **316**, 763-771.
20. Driscoll, M.D. and Hughes, S.H. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein can prevent self-priming of minus-strand strong stop DNA by promoting the annealing of short oligonucleotides to hairpin sequences *J Virol.*, **74**, 8785-8792.
21. Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J.L., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1993) Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains *J Mol Biol.*, **229**, 382-397.
22. Davis, T.M., McFail-Isom, L., Keane, E. and Williams, L.D. (1998) Melting of a DNA hairpin without hyperchromism *Biochemistry.*, **37**, 6975-6978.
23. Guo, J., Wu, T., Bess, J., Henderson, L.E. and Levin, J.G. (1998) Actinomycin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 minus-strand transfer in in vitro and endogenous reverse transcriptase assays *J Virol.*, **72**, 6716-6724.
24. Guo, J., Wu, T., Anderson, J., Kane, B.F., Johnson, D.G., Gorelick, R.J., Henderson, L.E. and Levin, J.G. (2000) Zinc finger structures in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein facilitate efficient minus- and plus-strand transfer *J Virol.*, **74**, 8980-8988.
25. Guo, J., Henderson, L.E., Bess, J., Kane, B. and Levin, J.G. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA *J Virol.*, **71**, 5178-5188.
26. Lapadat-Tapolsky, M., Gabus, C., Rau, M. and Darlix, J.L. (1997) Possible roles of HIV-1 nucleocapsid protein in the specificity of proviral DNA synthesis and in its variability *J Mol Biol.*, **268**, 250-260.
27. Golinelli, M.P. and Hughes, S.H. (2003) Secondary structure in the nucleic acid affects the rate of HIV-1 nucleocapsid-mediated strand annealing *Biochemistry.*, **42**, 8153-8162.
28. Hargittai, M.R., Mangla, A.T., Gorelick, R.J. and Musier-Forsyth, K. (2001) HIV-1 nucleocapsid protein zinc finger structures induce tRNA(Lys,3) structural changes but are not critical for primer/template annealing *J Mol Biol.*, **312**, 985-997.
29. Williams, M.C., Rouzina, I., Wenner, J.R., Gorelick, R.J., Musier-Forsyth, K. and Bloomfield, V.A. (2001) Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 6121-6126.
30. Johnson, P.E., Turner, R.B., Wu, Z.R., Hairston, L., Guo, J., Levin, J.G. and Summers, M.F. (2000) A mechanism for plus-strand transfer enhancement by the HIV-1 nucleocapsid protein during reverse transcription *Biochemistry.*, **39**, 9084-9091.
31. Hong, M.K., Harbron, E.J., O'Connor, D.B., Guo, J., Barbara, P.F., Levin, J.G. and Musier-Forsyth, K. (2003) Nucleic acid conformational changes essential for HIV-1 nucleocapsid protein-mediated inhibition of self-priming in minus-strand transfer *J Mol Biol.*, **325**, 1-10.
32. Allain, B., Lapadat-Tapolsky, M., Berlioz, C. and Darlix, J.L. (1994) Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome *Embo J.*, **13**, 973-981.
33. Cimarelli, A. and Darlix, J.L. (2002) Assembling the human immunodeficiency virus type 1 *Cell Mol Life Sci.*, **59**, 1166-1184.

34. Azoulay, J., Clamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P. and Mely, Y. (2003) Destabilization of the HIV-1 Complementary Sequence of TAR by the Nucleocapsid Protein Through Activation of Conformational Fluctuations *J Mol Biol.*, **326**, 691-700.
35. Beltz, H., Azoulay, J., Bernacchi, S., Clamme, J.P., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2003) Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 cTAR DNA on its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7 *J Mol Biol.*, **328**, 95-108.
36. Beltz, H., Piemont, E., Schaub, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2004) Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7 *J Mol Biol.*, **338**, 711-723.
37. Guo, J., Wu, T., Kane, B.F., Johnson, D.G., Henderson, L.E., Gorelick, R.J. and Levin, J.G. (2002) Subtle alterations of the native zinc finger structures have dramatic effects on the nucleic acid chaperone activity of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein *J Virol.*, **76**, 4370-4378.
38. Williams, M.C., Rouzina, I. and Bloomfield, V.A. (2002) Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments *Acc Chem Res.*, **35**, 159-166.
39. De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B. and Darlix, J.L. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **89**, 6472-6476.
40. Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2002) HIV-1 Nucleocapsid Protein Activates Transient Melting of Least Stable Parts of the Secondary Structure of TAR and its Complementary Sequence *J Mol Biol.*, **317**, 385-399.
41. Carreau, S., Gorelick, R.J. and Bushman, F.D. (1999) Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein *J. Virol.*, **73**, 6670-6679.
42. De Rocquigny, H., Ficheux, D., Gabus, C., Fournie-Zaluski, M.C., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1991) First large scale chemical synthesis of the 72 amino acid HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 in an active form *Biochem Biophys Res Commun.*, **180**, 1010-1018.
43. Kubala, M., Plasek, J. and Amler, E. (2004) Fluorescence competition assay for the assessment of ATP binding to an isolated domain of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase *Physiol Res.*, **53**, 109-113.
44. Livesey, A.K., and Brochon, J.C. (1987) Analyzing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method. *Biophys J.*, **52**, 693-706.
45. Stoylov, S.P., Vuilleumier, C., Stoylova, E., De Rocquigny, H., Roques, B.P., Gerard, D. and Mely, Y. (1997) Ordered aggregation of ribonucleic acids by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein *Biopolymers.*, **41**, 301-312.
46. Gorelick, R.J., Chabot, D.J., Rein, A., Henderson, L.E. and Arthur, L.O. (1993) The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent *J Virol.*, **67**, 4027-4036.
47. Gorelick, R.J., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Wiltrout, T.A., Coren, L.V., Chabot, D.J., Lifson, J.D., Henderson, L.E. and Arthur, L.O. (1999) Strict conservation of the retroviral nucleocapsid protein zinc finger is strongly influenced by its role in viral infection processes: characterization of HIV-1 particles containing mutant nucleocapsid zinc-coordinating sequences *Virology.*, **256**, 92-104.

48. Demene, H., Dong, C.Z., Ottmann, M., Rouyez, M.C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., Saragosti, S. *et al.* (1994) 1H NMR structure and biological studies of the His23-->Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity *Biochemistry.*, **33**, 11707-11716.
49. Tanchou, V., Decimo, D., Pechoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M. and Darlix, J.L. (1998) Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication *J Virol.*, **72**, 4442-4447.
50. Green, L.M. and Berg, J.M. (1990) Retroviral nucleocapsid protein-metal ion interactions: folding and sequence variants *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **87**, 6403-6407.
51. Morellet, N., Demene, H., Teilleux, V., Huynh-Dinh, T., de Rocquigny, H., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1998) Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC) *J Mol Biol.*, **283**, 419-434.
52. Maki, A.H., Ozarowski, A., Misra, A., Urbaneja, M.A. and Casas-Finet, J.R. (2001) Phosphorescence and optically detected magnetic resonance of HIV-1 nucleocapsid protein complexes with stem-loop sequences of the genomic Psi-recognition element *Biochemistry.*, **40**, 1403-1412.
53. 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.
54. 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.
55. Urbaneja, M.A., Kane, B.P., Johnson, D.G., Gorelick, R.J., Henderson, L.E. and Casas-Finet, J.R. (1999) Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function *J Mol Biol.*, **287**, 59-75.
56. Vuilleumier, C., Bombarda, E., Morellet, N., Gerard, D., Roques, B.P. and Mely, Y. (1999) Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study *Biochemistry.*, **38**, 16816-16825.
57. Bombarda, E., Ababou, A., Vuilleumier, C., Gerard, D., Roques, B.P., Piemont, E. and Mely, Y. (1999) Time-resolved fluorescence investigation of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein: influence of the binding of nucleic acids *Biophys J.*, **76**, 1561-1570.
58. Remy, E., de Rocquigny, H., Petitjean, P., Muriaux, D., Theilleux, V., Paoletti, J. and Roques, B.P. (1998) The annealing of tRNA^{Lys} to human immunodeficiency virus type 1 primer binding site is critically dependent on the NCp7 zinc fingers structure *J Biol Chem.*, **273**, 4819-4822.
59. 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.
60. Egele, C., Schaub, E., Ramalanjaona, N., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2004) HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds to the Viral DNA Initiation Sequences and Chaperones their Kissing Interactions *J Mol Biol.*, **342**, 453-466.

61. Fisher, R.J., Rein, A., Fivash, M., Urbaneja, M.A., Casas-Finet, J.R., Medaglia, M. and Henderson, L.E. (1998) Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides *J Virol.*, **72**, 1902-1909.
62. Mely, Y., de Rocquigny, H., Piemont, E., Demene, H., Jullian, N., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B. and Gerard, D. (1993) Influence of the N- and C-terminal chains on the zinc-binding and conformational properties of the central zinc-finger structure of Moloney murine leukaemia virus nucleocapsid protein: a steady-state and time-resolved fluorescence study *Biochim Biophys Acta.*, **1161**, 6-18.
63. Mely, Y., de Rocquigny, H., Sorinas-Jimeno, M., Keith, G., Roques, B.P., Marquet, R. and Gerard, D. (1995) Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific *J Biol Chem.*, **270**, 1650-1656.
64. Khan, R. and Giedroc, D.P. (1992) Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA *J Biol Chem.*, **267**, 6689-6695.
65. Stote, R.H., Kellenberger, E., Muller, H., Bombarda, E., Roques, B.P., Kieffer, B. and Mely, Y. (2004) Structure of the His44 --> Ala Single Point Mutant of the Distal Finger Motif of HIV-1 Nucleocapsid Protein: A Combined NMR, Molecular Dynamics Simulation, and Fluorescence Study *Biochemistry.*, **43**, 7687-7697.
66. Bernacchi, S. and Mely, Y. (2001) Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure *Nucleic Acids Res.*, **29**, E62.
67. Buckman, J.S., Bosche, W.J. and Gorelick, R.J. (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**, 1469-1480.
68. Heath, M.J., Derebail, S.S., Gorelick, R.J. and DeStefano, J.J. (2003) Differing roles of the N- and C-terminal zinc fingers in human immunodeficiency virus nucleocapsid protein-enhanced nucleic acid annealing *J Biol Chem.*, **278**, 30755-30763.
69. 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.

Figure legends

Figure 1. cTAR sequence and chemical structures of the dyes. The cTAR DNA is the complementary DNA copy of the TAR RNA sequence from the HIV-1 MAL strain. The equilibrium between the closed form and the various melted forms has been drawn according to the data described previously (35,36). In the doubly labeled TMR-5'-cTAR-3'-Fl species, these various forms are characterized by the lifetimes, τ_i , and relative populations, α_i , presented in Table 3. NC shifted this equilibrium toward the melted forms.

Figure 2. Sequences of HIV-1 NC derivatives used in this study. The arrows show the positions where residues were substituted.

Figure 3. Binding curves of NC derivatives with cTAR. Peptide concentration was 0.2 to 1.5 μ M in 25 mM Tris, 30 mM NaCl and 0.2 mM MgCl₂, pH 7.5. Excitation and emission wavelengths were 295 and 350 nm, respectively. Solid lines correspond to the fit of the experimental points [(NC(1-55) (solid square), NC(12-55) (solid diamond), W¹⁶F³⁷NC(12-55) (solid triangle) and NC(35-50) (solid circle)] with Eq. 1 and the parameters of Table 1. Inset: determination of the binding stoichiometry for NC(12-55). The intercept of the initial slope with the plateau gives the number of NC(12-55) binding sites on cTAR.

Figure 4. Determination of the binding constant of L³⁷NC(12-55) for cTAR. L³⁷NC(12-55) was competed from 100 nM cTAR with NC(12-55) (at a concentration of 500

nM) to determine its binding constant. The fluorescence intensity of NC(12-55) was monitored with an excitation wavelength of 295 nm and an emission wavelength of 350 nm. The experimental data (solid square) were fitted with Eq. 2 to derive the binding constant of L³⁷NC(12-55).

Tables

Table 1 : Binding parameters of the different NC derivatives to cTAR^a.

<i>Peptides</i>	$K_{app} (M^{-1})^b$	n^b	b^c
NC(12-55)	$1.7(\pm 0.2) \times 10^7$	7.6 ± 0.6	7.2
NC(1-55)	$1(\pm 0.2) \times 10^8$	7.8 ± 0.4	7
C ⁴⁴ NC(1-55)	$1.5(\pm 0.3) \times 10^8$	8.0 ± 0.6	6.9
C ²³ NC(12-55)	$3.9(\pm 0.5) \times 10^5$	8^d	6.9
NC(35-50)	$1.5(\pm 0.2) \times 10^4$	18^d	3
2.1NC(1-55)	$3(\pm 2) \times 10^7$	9.2 ± 0.6	6
2.2NC(1-55)	$2.9(\pm 0.9) \times 10^7$	8.1 ± 0.2	6.8
(SSHS) ₂ NC(1-55)	$> 5 \times 10^8$	8.3 ± 0.6	6.6
NC(13-61) _{dd}	$3.9(\pm 1.5) \times 10^6$	8.4 ± 0.7	6.5
L ³⁷ NC(12-55)	$3.4(\pm 1.0) \times 10^{5e}$	8^d	6.9
W ¹⁶ F ³⁷ NC(12-55)	$6(\pm 2) \times 10^6$	7.4 ± 0.6	7.4

^a Binding experiments were performed in 25 mM Tris, 30 mM NaCl, 0.2 mM MgCl₂, pH 7.5.

^b The number, n , of binding sites was determined at 1.5-2 μ M peptide, as described in the text and Fig. 3. The K_{app} value was calculated at 0.2 to 1.5 μ M peptide by fitting the data in Fig. 3 to Eq. 1 and fixing the number of binding sites to its closest integer. The n and K_{app} values are expressed as means \pm standard error of the mean for at least two to three experiments.

^c b designates the occluded binding site calculated by dividing the number of cTAR nucleotides by n .

^d The n values for NC(35-50), C²³NC(12-55) and L³⁷NC(12-55) were fixed as described in the text.

^e The binding affinity of L³⁷NC(1-55) was determined by fitting the data of Fig. 4 with Eq. 2.

Table 2: Destabilization of cTAR by NC derivatives, as monitored from steady-state fluorescence spectroscopy^a

<i>Peptides</i>	<i>concentration</i> (μM)	r^b	$I_{+peptide}/I_{-peptide}^b$	ν^b (%)
NC(12-55)	1	5	6.9±0.9	87
NC(1-55)	1	5	6.9±0.9	97
NC(13-61) _{dd}	1	5	1	66
	3	1.7	aggregation	
(SSH) ₂ NC(1-55)	1	5	1.2± 0.1	99
C ²³ NC(12-55)	1	5	1.6± 0.1	24
	3	1.7	2.6± 0.1	51
	10	0.5	4.9± 0.8	79
C ⁴⁴ NC(1-55)	1	5	6.5±1.5	98
2.1NC(1-55)	1	5	3.2± 0.1	89
2.2NC(1-55)	1	5	4.3± 0.2	91
NC(35-50)	1	5	1± 0.1	1
	30	0.17	1± 0.1	31
L ³⁷ NC(12-55)	1	5	1.8± 0.1	22
	3	1.7	2.8± 0.4	47
	10	0.5	3.6± 0.2	76
	30	0.17	aggregation	
W ¹⁶ F ³⁷ NC(12-55)	1	5	5.8± 0.4	74
	2.5	2	8.4± 0.9	91

^a Experiments were performed with Rh6G-5'-cTAR-3'DABCYL in the same buffer as in Table 1.

^b r designates the ratio of nucleotides to peptide. The $I_{+peptide}/I_{-peptide}$ ratio designates the fluorescence intensity of the doubly-labelled cTAR in the presence to that in the absence of peptide. This parameter describes the potency of each peptide to melt cTAR secondary structure. Excitation and emission wavelengths are 480 and 550 nm, respectively. ν designates the fraction of cTAR nucleotides coated by the peptides, as calculated from the binding parameters in Table 1.

Table 3: Destabilization of cTAR by NC derivatives, as visualized by time-resolved fluorescence spectroscopy^a.

Peptides	Concentration (μM)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	$\langle\tau\rangle$ (ns)	R_m	α_0
cTAR-3'-Fl				2.53 \pm 0.15	0.15	4.35 \pm 0.10	0.85	4.07		
TMR-5'-cTAR-3'-Fl		0.12 \pm 0.01	0.14	1.30 \pm 0.09	0.04	4.00 \pm 0.08	0.08	1.56	10.0	0.74
NC(12-55)	1	0.15 \pm 0.02	0.18	1.39 \pm 0.06	0.20	3.76 \pm 0.05	0.16	1.69	4.5	0.46
NC(1-55)	1	0.16 \pm 0.01	0.23	1.30 \pm 0.15	0.23	3.95 \pm 0.33	0.07	1.17	6.6	0.47
C ²³ NC(12-55)	1	0.15 \pm 0.02	0.12	1.21 \pm 0.12	0.07	3.84 \pm 0.15	0.08	1.49	10.0	0.73
	10	0.19 \pm 0.02	0.18	1.36 \pm 0.02	0.11	3.90 \pm 0.05	0.08	1.35	8.2	0.63
2.1NC(1-55)	1	0.14 \pm 0.01	0.23	1.06 \pm 0.03	0.11	3.70 \pm 0.01	0.08	1.06	9.1	0.58
2.2NC(1-55)	1	0.17 \pm 0.01	0.16	1.22 \pm 0.10	0.21	3.58 \pm 0.14	0.15	1.58	5.0	0.48
L ³⁷ NC(12-55)	1	0.13 \pm 0.02	0.15	1.20 \pm 0.06	0.08	4.01 \pm 0.06	0.09	1.42	9.1	0.68
	10	0.14 \pm 0.02	0.27	1.07 \pm 0.03	0.09	3.93 \pm 0.10	0.07	0.95	10	0.57
W ¹⁶ F ³⁷ NC(12-55)	1	0.16 \pm 0.03	0.14	1.35 \pm 0.08	0.17	3.72 \pm 0.10	0.16	1.81	4.8	0.53

^a cTAR was labeled by TMR and Fl at its 5' and 3' ends, respectively. The lifetimes, τ_i , of the doubly-labeled cTAR molecules with the more representative NC derivatives are expressed as means \pm standard error of the mean for at least three experiments. The standard error of the mean for the relative amplitudes, α_i , are usually below 15 %. R_m designates the ratio of the fluorescence intensity of the singly labeled cTAR-3'-Fl derivative in the absence of peptide to that of the doubly labeled one in the absence or in the presence of the NC derivatives. The relative amplitude, α_0 , of the dark species is calculated by Eq. 3.

Figures

Figure 1

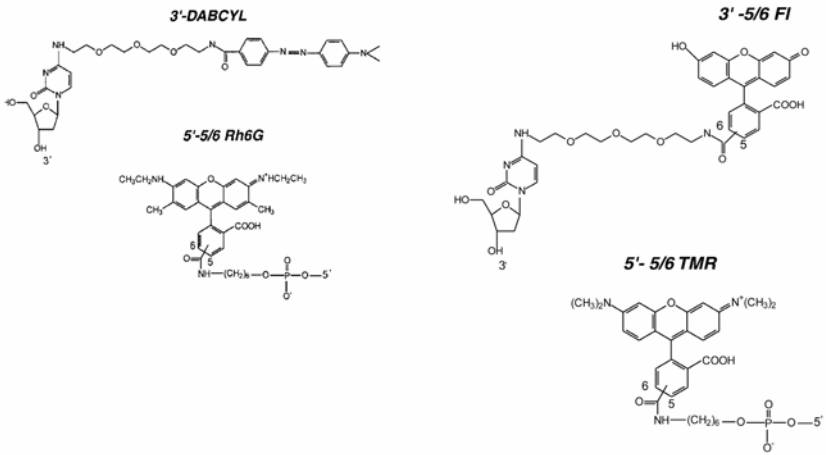
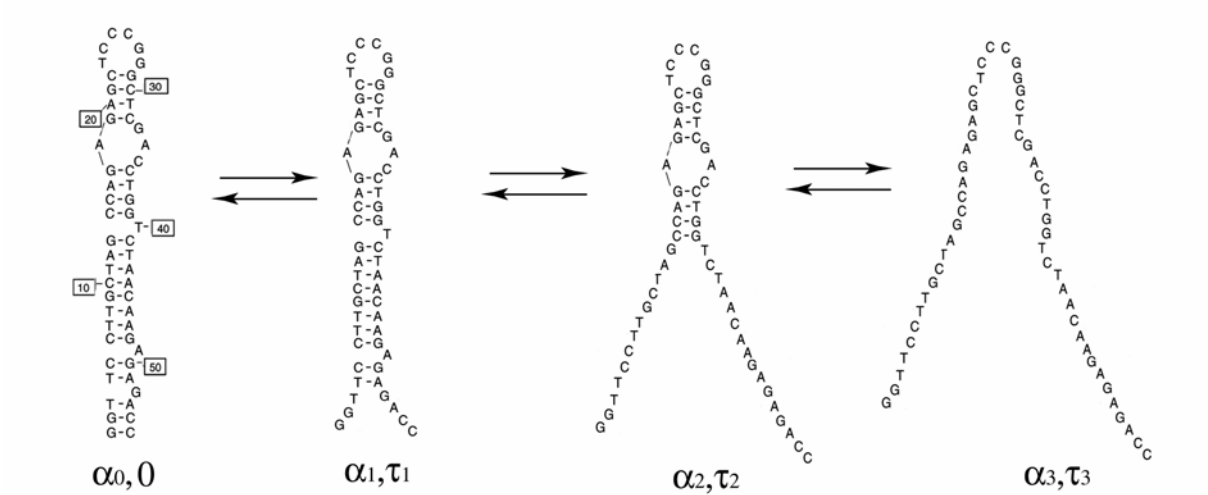


Figure 2

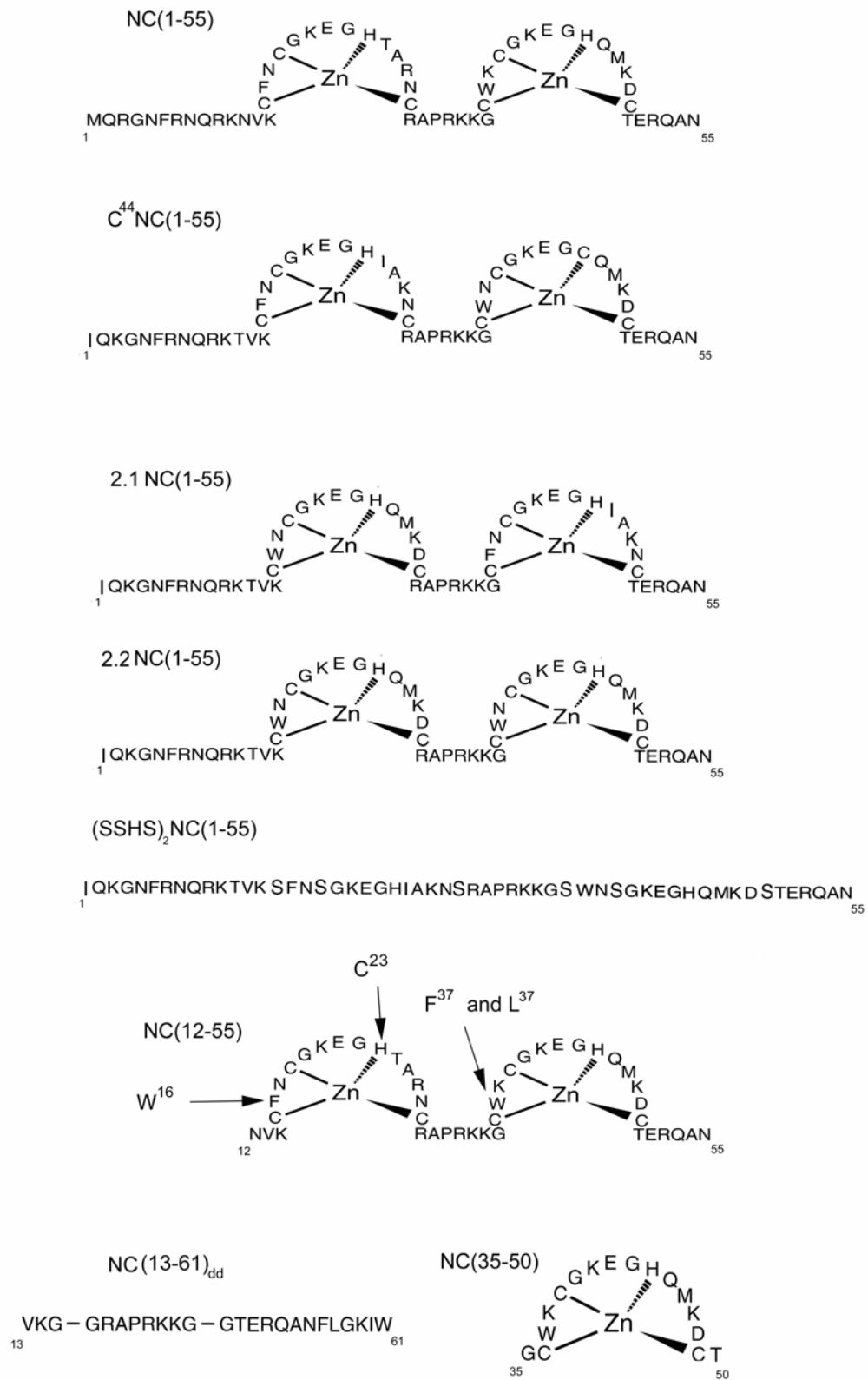


Figure 3

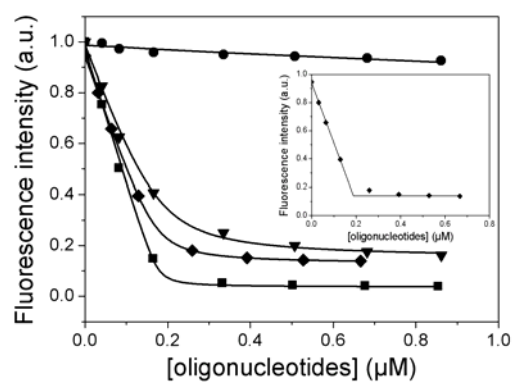
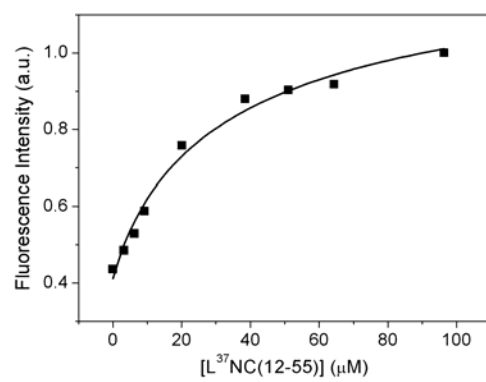


Figure 4



Description des propriétés
spectroscopiques de la 8-
vinyl-déoxyadénosine, un
analogue fluorescent
alternatif à la 2-aminopurine.
(Publication 4)

L'utilisation de sondes liées aux extrémités des oligonucléotides limite les études à une distance comprise entre $R_0/2$ et $2R_0$. C'est pour cela qu'il est intéressant d'étudier des phénomènes de façon complémentaire par des sondes internes. La plus connue de ces sondes internes est la 2-aminopurine (2AP). Elle est un analogue fluorescent de l'adénine et possède un rendement quantique de 0.68 (Ward, et al., 1969) sous forme libre. Pour l'étude en biologie, il faut incorporer ces sondes dans des oligonucléotides. Un désavantage de cette incorporation est la légère déstabilisation de la structure secondaire de la séquence. L'autre désavantage de la sonde est qu'une fois inclus dans une séquence nucléotidique son rendement quantique est divisé par un facteur 100. Elle a été utilisée dans un grand nombre d'études biologiques (Dunlap, et al., 2002; Nordlund, et al., 1989; Purohit, et al., 2003).

Le challenge a été d'entreprendre la synthèse d'un nouvel analogue fluorescent. Lors de la synthèse, il a été tenu compte de l'effet déstabilisant de cette sonde. Cet effet a dû être amenuisé tout en gardant des propriétés de fluorescence confortables à l'étude de séquences nucléotidiques. C'est dans cette optique que nous avons développé un nouvel analogue fluorescent : la 8-vinyl-déoxyadénosine ou 8vdA. La part de travail effectuée dans notre laboratoire se cantonne à l'étude spectroscopique de la sonde libre et incorporée dans une séquence nucléotidique. La partie synthèse et l'analyse chimique ont été effectuées par l'équipe du Pr A. Burger.

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés spectroscopiques de la sonde libre comparées à la 2AP. Son maximum d'absorption est à 290 nm soit 13 nm plus bas que la 2AP et son maximum d'émission est à 382 nm alors que pour la 2AP ce même maximum se situe à 370 nm (Tableau 1 de la publication 4). Le « stokes shift » de la 8vdA est de 92 nm alors qu'il n'est que de 67 nm pour la 2AP. D'autre part, son coefficient d'extinction molaire est de $13400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 290 nm ce qui est quasiment le double de celui de la 2AP alors que son rendement quantique est quasiment le même (0.65) que celui de la 2AP. Par conséquent, la 8vdA est une sonde deux fois plus sensible pour la spectroscopie de fluorescence que la 2AP alors que les autres propriétés spectroscopiques sont comparables à celles de la 2AP.

Après une étude par spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire, nous avons étudié la sonde libre par spectroscopie de fluorescence résolue en temps. Elle présente un déclin de fluorescence ajustable par une monoexponentielle donnant une durée de vie de 4.8ns ce qui est moins de la moitié de celle de la 2AP (10.4ns). Sa constante radiative k_r est de $1.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ce qui est le double de celle de la 2AP.

Par la suite nous avons étudié l'effet de l'environnement sur la sonde. En premier lieu, le pH entre 5 et 10 n'a aucun effet sur la fluorescence de la sonde (Figure 4 de la publication 4) ce qui fait qu'elle peut être utilisée en condition physiologique. En deuxième lieu, la température fait baisser à la fois le rendement quantique et la durée de vie (Figure 5 de la publication 4). En troisième lieu, remplacer l'eau par un autre solvant comme le méthanol diminue considérablement le Stokes shift en décalant à la fois le maximum d'émission et le maximum d'absorption (Table 1 de la publication 4). Mais le méthanol diminue d'environ un facteur 2 le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence. Enfin comme pour la 2AP, l'ajout d'un groupement diphosphate à la 8vdA n'a aucun effet sur les propriétés de fluorescence.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés spectroscopiques de la sonde incluse dans un oligonucléotide et par ce biais, la déstabilisation induite par la sonde dans la structure secondaire de ce même oligonucléotide.

Dans tous les cas sauf pour ODN3, la déstabilisation induite par la 8vdA est plus petite que celle induite par la 2AP (Tableau 2 de la publication 4). Pour déterminer les T_f ainsi que les ΔG^0 nous n'avons pas utilisé la méthode décrite dans le chapitre Matériels et méthodes III-A-2. En effet, cette méthode est uniquement valable pour des oligonucléotides ayant une structure secondaire en tige-boucle. Dans le cas de duplex, la T_f et la ΔG^0 dépendent de la concentration en oligonucléotide ce qui n'est pas le cas pour des tige-boucles. En effet, dans le cas des tige-boucles la réaction est intramoléculaire, ce qui fait qu'elle est indépendante de la concentration en oligonucléotides. Dans un premier temps, on convertit la différence d'absorbance en fraction de simple brin inclus dans un duplex (α). Cette fraction sera ensuite représentée en fonction de la température. La T_f est la température pour laquelle $\alpha=0.5$ et le ΔH^0 est égal à :

$$\Delta H^0 = 6RT_f^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T_f} \quad (\text{Equation 1 de la publication 4})$$

où $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T_f}$ est la pente de la courbe à $T=T_f$. De plus, ΔS^0 est calculé par :

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0}{T_f} + R \ln \left(\frac{4}{C_T} \right) \quad (\text{Equation 2 de la publication 4})$$

où C_T est la concentration totale en simple brin. Par contre, pour le calcul du ΔG^0 nous utilisons l'équation (20). Lorsque la 8vdA est voisine de A ou de T, elle est une meilleure sonde que la 2AP car elle est moins déstabilisante.

La sonde incluse dans un oligonucléotide présente un maximum d'absorption à 310 nm et un maximum d'émission à 387 nm (Figure 6 de la publication 4). Elle présente quatre durées de vie caractéristiques (Tableau 3 de la publication 4). Comme pour la 2AP, l'inclusion de la 8vdA dans un oligonucléotide fait baisser considérablement son rendement quantique et son k_f et fait augmenter son k_{nr} . Par conséquent, la baisse de rendement quantique s'explique par une augmentation du quenching dynamique et du quenching statique. On peut également noter que dans tous les cas la diminution de rendement quantique est plus petite que celle observée pour la 2AP. Pour ODN3, sa dimérisation aura pour effet de faire baisser son rendement quantique. Cette baisse est due à la formation des liaisons hydrogènes entre la 8vdA et son complémentaire T qui favorise le recouvrement des orbitales π . Ce recouvrement accentue fortement le quenching de la sonde. Mais dans le cas de ODN1 et ODN2 le quenching effectué par ces voisins n'est pas influencé par la formation du dimère et donc de la liaison hydrogène entre la 8vdA et son complémentaire T. Ce qui fait que la 8vdA dans ODN3 est une bonne sonde pour la dimérisation.

En conclusion, la 8vdA apparaît comme une bonne sonde biologique et de part ces propriétés de photophysique, elle est comme la 2AP très dépendante de son nucléotide voisin (Guest, et al., 1991; Nordlund, et al., 1989). Par conséquent, sa sensibilité à la température, à son nucléotide voisin, au pH et la dimérisation, fait apparaître la 8vdA comme une bonne remplaçante de la 2AP.

Publication 4

8-vinyl-deoxyadenosine, an alternative fluorescent nucleoside analogue to 2-aminopurine with improved properties.

Nouha Ben Gaied^{a,#}, Nicole Glasser^{b,#}, Hervé Beltz^b, Patrick Wolff^c, Roland Marquet^c, Alain Burger^{a,*}, Yves Mely^b.

^a Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 6001 du CNRS, Université de Nice Sophia Antipolis Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France

^b Laboratoire de Pharmacologie et Physico-chimie des interactions cellulaires et moléculaires, UMR 7034 du CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, 74 Route du Rhin - BP 24, 67401 Illkirch cedex, France

^c Laboratoire de Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance, UPR 9002 du CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France

[#] NBG and NG equally contributed to this work

^{*} Corresponding author

ABSTRACT.

We report here the synthesis and the spectroscopic characterization of 8-vinyldeoxyadenosine (8vdA), a new fluorescent analogue of deoxyadenosine. The free base was found to absorb and emit in the same wavelength range as 2-aminopurine (2AP), the most frequently used fluorescent base analogue. Though the quantum yield of 8vdA is similar to that of 2AP, its molar absorption coefficient is about twice, enabling a more sensitive detection. Moreover, the fluorescence of 8vdA was found to be sensitive to temperature and solvent but not to pH (around neutrality) or coupling to phosphate groups. Though 8vdA is base sensitive and susceptible to depurination, the corresponding phosphoramidite was successfully prepared and incorporated in oligonucleotides of the type d(CGT TTT XNX TTT TGC) where N=8vdA and X=A, T or C. The 8vdA-labeled oligonucleotides gave more stable duplexes than the corresponding 2AP-labeled sequences when X=A or T, indicating that 8vdA is less perturbing than 2AP in these cases. In addition, the quantum yield of 8vdA is significantly higher than the 2AP one in all tested oligonucleotides in both their single strand and duplex states. The steady-state and time-resolved fluorescence parameters of 8vdA and 2AP were found to depend similarly on the nature of their flanking residues and on base pairing suggesting that their photophysics are governed by similar mechanisms. Taken together, our data suggest that 8vdA is a non perturbing nucleoside analogue that may be used with improved sensitivity for the same applications as 2AP.

INTRODUCTION.

Fluorescent nucleoside analogues that minimally disturb the structure and function of nucleic acids are of major interest for studying the structure, the dynamics and the interactions of nucleic acids with their molecular targets (1). Among them, 2-Aminopurine (Fig. 1, 2AP) is the most popular. 2AP has a very high quantum yield (0.68) at physiological pH and a low excitation energy as compared to the natural nucleic acid bases and protein aminoacids and can therefore be selectively excited (2). 2AP is also able to establish stable Watson & Crick interactions with thymine preserving the normal B-form of DNA (3-6). Furthermore, using solid phase synthesis and phosphoramidite chemistry, it can substitute adenosines at any selected position in oligonucleotides. Due to these characteristics, 2AP has been largely used to probe the dynamics of melting (3,7), abasic sites (8,9), mismatched base pairs (10), metal ion binding (9,11) and the thermodynamics and kinetics of protein-induced DNA conformational transitions (2,3,7,12-19) as well as RNA-RNA complex formation(20,21). However, when 2AP is incorporated into single or double stranded oligonucleotides, its fluorescence quantum yield is reduced up to 100 fold, requiring thus high concentrations of 2AP-labeled oligonucleotides. Consequently, there is a strong demand for new nucleoside analogues with improved spectroscopic properties.

Here we report the synthesis of the 8-vinyldeoxyadenosine phosphoramidite monomer and its incorporation into oligonucleotides using solid phase automated DNA synthesis. The fluorescence properties of the monomer (Fig. 1, 8vdA) as well as their dependence on pH, temperature, solvent and coupling to phosphate group were characterized. In addition, the fluorescence properties of 8vdA and 2AP were further compared in the single-strand and duplex states of three 15-mer oligonucleotides differing by the nature of the closest neighbors to the fluorescent analogue. The thermodynamic stability of the duplexes were also investigated and compared with that of the corresponding canonic duplexes. Our data show that 8vdA can advantageously replace 2AP in nucleic acids for fluorescence studies because of its improved sensitivity.

MATERIALS AND METHODS.

Synthesis of 8vdA and oligonucleotides

The synthesis of 5'-Dimethoxytrityl-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (4), 5'-Dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamidine-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (5) and 3'-N,N'-diisopropylcyanoethylphosphoramidite-5'-dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamidine-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (6) and solid phase oligonucleotide synthesis are given in the supporting information section.

Spectroscopic measurements

Absorption spectra were recorded in a Peltier thermostated cell holder on a Cary 400 spectrophotometer. Melting curves were recorded by following the temperature-dependence of the absorbance changes of a 450-700 nM oligonucleotide concentration. The melting curves were converted into an α versus T profile, where α represents the fraction of single-strands in the duplex state (22). From this profile, assuming a two-state reaction, the van't Hoff transition enthalpy ΔH° was calculated using the expression:

$$\Delta H^\circ = 6RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T_m} \quad (1)$$

where $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T_m}$ is the slope of the transition at the melting temperature. The entropy change, ΔS° was then determined from:

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m} + R \ln \left(\frac{4}{C_T} \right) \quad (2)$$

where C_T is the total concentration of strands (the concentration of the two strands being equal). Finally, the free energy change, ΔG_{37}° , at 37°C is calculated by: $\Delta G_{37}^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$.

Steady-state fluorescence measurements were performed on a Fluoromax 3 spectrofluorometer. Quantum yields were determined relative to 2-aminopurine in water ($\phi = 0.68$) (2). Free 8vdA was dissolved at 20°C in Hepes buffer 25 mM, pH 7.5. 8vdA- and 2AP-labeled oligonucleotides were dissolved in Hepes buffer 25 mM, NaCl 30 mM, MgCl₂ 0.2 mM, pH 7.5. The experimental radiative rate constant, k_r , and nonradiative rate constant, k_{nr} , were determined by $k_r = \phi / \langle \tau \rangle$ and $k_{nr} = (1 - \phi) / \langle \tau \rangle$, respectively where $\langle \tau \rangle$ is the average lifetime.

The pH effect on 8vdA fluorescence intensity was studied by using different buffers: N-N'-diethyl-N-N'-bis(sulfopropyl)-ethylene-diamine (Despen) for pH < 6, 2-(N-morpholino)-ethane sulphonic acid (Mes) for 6 < pH < 7, N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane sulphonic acid (Hepes) for 7 < pH < 9 and finally 2-(N-cyclohexylamino)-ethane sulphonic acid (Ches) at pH > 9. The temperature effect was monitored by following the fluorescence intensity at the maximum emission wavelength between 10 and 60°C.

Time-resolved fluorescence measurements were carried out with the single-photon counting time-correlated technique, using a pulse-picked frequency tripled Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) as described (23). Excitation was at 295 nm. Emission was at 380 nm. Time-resolved data analysis was performed using the maximum entropy method (MEM) and the Pulse5 software (24). In all cases, the χ^2 values were close to 1.0, and the weighted residuals as well as the autocorrelation of the residuals were randomly distributed around zero indicating an optimal fit.

RESULTS.

Synthesis of phosphoramidite 6 and 8vdA-labeled oligonucleotides.

The synthesis of the phosphoramidite 6 and the 8vdA-labeled oligonucleotides needed to be addressed adequately due to the intrinsic sensitivity of the modified base to basic and

acidic conditions (25-28). These limiting factors were taken into account in our synthetic approach to obtain oligonucleotides of the highest purity for spectroscopic studies.

The synthesis of the phosphoramidite of 8vdA **6** is described in Fig. 2. The synthesis of 8vdA and the 5'-diphosphate derivative was described elsewhere (26,28). Compound **3** was prepared according to the literature (29,30). Subsequently, the vinyl moiety was introduced via a Stille coupling using Pd(PPh₃)₄ as catalyst and tetravinyltin. The last step before reaching the phosphoramidite monomer was to protect the exocyclic amine with the dimethylformamide group. This protecting group was preferred to the benzoyl group because it imparts depurination resistance (31) under acidic detritylation conditions (31-33) and is rapidly deprotected during the ammonia (31) treatment used in oligonucleotide synthesis (*vide infra*). The phosphoramidite **6** was finally obtained in satisfactory yield using preferentially the N,N'-diisopropyl-cyanoethylphosphorodiamidite instead of the chloride phosphoramidite to avoid side reactions (28).

Having in hand the phosphoramidite **6**, the solid phase synthesis of different sequences was undertaken. In order to obtain oligomers of the highest purity, several parameters were modified in the standard protocol. Preliminary studies with 8vdA showed that the base was quite stable in concentrated ammonia (28%) for short time reaction, but on prolonged reaction time gave a more polar compound that accumulated as evidenced by TLC and UV. Thus, to limit reaction of 8vdA with ammonia, fast-deprotecting building blocks were preferred. We used dichloroacetic acid (3 %) to reduce depurination during detritylation (34). Coupling was run for 35 s when the building block **6** was employed to ensure high coupling yield (>97%). Pac₂O in cap A was used instead of Ac₂O to avoid the formation of dG-N₆ acetylated derivatives (32,35-37). We also replaced the oxidizing agent normally used in solid phase synthesis (I₂/ Pyridin/ H₂O) by the commercially available ethyl (methyl)dioxirane. This new efficient reagent can be applied to both solid and solution phase with either N-protected or N-unprotected nucleosides under very fast nonbasic anhydrous conditions (38) and is more compatible with the formamide protecting group (31,39). Under these conditions, the average coupling yield per step was greater than 97%.

Deprotection in ammonia (28%) at room temperature was studied at different times with the 8vdA-labeled ODN3 sequence by ion exchange HPLC and MALDI-TOF MS (Fig. 7, supporting information). HPLC of the crude product obtained after 4h treatment showed one major compound and a minor compound eluting before the expected oligonucleotide. When deprotection lasted 24 h, the ratio of the two products was reversed (Fig. 8, supporting information). MS analysis of the slower eluting product gave the correct molecular weight whereas the faster eluting compound gave a molecular weight with a mass difference (ΔM) of 17. The latter compound might result from the addition of ammonia on the vinyl moiety. These data indicate that prolonged deprotection time is detrimental. Thus, we retained 4h ammonia treatment for the other sequences. Attempts using mild deprotecting conditions (K₂CO₃/MeOH) (35) were unsatisfactory even after 24 h. After 4 h ammonia treatment, the oligomers were purified by ion exchange HPLC and characterized by MS. The synthesis of the 8vdA-labeled 15-mer with X=G was also tried. However in this case, MS analysis afforded a m/z for the major compound exceeding the expected mass ($\Delta M = +151$ and $+174$). The mass differences are compatible with guanine and guanine and sodium adducts. This product might arise from nucleophilic addition of dG phosphoramidate (N-7) on the vinyl group of 8vdA during the coupling step. A similar problem was described with 6-vinylpurine nucleoside (40) and illustrates the limitation of the synthetic approach used here.

Spectroscopic properties of 8vdA

In a first step, the absorption and emission properties of 8vdA in 25 mM Hepes buffer, pH 7.5 were determined and compared to those of the reference compound, 2AP.

The absorption, excitation and emission spectra of 8vdA at room temperature are shown on Fig. 3. 8vdA exhibits a broad absorption spectrum, with a maximum absorption wavelength at 290 nm, close to that of 2-AP (303 nm). Since 8vdA could be excited up to 340 nm, it could like 2AP, be selectively excited without interfering with natural bases and amino acids, allowing observations of protein/ oligonucleotide interactions when 8vdA is excited. Though the absorption properties of the two dyes are qualitatively similar, they differ quantitatively since the absorption coefficient of 8vdA ($12,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (26) is about twice that of 2AP ($7,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The absorption and excitation spectra are largely superimposable, suggesting that fluorescent impurities are minimal. The fluorescence spectrum consists in a broad structureless band with a maximum emission wavelength at 382 nm, shifted to the red as compared to 2AP (370 nm). It follows that 8vdA exhibits a Stokes shift of 92 nm (8300 cm^{-1}) much larger than that of 2 AP, which is only of 67 nm (5970 cm^{-1}) (Table 1). The quantum yield at 25 °C is $0.65(\pm 0.01)$ and is independent of the excitation wavelength in the 260-310 nm region, confirming that fluorescence contaminants are negligible. The quantum yield of 8vdA is similar to that of 2AP (0.68) and is thus much higher than the quantum yield of other fluorescent nucleotide analogs like formycin or 2,6-diaminopurine which are below 0.1 (2). Since the extinction coefficient of 8vdA is about twice that of 2AP, it follows that 8vdA can be detected twice more sensitively by fluorescence than 2AP.

The fluorescent intensity decay of 8vdA is exponential with a 4.8 ns lifetime that is significantly less than the 10.4 ns lifetime of 2AP (table 1) (10). It follows that the radiative rate constant, $k_r=1.4\times 10^8\text{s}^{-1}$, of 8vdA is about twice that of 2AP ($k_r=6.5\times 10^7\text{s}^{-1}$). To get further information on 8vdA photophysics, the influence of various physico-chemical parameters was investigated. In Fig. 4, the pH dependence of the fluorescence intensity is reported. Like to 2AP, the fluorescence intensity of 8vdA is constant in the pH range 5-10, where the chromophore is neutral. At pH below 5 or above 10, the intensity decreases but with no maximum emission wavelength shift. From the fluorescence decrease in the acidic pH range, an excited pK value of $3.7(\pm 0.1)$, close to that of 2AP was obtained (2). In a next step, the temperature dependence of fluorescence intensity was studied over 10-60°C. When the temperature increases, a simultaneous decrease of the quantum yield and the fluorescence lifetime is observed. The quantum yield decreases from 0.71 at 10°C to 0.52 at 60°C and the lifetime from 5 ns to 3.3 ns while the shape of the emission spectrum is unaffected by temperature. The parallel decrease of the quantum yield and lifetime indicates that as expected, the radiative rate constant is independent of the temperature. In Fig. 5, the inverse of the lifetime was plotted as a function of the inverse of the temperature in an Arrhenius plot. The experimental data were fitted with the equation:

$$\frac{1}{\tau} = k_0 + A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (3)$$

where k_0 is the temperature-independent rate constant, A is the nonradiative thermal pre-exponential factor, E_a is the activation energy for thermal quenching, R is the gas constant and T is the absolute temperature. The k_0 value was found to be $1.9\times 10^8\text{s}^{-1}$. This value is slightly higher than the k_r value ($1.4\times 10^8\text{s}^{-1}$), suggesting that the radiative rate constant is probably not the only temperature independent pathway but it is the dominant one. The activation energy and the A factor were found to be 8.8 kcal/mol and $6.1\times 10^{13}\text{s}^{-1}$, respectively.

In an additional step, the effect of the polarity was tested on 8vdA. To this end, we dissolved 8vdA in methanol and compared its spectroscopic properties with those in water. We observe a 7 nm blue-shift in the emission maximum as compared to water, a value close to that observed with 2AP. Since in addition, there is a 4 nm red-shift in absorption, it results that the Stokes shift strongly decreases in methanol (7350 cm^{-1}). Moreover, the quantum yield

decreases by 50% and the fluorescence lifetime drops to 2.9 ns (table 1). Since the k_r value ($1.1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) in methanol is close to that in water, it results that the decrease of the fluorescence parameters (ϕ and τ) in methanol with respect to water are mainly due to an increase in the nonradiative rate constant.

Finally, the effect of the introduction of a diphosphate group on the ribosyl 5'-hydroxyl group was evaluated. As in the case of 2AP, the spectroscopic properties of 8vdA were only marginally affected by the diphosphate group (Table 1 and Fig. 5), indicating that the diphosphate group does not significantly affect the fluorophore at least in water.

Thermodynamic stability of the 8vdA-labeled oligonucleotides in the duplex state.

8vdA was incorporated in three 15-mer oligonucleotides (ODN1 to ODN3) of the type d(CGT TTT XNX TTT TGC) where N=8vdA and X=T, A, and C for ODN1, ODN2 and ODN3, respectively. The oligonucleotide sequences were designed to be structureless (as predicted from the mfold program (41)) and not autocomplementary. Moreover, the sequences differed by the residues flanking the modified nucleotide since these residues were shown to play a critical role on the fluorescence properties of 2AP (42). In order to compare the properties of 8vdA and 2AP, the same oligonucleotides were prepared with 2AP.

As a first step to characterize the 8vdA- and 2AP-containing oligonucleotides, the thermodynamic stability of their duplexes was compared with that of the corresponding unmodified oligonucleotide by monitoring the temperature-induced absorbance changes at 260 nm (Table 2). As expected, comparison of the nonlabeled sequences reveals that the most stable duplex is obtained with ODN3 in which the central A-T base pair is flanked by two stable G-C base pairs. T_m measurements further indicate that 8vdA destabilizes the duplexes by only 0.4 and 1.5°C with respect to the nonlabeled oligonucleotides when its flanking residues were T or A, respectively. This destabilization is significantly less than the 2.2 and 3.7°C decrease observed with the corresponding 2AP-containing oligonucleotides. A reverse situation was observed when the chromophore was flanked by C residues since the 4.1°C decrease in T_m with 8vdA was larger than that observed with 2AP. Similar conclusions were obtained when ΔG values were compared. Indeed, the free energy of the 8vdA-containing duplexes was -0.6 and -0.7 kcal/mol less than the 2AP-containing derivatives when the flanking residues were T or A, respectively, while it differed by +1 kcal/mol when the flanking residues were C. From the limited changes in free energy (less than 0.6 kcal/mol) of the 8vdA-labeled ODN1 and ODN2 duplexes with respect to the corresponding nonlabeled duplexes, it is likely that 8vdA forms a Watson-Crick base pair with the T residue in the complementary strand in these duplexes (43).

Spectroscopic properties of 8vdA in single and double stranded oligonucleotides

To further assess the potential use of 8vdA as a fluorescent analogue of adenosine, we characterized the spectroscopic properties of 8vdA in the ODN1 to ODN3 oligonucleotides either in their single-stranded or duplex states. These properties were compared to those of 2AP in the same sequences.

Absorption and emission spectra of 8vdA in the single-stranded form of ODN1 are given in Fig. 6. The absorption spectrum exhibits a broad absorption band with a maximum at 265 nm due to the native DNA bases and a shoulder centered at 310 nm (± 5 nm) due to 8vdA absorption. The ratio of the absorbances $A(310) / A(265)$ is close to the 1:15 ratio expected from the extinction coefficients of the bases and 8vdA, confirming that the sequences are stoichiometrically labeled. The emission spectrum of 8vdA in ODN1 with a maximum at 387 nm was found to be qualitatively similar to that of the 8vdA monomer. In sharp contrast, its quantum yield dropped dramatically (Table 3). This change in the quantum yield was accompanied by a dramatic increase in the complexity of the intensity decay, since up to four

lifetimes were necessary to describe the 8vdA decay in ODN1 (Table 3). The major lifetime is the 70 ps component whose relative amplitude is about 50%, while the less quenched lifetime (3.4 ns) represents only 1%. The $7.7 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ value of k_r is two times lower than that of the 8vdA monomer, suggesting static quenching. In addition, k_{nr} is increased by about two orders of magnitude with respect to the monomer, suggesting a strong increase of dynamic quenching. Furthermore, duplex formation blue-shifted the emission spectrum of the 8vdA-labeled ODN1 by about 5 nm with no significant change in quantum yield or time-resolved parameters, suggesting that the spectroscopic behavior of 8vdA is mainly governed by intra-strand factors.

From the comparison with the 2AP-labeled ODN1 derivative, it appears that the 27-fold drop in the quantum yield of 8vdA in ODN-1 with respect to the free dye was significantly less than the 40-fold drop observed with the corresponding 2AP-labeled derivative (Table 3). Interestingly, the number of lifetime components and the relative amplitudes of the corresponding lifetimes were similar in the two labeled oligonucleotides. In fact, only the lifetime values differed somewhat, those of the 2AP-labeled derivative being higher than the corresponding lifetimes in the 8vdA-labeled derivative. Moreover, the duplex formation of the 2AP-labeled oligonucleotide induces only limited changes in both the steady-state parameters and lifetime values as with the 8vdA-labeled oligonucleotide.

The data with the labeled ODN2 derivatives were similar to those of the ODN1 derivatives, except that the quantum yield of both dyes was significantly lower in ODN2 than in ODN1. In addition, the quantum yield of 8vdA was again higher (40%) than that of 2AP in ODN2. Moreover, the values of the four lifetime components of 8vdA were systematically higher in ODN2 than in ODN1, suggesting that these values are strongly dependent on the interaction with the flanking residues. A similar conclusion applies for the fractional populations associated with the lifetimes since notably the population associated with τ_1 was much larger in ODN2 than in ODN1 for both dyes.

Finally, the most interesting results were obtained with ODN3. The quantum yield of 8vdA was much higher in ODN3 than in ODN1 and ODN2 and was about twice the quantum yield of the 2AP-labeled ODN3 derivative. This suggests that 8vdA was less quenched by C than by A or T residues and that 2AP was more strongly quenched by C residues than 8vdA. The higher quantum yield of 8vdA in ODN3 as compared to ODN1 and ODN2 is mainly related to a decrease in k_{nr} and thus to a decrease in dynamic quenching. In contrast to ODN1 and ODN2, the lifetimes of 8vdA and 2AP were similar in ODN3. Remarkably, duplex formation dramatically decreases the quantum yield and lifetimes (mainly by increasing the k_{nr} values) of both 8vdA and 2AP in ODN3, implying that both probes could sensitively monitor duplex formation in this case.

DISCUSSION.

We reported herein an efficient approach for the synthesis of the sensitive 8vdA phosphoramidite. Using fast deprotecting groups and several modifications in standard solid phase chemistry, we have integrated this building block in different oligonucleotide sequences and have determined deprotection conditions to obtain quantities of product required for thermal denaturation and fluorescence studies.

Introduction of 8vdA in the central position of three oligonucleotides induces only a limited decrease in the melting temperature and free energy of the duplexes with respect to the corresponding canonic duplexes (Table 2). This strongly suggests that as expected from its structural similarity with A, 8vdA forms two hydrogen bonds with the T residue on the opposite strand in the duplex. The decrease in T_m and free energy induced by 8vdA was even less than with 2AP when the flanking residues were A or T. This may be rationalized by the displacement from the 6- to 2-position of the exocyclic amino group in 2AP but not 8vdA

which locally changes the duplex structure by moving one of the H bonds from the major to the minor groove (4). By analogy to 2AP, the quantum yield of 8vdA dramatically drops when it is included in an oligonucleotide. However, in all the three tested oligonucleotides, the quantum yield of 8vdA was higher than that of 2AP, the difference being up to a factor of two. Combined with the almost two-fold increase in the extinction coefficient, 8vdA appears as a better fluorescent analogue than 2AP.

The photophysics of 8vdA and 2AP in the oligonucleotides are probably similar since the time-resolved parameters and the quantum yield of the two analogues exhibit similar dependence on the nature of the flanking residues and strandness. In this respect, by analogy to 2AP (3,8,10), the multiple lifetime components of 8vdA in oligonucleotides may reflect a distribution of local conformations in which 8vdA experiences varying degrees of stacking with its flanking residues within the same strand. The small amplitude and lifetime values of the least-stacked form of 8vdA in the three tested oligonucleotides further suggest that 8vdA experiences only limited displacement relative to its neighbors. In addition, incorporation of 8vdA in oligonucleotides induces as for 2AP, a marked decrease in its radiative rate constant, in line with a mechanism of static quenching due to electron delocalization in the ground state with a loss of oscillator strength (42,44). Furthermore, the large increase in the nonradiative rate constant as well as the appearance of several short-lived lifetimes may result as in the case of 2AP from a dynamic quenching with loss of energy via nonradiative relaxation to one or more charge transfer states, which are absent in free 8vdA (42,44).

The limited changes in 2AP and 8vdA fluorescence parameters associated with the formation of ODN1 and ODN2 duplexes suggest that the photophysics as well as the stacking of 8vdA with its closest neighbors are not affected by the complementary strand. In contrast, the dramatic changes observed with ODN3 suggest that hydrogen bonding to the opposing residue may reinforce the π -stacking interactions of 8vdA with the neighboring bases in this case.

Taken together, our data indicate that 8vdA may be used as an alternative to 2AP, to fluorescently label oligonucleotides with minimal alterations of the DNA structure. Due to the sensitivity of its fluorescence to solvent, temperature and flanking bases, it may be used for the same applications than 2AP, with an improved sensitivity due to its higher extinction coefficient and quantum yield. On the other hand, in duplexes containing 2AP one hydrogen bond is moved from the major to the minor groove whereas in those containing 8vdA the hydrogen bonding pattern remains unchanged. This might be of prime importance as for example for studies of DNA replication fidelity (45). Moreover, since the 8 position offers larger possibilities of chemical modifications than the 2 position on the purine base, further improvements in the photophysical properties may in principle be achieved. Experiments are currently performed to further assess the potency of 8vdA as a fluorescent probe.

Aknowledgments

This work was supported by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), Sidaction (Ensemble Contre le Sida), Université Louis Pasteur and the European Community (TRIoH integrated project). HB and NBG were fellows from the Ministère de la Recherche et des Technologies.

REFERENCES.

1. Mollova, E.T. (2002) Single-molecule fluorescence of nucleic acids *Curr Opin Chem Biol.*, **6**, 823-828.

2. Ward, D.C., Reich, E. and Stryer, L. (1969) Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. I. Formycin, 2-aminopurine riboside, 2,6-diaminopurine riboside, and their derivatives *J. Biol. Chem.*, **244**, 1228-1237.
3. Nordlund, T.M., Andersson, S., Nilsson, L., Rigler, R., Graslund, A. and McLaughlin, L.W. (1989) Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI recognition sequence: fluorescence, molecular dynamics, and NMR studies *Biochemistry.*, **28**, 9095-9103.
4. Sowers, L.C., Fazakerley, G.V., Eritja, R., Kaplan, B.E. and Goodman, M.F. (1986) Base pairing and mutagenesis: observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in an oligonucleotide by proton NMR *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **83**, 5434-5438.
5. Sowers, L.C., Eritja, R., Chen, F.M., Khwaja, T., Kaplan, B.E., Goodman, M.F. and Fazakerley, G.V. (1989) Characterization of the high pH wobble structure of the 2-aminopurine.cntdot.cytosine mismatch by nitrogen-15 NMR spectroscopy *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 89-92.
6. Fagan, P.A., Fabrega, C., Eritja, R., Goodman, M.F. and Wemmer, D.E. (1996) NMR study of the conformation of the 2-aminopurine:cytosine mismatch in DNA *Biochemistry.*, **35**, 4026-4033.
7. Nordlund, T.M., Xu, D. and Evans, K.O. (1993) Excitation energy transfer in DNA: duplex melting and transfer from normal bases to 2-aminopurine *Biochemistry.*, **32**, 12090-12095.
8. Rachofsky, E.L., Seibert, E., Stivers, J.T., Osman, R. and Ross, J.B. (2001) Conformation and dynamics of abasic sites in DNA investigated by time-resolved fluorescence of 2-aminopurine *Biochemistry.*, **40**, 957-967.
9. Stivers, J.T. (1998) 2-Aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA: metal-ion and base sequence effects *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3837-3844.
10. Guest, C.R., Hochstrasser, R.A., Sowers, L.C. and Millar, D.P. (1991) Dynamics of mismatched base pairs in DNA *Biochemistry.*, **30**, 3271-3279.
11. Menger, M., Tuschl, T., Eckstein, F. and Porschke, D. (1996) Mg(2+)-dependent conformational changes in the hammerhead ribozyme *Biochemistry.*, **35**, 14710-14716.
12. Bandwar, R.P. and Patel, S.S. (2001) Peculiar 2-aminopurine fluorescence monitors the dynamics of open complex formation by bacteriophage T7 RNA polymerase *J Biol Chem.*, **276**, 14075-14082.
13. Ujvari, A. and Martin, C.T. (1996) Thermodynamic and kinetic measurements of promoter binding by T7 RNA polymerase *Biochemistry.*, **35**, 14574-14582.
14. Jia, Y., Kumar, A. and Patel, S.S. (1996) Equilibrium and stopped-flow kinetic studies of interaction between T7 RNA polymerase and its promoters measured by protein and 2-aminopurine fluorescence changes *J Biol Chem.*, **271**, 30451-30458.
15. Allan, B.W., Reich, N.O. and Beechem, J.M. (1999) Measurement of the absolute temporal coupling between DNA binding and base flipping *Biochemistry.*, **38**, 5308-5314.
16. Beechem, J.M., Otto, M.R., Bloom, L.B., Eritja, R., Reha-Krantz, L.J. and Goodman, M.F. (1998) Exonuclease-polymerase active site partitioning of primer-template DNA strands and equilibrium Mg²⁺ binding properties of bacteriophage T4 DNA polymerase *Biochemistry.*, **37**, 10144-10155.
17. Raney, K.D., Sowers, L.C., Millar, D.P. and Benkovic, S.J. (1994) A fluorescence-based assay for monitoring helicase activity *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91**, 6644-6648.

18. Holz, B., Klimasauskas, S., Serva, S. and Weinhold, E. (1998) 2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1076-1083.
19. Baliga, R., Baird, E.E., Herman, D.M., Melander, C., Dervan, P.B. and Crothers, D.M. (2001) Kinetic consequences of covalent linkage of DNA binding polyamides *Biochemistry.*, **40**, 3-8.
20. Rist, M. and Marino, J. (2001) Association of an RNA kissing complex analyzed using 2-aminopurine fluorescence *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2401-2408.
21. Rist, M.J. and Marino, J.P. (2002) Mechanism of nucleocapsid protein catalyzed structural isomerization of the dimerization initiation site of HIV-1 *Biochemistry.*, **41**, 14762-14770.
22. Breslauer, K.J. (1995) Extracting thermodynamic data from equilibrium melting curves for oligonucleotide order-disorder transitions *Methods Enzymol.*, **259**, 221-242.
23. Ramos, P., Coste, T., Piemont, E., Lessinger, J.M., Bousquet, J.A., Chapus, C., Kerfelec, B., Ferard, G. and Mely, Y. (2003) Time-resolved fluorescence allows selective monitoring of Trp30 environmental changes in the seven-Trp-containing human pancreatic lipase *Biochemistry.*, **42**, 12488-12496.
24. Livesey, A.K., and Brochon, J.C. (1987) Analyzing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method. *Biophys J.*, **52**, 693-706.
25. Manfredini, S., Baraldi, P.G., Bazzanini, R., Marangoni, M., Simoni, D., Balzarini, J. and De Clercq, E. (1995) Synthesis and cytotoxic activity of 6-vinyl- and 6-ethynyluridine and 8-vinyl- and 8-ethynyladenosine *J. Med. Chem.*, **38**, 199-203.
26. Van Aerschot, A.A., Mamos, P., Weyns, N.J., Ikeda, S., De Clercq, E. and Herdewijn, P.A. (1993) Antiviral activity of C-alkylated purine nucleosides obtained by cross-coupling with tetraalkyltin reagents *J. Med. Chem.*, **36**, 2938-2942.
27. Liu, F., Dalhus, B., Gundersen, L.-L. and Rise, F. (1999) Addition and cycloaddition to 2- and 8-vinylpurines *Acta Chemica Scandinavica.*, **53**, 269-279.
28. Lang, P., Gerez, C., Tritsch, D., Fontecave, M., Biellmann, J.-F. and Burger, A. (2003) Synthesis of 8-vinyladenosine 5'-di- and 5'-triphosphate: evaluation of the diphosphate compound on ribonucleotide reductase *Tetrahedron.*, **59**, 7315-7322.
29. Tierney, M.T. and Grinstaff, M.W. (2000) Synthesis and Stability of Oligodeoxynucleotides Containing C8-Labeled 2'-Deoxyadenosine: Novel Redox Nucleobase Probes for DNA-Mediated Charge-Transfer Studies *Org. Lett.*, **2**, 3413-3416.
30. Graham, D., Parkinson, J.A. and Brown, T. (1998) DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 1131-1138.
31. Froehler, B.C. and Matteucci, M.D. (1983) Dialkylformamidines: depurination resistant N6-protecting group for deoxyadenosine *Nucleic Acids Research.*, **11**, 8031-8036.
32. Sinha, N.D., Davis, P., Usman, N., Perez, J., Hodge, R., Kremsky, J. and Casale, R. (1993) Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation *Biochimie.*, **75**, 13-23.
33. Vu, H., McCollum, C., Jacobson, K., Theisen, P., Vinayak, R., Spiess, E. and Andrus, Alex. (1990) Fast oligonucleotide deprotection phosphoramidite chemistry for DNA synthesis *Tetrahedron Letters.*, **31**, 7269-7272.
34. Septak, M. (1996) Kinetic studies on depurination and detritylation of CPG-bound intermediates during oligonucleotide synthesis *Nucl. Acids. Res.*, **24**, 3053-3058.

35. Zhu, Q., Delaney, M.O. and Greenberg, M.M. (2001) Observation and elimination of N-acetylation of oligonucleotides prepared using fast-deprotecting phosphoramidites and ultra-mild deprotection *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **11**, 1105-1107.
36. Wu, T., Ogilvie, K.K. and Pon, R.T. (1989) Prevention of chain cleavage in the chemical synthesis of 2'-silylated oligoribonucleotides *Nucleic Acids Research.*, **17**, 3501-3517.
37. Schulhof, J.C., Molko, D. and Teoule, R. (1987) The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups *Nucleic Acids Research.*, **15**, 397-416.
38. Kataoka, M., Hattori, A., Okino, S., Hyodo, M., Asano, M., Kawai, R. and Hayakawa, Y. (2001) Ethyl(methyl)dioxirane as an Efficient Reagent for the Oxidation of Nucleoside Phosphites into Phosphates under Nonbasic Anhydrous Conditions *Organic Letters.*, **3**, 815-818.
39. McBride, L.J., Kierzek, R., Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. (1986) Nucleotide chemistry. 16. Amidine protecting groups for oligonucleotide synthesis *Journal of the American Chemical Society.*, **108**, 2040-2048.
40. Nagatsugi, F., Uemura, K., Nakashima, S., Maeda, M. and Sasaki, S. (1997) 2-Aminopurine derivatives with C6-substituted olefin as novel crosslinking agents and the synthesis of the corresponding .beta.-phosphoramidite precursors *Tetrahedron.*, **53**, 3035-3044.
41. SantaLucia, J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 1460-1465.
42. Jean, J.M. and Hall, K.B. (2001) 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 37-41.
43. Law, S.M., Eritja, R., Goodman, M.F. and Breslauer, K.J. (1996) Spectroscopic and calorimetric characterizations of DNA duplexes containing 2-aminopurine *Biochemistry.*, **35**, 12329-12337.
44. Jean, J.M. and Hall, K.B. (2002) 2-Aminopurine electronic structure and fluorescence properties in DNA *Biochemistry.*, **41**, 13152-13161.
45. Kunkel, T.A. and Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity *Annu Rev Biochem.*, **69**, 497-529.
46. Heck, R. F. (1985) *Palladium Reagents in Organic Syntheses*. Academic Press, London.

Figure legends

Figure 1: Structures of 2AP and 8vdA.

Figure 2: Synthesis of the 8-vinyl-2'-deoxyadenosine phosphoramidite (**6**). a) Br₂, Acetate buffer pH: 4.2 (72%) b) DMTrCl, DMAP_{cat}, Pyridine (87%) c) Pd(PPh₃)₄, Sn(CH=CH₂)₄, NMP, 110°C (82%) d) Me₂CH(OMe)₂, MeOH (93%); e) (CN(CH₂)₂OP[N(iPr)₂]₂, Tetrazole, CH₂Cl₂ (60%).

Figure 3: Absorption and emission spectra of 8vdA. The free 8vdA base was in Hepes 25mM, pH 7.5. The excitation spectrum (dotted line) was recorded at an emission wavelength of 380 nm. The emission spectrum (solid line) was recorded at an excitation wavelength of 305 nm.

Figure 4: pH dependence of the fluorescence of 8vdA. A concentration of 7.5μM of 8vdA was dissolved either in Despen, MES, Hepes, or CHES as described under materials and methods. It was checked at overlapping pH values that the fluorescence intensity does not depend on the buffer nature. Excitation and emission wavelengths were 305 and 380 nm, respectively.

Figure 5: Temperature dependence of the lifetimes of 8vdA in its free (solid square) and phosphorylated (solid inverted triangle) forms. The data were fitted with equation (3) using the data reported in the text.

Figure 6: Absorption and emission spectra of ds8vdA-ODN1. The oligonucleotide was in Hepes 25 mM, NaCl 30 mM, MgCl₂ 0.2 mM, pH 7.5 at a concentration of 5.5 μM. The excitation wavelength for the emission spectrum was 305 nm.

Table 1 : Steady-state and time-resolved fluorescence parameters of 8vdA.

	λ_{max} abs (nm)	λ_{max} em (nm)	$\phi \pm 0.02$ (25°C)	$\tau \pm 0.1$ ns (25°C)	k_r (10^7 s ⁻¹) \pm 0.5 $\times 10^7$	k_{nr} (10^7 s ⁻¹) \pm 0.5 $\times 10^7$
8vdA in Hepes	290	382	0.66	4.7	14.0	7.2
2AP in water ¹	303	370	0.68	10.4 ²	6.5	3.1
8vdA in methanol	294	375	0.32	2.9	11.0	23.5
8vdAdiP in Hepes ³	292	382	0.64	4.9	13.1	7.4
8vdAdiP in methanol ³	293	378	0.26	2.4	10.8	30.8

¹ Data from (2).

² Data from (10).

³ 8vdAdiP designates the 8vdA base with a diphosphate group on the ribosyl 5'-hydroxyl group.

Table 2: Thermodynamic parameters for duplex formation by the native and labeled oligonucleotides as monitored from the absorbance at 260 nm.^a

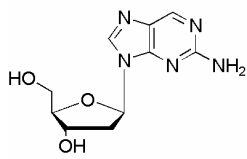
	$T_m \pm 0.1$ (°C)	ΔT_m (°C)	ΔG_{37}^0 (kcal/mol)
ODN1	39.3		-10.5
8vdA-ODN1	38.9	0.4	-10.2
2AP-ODN1	37.1	2.2	-9.6
ODN2	39.7		-10.6
8vdA-ODN2	38.2	1.5	-10.0
2AP-ODN2	36.0	3.7	-9.3
ODN3	42.4		-11.5
8vdA-ODN3	38.3	4.1	-10.1
2AP-ODN3	41.2	1.2	-11.1

¹ The thermodynamic parameters were deduced from the melting curves, as described in the materials and methods section.

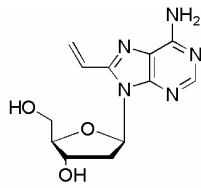
Table 3: Steady-state and time-resolved fluorescence parameters of 8vdA- and 2AP-labeled oligonucleotides¹

	λ_{em} nm	ϕ ± 0.005	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	τ_4 (ns)	α_4	$\langle\tau\rangle$ (ns) ± 0.03	k_r (10^7 s ⁻¹) $\pm 1 \times 10^7$	k_{nr} (10^9 s ⁻¹) $\pm 0.5 \times 10^9$
ss8vdA-ODN1	387	0.024	0.071	0.52	0.22	0.34	1.23	0.13	3.42	0.012	0.31	7.7	3.1
ds8vdA-ODN1	382	0.028	0.053	0.42	0.19	0.38	1.33	0.19	3.05	0.003	0.36	7.8	2.7
ss2AP-ODN1	372	0.017	0.065	0.52	0.31	0.27	1.58	0.17	4.21	0.045	0.58	2.9	1.7
ds2AP-ODN1	369	0.016	0.079	0.28	0.45	0.69	1.56	0.023	4.87	0.0061	0.40	4.0	2.5
ss8vdA-ODN2	388	0.014	0.16	0.81	0.64	0.14	1.63	0.044	4.39	0.009	0.33	4.2	3.0
ds8vdA-ODN2	383	0.016	0.15	0.73	0.35	0.19	1.32	0.081	3.85	0.0058	0.30	5.3	3.3
ss2AP-ODN2	372	0.010	0.15	0.72	1.10	0.19	2.66	0.09	6.14	0.0015	0.57	1.8	1.7
ds2AP-ODN2	369	0.012	0.17	0.86	0.58	0.084	2.27	0.044	6.75	0.012	0.37	3.2	2.7
ss8vdA-ODN3	389	0.037	0.20	0.64	0.89	0.28	1.99	0.076	4.02	0.0089	0.56	6.6	1.7
ds8vdA-ODN3	384	0.005	0.055	0.94	0.29	0.032	1.40	0.016	2.62	0.0083	0.11	4.6	9.0
ss2AP-ODN3	371	0.020	0.16	0.69	0.92	0.16	1.96	0.13	4.85	0.019	0.61	3.3	1.6
ds2AP-ODN3	369	0.003	0.044	0.96	0.34	0.015	1.44	0.011	3.76	0.0089	0.10	3.0	9.9

¹The fluorescence lifetimes, τ_i , the relative amplitudes, α_i , and the mean lifetime, $\langle\tau\rangle$, are expressed as means for at least two experiments. ss and ds represent respectively the single-strand and double-strand states of the different oligonucleotides.



2AP



8vdA

Figure 1:

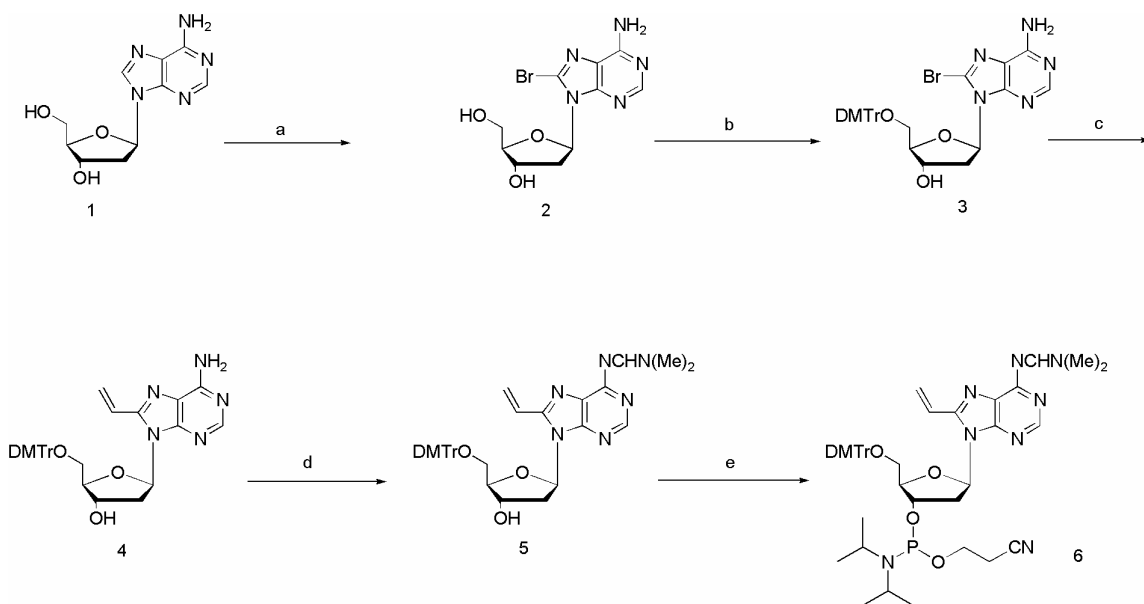


Figure 2

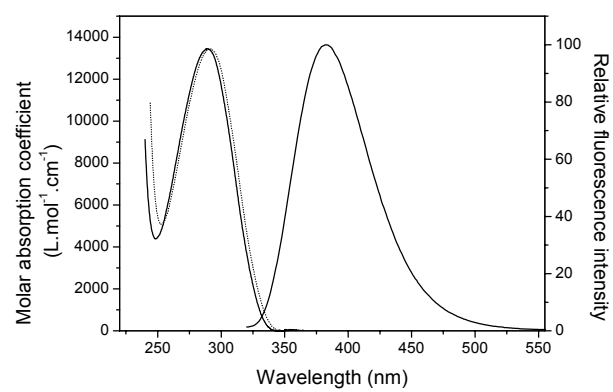


Figure 3

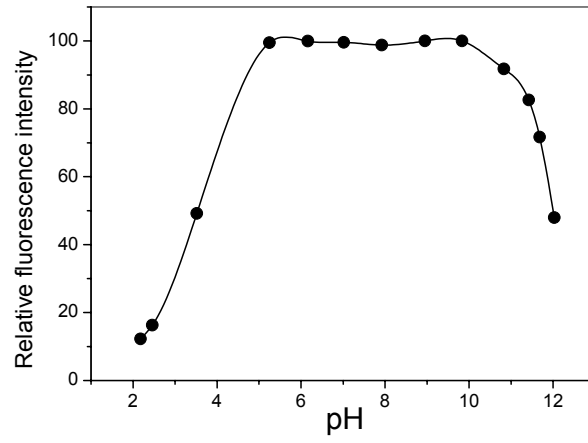


Figure 4

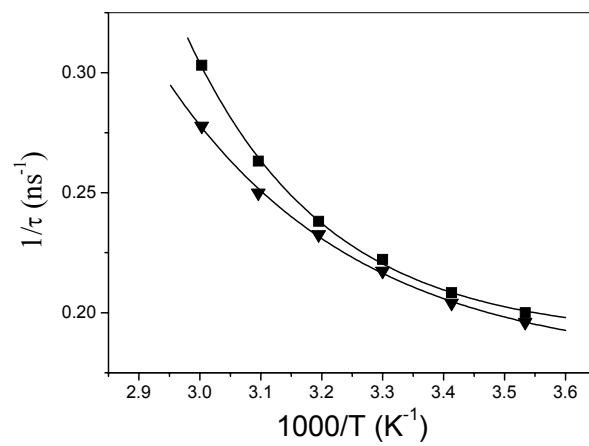


Figure 5

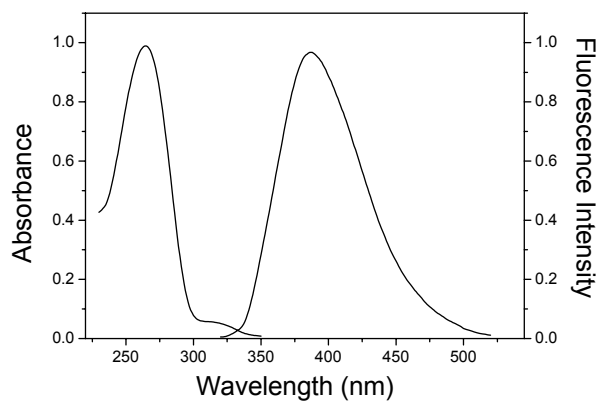


Figure 6

Supplementary materials

Synthesis: General information.

All nucleoside derivatives were dried twice by coevaporation with dry pyridine before use. Pyridine was distilled and stored over KOH. EtOAc was distilled over CaH₂; CH₂Cl₂ was distilled over P₂O₅, stored over molecular sieves (4Å) and filtered through an activated alumina column before use. Tetrazole was sublimated (P= 0.1 mBar, oil bath = 85°C, caution do not exceed 100°C). Pd(PPh₃)₄ was synthesised according to the procedure of Heck (46). Flash chromatography was made on silica gel purchased from Merck (40-63 μm) treated with NEt₃ to prevent dimethoxytrityl degradation. Thin layer chromatography was performed on Merck 60F₂₅₄ coated plates. Chromatography of the phosphoramidite was done on silica gel pre-treated as followed: silica gel was washed successively with HCl (1N), water, NH₄OH (10%) and water and finally, dried under reduced pressure. The phosphoramidite **6** was dissolved in CH₃CN (0.1M) (high quality for DNA synthesis, Fluka), stored overnight over activated 3Å molecular sieves (Merck) and filtered through a 0.45μm filter (Millex®-HV, Millipore) before use in oligonucleotide synthesis.

NMR spectra were recorded at 200 or 300 MHz on a Bruker Advance Spectrometer. The NMR chemical shifts are reported in ppm downfield from TMS for ¹H and ¹³C NMR and 85% H₃PO₄ for ³¹P NMR. Mass spectra were recorded on an Esquire 3000 Plus equipment, in either positive or negative Electron Spray Ionisation (ESI) mode.

5'-Dimethoxytrityl-8-vinyl -2'-deoxyadenosine (4):

In a Schlenk flask, compound **3** (500 mg, 0.8 mmol) was dissolved in N-methylpyrrolidone (NMP, 2.7 mL). Pd(PPh₃)₄ (90 mg, 0.078 mmol) was added and the reaction mixture was degassed three times before adding tetravinyltin under Ar (290 μL, 1.58 mmol). The reaction was then heated in an oil bath at 110°C and followed by TLC (CHCl₃/MeOH/NEt₃ 93:5:1). After 1h, the reaction mixture was cooled to room temperature,

and EtOAc and H₂O were added. The mixture was filtered over celite and the filtrate was washed twice with H₂O (40 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL), and brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. An oily residue was obtained and purified on pretreated silica gel. The product was eluted with CH₂Cl₂/ MeOH (0 →5%). An amorphous solid was obtained in 82% yield (656 mg). Mp:151°C (decomp.). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8.1 (1H, s, H₂), 7.38-7.12 (9H, m, DMTr), 7.07-7.01 (1H, dd, J₁= 11 Hz & J₂= 17 Hz, H_{vinyl}), 6.76- 6.72 (4H, m, DMTr), 6.48-6.43 (2H, t, J= 7 Hz, H_{1'} & dd: J₁= 1.5 and J₂= 17 Hz, H_{trans}), 5.93 (2H, s, NH₂), 5.48-5.44 (1H, dd, J₁= 1.5 Hz & J₂= 11 Hz, H_{cis}), 4.82-4.77 (1H, m, H_{4'}), 4.04-4.0 (1H, m, H_{3'}), 3.66 (6H, s, OCH₃ DMTr), 3.42-3.2 (3H, 2H_{5'} & H_{2'}), 2.3- 2.21 (1H, m, H_{2'}). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz): 158.4 (q), 154.9 (q), 152.3 (t), 150.5 (q), 144.6 (q), 135.8 (t), 130.1 (t), 128.3 (t), 128.1 (t), 127.8 (t), 126.8 (t), 124.1 (s), 119.2 (q) 113.6 (t), 85.7 (t), 83.5 (t), 72.1 (t), 63.3 (s), 55.2 (p), 38.5 (s). ESI MS (m/z): 614.0 [M+ Cl]⁻.

5'-Dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamidino-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (5):

Compound **4** (500 mg, 0.86 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL) and N,N-dimethyl-dimethoxyformamide (575 μL, 4.3 mmol) was added. After completion (TLC: CHCl₃/ MeOH/ NEt₃ 94:5:1), EtOAc was added and the organic phase was extracted with H₂O (15 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL), and brine (15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The resulting product (802 mg, 93%) was pure enough to be used in the next step without further purification. Mp:146°C (decomp.). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8.90 (1H, s, N=CH), 8.38 (1H, s, H₂), 7.41-7.07 (9H, m, DMTr), 7.03-6.8 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz & J₂= 17.2 Hz, H_{vinyl}), 6.8- 6.7 (4H, m, DMTr), 6.6- 6.5 (2H, J₁= 1.3 Hz & J₂= 17.2 Hz, H_{1'} and H_{trans}), 5.55- 5.50 (1H, dd, J₁= 1.3 Hz & J₂= 11.2 Hz, H_{cis}), 4.92- 4.87 (1H, m, H_{4'}), 4.17- 4.08 (1H, m, H_{3'}), 3.7 (6H, s, CH₃ DMTr), 3.43- 3.21 (3H, H_{5'} & H_{2'}), 3.16 (3H, s,

NCH₃), 3.15 (3H, s, NCH₃), 2.36- 2.30 (1H, m, H_{2'}). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz): 159 (q), 158.4 (q), 158 (t), 152.4 (q), 152 (t), 150 (q), 144.65 (q), 135.8 (t), 130.0 (t), 128.3 (t), 128.1 (t), 127.8 (t), 126.8 (t), 124.5 (s), 124 (q), 113 (t), 85.5 (t), 83.3 (t), 72.2 (t) 63.3 (s), 55.2 (p), 38.6 (p), 35.2 (s), 29.6 (p). ESI MS (m/z): 635.3 [M+H]⁺, 657.2 [M+Na]⁺, 680.1 [M+ 2Na]⁺.

3'-N,N'-diisopropylcyanoethylphosphoramidite-5'-dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamide-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (6):

Compound **5** (300 mg, 0.473 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (1.4 mL) under Ar. Tetrazole (16.6 mg, 0.28 mmol) was added, followed by a freshly prepared solution of N,N'-diisopropyl-cyanoethyl-phosphorodiamidite (225 μL, 0.71 mmol) in dry CH₂Cl₂ (200 μL). After 4h stirring (TLC: CH₂Cl₂/ EtOAc/ NEt₃ 45:45:10), EtOAc and NEt₃ were added and the organic phase was washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine; dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The oily residue obtained was purified on silica gel (CH₂Cl₂/ EtOAc/ NEt₃ 45:45:10). The phosphoramidite monomer was dissolved in toluene so that a 35% solution was obtained. The solution was slowly added to a rapidly stirred and cooled solution of hexane (-20°C, 20-25 volumes). The precipitated phosphoramidite **6** (237 mg, 0.284 mmol) was obtained in 60% yield. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz): 8.9 (1H, s, N=CH), 8.3 (1H, s, H₂), 7.4- 7.2 (9H, m, DMTr), 7.1-6.90 (1H, dd, J₁= 11 Hz & J₂= 17 Hz, H_{vinyl}), 6.80- 6.75 (4H, m, DMTr), 6.6- 6.4 (2H, m, H_{1'} and H_{trans}), 5.6- 5.5 (1H, m, H_{Cis}), 5- 4.9 (1H, m, H_{3'}), 4.2 (1H, m, H_{4'}), 3.8 (6H, s, CH₃ DMTr), 3.7- 3.6 (5H, m, CH₂O, H_{isopropyl}, H_{2'}; H_{5'}), 3.24- 3.21 (6H, s, CH₃), 2.67- 2.60 (1H, s, H_{2'}), 2.58- 2.48 (2H, m, CH₂CN), 1.35- 1.10 (12H, m, CH₃ isopropyl). ³¹P NMR (200 MHz, CD₂Cl₂): 149.9 and 149.2 ppm. ES MS (m/z): 835.2 [M+H]⁺.

Solid phase oligonucleotide synthesis.

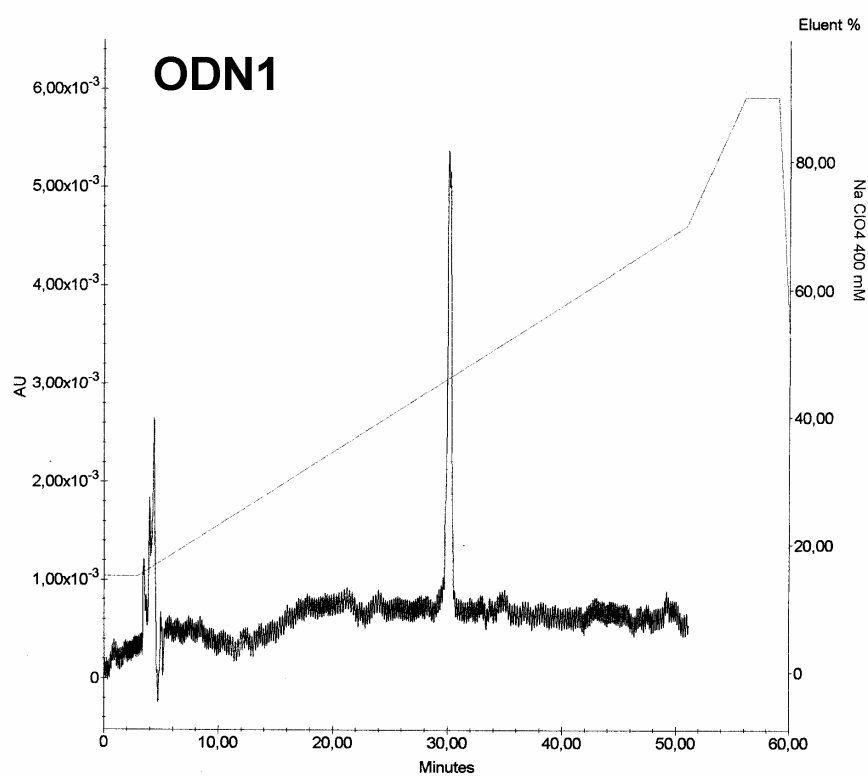
Three 15 mer sequences (ODN1 to ODN3) differing by the closest neighbors to the nucleoside analogue (N= 8vdA or 2AP) were synthesized in this study. Their sequences are d(CGT TTT **XX** TTT TGC) with X=T, A, and C for ODN1, ODN2 and ODN3, respectively.

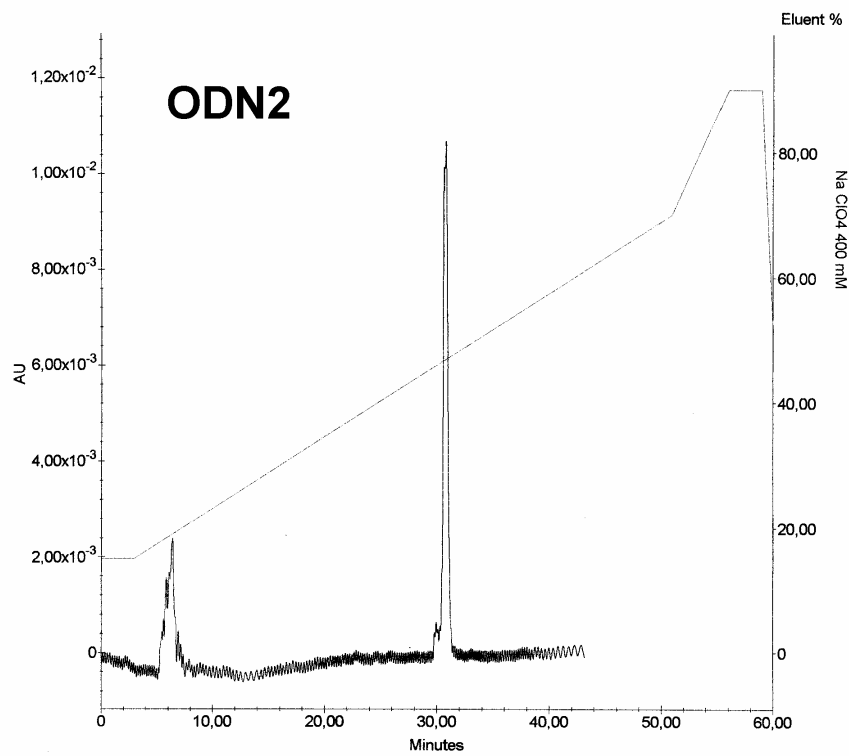
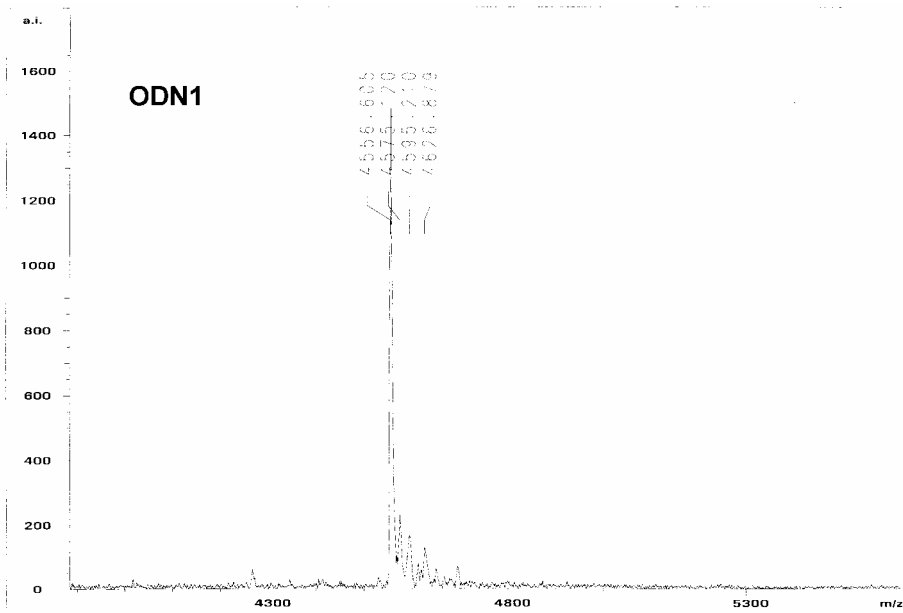
Oligodeoxyribonucleotides containing 8vdA were synthesized on an Applied Biosystem 392 synthesizer using fast-deprotecting phosphoramidite chemistry at a 1 μ mol scale. Pac-dA, iPr-Pac-dG, Ac-dC and T phosphoramidites were purchased from Eurogentec Glen Research. The following modifications to the standard procedure were applied. A longer coupling time (35 s) for 8vdA was used to ensure a high coupling yield. Dichloroacetic acid (3%) in acetonitrile was used for removal of the dimethoxytrityl group (DMTr) (34). Phenoxyacetic anhydride (Pac₂O) was used in Cap A (35). Phosphite oxidation was realized with 2-butanone peroxide in CH₂Cl₂ (0.1 M) (38). The 5'-terminal DMTr group of the synthesized ODNs was removed prior to its cleavage from the solid support. Each oligonucleotide was then cleaved and deprotected by treating the solid support with concentrated ammonia (28%) during 4 hours at room temperature. They were further evaporated to dryness and finally purified by HPLC on a DNAPAC™ PA-100 column (9×250 mm) purchased from Dionex. HPLC conditions (50°C): solution A = 4M urea 10% acetonitrile-20mM Mes buffer pH 6.5-1mM NaClO₄ and solution B = 400 mM NaClO₄; gradient = 85%A-15%B to 35%A-65%B in 50 min at a flow rate of 1ml/min. The oligomers were desalted by gel filtration on Sephadex G25 purchased from Pharmacia. The final oligonucleotide concentration was determined by UV absorption at 260 nm. Prior to mass spectrometry, metallic cations of the oligonucleotides were exchanged with ammonium (diammonium hydrogen citrate) using C₄ Reverse Phase ZipTip® purchased from Millipore. MALDI TOF MS analysis was realized on a Bruker Biflex III in a linear negative mode. All samples were analysed using 3-hydroxypicolinic acid as matrix (Aldrich).

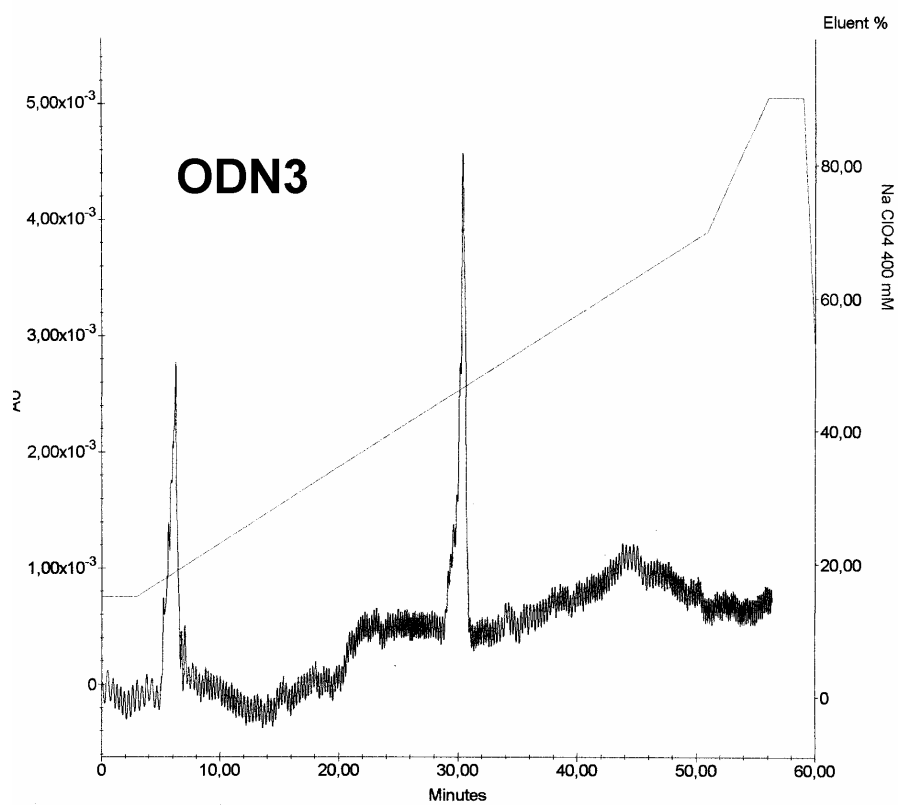
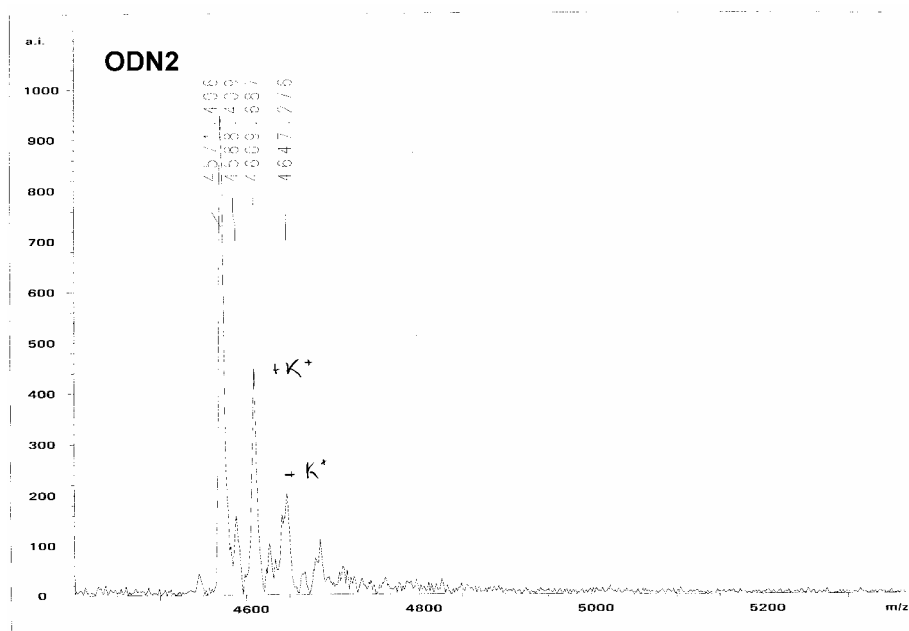
ODN1: $DO_{260nm} = 30$ (24%), MS $[M-H]^-$ calc. 4555 found 4556; ODN2 : $DO_{260nm} = 28$ (20%), MS $[M-H]^-$ calc. 4573 found 4571. ODN3 : $DO_{260nm} = 32$ (25%), MS $[M-H]^-$ calc. 4525 found 4528;

Nonlabeled (N= A) or 2AP-labeled (N= 2AP) ODN1 to ODN3 oligonucleotides as well as their complementary sequences were purchased by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany).

Figure 7: Anion exchange HPLC chromatograms and MALDI-TOF mass spectra of purified ODN1, ODN2 and ODN3







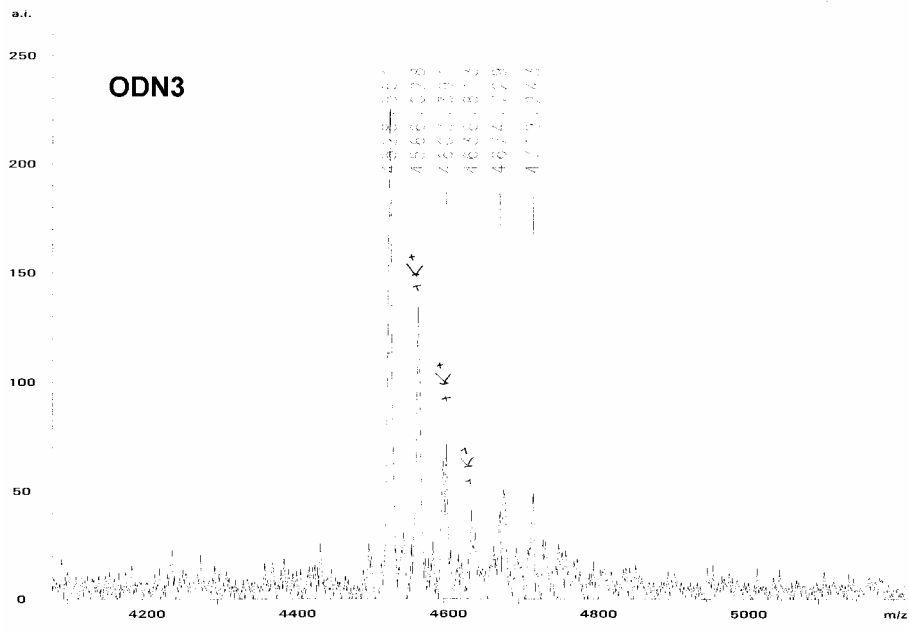
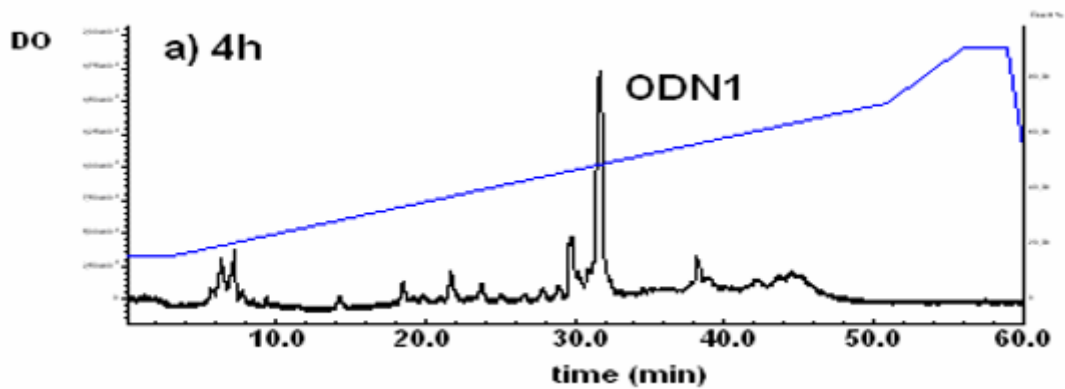
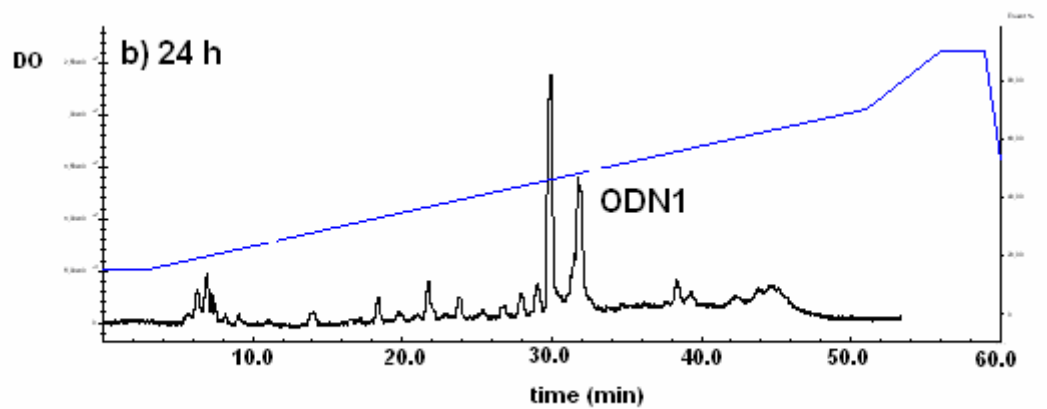


Figure 8: HPLC chromatograms of the 8vdA-labeled ODN3 crude product obtained after 4 hours (a) and 24 hours (b) treatment with NH_4OH .



Conclusions et perspectives

De part leur implication dans le cycle viral, l'interaction entre la protéine NCp7 et la séquence cTAR décrite dans ce travail semble être une cible privilégiée pour la thérapie contre le VIH. Mais pour permettre le développement de tels médicaments, il faut tout d'abord décrire d'une façon précise les mécanismes qui entrent en jeu dans le premier saut de brin. En effet, c'est par son activité chaperonne que la protéine NCp7 est capable de déstabiliser la séquence cTAR pour l'hybrider avec sa séquence complémentaire ARN TAR. Suite aux travaux effectués au sein de notre laboratoire qui ont mis en évidence la déstabilisation de cTAR durant le saut de brin, il paraissait important d'approfondir l'explication de ce mécanisme. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'impact des structures secondaires et primaires de cTAR et de la NCp7. Cette étude a été effectuée par différentes méthodes de spectroscopie de fluorescence.

Dans un premier temps, la partie haute de cTAR (supérieure au bulge en T⁴⁰) apparaît comme un nœud thermodynamique et limite fortement l'ouverture de cette séquence par la protéine NCp7. Il a été précédemment montré que la fusion de cTAR se faisait par le bas de la séquence qui est thermodynamiquement plus facile à ouvrir ce qui a été confirmée dans notre étude. Cependant, nous avons également montré que cette ouverture peut également se faire par la boucle interne, alors que la boucle apicale ne joue qu'un rôle mineur dans la déstabilisation. Nous avons mis en évidence que non seulement la structure secondaire de cTAR mais encore l'aptitude de NCp7 pour ouvrir cette même séquence est également fortement dépendante de la présence de l'un ou l'autre bulge de la partie basse de cTAR. En effet, nous avons montré que des structures trop stabilisées altèrent le saut de brin. Par conséquent, la stabilité de la séquence native est en parfaite adéquation avec l'aptitude de la protéine NCp7 à abaisser la barrière thermodynamique. Il y a eu probablement évolution concertée entre la séquence cTAR et la protéine NCp7.

Cette première partie des travaux amène un certain nombre de perspectives. En effet, comme la boucle interne est un site d'initiation de la fusion de la séquence cTAR par la NCp7 et qu'elle est aussi le site spécifique de liaison de la protéine Tat, on pourrait envisager d'étudier une compétition entre ces deux protéines. D'autre part, on pourrait utiliser les inhibiteurs existants de Tat pour les tester comme inhibiteurs de la liaison entre cTAR et NCp7. Dans un cadre plus général, après avoir décrit le mécanisme moléculaire entrant en jeu dans la déstabilisation nous pourrions trouver des substances inhibitrices en effectuant un criblage. D'autre part et en rapport avec la liaison de la NCp7 sur cTAR, il serait important de

révéler la structure tridimensionnelle de la séquence ainsi que son complexe avec la protéine. Dans une suite logique de ce travail, il apparaît important de s'intéresser au mécanisme d'hybridation de la séquence cTAR avec son complémentaire ARN TAR, ceci étant en cours au sein de notre laboratoire. Mais aussi, on pourrait envisager d'utiliser nos mutants de cTAR dans le cadre d'expériences *in vivo*. En effet, ces expériences permettraient d'observer l'effet de nos mutations de cTAR sur le cycle viral. En plus après avoir expliqué les mécanismes moléculaires du premier saut de brin, une étude similaire pourrait être envisagée pour la mise en évidence du mécanisme du deuxième saut de brin (déstabilisation et hybridation) mettant en jeu la séquence PBS et la protéine NCp7. Cette étude est en cours dans notre laboratoire.

Suite à l'étude effectuée sur les mutants de la partie haute de cTAR, nous avons mis en évidence par FCS, la formation d'homodimères d'un certain nombre de ces mutants par complexe boucle-boucle en présence de la NCp7. Ils ont été mis en évidence par la mesure du nombre de molécules fluorescente. Ce nombre est divisé par deux en présence de NCp7 pour certains mutants. Ces observations ont été confirmées par la mesure du coefficient de diffusion qui a été comparé au coefficient de diffusion théorique. Pour la séquence native, il semble que l'homodimère n'est qu'une étape intermédiaire vers un état plus stable.

Mais pour confirmer ces conclusions et comme perspective de ce travail, il faudrait développer la Spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCS croisée). Cette technique consiste à corréler les fluctuations de fluorescence d'une espèce marquée avec un chromophore avec les fluctuations d'une seconde espèce marquée avec un chromophore « spectralement » différent. Et donc s'il y avait formation d'un dimère entre deux de ces molécules, le mouvement des deux chromophores serait corrélé. Une autre perspective de ce travail serait d'effectuer des mutations dans la boucle de cTAR afin d'identifier les nucléotides impliqués dans la formation du complexe boucle-boucle.

Dans une deuxième partie, nous avons mis en évidence l'importance de la structure primaire de la protéine NCp7. Il apparaît que la présence des doigts de zinc est obligatoire au bon fonctionnement de l'activité chaperonne de NCp7. Mais c'est surtout le premier doigt qui semble indispensable ce qui est certainement dû à aux quatre acides aminés hydrophobes (Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴ et Ala²⁵). D'autre part, le Trp³⁷ joue également un rôle important dans la liaison de la protéine avec cTAR ainsi que de sa déstabilisation. Ce tryptophane influence également l'infectivité des virus (Dorfman, et al., 1993). Ce travail amène un certain nombre

de perspectives. Tout d'abord, on pourra étendre cette étude à d'autre protéine de la nucléocapside en particulier NCp10 de MuLV qui lui ne présente qu'un seul doigt de zinc mais on peut également effectuer ce type d'étude sur NCp8 de SIV. Au vu des résultats obtenus sur la liaison et la déstabilisation, il faudrait étudier l'impact de telles mutations sur NCp7 au regard de l'hybridation de TAR et PBS avec leur complémentaires.

En conclusion de ces deux parties, on peut dire qu'à la fois les éléments formant la structure secondaire de cTAR et les doigts de zinc formant la grande partie de la structure primaire de NCp7 sont indispensable au premier saut de brin de transcription inverse de VIH-1.

Dans une troisième et dernière partie, nous avons décrit les propriétés spectroscopiques d'un nouvel analogue fluorescent : la 8vdA. Il apparaît par ces propriétés spectroscopiques une bonne alternative à la 2AP. Il est adapté aux conditions physiologiques et son rendement quantique une fois incorporé dans un oligonucléotide baisse moins que celui de la 2AP. D'autre part, il est une bonne sonde pour la dimérisation. En conclusion, la 8vdA possède des caractéristiques similaire à la 2AP mais un certain nombre d'avantages non négligeable comme la sensibilité accrue et un quenching moins important dans les oligonucléotides. Une telle sonde apporte évidemment un certain nombre de perspective. En effet, elle pourra être utilisé pour l'étude de l'activité chaperonne de NCp7 sur cTAR ce qui ferait une étude complémentaire à l'étude entreprise durant cette thèse. Cette sonde étant un analogue de l'adénine, elle pourra être utilisée comme une sonde permettant la détection des complexes boucle-boucles ceci pour des séquences ayant une adénine dans la boucle. Ceci est possible sur les séquences PBS(+) et dTAR par exemple. Enfin, on pourrait synthétiser un équivalent ARN de la 8vdA afin de l'incorporer dans TAR et PBS par exemple.

Annexes

Mise en évidence de la dimérisation de VPR.

Vpr est une protéine de 96 acides aminés. Elle présente dans sa partie C-terminale (52-96) une structure de type « leucine-zipper ». Dans cette étude a été décrit la dimérisation de Vpr et plus particulièrement de sa partie C-terminale (contenant le motif « leucine-zipper ») par différentes méthodes. Nous avons participé à cette étude par le biais de la spectroscopie de fluorescence.

Pour ce faire, nous avons suivi la fluorescence du Trp⁵⁴ de Vpr. Or il a été montré que dans cette publication que le Trp⁵⁴ était proche de l'His⁷¹ dans le dimère. L'His⁷¹ est dans sa forme protonée un excellent inhibiteur de la fluorescence du tryptophane (Chen, et al., 1998; Shinitzky, et al., 1967). En premier lieu, nous avons suivi le rendement quantique en fonction de la concentration en (52-96)Vpr dans deux conditions différentes :

- les conditions des expériences de RMN (30% d'acétonitrile, pH3)
- les conditions sans acétonitrile (25mM Mes pH 4.5)

Les points expérimentaux ont été ajustés par l'équation 2 de la publication. Ces rendements baissent quand la concentration en protéine augmente. Ceci confirme les expériences de RMN selon lesquelles la dimérisation de la Vpr aurait lieu par sa partie C-terminale (52-96). Nous en avons extrait deux constantes de dissociation pour l'équilibre monomère-dimère dans les deux conditions respectivement de $7(\pm 3) \times 10^{-4}$ M et de $6(\pm 2) \times 10^{-5}$ M. La première est en parfaite adéquation avec celle déduit des mesures de RMN alors que la deuxième est dix fois plus petite. Nous noterons que le rendement quantique du dimère est très bas dû à la proximité entre le Trp⁵⁴ et l'His⁷¹. D'autre part, aucune variation de durée de vie de fluorescence en fonction de la concentration en protéine n'a été observée. De ces expériences on peut déduire qu'il y a très certainement un effet dû au pH sur la fluorescence du tryptophane par l'intermédiaire de la protonation de l'histidine. Ensuite, nous avons suivi l'intensité de fluorescence du Trp⁵⁴ en fonction du pH. Nous avons pu déduire de la courbe sigmoïdale que dans la forme dimère la protonation des deux histidines se faisait simultanément et en ajustant les points expérimentaux par l'équation 3 de publication nous avons déduit une constante de protonation K de 9.1×10^{10} M⁻².

Au vu des expériences en RMN ainsi que celles effectuées par spectroscopie de fluorescence, on peut conclure que la dimérisation de la Vpr a lieu par sa partie C-terminale plus précisément par les structures en leucine-zipper. Dans le dimère, il a été mis en évidence une interaction entre l'His⁷¹ et le Trp⁵⁴ ainsi qu'une protonation coopérative des His du dimère. Ceci indique que le dimère a une orientation antiparallèle. Dans la formation du dimère le Trp⁵⁴ et l'His⁷¹ ne sont pas les seuls résidus à être impliqués. En effet, avec la Val⁵⁷,

l'Ile⁶¹, la Leu⁶⁴ et ⁶⁸ et la Gly⁷⁵, ils forment le site de nature hydrophobe responsable de la dimérisation. Il existe alors un autre domaine hydrophobe formé par les acides aminés Gly⁵⁶, Leu⁶⁰ et ⁶⁷ et Ile⁶³, ⁷⁰ et ⁷⁴. Par conséquent, le dimère de (52-96)Vpr présente deux domaines hydrophobes accessibles au contraire du dimère de la protéine entière qui ne présente qu'un seul domaine hydrophobe. D'autre part, la Vpr interagit avec d'autres protéines ainsi que des acides nucléiques. Elle interagit notamment avec IN (Bischerour, et al., 2003). La protéine Vpr en interagissant est capable d'inhiber la protéine IN. Dans ce cas, la (52-96)Vpr sous forme dimère est capable de mimer l'effet de la protéine entière en compensant la partie manquante. En interagissant avec l'ADN, le dimère de (52-96)Vpr avec deux domaines sera un meilleur vecteur de transport de l'ADN que le dimère de (1-96)Vpr (Kichler, et al., 2000).

**THE C-TERMINAL DOMAIN OF VPR ADOPTS AN ANTIPARALLEL DIMERIC
STRUCTURE IN SOLUTION VIA ITS LEUCINE-ZIPPER-LIKE DOMAIN.**

Running Title

A leucine-zipper structure formed by (52-96)Vpr

S. Bourbigot¹, H. Beltz², J. Denis¹, N. Morellet¹, B. P. Roques¹, Y. Mély² and S. Bouaziz^{1}*

¹DEPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE CHIMIQUE & GÉNÉTIQUE

INSERM U640 - CNRS UMR8151

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

4, avenue de l'Observatoire • 75270 Paris Cedex 06 • France

²LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET PHYSICOCHIMIE DES

INTERACTIONS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

CNRS UMR 7034

Equipe Photophysique des interactions moléculaires • Université Louis Pasteur

74, route du Rhin • 67401 ILLKIRCH • France

* To whom correspondence should be addressed.

DEPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE CHIMIQUE & GÉNÉTIQUE

INSERM U640 - CNRS FRE 8151

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

4, avenue de l'Observatoire • 75270 Paris Cedex 06 • France

Tel. (33)-1-53-73-95-78. -Fax. (33)-1-43-26-69-18.

bouaziz@pharmacie.univ-paris5.fr

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr is a highly conserved accessory protein involved in many functions of the virus life cycle. Vpr facilitates the entry of the HIV preintegration complex through the limiting nuclear pore, induces G2 cell cycle arrest, regulates cell apoptosis, increases transcription from the LTR and enhances viral replication. Vpr contains a Leu/Ile rich domain (LR domain, aa 60-81) in its C-terminal part that is critical for dimerization. This C-terminal domain (52-96) is particularly implied in properties of the protein such as DNA interaction or apoptosis via interaction with the adenine nucleotide translocator. To understand (52-96)Vpr specific interactions, we have investigated the ability of the peptide to dimerize through a leucine-zipper, by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and fluorescence spectroscopy. Contrary to the study performed in the presence of TFE, our results, obtained in the presence of 30% CD₃CN, show that (52-96)Vpr in solution stills forms an α -helix spanning residues 53 to 75 and dimerizes in an antiparallel orientation, through hydrophobic interactions between leucine and isoleucine residues and a stacking between H71 and W54. The N-terminal part of (52-96)Vpr and the corresponding region in the entire protein show similar fold. Since the leucine-zipper evidenced in this work mimics (1-96)Vpr structure, this could explain why some of the properties of the (52-96) domain and (1-96) are identical while some are even enhanced for (52-96)Vpr.

Key Words : HIV, Vpr, Leucine-zipper, NMR, fluorescence

INTRODUCTION

The Human immunodeficiency virus type I (HIV-1) codes for several auxiliary proteins including Vpr, a 14 kDa virion associated protein containing 96 amino acids¹. Vpr interferes with many functions in the viral life cycle, induces G2/M cell cycle arrest^{2; 3}, controls apoptosis by permeabilizing the mitochondria membrane^{4; 5}, increases transcription of the long terminal repeat (LTR)⁶, enhances viral replication⁷ and helps the entry of the HIV-1 preintegration complex (PIC) containing the viral DNA⁸. Vpr shuttles between the nucleus and the cytoplasm. Moreover, Vpr concentrates in the nuclear envelope by interacting with components of the nuclear pore complex (NPC)⁹ and transfects various cell lines¹⁰ very efficiently. Different fragments of Vpr have also been extensively studied. The N-terminal part (1-51) was shown to play an important role in nuclear localization and in virion incorporation¹¹. More precisely, (13-33)Vpr is known to be essential for nuclear localization. (34-51)Vpr has been described to play an important role in Vpr oligomerization¹². Lastly, the C-terminal domain (52-96) of Vpr was shown to be involved in cell cycle arrest¹³, to bind the nucleocapsid protein NCp7¹⁴, and interact with HIV-1 RNA. Furthermore, this domain is thought to promote nuclear provirus transfer.

To gain insight into the structure-function relationships of Vpr, many structural studies have been performed on the (1-96)Vpr^{15; 16}, (1-51)Vpr¹⁷ and (52-96)Vpr¹⁸ domains and on shorter fragments^{12; 19}.

Whatever the solvent and the solution conditions employed, these fragments are characterized by long amphipathic α -helices spanning residues 13 to 33 for (13-33)Vpr, 34 to 51 for (34-51)Vpr, 17 to 29 and 35 to 46 for (1-51)Vpr and 53 to 78 for (52-96)Vpr. Moreover, it was shown that (52-96)Vpr dimerizes and L60 and L67 residues, located on the hydrophobic face of the amphipathic α helix, appear to be involved in this dimerization through a leucine-

zipper arrangement since their replacement into Ala¹⁸ prevented dimerization. Since no long range NOE has been observed in this previous work, in presence of 30% TFE, a theoretical model of the coiled-coil (52-96)Vpr dimer, suggested to take place through a parallel orientation, was proposed.

Lastly, the three-dimensional structure of the entire protein (residues 1-96) was determined in the presence of TFE or CD₃CN or in pure water by NMR^{15; 16}. The structure obtained in the presence of 30% of TFE reveals three well defined α -helices adopting a U-shaped form, while in presence of 0% to 30% CD₃CN, the protein shows the same well-defined α -helices folded around a hydrophobic core constituted of Leu, Ile, Val and aromatic residues¹⁶. Within (1-96)Vpr, point mutational analysis of the Leu/Ile residues in the leucine rich (LR) domain suggested that multiple Leu/Ile residues may be involved in maintaining an intramolecular leucine-zipper-like structure²⁰.

Taking into account the solvent effects on (1-96)Vpr structure, study of the (52-96) domain in the presence of CD₃CN and at acidic pH was undertaken. In these conditions, it was possible to observe the formation of a leucine-zipper through an antiparallel orientation of two α -helices connected through hydrophobic residue interactions. These results were confirmed by NMR and fluorescence experiments.

RESULTS

Determination of conditions for NMR spectroscopy

Due to its cellular toxicity²¹, Vpr cannot be easily obtained in large quantities by recombination. Solid-phase synthesis of (52-96)Vpr was carried out and 17 labeled amino acids have been introduced specifically at several positions of the (52-96) C-terminal sequence to facilitate the NMR spectra assignment (Figure 1). 30% CD₃CN were added to the

solvent to prevent the strong tendency of the domain to oligomerize in pure water. During the study of (1-96)Vpr structure, we showed that the use of TFE, a hydrophobic solvent, lead to the elimination of oligomerization but forced the structure to adopt an open U-shaped form. The use of acetonitrile (CD_3CN), less hydrophobic than TFE, allowed to prevent Vpr oligomerization while still maintaining tertiary structure of the protein thanks to hydrophobic interactions between the three helices. Thus, acetonitrile made it possible to obtain good quality spectra that allowed highlight the formation of the dimer.

NMR analysis and intramolecular versus intermolecular NOE restraints

DQF-COSY^{22; 23} and TOCSY²⁴ experiments were used to identify spin systems and NOESY experiments^{25; 26} were used for sequential and long range distance assignment²⁷. The 17 labeled amino acids (95% ^{15}N , 15% ^{13}C) have unambiguously been identified from 2D ^{15}N HSQC^{28; 29; 30} and confirmed the proton assignment. Although many overlaps occur in the aliphatic region, characteristic connectivities $d\alpha\text{N}(i,i+3)$ and $d\alpha\beta(i,i+3)$ and the strong NOEs $d\text{NN}(i,i+1)$ and $d\beta\text{N}(i,i+1)$ have been identified from amino acids 53 to 75 indicating the presence of an α helix spanning these residues. The C-terminal moiety (76-96) of the peptide does not present any particular secondary structure element.

The antiparallel dimerization of the molecule through the formation of a leucine-zipper has been evidenced by the correlation peaks observed between the aromatic protons of W54 and H71 and between W54 and L68 protons (Figure 2) and the unusual chemical shift of H71 protons. To obtain the structure of the homodimer with two-fold axis symmetry, it was necessary to discriminate between inter- and intra-molecular NOEs. The method to assign unambiguously the inter and intra molecular NOEs³¹ by mixing 50/50 selectively labeled and unlabeled protein was not applicable in our case since only 17 amino acids were labeled.

Structure calculation of the leucine-zipper forming domain

The structure of the (52-96)Vpr dimer was calculated by restrained simulated annealing, molecular dynamics and energy minimization implemented with a total of 573 NOE-derived distances. Of these distances, 275 are intraresidual, 128 are sequential and 148 are medium range ($|i-j| \leq 4$). Moreover, 22 intermolecular distances were identified and defined unambiguously while all other restraints were defined ambiguously for structure calculation in X-PLOR^{32; 33}. The distinction between intramolecular and intermolecular correlations was straightforward concerning residues far from each other in the sequence while this differentiation was impossible for residues close to each other both in the monomer and in the dimer. About 12 constraints per residue allowed a good definition of the structure to be obtained.

Out of 100 calculated structures, 10 were selected according to their low overall energy and their weak number of distance restraint violations. None of the structure exhibited a NOE violation greater than 0.2 Å and all of them presented a good covalent geometry, with no bond or angle violations. The distribution of the ϕ, ψ angles reveals that 98 % of the residues are found in the allowed region while 2% were located in non-favorable regions (see table 1). The superimposition of the 10 lowest energy structures on their backbone atoms shows a good convergence of the structures (Figure 3). The pairwise r.m.s. deviation has been calculated for the monomer and evaluated to 0.90 ± 0.22 Å on the backbone atoms for residues 53-75, which form the best defined part of the structure. The pairwise rmsd calculated on the backbone atoms for the dimer has been evaluated to 1.40 ± 0.30 Å for the same domain. Input data for structural calculations and statistics are listed on table 1.

Each domain within the dimer structure displays the same characteristics as the monomer structure calculated in the presence of 30% TFE¹⁸. The structure is an amphipathic α helix

with a large hydrophobic face composed of residues W54, G56, V57, L60, I61, I63, L64, L67, L68, I70, H71 and I74 and a less extended hydrophilic one constituted by the residues E58, R62, Q65, Q66, R73 and R77. Leucines, valines and isoleucines constituting the hydrophobic interface of the dimer with W54/H71 clamping the structure are represented on figure 4.

The relative orientation of the residues essential for the leucine-zipper motif formation can be represented on a helical wheel (Figure 5). Many isoleucine and leucine residues are in the required position to interact together to form the leucine-zipper and the stability of the dimer is ensured by hydrophobic interactions taking place at the interface. The dimeric structure is also maintained by the stacking of residues W54 and H71. A supplementary hydrophobic platform comprising residues G56, L60, I63, L67, I70 and I74 remains for additional interactions (Figure 5).

Characterization of the dimer interface and dissociation constant determination

Dimerization of the (52-96)Vpr C-terminal domain and the dissociation constant for the monomer-dimer equilibrium were investigated by following the ^1H and ^{15}N chemical shift variation over a concentration ranging from 2.0 mM to 0.03 mM by heteronuclear NMR experiments. Figure 6 shows the superposition of the ^{15}N HSQC spectra registered at the lowest and highest concentrations displaying the greatest chemical shift variations. Significant concentration-dependent ^1H and ^{15}N chemical shifts variations were examined for a subset of residues involved at the interface of the dimer and are reported in table 2. The largest chemical shift variations have been observed for residues T55, I61, H71, F72 and T55, V57, I61, F72 in the ^1H and in the ^{15}N dimensions respectively. The absolute values of the ^1H and ^{15}N chemical shift deviation varied from 0.005 to 0.12 ppm and from 0.02 to 0.76 ppm. As it can be observed, the amino acids experiencing the most important chemical shift variation are

located either directly at or close to the dimer interface.

Since the exchange rate between the monomeric and dimeric states is much faster than the difference in chemical shifts between the two states, the observed resonance frequency, ω_{obs} , may be related to the population weighted average of the monomer and the dimer resonance frequencies according to:

$$\omega_{obs} = \omega_D + \frac{\sqrt{K_d(K_d + 8c)} - K_d}{4c} (\omega_M - \omega_D) \quad (1)$$

where K_d is the dissociation constant of the monomer-dimer equilibrium, c is the total protein concentration, ω_M and ω_D are the monomer and the dimer resonance frequencies respectively. The mean K_d value calculated from the 1H or ^{15}N data were $9(\pm 3) \times 10^{-4}$ M and $6(\pm 8) \times 10^{-4}$ M, respectively and are thus fully consistent. Due to larger shift changes relative to line widths and higher digital resolution in the 1H dimension, a higher precision in the 1H data set has been obtained. Relative populations of monomer and dimer at different concentrations were calculated (Figure 7). The analysis was limited by the significant line broadening of the NMR spectrum attributable to increased transverse relaxation rates and by the increased population of dimers at a given sample concentration.

Comparison with the C-terminal domain of previously determined structures

The present structure established in the presence of 30% CD_3CN and the same domain in the whole protein (1-96)Vpr¹⁶ have been compared. The helix, spanning residues 53 to 75, is a little shorter than in (1-96)Vpr structure. The orientation of the hydrophobic residues is conserved and located on the same face of the helix and many of these residues are involved at the interface of the dimer or in the formation of the hydrophobic core in the full protein. A superimposition of the (53-75) domains of one α -helix of the dimer and of the same domain

in the whole protein (1-96) shows an r.m.s.d. of 1.2 Å calculated on the backbone atoms. Interestingly, the second α -helix (53-75) of the dimer adopts the same position as the N-terminal α -helix (15-34) in the whole protein, in opposite way. These data show that the hydrophobic residues are protected from the solvent at the interface of the dimer (52-96) as in the cluster in the whole protein (1-96). In all cases, the C-terminal domain spanning residues 80 to 96 is disordered (Figure 8).

Fluorescence spectroscopy

To independently assess the dimer-monomer equilibrium of (52-96)Vpr, the dependence of the quantum yield of the single Trp residue (at position 54) of (52-96)Vpr on the peptide concentration was investigated. The rationale of this approach is that the spatial proximity between W54 with H71 evidenced by NMR in the head-to-tail dimer should lead to a strong quenching of the W54 fluorescence. Indeed, His has been shown to be efficient quencher, but only in its protonated form^{34,35}. The concentration dependence of (52-96)Vpr quantum yield was first determined in the NMR conditions (30% acetonitrile, pH 3) where the His residues are expected to be fully protonated. In full line with our hypothesis, we observe a dramatic decrease of the quantum yield when the peptide concentration was increased (Figure 9). This decrease was not associated with any change of the maximum emission wavelength, which remains at 448 nm, a wavelength typical of solvent-exposed Trp residues. The concentration dependence of the quantum yield of (52-96)Vpr was fitted with an equation derived from Equation (1):

$$\phi_{obs} = \phi_D + \frac{\sqrt{K_d(K_d + 8c)} - K_d}{4c} (\phi_M - \phi_D) \quad (2)$$

where c is the total protein concentration, ϕ_M and ϕ_D are the quantum yields of the monomer and the dimer, respectively. We found a dissociation constant value for the monomer-dimer equilibrium of $K_d = 7(\pm 3) \times 10^{-4}$ M, in excellent agreement with the K_d values obtained from

NMR. Moreover, ϕ_M and ϕ_D were found to be 0.025 and 0, respectively. The negligible fluorescence of the dimers suggest that due to their close proximity, W54 and H71 residues may form ground state interactions that totally quench Trp fluorescence. Such interactions have already been reported between 3-methyl indole and N-acetyl histine at high concentrations (>0.2 M)³⁵. As a further support to this, the time-resolved fluorescence parameters of (52-96)Vpr at high concentration (2 mM) do only slightly differed from those at low concentration (1 μ M), confirming that the dimers are not emissive or emit with a lifetime lower than the resolution (20 ps) permitted by our device (data not shown).

To further strengthen our conclusions and exclude any artifact due to acetonitrile, the concentration dependence of W54 quantum yield was further investigated in 25 mM Mes, pH 4.5. In line with the results obtained with 30% acetonitrile, we found a steep decrease of (52-96)Vpr quantum yield when the peptide concentration was increased (Figure 9). Using equation (2) to fit the data, a dissociation constant of $6(\pm 2) \times 10^{-5}$ M was obtained, indicating a shift with respect to the monomer-dimer equilibrium in 30% acetonitrile by about one order of magnitude. The fitted quantum yield of the dimer was again very small, suggesting that a head-to-tail dimer may also be observed in the Mes buffer. To confirm this, the pH dependence of the fluorescence of W54 was monitored in this buffer. In line with the fluorescence quenching properties of the protonated form of His and the usual pKa values of His residues, a sharp fluorescence change with a mid-transition at about pH 5.5 was observed (Figure. 10). From the sigmoidal shape of the transition, it is further inferred that the protonation of the dimers may be considered as an all-or-none reaction where the two His residues in the dimer are protonated simultaneously. To check this hypothesis, we fitted this pH titration with the following equation:

$$I = I_{DH2} + \frac{(I_D - I_{DH2})}{(1 + K \times 10^{-2pH})} \quad (3)$$

where I is the fluorescence intensity at a given pH, I_D and I_{DH_2} are the fluorescence intensities of the unprotonated and the protonated dimer, respectively. The protonation constant K describes the simultaneous protonation of the two His residues in the dimer. A very good fit was obtained with this model, giving a K value of $9.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-2}$. In sharp contrast, no satisfactory fit could be obtained if either a noncooperative binding of the two protons or a binding of a single proton is assumed (Figure 10, dotted line). Noticeably, the nonzero value of the fluorescence intensity at acidic pH is probably related to the population of (52-96)Vpr monomers existing at the peptide concentration (22 μM) of the experiment. It was further checked at low peptide concentration (1 μM) that the fluorescence intensity of the monomers exhibited negligible sensitivity to pH, suggesting that the protonation of H71 does not significantly affect the fluorescence of W54 on the same monomer (data not shown).

DISCUSSION

In this work, we confirmed that the structure adopted by the (52-96)Vpr domain is a well defined α helix, spanning residues 53 to 75, as determined in an earlier study¹⁸ undertaken in 30% TFE. But, in contrast to this previous study, we showed herein that, in the presence of 30% CD_3CN , (52-96)Vpr is able to form a head to tail dimer through interaction between two leucine-zipper like domains. Though such dimers have already been suggested from circular dichroism and gel filtration¹⁸, the present study constitutes the first direct structural evidence for the formation of a dimer involving the leucine-zipper-like motif within (52-96)Vpr.

The antiparallel dimeric structure is strongly substantiated by i) the large upfield shift undergone by the 4H proton of H71 resulting from the current cycle due to the stacking with W54, ii) the strong fluorescence quenching of W54 by the protonated form of H71 in the opposite monomer and iii) the cooperative protonation of the H71 residues in the dimer. In this dimeric structure, residues W54, V57, I61, L64, L68, H71, and G75 constitute the

hydrophobic interface. Another hydrophobic domain constituted by residues G56, L60, I63, L67, I70 and I74 remains accessible to interact with additional (52-96)Vpr partners (Figure 5). A flexible region, encompassing residues 76-96, follows the helical region.

It appears that the two helices of the (52-96)Vpr dimer mimic the first and third helices of the (1-96)Vpr structure (figure 8). In both structures, the hydrophobic residues (G56, L60, I63, L67, I70 and I74) remain accessible. But in (52-96)Vpr, two hydrophobic platforms exist since two monomers are present. In the entire protein, only one hydrophobic domain is available while the second one is replaced by the hydrophilic region found in the first helix. The tendency of (52-96)Vpr to form oligomers has also been observed for the full protein^{7; 36}. (1-96)Vpr could dimerize either by its hydrophobic region, in the same way as (52-96)Vpr or by electrostatic interactions between its acidic N-terminal and basic C-terminal domains. Early observations have shown that antibodies in HIV-1-infected patients preferentially recognize the dimeric form of (1-96)Vpr³⁷ and these homodimers could correspond to the stabilized form of the protein.

Vpr(52-96) interacts with various partners such as proteins and nucleic acids and among its most important properties, it is an apoptogenic peptide. It induces mitochondrial membrane permeabilization via a specific interaction with the adenine nucleotide translocator (ANT) located in the inner membrane of the mitochondria³⁸. (52-96)Vpr is also able to transfect various cell lines^{10; 39}. The dimeric structure reported in this work could help to understand how (52-96)Vpr is able to interact with host or viral effectors but also could inform about the similarities and differences between (1-96)Vpr and (52-96)Vpr in their interactions.

Very recently, the effect of full length Vpr and (52-96) C-terminal domain on integration properties of integrase (IN) have been compared⁴⁰. Both of them, at concentrations above 1.6 μ M, inhibit the homologous integration activity of integrase. Conversely, at concentration

below 1.6 μ M, (1-96)Vpr is still an inhibitor whereas (52-96)Vpr stimulates the integration. This phenomenon can be explained in the following way. At concentration above 1.6 μ M, (52-96)Vpr is most likely a dimer, mimics the full protein and exhibits the same properties as (1-96)Vpr, inhibiting integration. In this case, the same hydrophobic platform remains accessible for interaction and prevents integrase activity. The domain (71-82) is certainly not involved in this process since it is accessible as well in the dimer as in the entire Vpr. At lower concentration (52-96)Vpr is in monomeric form and its effect is different because its three dimensional structure has changed. A second hydrophobic platform appears that was buried within the dimer and is available for additional interactions, which inhibit integration activity. Thus the accessible residues are different than those in (52-96)Vpr dimer or in the full-length protein. This might explain the differences between the effect of this domain and (1-96) on IN integration activity, at low concentrations.

The capacity of (1-96)Vpr and some of its fragments to interact with oligonucleotides has also been studied¹⁰. It was shown that the basic residues implied in DNA interaction are located in the domain Vpr (70-80)^{41; 42} containing the H(S/F)RIG motif. In transfection assays, (52-96) domain is more efficient than (1-96)Vpr. These results are fully consistent with the present study. Since the (52-96) domain may dimerize, it presents two basic domains located at the C-terminal end of each monomers. Thus it doubles the capacity of this peptide to interact with nucleic acids, compared to (1-96)Vpr, which possesses only one such domain. This might explain why (52-96)Vpr is a better transfection agent compared to the full-length protein.

Vpr induces apoptosis⁴ in cells via its interaction with ANT. The full-length protein and its (52-96) domain alone kill Jurkat lymphoma cells while (1-51)Vpr is unable to perform such activity. (52-96)Vpr conserves this property, even when the peptide is in monomeric state. It has also been shown that (71-96)Vpr is sufficient to induce apoptosis and that mutations on

R73, R77 or R80 reduced the apoptogenic effect of (52-96)Vpr . These results are consistent with the structure determined in this work where these three arginines, within the (71-82) domain, are not involved in (52-96)Vpr dimerization and have the same accessibility whether the domain is a dimer or not.

The knowledge of the dimeric structure of (52-96)Vpr could be a basis for the design of new therapeutic molecules related to the transfection properties of (52-96)Vpr or to its apoptogenic abilities. These new agents could be new transfection factors or new molecules showing antitumoral activities.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

The (52-96) C-terminal domain of Vpr has been obtained by automated solid phase synthesis using the Fmoc strategy and then purified by reversed-phase HPLC, using procedures already reported for the production of retroviral proteins⁴³. The peptide was analyzed by mass spectrometry and found to have purity higher than 98 %. During protein synthesis, 17 labeled amino acids (95% ¹⁵N, 15% ¹³C) were introduced: T53, T55, V57, A59, L61, I63, L64, L67, L68, P69, H71, P72, G75, G82, T89, A93, Lys 95. Since the protein Vpr has the ability to arrest the cell cycle in the G2 phase and has the capacity to form ion channels, it is highly toxic for cells generally used for expression and the protein Vpr or its fragments could not be obtained by other way than chemical synthesis.

NMR experiments

All NMR experiments were recorded on a sample at a concentration of 2 mM in water with 30% CD₃CN, pH 3.0, at 293K, 308K and 313K, on an Avance Bruker spectrometer operating

at 600.14 MHz. 2D spectra were performed with 2048 real points in t_2 , a spectral width of 7062 Hz and 512 t_1 increments. The transmitter frequency was set to the water signal. The solvent resonance was suppressed using a 3-9-19 pulse sequence²⁸ with gradients during the relaxation delay of 1.6 s between free induction decays (FIDs). A mixing time of 200 ms has been used in NOESY experiments²⁵. All heteronuclear spectra were recorded with a spectral width of 7936.5 Hz sampled over 2048 complex points in ω_2 (^1H) and a spectral width of 1200 Hz sampled over 128 complex points in ω_1 (^{15}N). Decoupling of the ^{15}N nucleus during proton acquisition has been performed by application of a GARP sequence⁴⁴. Experiments were recorded on the phase sensitive mode using echo/antiecho gradient selection^{45; 46; 47} and trim pulses in inept transfer. The initial analysis of (52-96)Vpr dimerization was based on two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC^{29; 30} spectra recorded at different concentrations ranging from 0.03 mM to 2.0 mM, pH 3.0 in a 30% CD_3CN containing solution of aqueous water. For all experiments, the temperature was externally controlled using a special temperature control system (BCU 05 Bruker).

Data analysis and structure calculation

All data were processed using XWINNMR software (Bruker). A $\pi/6$ phase-shifted sine bell window function was applied and data were zero filled once prior to Fourier transformation in both dimensions (t_1 and t_2). The final size of the frequency domains matrices was 2048 and 2048 real points in ω_2 and ω_1 respectively. For all experiments, ^1H frequency scale was directly referenced to water as reference. The data were then analyzed with the Felix program (Accelrys, San Diego).

A set of distance restraints has been obtained from NOE cross-signal volume measured on a 200 ms mixing time NOESY at 303 K by integration of the peaks into distances by a R-6 dependency and a tolerance of 20 % to take into account integration errors. The distances

were calibrated using the distance between aromatic protons. No dihedral torsion angle restraints were included in the calculations. Standard protocols using distance geometry and simulated annealing were performed in X-PLOR 3.84^{33; 48} version on a SGI O2 R12000 computer.

Distance geometry and simulated annealing regularization Metric matrix distance geometry calculations were performed to embed and optimize initial structures. The experimentally obtained distance restraints were duplicated for the two monomers of (52-96)Vpr, during the embedding stage of the protocol. For optimization with simulated annealing (DGSA protocol) all distance restraints were specified with the "SUM" averaging option in X-PLOR^{33; 49}, which allows for ambiguity in the atom specification in input distance restraints. This feature is particularly useful, since many NOE cross-peaks arise from a combination of intra-molecular and inter-molecular proton pairs, and the inherent symmetry in the system prevents monomer specific assignments of the cross-peaks.

Out of 100 attempts at embedding and optimization, 10 best structures were selected based on the criterion of acceptable covalent geometry, low distance restraint violations, and favorable non-bonded energy. These structures were further optimized with restrained molecular dynamics simulations. Distance restrained molecular dynamics was carried out in vacuum with a distance-dependent dielectric constant. The dynamics was initiated at 5 K and the temperature was gradually increased to 1000 K in 5.0 ps and then equilibrated for 1.0 ps. The force constants for the distance restraints were kept at $2.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ during these stages. Subsequently, the force constants for the distance restraints were scaled up to a final value of $30 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ over 6.0 ps. The system was then allowed to evolve for 20.0 ps at 1000 K and then slow cooled to 300 K in 14.0 ps and equilibrated for 10.0 ps. The coordinates saved every 0.5 ps in the last 4.0 ps were averaged. The resulting structure was subject to conjugate

gradient minimization till a final gradient of $0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ was reached. All dynamics were carried out with a time step of 1.0 fs. Non-crystallographic symmetry restraints were maintained throughout. Quality of structures was evaluated with PROCHECK⁵⁰ and INSIGHT II (Accelrys) software was used to visualize structures.

The dimer dissociation constant was determined from the fits with equation (2). The K_d , ω_M and ω_D parameters were fitted to sets of data pairs consisting of ω_{obs} and c , using non-linear least-squares optimization. Since the parameters are fitted all together to data for selected residues, the dissociation constant K_d can be determined with precision from a series of HSQC spectra recorded at different concentrations⁵¹. The fits were performed with a Levenberg–Marquardt non-linear least-squares optimization implemented in Gnuplot.

Absorbance and Fluorescence spectroscopy

Absorption spectra were performed on a Cary 400 spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were recorded on a FluoroMax spectrofluorometer (Jobin Yvon) equipped with a thermostated cell compartment. Quantum yields were determined relative to Trp in water according to the method of Parker and Rees⁵². The quantum yield for Trp in water is taken as 0.14⁵³. At high concentrations of the peptide ($>100 \text{ }\mu\text{M}$), the measurements were performed in a $50 \text{ }\mu\text{L}$ microcell (optical length: 0.3 mm). At lower peptide concentrations, conventional cells with a 0.4 mm optical length were used. The concentration dependence of the quantum yield of (52-96)Vpr was fitted with Equation (2) using the Origin software. The pH dependence of the peptide fluorescence was determined by adding NaOH to the peptide in 25 mM MES in the presence of 10 mM β -Mercaptoethanol to avoid oxidation of the $-\text{SH}$ groups. This experiment was done at 9.3 and 22 μM peptide concentrations.

The time-resolved fluorescence measurements were carried out with the single-photon counting time-correlated technique, using the stable picosecond excitation pulses provided by

a pulse-picked frequency tripled Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) pumped by a Millennia X laser (Spectra Physics) as described previously⁵⁴.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Etienne Piémont for his help in lifetime measurements and Hugues de Rocquigny for his advices and for discussion. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) and SIDACTION. S.B. and H.B. were supported by a grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

REFERENCES

1. Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67, 1-25.
2. Re, F. & Luban, J. (1997). HIV-1 Vpr: G2 cell cycle arrest, macrophages and nuclear transport. *Prog Cell Cycle Res* 3, 21-7.
3. Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L. & Chen, I. S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* 69, 6304-13.
4. Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K. F., Vieira, H. L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillenec, S., Hoebeke, J., Briand, J. P., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S. A., Cointe, D., Xie, Z. H., Reed, J. C., Roques, B. P. & Kroemer, G. (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* 191, 33-46.
5. Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B. & Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* 71, 5579-92.
6. Vanitharani, R., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Singh, S. P., Srinivasan, A., Weiner, D. B. & Ayyavoo, V. (2001). HIV-1 Vpr transactivates LTR-directed expression through sequences present within -278 to -176 and increases virus replication in vitro. *Virology* 289, 334-42.
7. Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Kudchodkar, S., Chang, D., Nagashunmugam, T., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1997). HIV-1 viral protein R (Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cells and monocytoid cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology* 62, 93-9.

8. Fouchier, R. A. & Malim, M. H. (1999). Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 52, 275-99.
9. Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustom, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C. & Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* 277, 45091-8.
10. Kichler, A., Pages, J. C., Leborgne, C., Druillennec, S., Lenoir, C., Coulaud, D., Delain, E., Le Cam, E., Roques, B. P. & Danos, O. (2000). Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* 74, 5424-31.
11. Yao, X. J., Subbramanian, R. A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995). Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* 69, 7032-44.
12. Engler, A., Stangler, T. & Willbold, D. (2002). Structure of human immunodeficiency virus type 1 Vpr(34-51) peptide in micelle containing aqueous solution. *Eur J Biochem* 269, 3264-9.
13. Zhou, Y., Lu, Y. & Ratner, L. (1998). Arginine residues in the C-terminus of HIV-1 Vpr are important for nuclear localization and cell cycle arrest. *Virology* 242, 414-24.
14. de Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J. L. & Roques, B. P. (1997). The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem* 272, 30753-9.

15. Wecker, K., Morellet, N., Bouaziz, S. & Roques, B. P. (2002). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domains. *Eur J Biochem* 269, 3779-88.
16. Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. & Roques, B. P. (2003). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol* 327, 215-27.
17. Wecker, K. & Roques, B. P. (1999). NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr. *Eur J Biochem* 266, 359-69.
18. Schuler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J. & Roques, B. P. (1999). NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol* 285, 2105-17.
19. Engler, A., Stangler, T. & Willbold, D. (2001). Solution structure of human immunodeficiency virus type 1 Vpr(13-33) peptide in micelles. *Eur J Biochem* 268, 389-95.
20. Wang, L., Mukherjee, S., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178, 7-13.
21. Piller, S. C., Ewart, G. D., Jans, D. A., Gage, P. W. & Cox, G. B. (1999). The amino-terminal region of Vpr from human immunodeficiency virus type 1 forms ion channels and kills neurons. *J Virol* 73, 4230-8.
22. Rance, M., Sorensen, O.W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R.R., Wüthrich, K. (1983). Improved spectral resolution in cosy ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 117, 479-485.
23. Marion, D. & Wuthrich, K. (1983). Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ¹H-¹H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 967-74.

24. Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. & Ernst, R. R. (1988). Clean TOCSY for ^1H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7870-7872.
25. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & R.R., E. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553.
26. Kumar A, E. R. R., Wüthrich K. (1980). A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *biochem Biophys res commun* 95, 1-6.
27. Wüthrich. (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. *Wiley-Interscience, USA*.
28. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2, 661-5.
29. Norwood, T. J., Boyd, J. E., Heritage, J. E., Soffe, N. & Campbell, I. D. (1990). Comparison of techniques for ^1H -detected heteronuclear ^1H - ^{15}N spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 87, 488-501.
30. Bax, A., Ikura, M., Kay, L. E., Torchia, D. A. & Tschudin, R. (1990). Comparison of different modes of two-dimensional reverse-correlation NMR for the study of proteins. *J. Magn. Reson.* 86, 304-318.
31. Burgering, M. J., Boelens, R., Gilbert, D. E., Breg, J. N., Knight, K. L., Sauer, R. T. & Kaptein, R. (1994). Solution structure of dimeric Mnt repressor (1-76). *Biochemistry* 33, 15036-45.
32. Nilges, M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1988). Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical

simulated annealing from a random array of atoms. Circumventing problems associated with folding. *FEBS Lett* 239, 129-36.

33. Brünger, A. T. (1992). *X-PLOR: Software Manual, version 3.1*. (Press, Y. U., Ed.), New Haven, CT.
34. Shinitzky, M. & Goldman, R. (1967). Fluorometric detection of histiine-tryptophan complexes in peptides and proteins. *Eur J Biochem* 3, 139-44.
35. Chen, Y. & Barkley, M. D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37, 9976-82.
36. Zhao, L. J., Wang, L., Mukherjee, S. & Narayan, O. (1994). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *J Biol Chem* 269, 32131-7.
37. Gras-Masse, H., Ameisen, J. C., Boutillon, C., Gesquiere, J. C., Vian, S., Neyrinck, J. L., Drobecq, H., Capron, A. & Tartar, A. (1990). A synthetic protein corresponding to the entire vpr gene product from the human immunodeficiency virus HIV-1 is recognized by antibodies from HIV-infected patients. *Int J Pept Protein Res* 36, 219-26.
38. Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillenec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Metivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., Vieira, H. L., Loeffler, M., Belzacq, A. S., Briand, J. P., Zamzami, N., Edelman, L., Xie, Z. H., Reed, J. C., Roques, B. P. & Kroemer, G. (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med* 193, 509-19.
39. Coeytaux, E., Coulaud, D., Le Cam, E., Danos, O. & Kichler, A. (2003). The cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J Biol Chem* 278, 18110-6.

40. Bischerour, J., Tauc, P., Leh, H., de Rocquigny, H., Roques, B. & Mouscadet, J. F. (2003). The (52-96) C-terminal domain of Vpr stimulates HIV-1 IN-mediated homologous strand transfer of mini-viral DNA. *Nucleic Acids Res* 31, 2694-702.
41. de Rocquigny, H., Caneparo, A., Delaunay, T., Bischerour, J., Mouscadet, J. F. & Roques, B. P. (2000). Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus. *Eur J Biochem* 267, 3654-60.
42. Zhang, S., Pointer, D., Singer, G., Feng, Y., Park, K. & Zhao, L. J. (1998). Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 212, 157-66.
43. Cornille, F., Wecker, K., Loffet, A., Genet, R. & Roques, B. (1999). Efficient solid-phase synthesis of Vpr from HIV-1 using low quantities of uniformly ¹³C-, ¹⁵N-labeled amino acids for NMR structural studies. *J Pept Res* 54, 427-35.
44. Shaka, A., Barker, P. B. & Freeman, R. (1985). Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.* 64, 547-552.
45. Palmer, A. G., J. Cavanagh, P.E. Wright, and M. Rance. (1991). Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 93, 151-170.
46. Kay, L. E., P. Keifer, and T. Saarinen. (1992). Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.
47. Schleucher, J., M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen, and C. Griesinger. (1994). A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* 4, 301-306.

48. Nilges, M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1988). Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations. *FEBS Lett* 229, 317-24.
49. Nilges, M. (1995). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol.* 245, 645-60.
50. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8, 477-86.
51. Akerud T, T. E., Van Etten RL, Akke M: Intra. (2002). molecular dynamics of low molecular weight protein tyrosine phosphatase in monomer-dimer equilibrium studied by NMR: a model for changes in dynamics upon target binding. *J Mol Biol* 322, 137-152.
52. Parker, C. A. & Rees, W. T. (1960). Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* 85, 587-600.
53. Kirby, E. P. & R.F., S. (1970). The influence of solvent and temperature upon the fluorescence of indole derivatives. *J Phys Chem* 74, 4480-4490.
54. Ramos, P., Coste, T., Piemont, E., Lessinger, J. M., Bousquet, J. A., Chapus, C., Kerfelec, B., Ferard, G. & Mely, Y. (2003). Time-resolved fluorescence allows selective monitoring of Trp30 environmental changes in the seven-Trp-containing human pancreatic lipase. *Biochemistry* 42, 12488-96.

Supplementary material. NMR chemical shifts of the (52-96) protein Vpr in 30% CD₃CN 70% water at 303K, pH 3, calibrated to H₂O. (to be continued).

Residues	¹⁵N	NH	αH	βH	Others
D52		7.81	4.31	2.89, 2.94	
T53	114.18	8.33	4.16	3.93	γCH ₃ 0.97
W54		7.93	4.47	3.22	2H 7.21; 4H 7.45; 5H 6.94; 6H 7.09; 7H 7.36; NH 9.97
T55	114.38	7.98	4.05	4.15	γCH ₃ 1.2
G56		7.9	3.84		
V57	121.22	7.86	3.7	2.19	γCH ₃ 0.98
E58		8.08	3.92	2.03, 2.14	γCH ₂ 2.48, 2.4
A59	120.64	7.91	4.03	1.46	
L60		7.75	4.06	1.81	γCH ₂ 1.71; δCH ₃ 0.86
I61	119.25	8.17	3.52	1.92	γCH ₂ 1.05, 1.79; γCH ₃ 0.89; δCH ₃ 0.81
R62		7.71	4.06	1.91	γCH ₂ 1.61; δCH ₂ 3.14; NH 7.15
I63	119.84	7.92	3.78	2.01	γCH ₂ 1.19, 1.78; γCH ₃ 1.69; δCH ₃ 0.85
L64	120.11	8.37	4	1.9	γH 1.46
Q65		8.56	3.87	1.98	γCH ₂ 2.26, 2.53; δNH ₂ 6.9, 6.5
Q66		7.95	4.1	2.18, 2.27	γCH ₂ 2.39, 2.52; δNH ₂ 7.08, 6.56
L67	119.02	8.27	4.09	2.01	δCH ₃ 0.91
L68	119.25	8.22	4	1.85	γH 1.6; δCH ₃ 0.93
F69	118.49	8.18	4.34	3.24, 3.29	2.6H 7.25; 3.5H 7.3
I70		8.21	3.69	1.96	γCH ₂ 1.28, 1.78; γCH ₃ 0.86; δCH ₃ 0.88
H71	117.29	8.08	4.18	2.83, 2.95	4H 6.31; 2H 8.42
F72	117.08	8.1	4.32	3.17	2.6H 7.25; 3.5H 7.3
R73		7.94	4.02	1.69, 1.73	γCH ₂ 1.48; δCH ₂ 3.27; NH 7.09
I74	7.83	3.96	1.82	γCH ₂ 1.16; γCH ₃ 0.85; δCH ₃ 0.79	
G75	110.09	7.99	3.88, 3.81		
C76		7.79	4.37	2.82	

NMR chemical shifts of the (52-96) protein Vpr in 30% CD₃CN 70% water at 303K, pH 3, calibrated to H₂O.

Residues	¹⁵ N	NH	αH	βH	Others
R77		8.01	4.19	1.53, 1.6	γCH ₂ 1.7, 1.77; δCH ₂ 3.12; NH 7.13
H78		8.23	4.66	3.12, 3.25	4H 7.28; 2H 8.58
S79		8.08	4.39	3.78, 3.83	
R80		8.27	4.32	1.62 1.73	γCH ₂ 1.84; δCH ₂ 3.14; NH 7.15
I81		7.9	4.1	1.82	γCH ₂ 1.17; γCH ₃ 0.89; δCH ₃ 0.84
G82	111.68	8.14	3.84	3.92	
I83		7.72	4.1	1.82	γCH ₂ 1.14, 1.43; γCH ₃ 0.88; δCH ₃ 0.82
I84		7.91	4.05		γCH ₂ 1.15; γCH ₃ 0.93; δCH ₃ 0.86
Q85	8.17	4.23	2.31	γCH ₂ 2.03; δNH ₂ 6.68, 7.32	
Q86		8.17	4.23	2.31	γCH ₂ 2.03; δNH ₂ 6.77, 7.41
R87		8.16	4.23	1.73, 1.81	γCH ₂ 1.61; δCH ₂ 3.15; NH 7.11
R88		7.93	4.35	1.73; 1.84	γCH ₂ 1.6; δCH ₂ 3.13; NH 7.13
T89	114.34	7.94	4.31	4.17	γCH ₃ 1.17
R90		8.2	4.3	1.73, 1.84	γCH ₂ 1.6; δCH ₂ 3.15; NH 7.12
N91		8.28	4.63	2.72, 2.78	
G92		8.19	3.88		
A93	122.92	7.99	4.32	1.37	
S94		8.04	4.39	3.81	
K95	122.56	8.12	4.38	1.65, 1.42	γCH ₂ 1.74; δCH ₂ 1.87; εCH ₂ 2.95; εNH ₃ ⁺ 7.4
S96		8.08	3.88	3.81	

* Chemical shifts at 2mM concentration might not be exactly the same ones as observed on heteronuclear experiments. This is due to a slight difference in acetonitrile concentration.

Table 1. Structural statistics of the Vpr(52-96) structure

Restraints for calculation		
Total NOE restraints		573
Intraresidue		275
Sequential ($ i-j =1$)		128
Medium range ($ i-j \leq 4$)		148
Intermolecular		22
Structure statistics		
Rmsd		
Bonds (Å)		$1.87 \cdot 10^{-3} - 2.38 \cdot 10^{-3}$
Bond angles (°)		0.48 - 0.54
Improper torsions (°)		0.36 - 0.38
NOE restraints (Å)		$1.76 \cdot 10^{-2} - 2.41 \cdot 10^{-2}$
Final energies (kcal/mol)		
E total		136.43 - 186.09
E bonds		5.33 - 8.69
E angles		97.94 - 120.01
E improper angles		15.76 - 17.97
E Van der Waals		8.18 - 27.41
E NOE		9.19 - 17.30
Ramachandran plot		
Residues in most favourable regions (%)		60.00
Residues in additional allowed regions (%)		32.82
Residues in generously allowed regions (%)		5.13
Residues in disallowed regions (%)		2.05
Atomic rms deviation (Å) on the backbone atoms:		
	(52-75) monomer ^a	(52-75) dimer ^b
pairwise	0.90 ± 0.22	1.40 ± 0.30
to mean structure	0.88 ± 0.14	1.30 ± 0.15

^a the superimposition was performed for both monomers of Vpr(52-96) separately. Results are the same for the two monomers.

^b the superimposition was performed for both monomers

Table 2. Amide proton and nitrogen chemical shift variation under (52-96)Vpr
Concentration

Residue	δ_{Hi}	δ_{Hf}	$\Delta\delta_H$	δ_{Ni}	δ_{Nf}	$\Delta\delta_N$
T53	8.33	8.31	0.02	114.09	114.18	0.09
T55	7.85	7.96	0.11	113.81	114.39	0.58
V57	7.79	7.78	0.01	120.58	121.23	0.65
A59	7.83	7.81	0.02	120.48	120.65	0.17
I61	7.92	8.04	0.12	118.48	119.25	0.77
I63	7.71	7.76	0.05	119.67	119.84	0.17
L64	8.22	8.24	0.02	120.21	120.11	0.10
L67	8.14	8.10	0.04	118.93	119.03	0.10
L68	8.07	8.05	0.02	119.44	119.25	0.19
F69	8.02	8.03	0.01	118.51	118.46	0.05
H71	8.03	7.96	0.07	118.01	117.29	0.72
F72	8.07	7.95	0.12	117.25	117.08	0.17
G75	8.01	7.99	0.02	109.98	110.09	0.11
G82	8.12	8.09	0.03	111.68	111.68	0.00
T89	7.93	7.91	0.02	114.30	114.35	0.05
A93	7.96	7.93	0.03	122.90	122.93	0.03
K95	8.10	8.09	0.01	122.44	122.57	0.13

(i) and (f) indicate the chemical shift measured at 31×10^{-6} M and 2.0×10^{-3} M respectively

FIGURE CAPTION

Figure 1: Primary sequence of the (52-96)Vpr C-terminal domain. The identified Leucine/Isoleucine rich domain (60-84) and the basic domain (70-96) are specified. The 17 labeled amino acids incorporated during the chemical synthesis are represented in bold.

Figure 2: Extracts of the NOESY spectrum recorded with a 100 ms mixing time on the (52-96)Vpr domain. This spectrum shows the particular chemical shift for the protons 4H of H71 (b) and their correlation with the aromatic protons of W54 (a, b, d) and correlations between W54 and L68 protons (c).

Figure 3: Superimposition of 10 NMR refined structures showing the arrangement of the leucine-zipper structure. The helix spanning residues 53 to 75 is colored in red and shows a good convergence with a low rmsd calculated on the backbone atoms. The domain encompassing residues 80 to 96 is colored in blue and is disordered.

Figure 4: View of the leucine-zipper structure showing the stacking of residues W54 and H71 in green at each edge. Amino acids involved in the hydrophobic interface are colored in yellow. Only the (53-75) domain is represented.

Figure 5: Helical Wheel representation showing the relative arrangement of the two α helices forming the leucine-zipper dimer in an antiparallel mode. Leu/Ile residues are found at the interface of the dimer characterized by a hydrophobic face and a hydrophilic one. A second hydrophobic platform and a hydrophilic one seem to be available for supplementary interactions.

Figure 6: Superimposition of the echo-antiecho HSQC experiments performed at 600 MHz, 303 K and pH 2.6, at low concentration (0.03 mM) in black and high concentration (2.0 mM) in red. The 17 labeled amino acids have been assigned and identified on the spectrum. Arrows indicate residues with the most substantial ^1H chemical shift variations, T55, I61, L67, L68, H71, F72.

Figure 7: Monomer-dimer equilibrium for (52-96)Vpr in 30% CD_3CN . The population of monomers, p_M , as a function of the peptide concentration were calculated according to the equation: $p_M = \frac{(\omega_{obs} - \omega_D)}{(\omega_M - \omega_D)}$. The symbols (x) indicate the experimental data points included in the fit to equation (1) in order to determine the dissociation constant. The continuous and broken lines indicate the fitted populations of monomers and dimers, respectively.

Figure 8: Superimposition of the two averaged minimized structures of the dimeric leucine-zipper formed by the C-terminal domain (52-96)Vpr, colored in green and the full (1-96)Vpr protein, colored in purple.

Figure 9: Dependence of (52-96)Vpr quantum yield as a function of the concentration. The single Trp residue at position 54 of (52-96)Vpr was excited at 295 nm. The quantum yields were determined in 30% CD_3CN , pH 3.0 (●) and 25 mM MES, pH 4.5 (■), respectively. Solid lines correspond to the fit of the experimental points with equation (2).

Figure 10: pH dependence of (52-96)Vpr quantum yield. The peptide concentration was 22 μM in 25 mM MES, 10 mM β -mercaptoethanol. Excitation and emission wavelengths were 295 and 350 nm, respectively. The solid line corresponds to a fit of the experimental points with Equation (3). The dotted line corresponds to a fit with an equation assuming either a binding of a single proton or noncooperative binding of two protons.

Figure 1

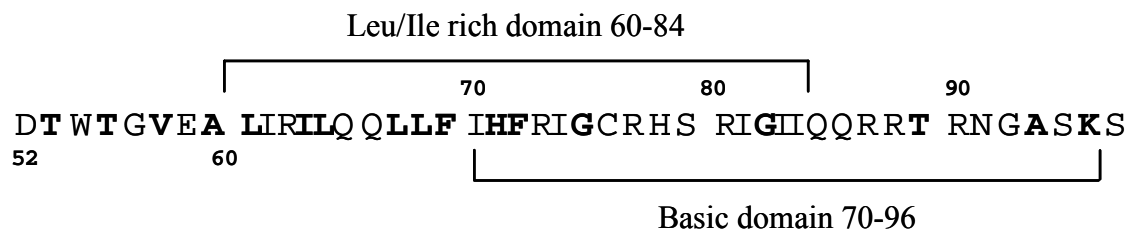


Figure 2

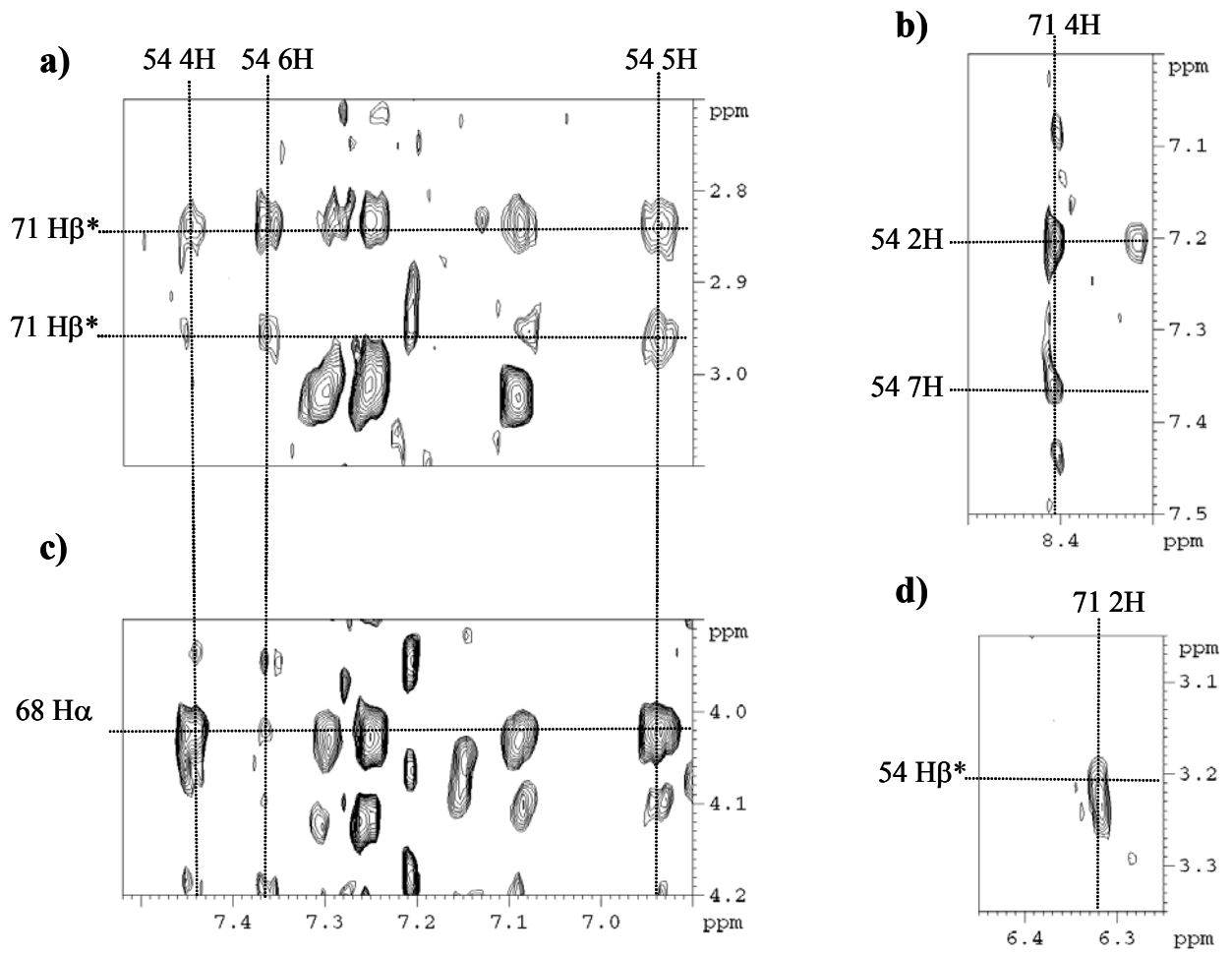


Figure 3

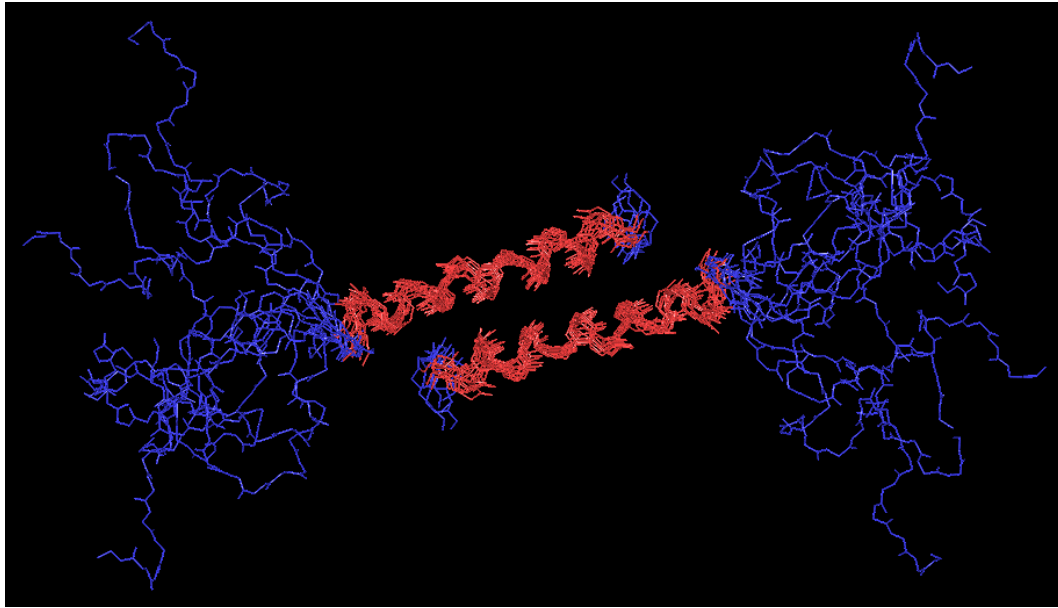


Figure 4

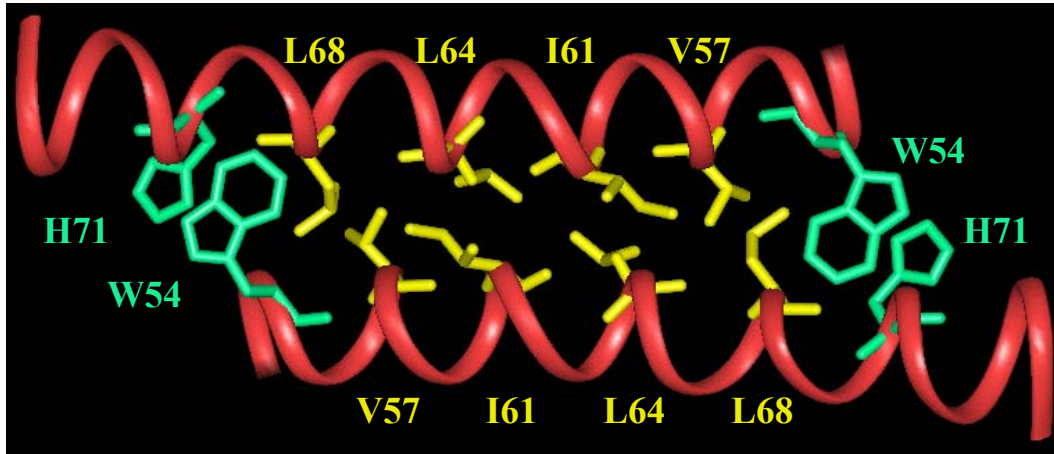


Figure 5

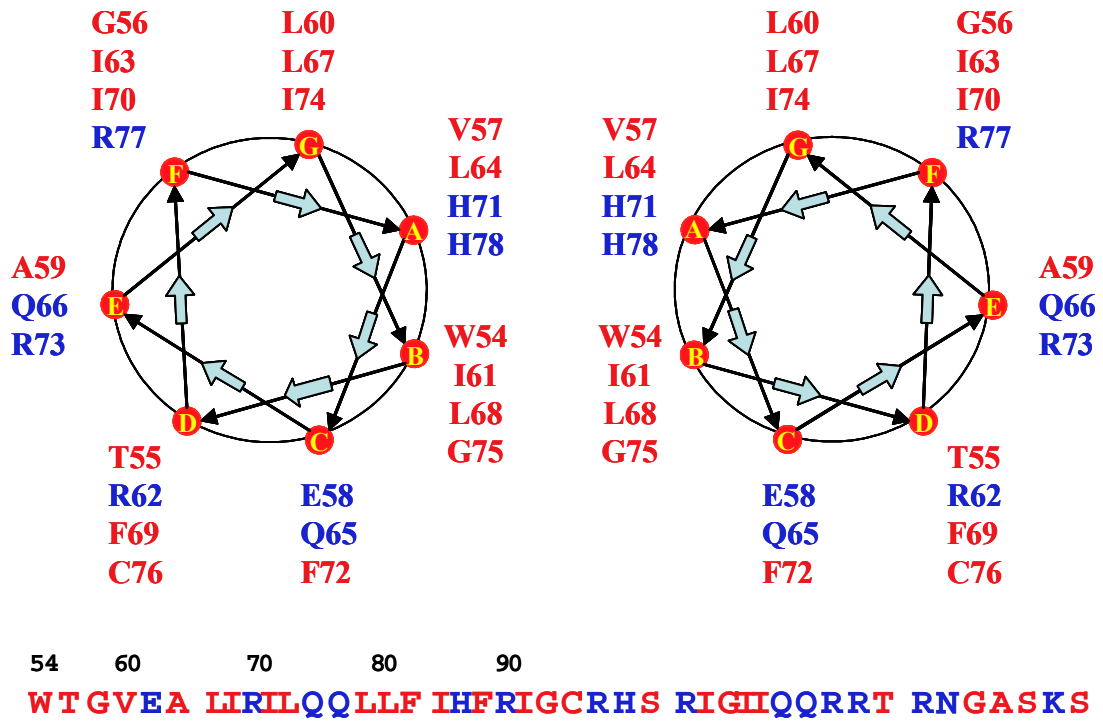


Figure 6

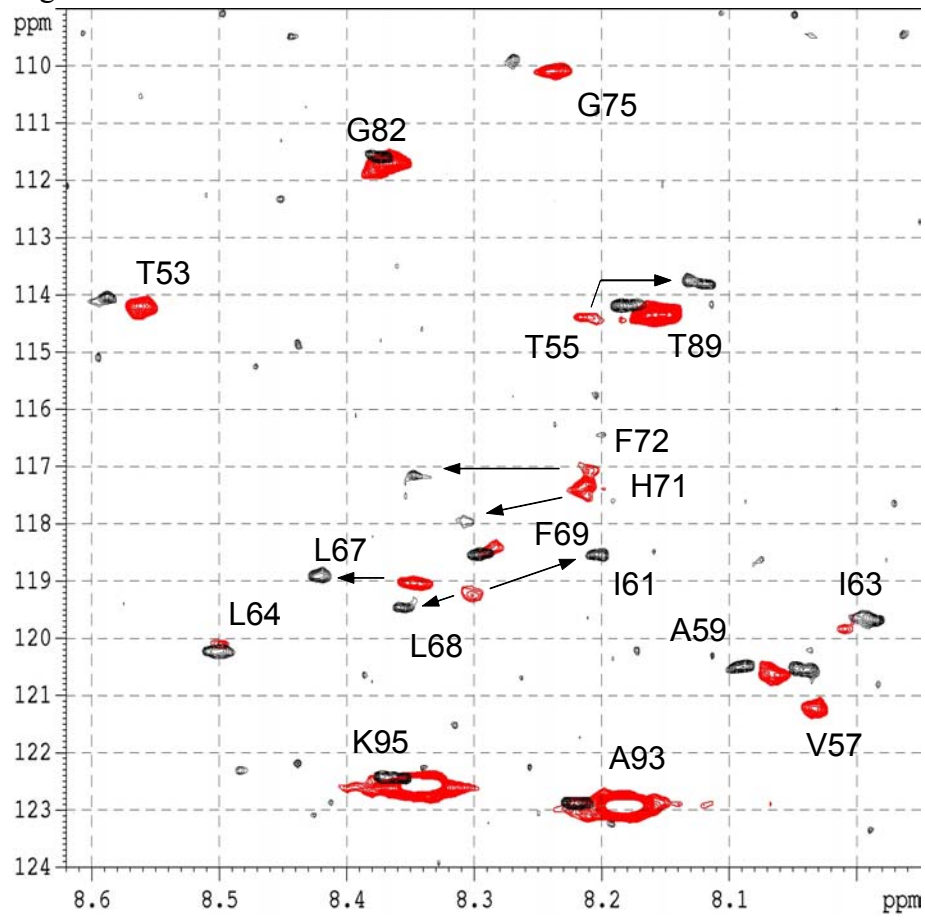


Figure 7

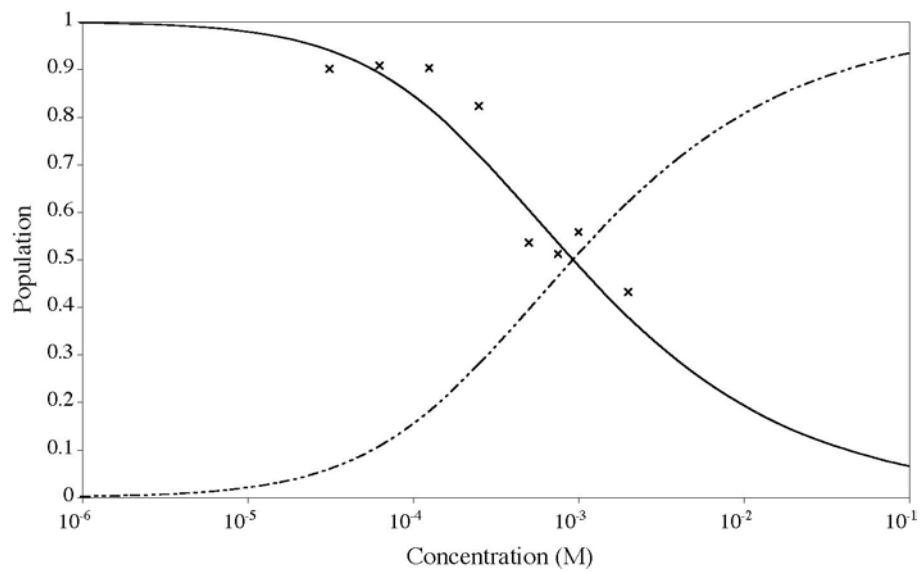


Figure 8

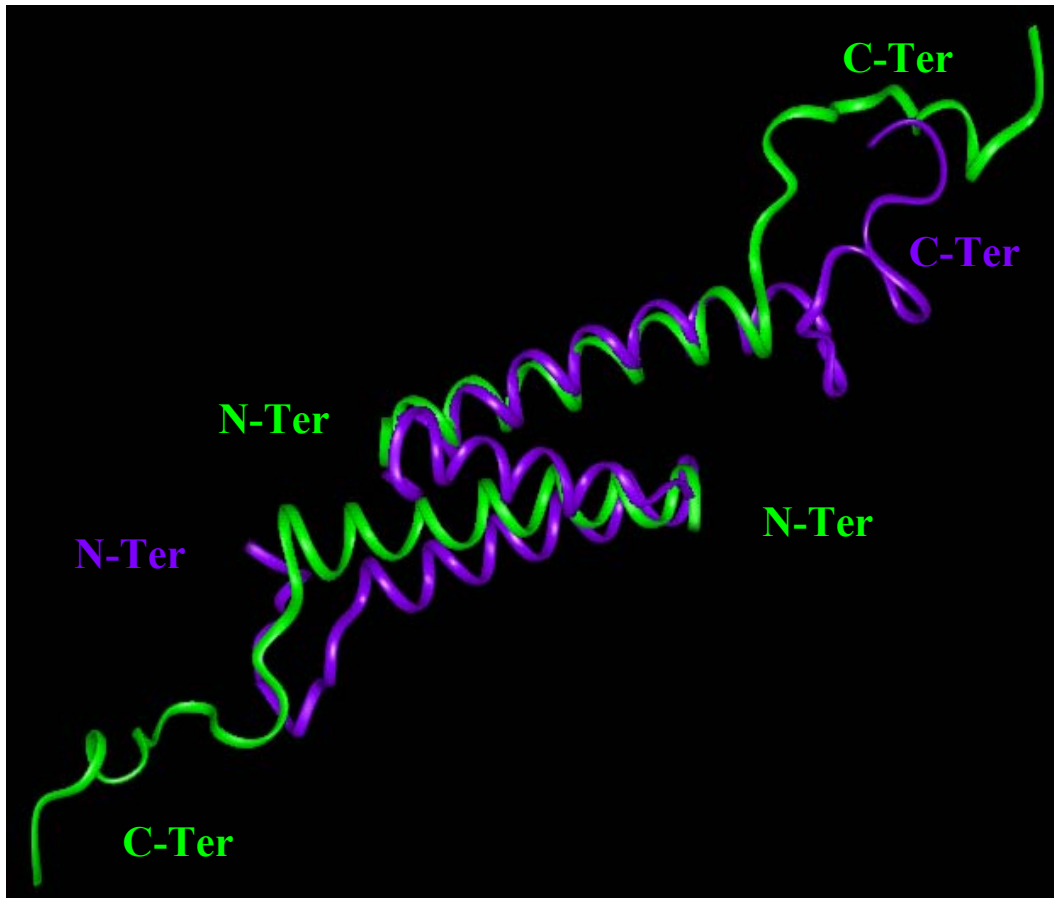


Figure 9

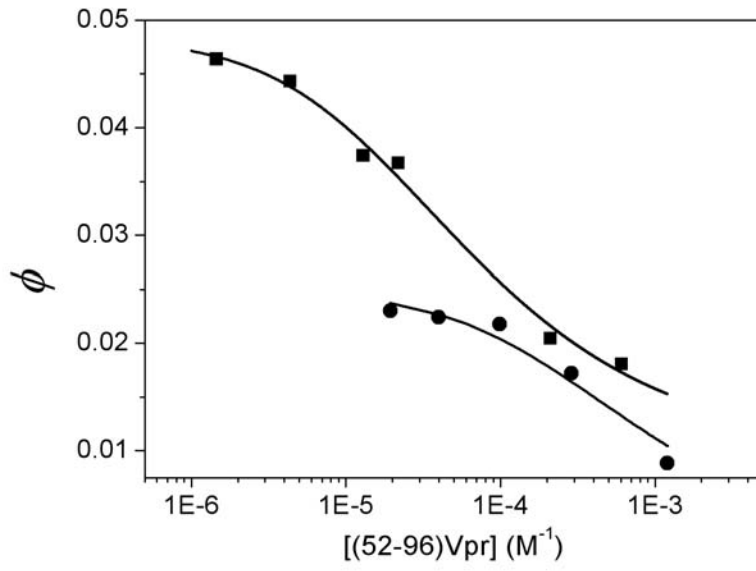
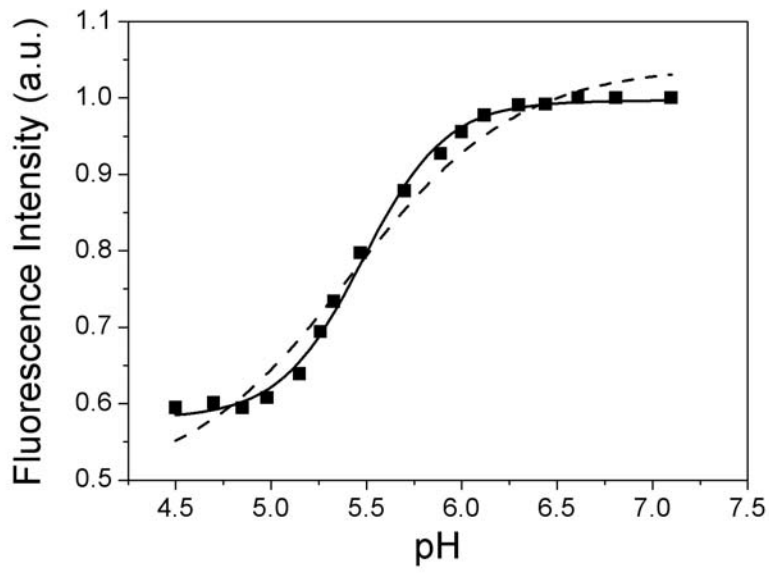


Figure 10



Etude par spectroscopie de
fluorescence résolue en temps
et par FCS biphotonique de
l'interaction de la NCp7 avec
des oligonucléotides en tige-
boucle.

Revue de la 8ème Conférence
« Methods and Applications
of Fluorescence:
spectroscopy, Imaging and
Probes Prague »

Time-resolved fluorescence and two-photon FCS investigation of the interaction of HIV-1 nucleocapsid protein with hairpin loop oligonucleotides

JOEL AZOULAY¹, SERENA BERNACCHI¹, HERVÉ BELTZ¹, JEAN-PIERRE CLAMME¹,
ETIENNE PIEMONT¹, EMMANUEL SCHAUB¹, DAMIEN FICHEUX², BERNARD ROQUES³,
JEAN-LUC DARLIX⁴ AND YVES MÉLY^{1,*}

¹*Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie, UMR 7034 du CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 67401 ILLKIRCH cedex, France*

²*IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France*

³*Département de Pharmacochimie Moléculaire et Structurale, INSERM U266 Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France*

⁴*LaboRétro, Unité de Virologie Humaine INSERM, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon France*

e-mail: mely@aspirine.u-strasbg.fr

Tel.: 33 390 244 263

Fax: 33 390 244 312

* Corresponding author

1 Introduction

2 Materials and Methods

3 Results and discussion

3.1 Time-resolved fluorescence spectroscopy

3.2 Fluorescence correlation spectroscopy

4 Conclusions

References

Abbreviations: FCS, fluorescence correlation spectroscopy; TPE, two photon

excitation; NC, nucleocapsid protein of HIV-1;

FRET, fluorescence resonance energy transfer;

TMR, 5(and 6)-carboxytetramethylrhodamine;

Fl, 5(and 6)-carboxyfluorescein

1 Introduction

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a versatile technique for in vitro and in vivo investigations of biomolecular interactions. It has been introduced more than 30 years ago [1]. FCS is based on the analysis of the statistical fluctuations in the fluorescence intensity of a small illumination sample volume. This analysis leads to quantitative information about the processes that provoke these fluctuations. Basically, FCS is designed to measure diffusion constants and concentrations of fluorescently labeled molecules [2-6]. Depending on the investigated system, additional parameters concerning photophysical reactions [2, 7-14], rotational dynamics [15, 16], protein self-association [17-22], binding equilibria [23-30] and kinetics [23, 31, 32], or conformational dynamics of nucleic acids [33-36] can be extracted. Using one photon excitation, the sample volume is defined both by a focused laser beam and a confocal pinhole. In this respect, though the laser beam is focused, the excited volume is much larger than the sample volume. It results that side effects like out-of-focus photobleaching will be observed. This drawback is largely minimized by using two photon excitation (TPE). Indeed, two photon absorption is proportional to the square of illumination intensity, and thus for a tightly focused beam, the excitation of fluorescent molecules declines rapidly with the axial distance (roughly as z^{-4}) from the focal plane. This inherent excitation confinement provides 3D spatial resolution and a nearly 3D Gaussian observation volume. As a consequence, the background fluorescence level and out-of-focus photodamage are markedly reduced in comparison with one photon excitation. Moreover, TPE also provides a large spectral separation between excitation and emission wavelengths, allowing background due to Raman and Rayleigh scattering of water to be largely excluded.

Time-resolved fluorescence measurements are also widely used for studying biological molecules and their interactions. This is because time-resolved data provide exquisite sensitive information about the environment of the fluorophores, the conformation of the biomolecules, interchromophore distances, dynamical and photophysical processes [37-40]. While most investigations on proteins are based on the intrinsic fluorescence of Trp residues, nucleic acids are mainly monitored by using extrinsic fluorophores coupled at the 5' and 3' ends.

In this context, the aim of this paper is to review the potency of the combined use of time-resolved fluorescence and two photon FCS techniques to characterize the interaction of NCp7, the nucleocapsid protein of HIV-1, with DNA hairpin loops [34, 35, 41]. NCp7 is a small basic protein characterized by two CCHC zinc finger motifs that plays critical roles in HIV-1 structure and replication. The activities of NCp7 in the viral life cycle strongly rely on its nucleic acid chaperone properties [42-45], which allow NCp7 to lower the energy barrier for the breaking and the reformation of base-pairs. These chaperone properties are notably important during the reverse transcription process which consists in a complex series of reactions leading to the synthesis of a linear, double-stranded DNA copy of the viral RNA genome. Among these reactions, the first strand transfer is of particular interest. During this step, minus-strand strong-stop DNA [(-)ssDNA] is translocated to the 3' end of the viral RNA genome, in a reaction mediated by base-pairing of the repeat (R) sequences at the 3' ends of the RNA and DNA reactants. In the absence of NCp7, this reaction does not proceed efficiently [46-48] since both the TAR RNA sequence in the viral RNA genome and its complementary sequence, cTAR DNA, in (-)ssDNA (Fig. 1) are thought to fold into a stable stem loop structure [49-51].

Figure 1

In contrast, addition of NCp7 has been shown to largely stimulate minus-strand transfer by increasing the rate and extent of annealing [48, 52-55] and by blocking non-specific self-primed reverse transcription [46, 47, 51, 53]. The initial step of the activation of minus strand transfer is probably the destabilization of nucleic acid secondary and tertiary structures induced by the binding of NCp7 [56-58]. To further understand the molecular mechanism of this destabilization, we combined time-resolved fluorescence intensity and FCS measurements using a cTAR DNA sequence labeled at its 5' and 3' extremities by a couple of fluorophores frequently used in fluorescence resonance energy transfer (FRET) [59, 60] and a NC(12-55) peptide (Fig. 1c) that contains the zinc-finger motifs but lacks the ability to aggregate the oligonucleotides [61].

2 Materials and Methods

Materials

NC(12-55) peptide was synthesized as described previously [62]. The purity of the peptide was greater than 98%. The peptide was stored lyophilized in its zinc-bound form and an extinction coefficient of $5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280nm was used to determine its concentration.

Doubly and singly-labeled DNA oligonucleotides were synthesized at a 0.2 μmole scale by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany). The 5' terminus of the oligonucleotides was labeled by 5(and 6)-carboxytetramethylrhodamine (TMR) via an amino-linker with a six carbon spacer arm. The 3' terminus of the doubly-labeled oligonucleotide was labeled with 5(and 6)-carboxyfluorescein (Fl) using a special solid support with the dye already attached. Oligonucleotides were purified by the manufacturer by reverse-phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. The purity of the labeled oligonucleotides was greater than 93%. Experiments were performed in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM NaCl and 0.2 mM MgCl_2 . An extinction coefficient of $521,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 260 nm was used to calculate the concentration of cTAR. The absorption spectra were recorded on a Cary 400 spectrophotometer.

Steady-state and time-resolved fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra were recorded on an SLM 48000 spectrofluorometer, equipped with a thermostated cell compartment. Time-resolved fluorescence measurements were performed with a time-correlated single photon counting technique using the stable excitation pulses provided by a pulse-picked frequency tripled Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) pumped by a Millennia X laser (Spectra Physics). Temperature was maintained at 20°C. The excitation pulses were at 470nm, with a repetition rate of 4MHz. The emission was collected through a polarizer set at the magic angle and a 4nm band-pass monochromator (Jobin-Yvon H10) at 520nm. The single-photon events were detected with a microchannel plate Hamamatsu R3809U photomultiplier coupled to a Phillips 6954 pulse preamplifier and recorded on a multichannel analyzer (Ortec 7100) calibrated at 25.5ps/channel. The instrumental response function was recorded with a polished aluminum reflector, and its full width at half-maximum

was 40ps. Time-resolved data analysis was performed using the maximum entropy method and the Pulse5 software [63, 64]. For the analysis of the fluorescence decay, a distribution of 200 equally spaced lifetime values on a logarithmic scale between 0.01 and 20 ns, was used. In all cases, the χ^2 values were close to 1.0, and the weighted residuals as well as the autocorrelation of the residuals were randomly distributed around zero indicating an optimal fit.

FCS set up

Figure 2

FCS measurements were performed on a two-photon platform (Fig. 2), as previously described [34, 65]. TPE is provided by a mode-locked Tsunami Ti:sapphire laser pumped by a Millennia V solid state laser (Spectra Physics). Pulses of about 100fs are produced at a wavelength of 850nm. FCS measurements were performed on an Olympus IX70 inverted microscope equipped with a Märzhäuser motorized microscope stage. After a beam expander, parallel infra-red laser light is focused into the sample by a water-immersion Olympus 60× objective (NA=1.2). The back aperture of the objective was slightly overfilled, creating a diffraction-limited focal spot of 0.6 μm in diameter, which can be approximated by a gaussian-gaussian intensity profile. The measurements were carried out in 8 Well Lab-Tek II chambers, using a 400 μl volume per well. The focal spot is set about 20 μm above the coverslip. The resulting fluorescence is collected through the same objective and directed by a dichroic mirror (COWL 750 nm; Coherent) to the lateral output of the microscope. After rejection of residual IR light by a BG 39 (Schott) filter and rejection of photons below 550nm by a Coherent OG550 glass filter, the emitted photons are focused by a 200 mm achromatic lens on the 64 μm core of a multimode optical fiber coupled to an avalanche photodiode (EG&G SPCM-200 FC). The detector signal is correlated online by an ALV-5000E correlator (ALV, Germany). At this step, the normalized autocorrelation function, $G(\tau)$ is calculated from the fluorescence fluctuations, $\delta F(t)$, by:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

where $\delta F(t)$ is the difference between the fluorescence signal, $F(t)$, at a given time and the mean fluorescence signal, $\langle F(t) \rangle$. Moreover, $\delta F(t+\tau)$ designates the fluorescence fluctuations at a later time. Typical data recording times are 10×60 s and the optical collection efficiency was estimated to be about one percent. An appropriate illumination intensity was selected by investigating the dependence of the apparent diffusion time, τ_{da} , of carboxytetramethylrhodamine (TMR) in buffer with the illumination power at the sample. τ_{da} was nearly constant up to 5 mW and then decreased at higher power. From the τ_{da} plateau value at low power which represents the diffusion time in the absence of photobleaching, a lateral radius, ω_0 , of $0.3 \mu\text{m}$ and a s value of 3 to 4 (using $D_{TMR} = 2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) were determined for the sample volume. As a compromise between photobleaching and a good signal to noise ratio, we select a power of 5-6 mW. At this power, the photon counting rate per molecule is around 4-5 kHz.

3 Results and discussion

3.1 Time resolved fluorescence measurements

To interpret the data with the doubly-labeled TMR-5'-cTAR-3'-Fl derivative, it was first necessary to analyze the data with the corresponding singly-labeled cTAR-3'-Fl derivative. In the absence of NC(12-55), the fluorescence decay of cTAR-3'-Fl (Table 1) is characterized by two lifetimes, τ_2 and τ_3 , which may be ascribed to two conformational states differing by the relative location of the dye in respect with the oligonucleotide [66-68]. In these conditions, the relative amplitudes, α_2 and α_3 , may correspond to the fractional populations associated to these conformational states. The long-lived lifetime represents 85% and is typical of solvent-exposed Fl. Interestingly, addition of NC(12-55) induces only limited changes in both the lifetimes and associated amplitudes of cTAR-3'-Fl, suggesting that the peptide does not dramatically alter Fl environment .

Table 1

The decay of TMR-5'-cTAR-3'-Fl is more complex, being characterized by three lifetimes. Both the appearance of a short-lived component (0.12 ns) and the

significant decrease of both intermediate- and long-lived lifetimes as compared to cTAR-3'-Fl are consistent with a FRET mechanism between Fl and TMR in the three conformational states associated to these lifetimes. Interestingly, each of these lifetimes is associated with a rather narrow distribution suggesting that only discrete degrees of stem opening are observed. Since the ratio of 3 between the mean lifetimes, $\langle \tau \rangle$, of cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR-3'-Fl is much lower than the ratio, R_m , of 15 between their steady-state fluorescence intensities, this strongly suggests the existence of dark species with very short (<20ps) or null lifetime and a relative amplitude of 80%. These species may correspond to oligonucleotides where the terminal segment is closed and thus, the Fl and TMR dyes are close together. The relative amplitude, α_0 , associated with these dark species could be calculated by:

$$\alpha_0 = 1 - \frac{\langle \tau \rangle_{Fl}}{\langle \tau \rangle_m \times R_m} \quad (2)$$

where $\langle \tau \rangle_{Fl}$ and $\langle \tau \rangle_m$ correspond to the measured mean lifetimes of cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR-3'-Fl, respectively. As a consequence, the relative amplitudes of the various lifetimes have been recalculated according to: $\alpha_{ic} = \alpha_i (1 - \alpha_0)$, where α_i corresponds to the measured amplitude of the *i*th lifetime (Table 1). Melting of TMR-5'-cTAR-3'-Fl ($T_m=47^\circ\text{C}$) by temperature induces a disappearance of the dark species and the species associated with the short-lived component, strongly suggesting that these latter may correspond to non- or partly-melted species. In addition, since the two remaining lifetimes are shorter than the corresponding ones in cTAR-3'-Fl at 60°C , FRET is still observed in the fully melted species.

To get further information on the physical origin of these dark species, the absorption spectrum of TMR-5'-cTAR-3'-Fl was compared to that of an equimolar mixture of TMR-5'-cTAR and cTAR-3'-Fl (Fig. 3).

Figure 3

The spectrum of the doubly labeled derivative differed from the spectrum of the mixture by a significant blue-shift and absorbance increase of the Fl peak as well as by a red-shift and absorbance decrease of the TMR peak [69]. Interestingly, heating TMR-5'-cTAR-3'-Fl above the melting temperature restores an absorption spectrum close to that of the mixture (data not shown), indicating that

the integrity of the stem is required for the absorbance changes. In fact, the dramatic absorbance changes of TMR-5'-cTAR-3'-Fl as compared to the mixture of TMR-5'-cTAR and cTAR-3'-Fl are in line with those reported previously using different couples of dyes, namely (TMR, DABCYL) and (Rh6G, DABCYL) [70]. These changes in the absorption spectra are clearly incompatible with a Förster-type FRET mechanism since the weak dipolar coupling that governs this mechanism, does not induce any change in the absorption spectrum [71]. In contrast, these spectral changes indicate that in the closed form of the stem, the fluorophore and the quencher form a ground-state intramolecular heterodimer. This allows a strong coupling between the transition dipoles of the two dyes, which causes the delocalization of excitation over the two dyes [71-73]. It follows that the spectral properties can no more be ascribed to the individual dyes but correspond to a unique optical signature of the heterodimer. Since this coupling strongly depends on the exact geometry of and distance between the dyes, the associated spectral changes could be used to investigate short range (<20Å) modifications of the stem structure. Moreover, when the heterodimer dissociates, FRET becomes applicable and its associated fluorescence changes could be used to characterize the interchromophore distances of partly melted species. Since FRET requires that the interchromophore distance is within a factor of 2 of the Förster critical distance ($R_0=60$ Å), this implies that interchromophore distances comprised between 30 and 120 Å are measurable. Two favorable features allow us to infer the interchromophore distances in this system. The first one is the large prevalence of the long-lived lifetime (representing more than 80%) for the fluorescence of Fl in the absence of acceptor (Table 1). It results that the interchromophore distances may be calculated by comparing Fl lifetimes in TMR-5'-cTAR-3'-Fl to this long-lived component. The second favorable feature is the binding of both Fl and TMR dyes to cTAR through flexible linkers (Fig. 1) that probably allow both dyes to sample many orientations during the transfer period. Accordingly, as in the doubly-labeled tRNA^{Lys,3} derivative [74], a value of 2/3 may be reasonably assumed for the orientation factor κ^2 in the calculation of the Förster distance, R_0 . Using the above assumptions, the energy transfer efficiencies, E , were calculated by:

$$E = 1 - \frac{\tau_i^{Fl,TMR}}{\tau_3^{Fl}} \quad (3)$$

where τ_3^{Fl} is the long-lived lifetime of cTAR-3'-Fl and $\tau_i^{Fl,TMR}$ is the i-th fluorescence lifetime of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. The calculated E values are respectively 0.97, 0.71 and 0.10 for the three fluorescent species of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. In a next step, these values were used together with the R_0 value of the (Fl, TMR) couple to calculate the interchromophore distances, R , by using:

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (4)$$

Accordingly, interchromophore distances of 34, 52 and 86Å, respectively, were calculated for the three conformational states associated to the τ_1 to τ_3 lifetimes of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. These distances could be compared to the theoretical distances calculated by assuming that an increasing number of segments at the oligonucleotide terminus is melted (Table 2). These theoretical distances were calculated using the wormlike chain (WLC) model [75] by considering the opened fraction of the stem as a continuous single strand. By using this model, the mean square end-to-end distance, $\langle R^2 \rangle$, is given by:

$$\langle R^2 \rangle = 2PL \left[1 - \frac{P}{L} (1 - e^{-L/P}) \right] \quad (5)$$

The contour length L is calculated assuming an internucleotide distance of 0.6nm [76]. A persistence length, P , of 0.75nm is used for the single strand [77]. Moreover, an additional 10Å distance was considered to take into account the length of each spacer [78] and calculate the minimal, R_{min} , and the maximal distance, R_{max} , between the dyes.

Table 2

If we assume that the flexible linkers adopt a large number of orientations with respect to the oligonucleotide ends, the average interchromophore distances may be close to the $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ values and thus, the 0.12 ns lifetime may correspond to species where the terminal or the two terminal segments are melted. This conclusion was further confirmed by the comparison with a cTAR mutant where the terminal bulge has been deleted [35]. The cooperative melting of the terminal or the two terminal double-stranded segments is consistent with the cooperative opening of DNA hairpin-loops that has been shown to result in a two-state equilibrium between closed and open species [79]. Similarly, a cooperative

opening until the fourth base pair from the end of a duplex has been shown to occur as a consequence of fraying [80-82]. Moreover, from comparison with several cTAR mutants, the 1.24ns lifetime was inferred to correspond to species where the stem has been melted up to the ¹⁰C-A⁴⁴ mismatch in the central double-stranded segment or the central T⁴⁰ bulge. Finally, the 3.85ns component may correspond to fully melted species.

From our data, it thus appears that thermal fluctuations generate an equilibrium between closed and melted species at the stem terminus, consistent with a mechanism of fraying. This equilibrium is governed by an equilibrium constant, $K_d=0.25$ (Table 1) in excellent agreement with the K_d value for the fraying of the terminal G-C pair of a duplex [80] or the melting of the short stem of various DNA hairpin loops [79]. Moreover, since the fluorescent species with the shortest lifetime are the most populated (Table 1), it results that the melting of the terminal segment(s) is favored.

The major feature observed with the addition of NC(12-55) at a ratio, r , of nucleotide to peptide of 5 (which is expected to lead to a large coating of the oligonucleotide by the peptide), is the dramatic decrease of the relative amplitude associated to the dark species that drops to 46%. The dark species are essentially converted into species with intermediate- and long-lived lifetimes identical to those observed in the absence of peptide. This suggests that NC(12-55) does not generate new species but only shifts the equilibrium toward the open species already observed in the absence of peptide by increasing the level of fraying (K_d increases up to 1.2) of the stem terminus (Table 1). The closed species are mainly converted into the species with a 52Å interchromophore distance, suggesting that the peptide favors the cooperative melting of the lower half of cTAR stem.

The NC-induced destabilization has been found to depend inversely on oligonucleotide stability and be thus more efficient for cTAR DNA than for the more stable TAR RNA sequence [41]. Moreover, by using cTAR mutants where either or both bulges at positions 49 and 52 were replaced by base pairs, it could be inferred that the destabilizing activity of NC(12-55) strongly relies on the two terminal bulges which cooperatively destabilize cTAR secondary structure [35]. In addition, since cTAR DNA bulges or mismatches appear well conserved among all HIV-1 strains, a strong evolutionary relationship between the stability of the cTAR hairpin and NC destabilizing activity was deduced.

3.2 Fluorescence correlation spectroscopy

In order to determine the kinetics of fraying of cTAR derivatives and the effect of NC(12-55) on these kinetics, FCS with TPE was performed on labeled cTAR derivatives. Since in TMR-5'-cTAR-3'-Fl, the conformational fluctuations between the open fluorescent and closed nonfluorescent states are thought to contribute to the fluorescence fluctuations in the sample volume, we first performed FCS on the singly-labeled TMR-5'-cTAR derivative (Fig. 4a) where fluctuations may only result from the translational diffusion of the labeled molecules in and out the excitation volume.

Figure 4

By analyzing the fluorescence fluctuations through the autocorrelation function, $G(\tau)$, the apparent diffusion time, τ_{da} , as well as the mean number, N , of diffusing molecules in the sample volume could be recovered by:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{da}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{s^2} \frac{\tau}{\tau_{da}} \right)^{-1/2} \left(1 + \left(\frac{f_t}{1-f_t} \right) \exp(-\tau/\tau_t) \right) \quad (6)$$

where s designates the ratio between the axial and lateral radii of the sample volume. In addition to the diffusion process, the TMR-5'-cTAR derivative like most labeled molecules undergoes photodynamic reactions involving the triplet state. The time scale (about 2 μ s) of these reactions is much faster than the diffusion time and these reactions could thus be easily distinguished from the diffusion contribution in $G(\tau)$. The parameters associated to these fast reactions are f_t , the mean fraction of fluorophores in their triplet state and τ_t , the triplet state lifetime.

From the value of the apparent diffusion time, τ_{da} , deduced by fitting the autocorrelation data of TMR-5'-cTAR (Fig. 4a) with Eq. (6), a diffusion coefficient, $D_{exp}=0.60(\pm 0.04)\times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ was inferred by using free TMR in buffer as a reference. This D_{exp} value could be compared to the theoretical one, D_{th} , calculated by assuming that cTAR may be modeled as a rodlike double-stranded DNA of 27bp:

$$D_{th} = \frac{k_b T}{3\eta\pi} \frac{1}{L} \left(\ln \frac{L}{l} + \gamma \right) \quad (7)$$

where k_b is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature and η is the viscosity of the solution. γ designates the end-correction parameter and is about 0.39 [83]. Assuming a rise per base of 3.4Å, the length, L , of the rodlike DNA, was calculated to be about 92Å. Finally, the hydrodynamic diameter, l , for a number of DNA fragments with a length similar to cTAR was reported to be from 20.5 to 28Å [84]. Using these values, we found that $0.74 \times 10^{-6} < D_{th} < 0.88 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. The slower motion of cTAR as compared with the theory may be explained by deviations of cTAR from the rodlike model due to the bulges and loops (Fig. 1) as well as to the mechanism of fraying.

Fig. 4a represents the autocorrelation curves of singly- and doubly-labeled cTAR sequences at the same concentration (100nM). The average number of fluorescent molecules (which is equal to the inverse of the amplitude of $G(\tau)$ when $\tau \rightarrow 0$) for TMR-5'-cTAR-3'-Fl appears strongly decreased as compared to TMR-5'-cTAR, in line with the presence of a large fraction of dark species. As a consequence, the fraying may be treated as a two-state mechanism with a transition between an open fluorescent and a closed dark state. Using Eq. (6), we found a τ_{da} value that is about 27% less than that of TMR-5'-cTAR. Since the only fluorescent species are the partially melted forms of TMR-5'-cTAR-3'-Fl which are expected to diffuse more slowly than the closed species, such a decrease seems to be paradoxical. However, this paradox is easily solved if fraying induces additional fluorescence fluctuations with kinetic rate constants similar or faster than the diffusion rate constant. It follows that the autocorrelation function of TMR-5'-cTAR-3'-Fl may be written as:

$$G(\tau) = G_D(\tau) \times \left[1 + \left(\frac{f_t}{1 - f_t - f_c} \right) \exp(-\tau/\tau_t) + \left(\frac{f_c}{1 - f_c - f_t} \right) \exp(-\tau/\tau_r) \right] \quad (8)$$

where $G_D(\tau)$ is the autocorrelation function resulting from diffusion and f_c is the fraction of molecules in the closed form. The chemical reaction time, τ_r , corresponds to: $\tau_r^{-1} = k_{op} + k_{cl}$, where k_{op} and k_{cl} are respectively the opening and closing rate constants of the secondary structure of cTAR involved in the fraying mechanism. The τ_r parameter could be extracted from the ratio, $G^*(\tau)$, of the autocorrelation function of TMR-5'-cTAR-3'-Fl to that of TMR-5'-cTAR [79].

Since τ_r is expected to be much larger than τ_t , this latter may be neglected and thus, $G^*(\tau)$ becomes a simple monoexponential function fitted by:

$G^*(\tau)=A+Bexp(-t/\tau_r)$. In keeping with our two-state model, an excellent fit of the experimental $G^*(\tau)$ function (Fig. 4b) was obtained with the above three-parameter exponential, using $\tau_r=160(\pm 40)\mu s$. The effective opening, k_{op} , and closing, k_{cl} , rate constants could then be deduced by:

$$k_{op} = \tau_r^{-1} \frac{K_d}{1 + K_d} \quad k_{cl} = \tau_r^{-1} \frac{1}{1 + K_d} \quad (9)$$

Using $K_d=0.25$ (Table 1), values of 1250 s^{-1} and 5000 s^{-1} were calculated for k_{op} and k_{cl} , respectively (Table 3).

Table 3

Addition of NC(12-55) (at a NC to nt molar ratio of 1:5) decreased the diffusion coefficient, D_{exp} , to a value of $0.46(\pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. This change of D_{exp} was expected since both the increase of the molecular weight due to the binding of the peptide and the deviation from a rodlike structure associated with the peptide-induced partial melting of cTAR (Table 1) are thought to decrease the D_{exp} value. Moreover, in agreement with the time-resolved fluorescence measurements, addition of NC(12-55) to TMR-5'-cTAR-3'-Fl significantly increased the effective number of fluorescent species (Fig. 4a). The $G^*(\tau)$ ratio of the autocorrelation function of TMR-5'-cTAR-3'-Fl to that of TMR-5'-cTAR in the presence of NC(12-55) is reported in Fig. 4b and appears to decay much faster than in the absence of NC(12-55). According to the limitations of the technique, only an upper limit of $30\mu s$ could be deduced for the reaction time τ_r . Nevertheless, it is likely that τ_r may be close to this upper limit. Calculation of the kinetic rate constants from τ_r indicated that NC(12-55) increases k_{op} by about one order of magnitude and k_{cl} by at least a factor of 3. This major effect of NC on k_{op} and thus on the opening frequency clearly strengthens the hypothesis that NC lowers the energy barrier for breakage of base-pairs [44, 85, 86]. Moreover, the increase in k_{cl} may result from the neutralization of DNA phosphate charges by the positively charged NC, which may decrease the repulsion between the single-stranded segments.

4 Conclusion

Figure 5

Based on our data, a tentative mechanism may be proposed for the destabilization of the lower part of cTAR stem by NC (Fig. 5). First, due to fraying, the 3 to 5 terminal nucleotides on the 5' end and the 4 to 7 terminal nucleotides of the 3' end of cTAR DNA are transiently present as single-stranded segments (step 1). Due to the preferential affinity of NC for single-stranded versus double-stranded sequences [87-89], this may constitute initial binding sites for NC (step 2). From these sites, NC may then destabilize the neighboring base pairs, allowing the sliding of the peptide [90] and cooperative binding of additional peptides [91] (step 3). Due to the limited stability of cTAR stem, the melting may then easily propagate up to the ¹⁰C-A⁴⁴ mismatch or the T⁴⁰ bulge (step 4). At this level, it is likely that the stability of the remaining double-stranded segments may be high enough to prevent the full melting of cTAR. As a consequence, there may be a competition between melting extension (step 5') and closure of the opened sequences (steps 5 and 6). Since closure probably occurs when the single-stranded segments are still partially covered by NC (step 5), the resulting neutralization of DNA phosphate charges by the positively charged NC may decrease the repulsive interactions between the single-stranded segments [58, 61] and explain the NC-induced increase in the k_{cl} value. By symmetry to the mechanism of stem opening, its closure is expected to be strongly cooperative and thus rapidly induce NC release (step 6). According to the limited population of fully melted species observed by time-resolved fluorescence (Table 1), it is believed that full melting is a minor pathway.

One important remaining question is to determine the degree of cTAR melting required to initiate the hybridization with TAR RNA. Nevertheless, since cTAR is expected to form a loop-loop kissing complex with TAR [92, 93], it may be speculated that the increase of the frequency of the open state may increase the probability of initiating the nucleation of the extended duplex. However, this increase is not the sole favoring event since the NCp7-induced increase of k_{op} is limited to one order of magnitude while the increase of the hybridization kinetics between cTAR and TAR is about three orders of magnitude [94]. It is likely that the neutralization by NC positive charges of the negative phosphate groups of the

oligonucleotides [58, 61] reduces the electrostatic repulsion between the complementary sequences and thus further favors their interaction.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). HB was a fellow from the Ministère de la Recherche et des Technologies. JA was a fellow from Sidaction. SB was a fellow from ANRS and Sidaction. JPC was a fellow from the Ligue contre le Cancer région Alsace.

References

1. Magde D, Elson EL, Webb WW (1972) *Phys Rev Lett* 29:705
2. Thompson NL, Lieto AM, Allen NW (2002) *Curr Opin Struc Biol* 12:634
3. Thompson NL (1991) Fluorescence correlation spectroscopy In: J. R. Lakowicz (ed) *Topics in Fluorescence Spectroscopy* Plenum Press, New York, p 337
4. Elson EL, Magde D (1974) *Biopolymers* 13:1
5. Magde D, Elson EL, Webb WW (1974) *Biopolymers* 13:29
6. Hess ST, Huang S, Heikal AA, Webb WW (2002) *Biochemistry* 41:697
7. Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13573
8. Widengren J, Mets G, Rigler R (1999) *Chem Phys* 250:171
9. Widengren J, Schwille P (2000) *J Phys Chem A* 104:6416
10. Schwille P, Kummer S, Heikal AA, Moerner WE, Webb WW (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:151
11. Jung G, Bräuchle C, Zumbusch A (2001) *J Chem Phys* 114:3149
12. Widengren J, Mets U, Rigler R (1995) *J Phys Chem* 99:13368
13. Widengren J, Rigler R, Mets U (1994) *J Fluorescence* 4:255
14. Kask P, Piksarv P, Mets U (1985) *Eur Biophys J* 12:163
15. Ehrenberg M, Rigler R (1974) *Chem Phys* 4:390
16. Aragon SR, Pecora R (1976) *J Chem Phys* 64:1791
17. Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M, Kretzschmar H (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5468
18. Hinterdorfer P, Gruber HJ, Striessnig J, Glossmann H, Schindler H (1997) *Biochemistry* 36:4497
19. Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D (1998) *Nat Med* 4:832
20. Tjernberg LO, Pramanik A, Bjorling S, Thyberg P, Thyberg J, Nordstedt C, Berndt KD, Terenius L, Rigler R (1999) *Chem Biol* 6:53
21. Post K, Pitschke M, Schafer O, Wille H, Appel TR, Kirsch D, Mehlhorn I, Serban H, Prusiner SB, Riesner D (1998) *Biol Chem* 379:1307

22. Jansen K, Schafer O, Birkmann E, Post K, Serban H, Prusiner SB, Riesner D (2001) *Biol Chem* 382:683
23. Pramanik A, Rigler R (2000) FCS-Analysis of Ligand-Receptor Interactions in Living Cells In: R. Rigler and E. S. Elson (ed) *Fluorescence Correlation Spectroscopy Theory and Application* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p 101
24. Matayoshi E, Swift K (2000) Application of FCS to Protein-Ligand Interactions: Comparison with Fluorescence Polarization In: R. Rigler and E. S. Elson (ed) *Fluorescence Correlation Spectroscopy Theory and Applications* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p 84
25. Van Craenenbroeck E, Vercammen J, Matthys G, Beirlant J, Marot C, Hoebeke J, Strobbe R, Engelborghs Y (2001) *Biol Chem* 382:355
26. Chen Y, Muller JD, Tetin SY, Tyner JD, Gratton E (2000) *Biophys J* 79:1074
27. Schuler J, Frank J, Trier U, Schafer-Korting M, Saenger W (1999) *Biochemistry* 38:8402
28. Lagerkvist AC, Foldes-Papp Z, Persson MA, Rigler R (2001) *Protein Sci* 10:1522
29. Hasler K, Panke O, Junge W (1999) *Biochemistry* 38:13759
30. Wohland T, Friedrich K, Hovius R, Vogel H (1999) *Biochemistry* 38:8671
31. Neumann T, Kirschstein SO, Camacho Gomez JA, Kittler L, Unger E (2001) *Biol Chem* 382:387
32. Bismuto E, Gratton E, Lamb DC (2001) *Biophys J* 81:3510
33. Wallace MI, Ying L, Balasubramanian S, Klenerman D (2000) *J.Phys. Chem. B* 104:11551
34. Azoulay J, Clamme JP, Darlix JL, Roques BP, Mely Y (2003) *J Mol Biol* 326:691
35. Beltz H, Azoulay J, Bernacchi S, Clamme JP, Ficheux D, Roques B, Darlix JL, Mely Y (2003) *J Mol Biol* 328:95
36. Bonnet G, Krichevsky O, Libchaber A (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:8602
37. Lackowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd New York
38. Beechem JM, Brand L (1985) *Annu Rev Biochem* 54:43
39. Engelborghs Y (2001) *Spectrochim Acta A* 57:2255
40. Klostermeier D, Millar DP (2001) *Biochemistry* 40:11211
41. Bernacchi S, Stoylov S, Piemont E, Ficheux D, Roques BP, Darlix JL, Mely Y (2002) *J Mol Biol* 317:385
42. Herschlag D (1995) *J Biol Chem* 270:20871
43. Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z, Karpel RL (1994) *Embo J* 13:2913
44. Rein A, Henderson LE, Levin JG (1998) *Trends Biochem Sci* 23:297
45. Tsuchihashi Z, Brown PO (1994) *J Virol* 68:5863
46. Guo J, Henderson LE, Bess J, Kane B, Levin JG (1997) *J Virol* 71:5178
47. Lapadat-Tapolsky M, Gabus C, Rau M, Darlix JL (1997) *J Mol Biol* 268:250
48. Lapadat-Tapolsky M, Pernelle C, Borie C, Darlix JL (1995) *Nucleic Acids Res* 23:2434
49. Baudin F, Marquet R, Isel C, Darlix JL, Ehresmann B, Ehresmann C (1993) *J Mol Biol* 229:382
50. Jeeninga RE, Huthoff HT, Gultyaev AP, Berkhout B (1998) *Nucleic Acids Res* 26:5472
51. Driscoll MD, Hughes SH (2000) *J Virol* 74:8785
52. Guo J, Wu T, Bess J, Henderson LE, Levin JG (1998) *J Virol* 72:6716
53. Guo J, Wu T, Anderson J, Kane BF, Johnson DG, Gorelick RJ, Henderson LE, Levin JG (2000) *J Virol* 74:8980
54. Davis WR, Gabbara S, Hupe D, Peliska JA (1998) *Biochemistry* 37:14213
55. You JC, McHenry CS (1994) *J Biol Chem* 269:31491
56. Johnson PE, Turner RB, Wu ZR, Hairston L, Guo J, Levin JG, Summers MF (2000) *Biochemistry* 39:9084
57. Hargittai MR, Mangla AT, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K (2001) *J Mol Biol* 312:985

58. Williams MC, Rouzina I, Wenner JR, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K, Bloomfield VA (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6121
59. Tyagi S, Kramer FR (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:303
60. Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer FR (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6171
61. Stoylov SP, Vuilleumier C, Stoylova E, De Rocquigny H, Roques BP, Gerard D, Mely Y (1997) *Biopolymers* 41:301
62. De Rocquigny H, Ficheux D, Gabus C, Fournie-Zaluski MC, Darlix JL, Roques BP (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 180:1010
63. Livesey AK, and Brochon, J.C. (1987) *Biophys J.* 52:693
64. Brochon JC (1994) *Methods Enzymol* 240:262
65. Clamme JP, Azoulay J, Mély Y (2003) *Biophys J* 84:1960
66. Edman L, Mets U, Rigler R (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6710
67. Widengren J, Dapprich J, Rigler R (1997) *Chem Phys* 216:417
68. Vamosi G, Gohlke C, Clegg RM (1996) *Biophys J* 71:972
69. Bernacchi S, Piemont E, Potier N, Dorselaer A, Mely Y (2003) *Biophys J* 84:643
70. Bernacchi S, Mely Y (2001) *Nucleic Acids Res* 29:E62
71. Kasha M (1963) *Radiat Res* 20:55
72. Kasha M (1991) *Basic Life Sci* 58:231
73. Scholes DS, Ghiggino KP (1994) *J Phys Chem* 98:4580
74. Chan B, Weidemaier K, Yip WT, Barbara PF, Musier-Forsyth K (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:459
75. Rivetti C, Walker C, Bustamante C (1998) *J Mol Biol* 280:41
76. Ying L, Wallace MI, Balasubramanian S (2000) *J Phys Chem B* 104:5171
77. Smith C, Lee SW, Wong E, Gallardo H, Page K, Gaspar O, Lebkowski J, Gilboa E (1996) *Antiviral Res* 32:99
78. Wennmalm S, Edman L, Rigler R (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10641
79. Bonnet G, Krichevsky O, Libchaber A (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8602
80. Nonin S, Leroy JL, Gueron M (1995) *Biochemistry* 34:10652
81. Leroy JL, Charretier E, Kochoyan M, Gueron M (1988) *Biochemistry* 27:8894
82. Cain RJ, Glick GD (1997) *Nucleic Acids Res* 25:836
83. Kovacic RT, van Holde KE (1977) *Biochemistry* 16:1490
84. Tirado MM, Garcia de la Torre J (1979) *J Chem Phys* 71:2581
85. Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z, Karpel RL (1994) *Embo J* 13:2913
86. Urbaneja MA, Wu M, Casas-Finet JR, Karpel RL (2002) *J Mol Biol* 318:749
87. Sykora KW, Moelling K (1981) *J Gen Virol* 55:379
88. Vuilleumier C, Bombarda E, Morellet N, Gerard D, Roques BP, Mely Y (1999) *Biochemistry* 38:16816
89. Urbaneja MA, Wu M, Casas-Finet JR, Karpel RL (2002) *J. Mol Biol* 318:749
90. Tisne C, Roques BP, Dardel F (2001) *J Mol Biol* 306:443
91. Mely Y, de Rocquigny H, Sorinas-Jimeno M, Keith G, Roques BP, Marquet R, Gerard D (1995) *J Biol Chem* 270:1650
92. Berkhout B, Vastenhouw NL, Klasens BI, Huthoff H (2001) *RNA* 7:1097
93. Chang KY, Tinoco I, Jr. (1997) *J Mol Biol* 269:52
94. You JC, McHenry CS (1994) *J Biol Chem* 269:31491
95. SantaLucia J, Jr. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1460

Fig. 1: (a) cTAR and (c) NC(12-55) sequences and, (b) chemical structures of the dyes used in this study. The selected cTAR DNA sequence is the cDNA copy of the TAR RNA sequence from the MAL strain. The secondary structures of cTAR derivatives were predicted from that of TAR [49] and the mfold program [95] (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>). Figure reproduced from [35] with permission of Elsevier.

Fig. 2: Diagram of the experimental two-photon excitation FCS setup. (OD) optical density filter; (BE) beam expander made of two convergent lenses (L1/L2); (DC) dichroic beamsplitter; (F) BG39 filter; (APD) avalanche photodiode.

Fig. 3: Absorption spectra of the singly and doubly labeled cTAR derivatives. The spectra of TMR-5'-cTAR-3'-Fl (solid line) and an equimolecular mixture of TMR-5'-cTAR and cTAR-3'-Fl (dashed line) were performed at pH7.5 and 20°C.

Fig. 4: Dynamics of cTAR fraying. (a) Autocorrelation curves of TMR-5'-cTAR (◆) and TMR-5'-cTAR-3'-Fl in the absence (▲) or in the presence of NC(12-55) (△) added at $t=5$. Solid lines correspond to fits of the experimental points with Eq. (6) and the parameters of Table 3. (b) Ratio $G^*(\tau)$ between the autocorrelation curves of TMR-5'-cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR. The $G^*(\tau)$ ratios were obtained either in the absence (▲) or in the presence (△) of NC(12-55). The solid line is a three-parameter exponential fit to the data (see text) with the parameters given in Table 3. Figure reproduced from [35] with permission of Elsevier.

Fig. 5: Proposed model for cTAR destabilization by NC. Peptides are represented by rectangles. The shaded rectangles correspond to the first peptides that bind to cTAR DNA. Steps 1 to 6 are described in the text. Figure reproduced from [35] with permission of Elsevier.

Table 1. Time-resolved fluorescence parameters of singly- and doubly-labeled cTAR derivatives^a.

	$t(^{\circ}C)$	r	α_0	$\tau_1 (ns)$	α_1	$\tau_2 (ns)$	α_2	$\tau_3 (ns)$	α_3	$\langle\tau\rangle (ns)$	R_m	K_d
cTAR-3'-F1	20	-	-	-	-	2.03±0.10	0.15±0.01	4.28±0.02	0.85±0.01	3.94±0.02	-	-
	20	5	-	-	-	1.76±0.05	0.19±0.01	4.44±0.01	0.81±0.01	3.93±0.01	-	-
	60	-	-	-	-	2.00±0.15	0.23±0.04	4.00±0.05	0.77±0.03	3.54±0.01	-	-
TMR-5'-cTAR-3'-F1	20	-		0.12±0.01	0.56±0.04	1.24±0.05	0.17±0.03	3.85±0.06	0.27±0.03	1.32±0.09	15	0.25
				0.80±0.03	0.12	0.03	0.05					
	20	5		0.18±0.03	0.30±0.01	1.27±0.02	0.45±0.04	3.69±0.08	0.25±0.01	1.55±0.04	4.71	1.2
				0.46±0.05	0.17	0.24	0.13					
60	-	-	-	-	1.84±0.13	0.27±0.04	3.47±0.05	0.73±0.04	3.03±0.01			

^a The fluorescence lifetimes, τ_1 to τ_3 , the relative amplitudes, α_1 to α_3 , and the mean lifetime, $\langle\tau\rangle$, are expressed as means \pm standard error of the mean for three experiments. r designates the ratio of nucleotides to NC. The equilibrium constant, K_d , was calculated using: $K_d=[open]/[close]=(1-\alpha_0)/\alpha_0$. The relative amplitude, α_0 , of the dark species is calculated by Eq. (2). Table reproduced from [41] with permission of Elsevier.

Table 2: Calculated interchromophore distances for the melting of an increasing number of double-stranded segments in TMR-5'-cTAR-3'-Fl.

n_{seg}^a	n_{nt}^a	$\langle R^2 \rangle^{1/2} (\text{Å})^a$	$R_{min}-R_{max} (\text{Å})^a$
1	9	26	6-46
2	14	34	14-54
3	31	52	32-72
4	43	61	41-81
5	55	70	50-90

^a n_{seg} designate the number of melted double-stranded segments starting from the terminal segment. This melting leads to the formation of two single-stranded segments that may be approximated as a continuous single strand (if we include the terminal base pair of the non-melted domain) with n_{nt} nucleotides. The average interchromophore distance, $\langle R^2 \rangle^{1/2}$, was calculated from Eq. (5). The minimum and maximum interchromophore distances, R_{min} and R_{max} , were calculated by assuming a linker length of 10 Å. The relevance of these distances is assessed by the good agreement between the 70Å distance calculated for a fully melted oligonucleotide with the 80Å distance calculated from the mean

lifetimes of Fl-5'-cTAR-3'-TMR and Fl-5'-cTAR at 60°C (Table 1) using $E = 1 - \frac{\langle \tau \rangle^{Fl,TMR}}{\langle \tau \rangle^{Fl}}$ and Eq. (4). Table reproduced from [41] with permission of Elsevier.

Table 3. Kinetics of fraying of cTAR derivatives

nt/NC	τ_r (μs)	k_{op} (s^{-1})	k_{cl} (s^{-1})
-	160±40	1,250±150	5,000±600
5	<30	>18,000	>15,400

The chemical rate constants, τ_r , were deduced from the fits of the data in Fig. 4b to $G^*(\tau)=A+Bexp(-t/\tau_r)$. The opening rate constant, k_{op} and the closing rate constant, k_{cl} , were deduced from Eq. (9). The results are expressed as means \pm standard error of the mean for at least two independent experiments. Table reproduced from [35] with permission of Elsevier.

Figure 1

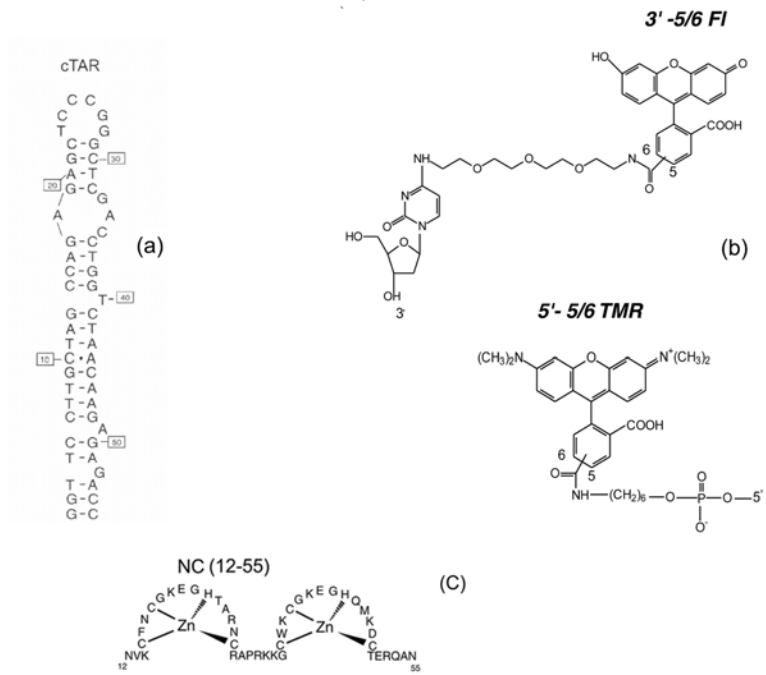


Figure 2

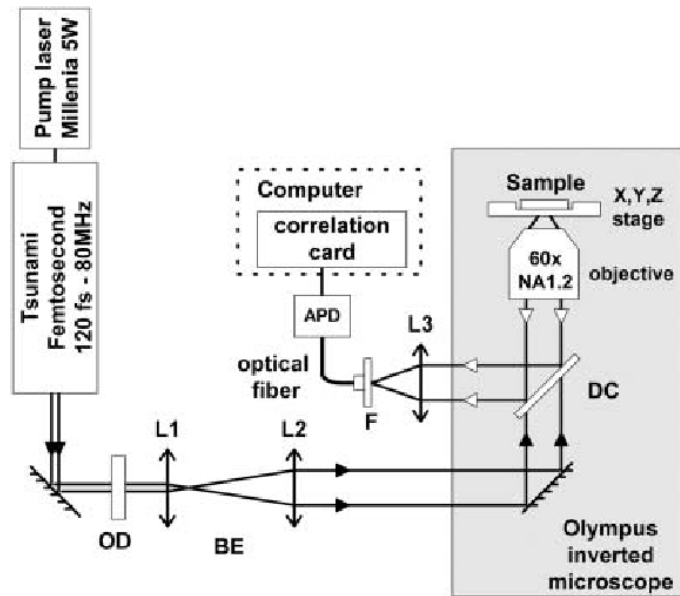


Figure 3

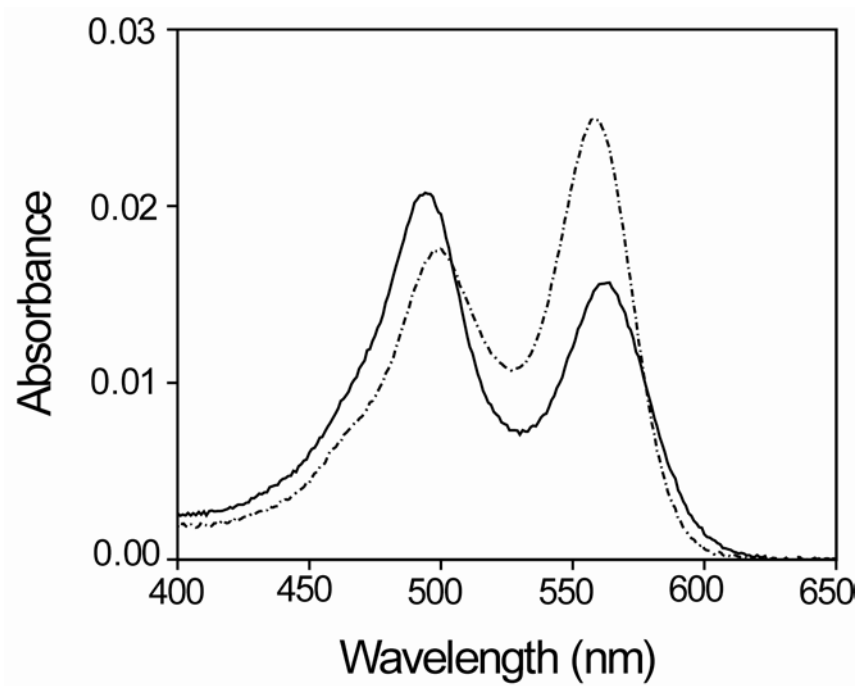


Figure 4

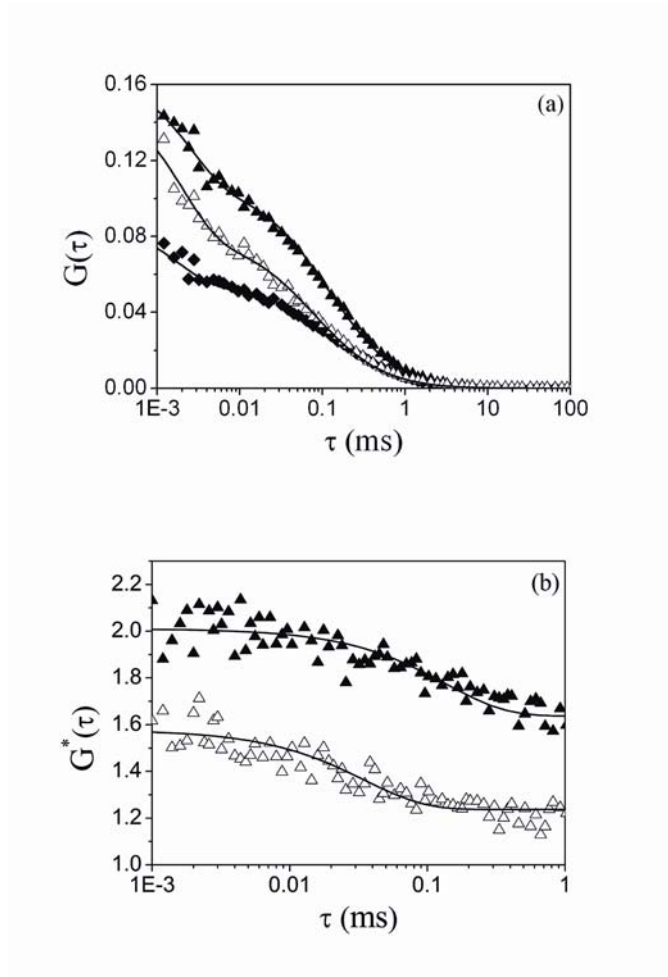
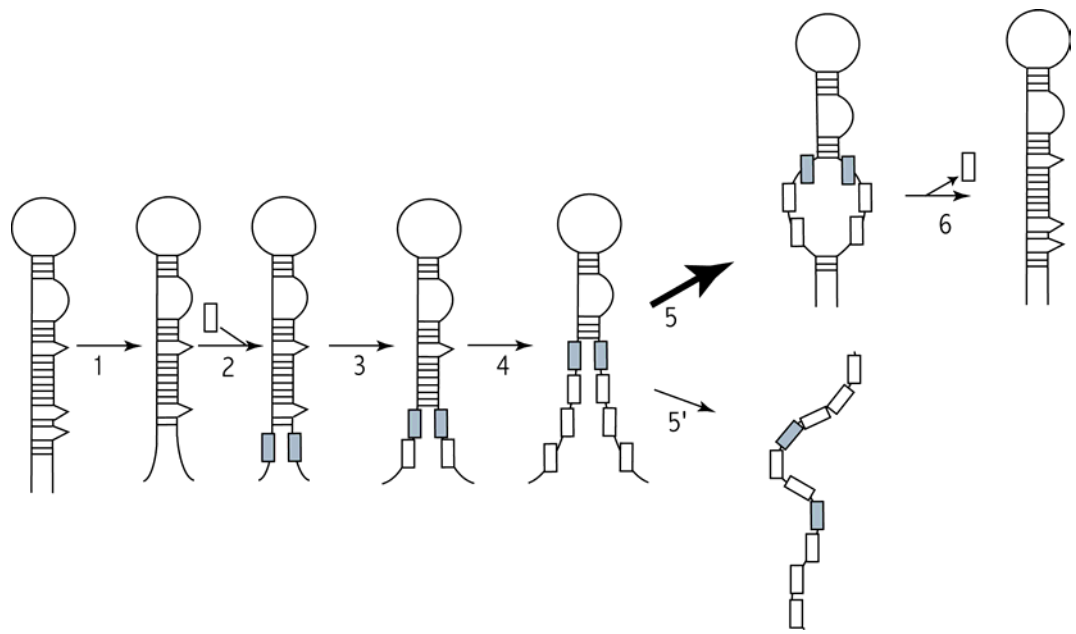


Figure 5



Photonics Europe 2004:
Metrology, Sensing and
Biophotonics, Proceedings of
SPIE

Investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy of the interaction of the nucleocapsid protein of HIV-1 with hairpin loop DNA sequences

Y. Mély*^a, J. Azoulay^a, H. Beltz^a, J.P. Clamme^a, S. Bernacchi^a, D. Ficheux^b, B. Roques^c & J.L. Darlix^d

^aUMR7034 CNRS, ULP, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France, ^bIBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France, ³Département de Pharmacologie Moléculaire et Structurale, Inserm U266, Faculté de Pharmacie, 75270 Paris Cedex 06, France, ⁴Laboratoire, Unité de virologie humaine, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69634 Lyon, France.

ABSTRACT

The nucleocapsid protein NCp7 of HIV-1 possesses nucleic acid chaperone properties that are critical for the two strand transfer reactions required during reverse transcription. The first DNA strand transfer relies on the destabilization by NCp7 of double-stranded segments of the transactivation response element, TAR sequence, at the 3' end of the genomic RNA and the complementary sequence cTAR at the 3' terminus of the early product of reverse transcription. To characterize NCp7-mediated nucleic acid destabilization, we investigated by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy and two photon fluorescence correlation spectroscopy, the interaction of a doubly-labelled cTAR sequence with NCp7. The conformational fluctuations observed in the absence of NCp7 were associated with the rapid opening and closing (fraying) of the double stranded terminal segment of cTAR. NCp7 destabilizes cTAR mainly through a large increase of the opening rate constant. Additionally, the various destabilizing structures (bulges, internal loop, mismatches) spread all over cTAR secondary structure were found to be critical for NCp7 chaperone activity. Taken together, our data enabled us to propose a molecular mechanism for the destabilizing activity of NCp7 on cTAR which is crucial for the formation of the cTAR-TAR complex during the first strand transfer reaction.

Keywords: Fluorescence correlation spectroscopy, two photon, time-resolved fluorescence, nucleocapsid, nucleic acids, molecular beacons, exciton coupling, chaperone

1. INTRODUCTION

The nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a small basic protein (55 amino acids) characterized by two highly conserved CCHC zinc finger motifs that strongly coordinate zinc ions (Bess et al, 92; Summers et al., 92) (Fig. 1a). This structural protein is generated by protease-mediated processing of the Gag polyprotein precursor (ref 16 de HB 04) and is thought to play a critical role in several steps of the viral cycle, notably during reverse transcription, integration and encapsidation. Its most documented role is during reverse transcription which consists in a complex series of events resulting in the conversion of the single stranded genomic RNA into a linear, double-stranded DNA by reverse transcriptase (1 de HB 04). Reverse transcription notably involves two NCp7-assisted obligatory strand transfers. The first one requires the annealing of the early product of HIV-1 cDNA synthesis, the minus strand strong stop DNA (ss-cDNA(-)) to the 3' end of the genomic RNA. This transfer reaction is mediated by the hybridization of the repeat sequences (R) at the 3' end of the genomic RNA to the complementary R at the 3' end of the ss-cDNA(-). The second strand transfer involves the plus-strand strong-stop DNA [(+)ssDNA] which is synthesized by RT from the minus-strand template having the tRNA^{Lys,3} primer still hybridized to its 5'-end. Synthesis of (+)ssDNA continues until the 18 nucleotides (nt) at the 3' end of the tRNA are copied, in order to reconstitute the primer binding site (PBS) sequence. Before (+)ssDNA transfer, the tRNA primer is removed by the RNase H activity of RT, in order to free the (+)PBS at the 3' end of (+)ssDNA. This allows then the (+)PBS to hybridize to the (-)PBS synthesized at the 3' end of the (-) strand DNA, enabling the synthesis to resume with strands copying each other. In vitro, NCp7 has been found to promote ss-cDNA transfer by increasing the rate and extent of annealing^{5,8,11,17,18} and by preventing non-specific self primed cDNA synthesis^{2,4,6,11}. NCp7 also stimulates the plus-strand transfer reaction (refs

^{12,22-24} de Caro) by removing the tRNA^{Lys,3} primer from the 5' end of minus-strand DNA, and by annealing the (+)ssDNA PBS sequence to its complement in minus-strand DNA.

The activity of NCp7 in both strand transfers probably results from its nucleic acid chaperoning properties that assist the rearrangement of nucleic acid molecules into their most stable conformation^{19,20}. These chaperoning properties are similar to the combined effects of heat and salt in the promotion of duplexes from folded complementary sequences. Indeed, it is well known that if two complementary sequences are mixed, they can spontaneously lead to duplexes. This reaction is thermodynamically favourable since the stability of the duplex is much larger than that of the isolated sequences. However, if the initial sequences are highly folded, the formation of the duplex can be slow. To increase the reaction rate, the sequences may be heated to disrupt their secondary structures and salt may be added to screen the repulsive electrostatic interactions between the negatively charged nucleic acids. By analogy, since NCp7 activates the annealing of complementary folded sequences (You & Mc Henry, 94; Guo et al., 00), NCp7 is thought to destabilize the secondary structure of the folded initial sequences and promote their annealing. NCp7 chaperoning properties are also illustrated by the ability of this protein to promote strand exchange reactions. Indeed, when an imperfect duplex is mixed with a single-stranded oligonucleotide fully complementary to one strand of the imperfect duplex, NCp7 promotes the formation of the stable perfect duplex (Tsuchihashi & Brown, 94; Urbaneja et al., 04).

In this context, the aim of our study was to characterize at a molecular level the destabilizing component of NCp7 chaperoning activity on the cTAR DNA sequence that is involved in the first strand transfer. The stem of this hairpin sequence contains twenty Watson-Crick base pairs and is thus expected to be highly stable. However, due to three bulged nucleotides, an internal loop and one mismatch, the stem is not continuous but consists of short contiguous double-stranded segments. To monitor the destabilizing effect of NCp7 on cTAR secondary structure, we used the “molecular beacon” strategy (Tyagi & Kramer, 96) with cTAR sequences doubly labelled at their 5' and 3' ends by 5-(and-6)-carboxyfluorescein (F1) and carboxytetramethylrhodamine (TMR), acting respectively as donor and acceptor in a mechanism of fluorescence resonance energy transfer (FRET). The interaction of NCp7 with the labelled oligonucleotides was monitored by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy as well as two photon fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

2. METHODOLOGY

2.1. Materials

NC(12-55) peptide was synthesized as previously described⁷³. The purity of the peptide was greater than 98%. The peptide was stored lyophilized in its zinc-bound form and an extinction coefficient of 5,700 M⁻¹cm⁻¹ at 280 nm was used to determine its concentration.

Doubly and singly-labeled cTAR DNA oligonucleotides (Fig. 1c) were synthesized at a 0.2 μmole scale by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany). The 5' terminus of the oligonucleotides was labeled by TMR via an amino-linker with a six carbon spacer arm (Fig. 1b). The 3' terminus of the doubly-labeled oligonucleotide was labeled with F1 using a special solid support with the dye already attached. Oligonucleotides were purified by the manufacturer by reverse-phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. The purity of the labeled oligonucleotides was checked by electrospray ionization mass spectrometry and found to be > 93%. Experiments were performed in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM NaCl and 0.2 mM MgCl₂. An extinction coefficient of 521,900 M⁻¹cm⁻¹ at 260 nm was used to calculate the concentration of cTAR.

2.2. Methods

Emission spectra were recorded on an SLM 48000 spectrofluorometer equipped with a thermostated cell compartment. Time-resolved fluorescence measurements were performed with a time-correlated, single-photon counting technique using the stable excitation pulses provided by a pulse-picked frequency tripled Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) pumped by a Millennia X laser (Spectra Physics). Temperature was maintained at 20°C. The excitation pulses were at 480 nm, with a repetition rate of 4 MHz. The emission was collected through a polarizer set at magic angle and a 4 nm band-pass monochromator (Jobin-Yvon H10) at 523 nm. The single-photon events were detected with a microchannel plate Hamamatsu R3809U photomultiplier coupled to a Phillips 6954 pulse preamplifier and recorded on a multichannel analyzer (Ortec 7100) calibrated at 25.5 ps/channel. The instrumental response function was recorded with a polished aluminium reflector, and its full width at half-maximum was 40 ps. Time-resolved data analysis was performed using the maximum entropy method (MEM) and the Pulse5 software^{79,80}. For the analysis of the

fluorescence decay, a distribution of 200 equally spaced lifetime values on a logarithmic scale between 0.01 and 20 ns, was used. In all cases, the χ^2 values were close to 1.0, and the weighted residuals as well as the autocorrelation of the residuals were randomly distributed around zero indicating an optimal fit.

FCS measurements were performed on a two-photon platform (Fig. 2) including an Olympus IX70 inverted microscope, as previously described^{9,73}. Two photon excitation at 850 nm is provided by a mode-locked Tsunami Ti:sapphire laser pumped by a Millennia V solid state laser (Spectra Physics). The measurements were carried out in a 8 Well Lab-Tek II coverglass system, using a 400 μ l volume per well. The focal spot is set about 20 μ m above the coverslip. The normalized autocorrelation function, $G(\tau)$ is calculated online by an ALV-5000E correlator (ALV, Germany) from the fluorescence fluctuations, $\delta F(t)$, by:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

where $\langle F(t) \rangle$ is the mean fluorescence signal and τ is the lag time.

The analysis of $G(\tau)$ can provide information about the underlying mechanisms responsible for the intensity fluctuations such as diffusion of the particles, electronic transition within the molecules and transitions between states of different brightness (Hess et al., 03). For an ideal case of freely diffusing monodisperse fluorescent particles undergoing triplet blinking in a Gaussian excitation volume, the correlation function, $G(\tau)$, calculated from the fluorescence fluctuations can be fitted according to⁷⁴:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{da}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{s^2} \frac{\tau}{\tau_{da}} \right)^{-1/2} \left(1 + \left(\frac{f_t}{1-f_t} \right) \exp\left(-\tau/\tau_t\right) \right) \quad (2)$$

where τ_{da} is the apparent diffusion time (a parameter that is inversely related to the diffusion constant of the molecule), N is the mean number of molecules within the sample volume, s is the ratio between the axial and lateral radii of the sample volume, f_t is the mean fraction of fluorophores in their triplet state and τ_t is the triplet state lifetime. The excitation volume is about 0.3 μ m³ and s is about 3. Using carboxytetramethylrhodamine (TMR) in water as a reference ($D_{TMR}=2.8 \times 10^{-6}$ cm².s⁻¹), the diffusion coefficient, D_{exp} , of the labeled oligonucleotides was calculated by: $D_{exp} = D_{TMR} \times \tau_{da}(TMR) / \tau_{da}(oligo)$ where $\tau_{da}(TMR)$ and $\tau_{da}(oligo)$ are the measured correlation times for TMR and the oligonucleotide, respectively. As a compromise between photobleaching and a good signal to noise ratio, we select a power of 5 mW. At this power, the photon count rate per molecule is about 5 kHz. Typical data recording times are 10 min.

3. RESULTS

3.1. NCp7 partially melts cTAR DNA secondary structure

In a first attempt to evaluate the effect of NCp7 on the secondary structure of cDNA, we monitored the fluorescence intensity changes induced by NCp7 on the doubly-labeled TMR-5'-cTAR-3'-Fl derivative. In a former study, we have shown that in its closed form, the TMR and DABCYL dyes are held stably close together and form a ground-state intramolecular H-type heterodimer (SB, 01 et 03). This allows a strong coupling between the transition dipoles of the two dyes, which causes the delocalization of excitation over the dyes. It follows that the spectral properties can no more be ascribed to the individual dyes but correspond to a unique spectral signature of the heterodimer. This strong coupling between the transition dipoles can be described by the molecular exciton model and is clearly distinct from the FRET mechanism which relies on weak dipolar coupling. One of the major differences between FRET and exciton coupling is that only the last one induces large changes in the absorption properties of the dyes. These absorption changes are clearly observed when the absorption spectrum of TMR-5'-cTAR-3'-Fl is compared to that of an equimolecular mixture of TMR-5'-cTAR and cTAR-3'-Fl (see Fig. 3 of SB, 03). Another distinct feature between FRET and exciton coupling is that the last one could be observed only at very short distances (<20 angströms) in solution since it strongly depends on the exact geometry and the distance between the dyes. As a consequence, when the heterodimer dissociates, FRET becomes applicable and its associated fluorescence changes could be used to get information on the interchromophore distance. Noticeably, exciton coupling is not specific to the (Fl, TMR) couple and could also be observed for other couples of dyes. However, this coupling strongly depends on the terminal double-stranded segments since it largely disappears when the terminal nucleotides were mutated to prevent base pair formation (SB, 03).

The fluorescence spectrum of TMR-5'-cTAR-3'-Fl was recorded with an excitation wavelength of 450 nm to keep the direct excitation of TMR into a minimum. In the absence of NCp7, the fluorescence of TMR-5'-cTAR-3'-Fl was significant, showing two peaks corresponding to the emission of Fl and TMR, respectively. Since in the same conditions the fluorescence of the singly-labeled TMR-5'-cTAR species was negligible and since H-type heterodimers are not fluorescent, it may be concluded that FRET is observed. Since the Förster distance, R_0 , for the (Fl, TMR) couple is about 60 Å (Bernacchi et al., 2002) and since the fluorescence of the donor could only be detected if the distance to the acceptor exceeds $R_0/2$ (Lackowicz, 1999), it results that the observed FRET may be related to partially melted species in equilibrium with the closed species. Melting of the oligonucleotide by temperature induces a large increase of both Fl and TMR peaks, in line with the conversion of the closed species into the melted ones. In a next step, the emission spectrum of TMR-5'-cTAR-3'-Fl was recorded in the presence of NC(12-55), a NCp7 derivative that comprises the two-finger domain but lacks the N-terminal basic domain (Fig. 1a). This derivative was preferred to the native NCp7 since it shows similar nucleic acid destabilizing properties (data not shown) but less nucleic acid-aggregating properties (10, 50, 51 de SB 02). Addition of NC(12-55) induces a significant increase of both TMR and Fl peaks but with no significant change in their ratio. The effect is smaller than that induced by temperature. Since NC(12-55) induces only a very limited increase of the fluorescence of the singly-labelled cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR derivatives (data not shown), the effect observed with TMR-5'-cTAR-3'-Fl is not due to a direct interaction of the peptide with the dyes but results from a separation of the dyes. Since a fluorescence increase in TMR-5'-cTAR-3'-Fl can only be perceived with a large separation of the dyes (>30 Å), it can be concluded that NC(12-55) induces a significant opening of the stem in at least a fraction of the cTAR molecules. The partial restoration of Fl fluorescence in TMR-5'-cTAR-3'-Fl gradually increases with peptide concentration and reaches a plateau value close to 32% at $r=7.5$. No further increase of Fl fluorescence was observed at higher peptide concentration, suggesting that NC(12-55) is unable to fully melt cTAR secondary structure. Moreover, since the binding site size of NCp7 is about five to seven nucleotides (You and Mc Henry, 93; Mély et al., 95; Vuilleumier et al., 98; Fisher et al., 98), it may be inferred that an extensive coating of the oligonucleotide by NC(12-55) is required to observe the maximal effect. From these data, it appears that NCp7 induces a partial melting of cTAR secondary structure.

3.2. NCp7 shifts the conformational equilibrium of cTAR molecules toward the open conformers

Since steady-state fluorescence spectroscopy provides only global information, it is impossible to know if NC(12-55) i) fully melts a fraction of the cTAR molecules, leaving the remaining molecules unaffected, ii) partly but uniformly melts the whole population of cTAR molecules or iii) leads to a mixture of fully, partly and non-melted cTAR molecules. To discriminate between these hypotheses, time-resolved fluorescence measurements were performed. This technique allows to recover the lifetimes and the fractional amplitudes of the molecules in solution. Since the lifetimes are exquisitely sensitive to the environment of the dye, this technique allows to distinguish different populations of molecules. Since the mechanism of FRET decreases the lifetime of the donor as a function of the distance between the donor and the acceptor, the lifetimes of Fl in TMR-5'-cTAR-3'-Fl are expected to depend mainly on the interchromophore distance.

To interpret the data with TMR-5'-cTAR-3'-Fl, we first analyzed the fluorescence intensity decay of the singly-labeled cTAR-3'-Fl derivative. The fluorescence decay of cTAR-3'-Fl (Table 1) is characterized by two lifetimes, τ_2 and τ_3 , which may be ascribed to two conformational states differing by the relative location of the dye in respect with the oligonucleotide [66-68 de JA 04]. The long-lived lifetime represents 85% and is typical of solvent-exposed Fl and may thus correspond to species where the Fl dye does not interact with cTAR. In contrast, the minor population with short-lived lifetime may correspond to species where the Fl interacts with cTAR stem. Indeed, it is well-known that for instance guanine bases could quench various dyes through an electron transfer mechanism (ref 19 et 20 de JA, 03). In line with the limited effects of NC(12-55) on the fluorescence spectrum of cTAR-3'-Fl, NC(12-55) induces only limited changes in both the lifetimes and associated amplitudes of cTAR-3'-Fl, suggesting that the peptide does not dramatically alter Fl environment.

The decay of TMR-5'-cTAR-3'-Fl is more complex, being characterized by three lifetimes. Both the appearance of a short-lived component (0.12ns) and the significant decrease of both intermediate- and long-lived lifetimes as compared to cTAR-3'-Fl are consistent with a FRET mechanism between Fl and TMR in the three conformational states associated to these lifetimes. Interestingly, each of these lifetimes is associated with a rather narrow distribution suggesting that only discrete degrees of stem opening are observed. Since the ratio of 3 between the mean lifetimes, $\langle \tau \rangle$, of cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR-3'-Fl is much lower than the ratio, R_m , of 15 between their steady-state fluorescence intensities, this strongly suggests the existence of dark species with very short (<20 ps) or null lifetime. These species probably

correspond to oligonucleotides where the terminal segment is closed and thus, the Fl and TMR dyes are close together. The relative amplitude, α_0 , associated with these dark species could be calculated by:

$$\alpha_0 = 1 - \frac{\langle \tau \rangle_{Fl}}{\langle \tau \rangle_m \times R_m} \quad (3)$$

where $\langle \tau \rangle_{Fl}$ and $\langle \tau \rangle_m$ correspond to the measured mean lifetimes of cTAR-3'-Fl and TMR-5'-cTAR-3'-Fl, respectively. The relative amplitude of these dark species was found to be 80% (Table 1). As a consequence, the relative amplitudes of the various lifetimes have been recalculated according to: $\alpha_{ic} = \alpha_i(1 - \alpha_0)$, where α_i corresponds to the measured amplitude of the *i*th lifetime (Table 1). Melting of TMR-5'-cTAR-3'-Fl ($T_m = 47^\circ\text{C}$) by temperature induces the disappearance of the dark species and the species associated with the short-lived component, strongly suggesting that these latter may correspond to non- or partly-melted species. As a consequence, it may be concluded that the closed species are in equilibrium with partly melted species in cTAR giving FRET in line with the above conclusions from steady-state data.

In a next step, the interchromophore distances of the partly melted species were calculated from their lifetimes. Two favorable properties of the system permit this calculation. The first one is the large prevalence of the long-lived lifetime for the fluorescence of Fl in the absence of acceptor (Table 1). Thus, the interchromophore distances may be calculated by comparing Fl lifetimes in TMR-5'-cTAR-3'-Fl to this long-lived component. The second favorable feature is the binding of both Fl and TMR dyes to cTAR through flexible linkers (Fig. 1) that probably allow both dyes to sample many orientations during the transfer period. Accordingly, as in the doubly-labeled tRNA^{Lys,3} derivative [74], a value of 2/3 may be reasonably assumed for the orientation factor κ^2 in the calculation of the Förster distance, R_0 . Using the above assumptions, the energy transfer efficiencies, E , were calculated by:

$$E = 1 - \frac{\tau_i^{Fl,TMR}}{\tau_3^{Fl}} \quad (4)$$

where τ_3^{Fl} is the long-lived lifetime of cTAR-3'-Fl and $\tau_i^{Fl,TMR}$ is the *i*-th fluorescence lifetime of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. The calculated E values are respectively 0.97, 0.71 and 0.10 for the three fluorescent species of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. In a next step, these values were used together with the R_0 value of the (Fl, TMR) couple to calculate the interchromophore distances, R , by using:

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (5)$$

Accordingly, interchromophore distances of 34, 52 and 86 Å, respectively, were calculated for the three conformational states associated to the τ_1 to τ_3 lifetimes of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. These distances can be compared to the theoretical distances calculated using the wormlike chain (WLC) model [75 de JA, 04] by assuming that an increasing number of segments at the oligonucleotide terminus is melted (SB, 02). From this comparison, it is concluded that the 0.12 ns lifetime may correspond to species where only the stem terminus is melted, while the 1.24 ns component may correspond to cTAR species melted up to middle of the stem and the 3.85 ns component may correspond to fully melted species. Among the melted species, the one with the short-lived lifetime is by far the most populated one, suggesting that thermal fluctuations lead only to a limited melting of cTAR stem terminus. This limited melting is consistent with a mechanism of fraying in which the terminal base pair of a duplex rapidly fluctuates between an open and a close state [80-82 de JA, 04]. Nevertheless, it can not be excluded that the fraying may not be limited to the last base pair but involves the three base pairs of the terminal double-stranded segment. Indeed, a similar cooperative opening until the fourth base pair from the end of a duplex has been shown to occur as a consequence of fraying (ref 48, 49 et 70 de SB, 02) and the cooperative opening of DNA hairpin-loops with short stems has been shown to result in a two-state equilibrium between closed and open species [79].

To further determine the melting degree of the partly melted species, time-resolved fluorescence were performed on three cTAR derivatives where either the bulge at position 49 (cTAR1), at position 52 (cTAR2) or at both positions

(cTAR1,2) were replaced by base pairs (Fig. 1c). The time-resolved parameters of the three doubly labelled cTAR derivatives were found to be strikingly similar to those of TMR-5'-cTAR-3'-Fl. Due to the stabilization of cTAR stem terminus in cTAR1,2 and cTAR2, it is likely that the fraying may be limited to the terminal base pair in these mutants. In line with this hypothesis, the equilibrium constant, K_d , between dark and fluorescent species for the various cTAR derivatives (Table 1) is very close to the K_d measured for the fraying of the terminal G-C base pair of a duplex⁵⁸. For the species associated to τ_2 , the melting is expected to propagate up to the first destabilizing structure that is common to the three cTAR derivatives. A likely candidate would be the central T bulge. In line with this hypothesis, thermodynamic studies have shown that the lower half of cTAR stem is much less stable than the upper half, strongly suggesting that the secondary structure of cTAR stem may melt up to the T⁴⁰ bulge. Addition of NC(12-55) to TMR-5'-cTAR-3'-Fl at a ratio, r , of nucleotide to peptide of five does not significantly change the lifetimes but strongly modifies their associated amplitudes (Table 1), suggesting that NC(12-55) does not generate new species but only modifies the equilibrium between the species already existing in the absence of the peptide. The major feature in respect with the amplitudes is the dramatic decrease of the relative amplitude associated to the dark species which drops to 46%. The dark species are mainly converted into species with the intermediate-lived lifetime, suggesting that the peptide favors the cooperative melting of the lower half of cTAR stem. The relative population of fully melted species is only slightly increased, confirming that NCp7 shows only moderate melting properties (Loret et al., 97). The effect of NC(12-55) on cTAR mutants was even less. From the decrease in α_0 , the following order can be deduced for NC-mediated destabilization: cTAR>>cTAR1>cTAR2>cTAR1,2; the α_0 decrease being very limited in the last cTAR mutant. It thus appears that the effect of NC(12-55) on cTAR terminus is critically dependent on the presence of the terminal bulges which destabilize the cTAR terminus. Indeed, thermodynamic investigation of the stability of cTAR derivatives revealed that in cTAR1 and cTAR2, each bulge induces a free energy change, $\Delta\Delta G_{37}^0$, of about 2 kcal/mol. Moreover, the destabilizing effect of the two bulges on cTAR was found to be more than additive, leading to a free energy change of about 5 kcal/mol. This suggests that the two bulges cooperatively destabilize cTAR stem. Taken together, our data suggest that NCp7 induces only a limited melting of cTAR secondary structure, resulting in a shift of cTAR conformational equilibrium toward the open conformers. This melting activity critically depends on the two terminal bulges which cooperatively destabilizes the cTAR stem. The close correlation between NCp7 activity and the presence of destabilizing elements in cTAR has been further assessed that NCp7 destabilizing activity on cTAR upper half is strongly dependent on the presence and the base composition of the 3 nt bulging out of the stem (HB, 04).

3.3. NCp7 activates the kinetics of the fraying of cTAR terminus

Since fluorescence lifetimes are in the nanosecond range, fluorescence time-resolved experiments could not provide information on events that are in the microsecond range or slower. As a consequence, the investigation of the kinetics of cTAR conformational equilibrium requires an additional technique. Fluorescence correlation spectroscopy was used to reach this aim. This technique is based on the analysis of the statistical fluctuations in the fluorescence intensity of a small sample volume (usually less than one femtoliter) in a solution at equilibrium. Using one photon excitation, the sample volume is defined both by a focused laser beam and a confocal pinhole. In this respect, though the laser beam is focused, the excited volume is much larger than the sample volume. It results that side effects like out-of-focus photobleaching will be observed. This drawback is largely minimized by using two photon excitation (TPE). Indeed, two photon absorption is proportional to the square of illumination intensity, and thus for a tightly focused beam, the excitation of fluorescent molecules declines rapidly with the axial distance (roughly as z^{-4}) from the focal plane. This inherent excitation confinement provides 3D spatial resolution and a nearly 3D Gaussian observation volume. As a consequence, the background fluorescence level and out-of-focus photodamage are markedly reduced in comparison with one photon excitation. Moreover, TPE also provides a large spectral separation between excitation and emission wavelengths, allowing background due to Raman and Rayleigh scattering of water to be largely excluded. From the analysis of fluorescence fluctuations, quantitative information about the processes that provoke these fluctuations could be recovered. Diffusion of the labelled particles in and out the sample volume is usually the main source of fluorescence fluctuations, enabling the determination of diffusion constants. Depending on the system, additional sources of fluorescence fluctuations may occur, as for instance photophysical reactions [2, 7-14], rotational dynamics [15, 16], protein self-association [17-22], binding equilibria [23-30] and kinetics [23, 31, 32], or conformational dynamics of nucleic acids [33-36]. FCS seems well suited to resolve the kinetics of cTAR fraying since fluorescence fluctuations are thought to result from the transition between the closed nonfluorescent species and the partly melted fluorescent species. Moreover, it has been previously shown by NMR that fraying of the terminal base pairs of a duplex is in the

submillisecond time range (Cain et al., 97) and fits thus with the time scale of FCS which spans from about one hundred picoseconds to seconds range (Schwille et al., revue).

In a first step, FCS was performed on the singly-labeled TMR-5'-cTAR derivative where due to the absence of Fl at the 3' end, fluorescence fluctuations due to fraying can not occur. As expected, the autocorrelation function, $G(\tau)$, of TMR-5'-cTAR could be well fitted with Eq. (1) in the methodology section (Fig. 4a). In addition to the diffusion process, the TMR-5'-cTAR derivative like most labeled molecules undergoes photodynamic reactions involving the triplet state. The time scale (about 2 μ s) of these reactions is much faster than the diffusion time and these reactions could thus be easily distinguished from the diffusion contribution in $G(\tau)$. From the value of the apparent diffusion time, τ_{da} , of TMR-5'-cTAR, a diffusion coefficient, $D_{exp}=0.60(\pm 0.04)\times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ was inferred. This D_{exp} value could be compared to the theoretical one, D_{th} , calculated by assuming that cTAR may be modeled as a rodlike double-stranded DNA of 27bp:

$$D_{th} = \frac{k_b T}{3\eta\pi} \frac{1}{L} \left(\ln \frac{L}{l} + \gamma \right) \quad (6)$$

where k_b is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature and η is the viscosity of the solution. γ designates the end-correction parameter and is about 0.39 [83]. Assuming a rise per base of 3.4 \AA , the length, L , of the rodlike DNA, was calculated to be about 92 \AA . Finally, the hydrodynamic diameter, l , for a number of DNA fragments with a length similar to cTAR was reported to be from 20.5 to 28 \AA [84]. Using these values, we found that $0.74\times 10^{-6} < D_{th} < 0.88\times 10^{-6}$ cm².s⁻¹. The slower motion of cTAR as compared with the theory may be explained by deviations of cTAR from the rodlike model due to the bulges and loops (Fig. 1c) as well as to the mechanism of fraying.

From the comparison of the autocorrelation curves (Fig. 4a) of singly- and doubly-labeled cTAR sequences at the same concentration (100nM), the average number of fluorescent molecules (which is equal to the inverse of the amplitude of $G(\tau)$ when $\tau \rightarrow 0$) for TMR-5'-cTAR-3'-Fl appears strongly decreased as compared to TMR-5'-cTAR, in line with a large fraction of dark species. Using Eq. (1), a τ_{da} value about 27% less than that of TMR-5'-cTAR was found, suggesting that fraying generate additional fluorescence fluctuations with kinetic rate constants similar or faster than the diffusion rate constant. Assuming that fraying may be treated as a two-state mechanism with a transition between an open fluorescent and a closed dark state, fraying can be characterized by a chemical reaction time, τ_r , corresponding to: $\tau_r^{-1} = k_{op} + k_{cl}$, where k_{op} and k_{cl} are respectively the opening and closing rate constants of the secondary structure of cTAR involved in fraying. The τ_r parameter could be extracted from the ratio, $G^*(\tau)$, of the autocorrelation function of TMR-5'-cTAR-3'-Fl to that of TMR-5'-cTAR [79]. Since τ_r is expected to be much larger than τ_r , this latter may be neglected and thus, $G^*(\tau)$ becomes a simple monoexponential function fitted by: $G^*(\tau) = A + B \exp(-t/\tau_r)$. In keeping with our two-state model, an excellent fit of the experimental $G^*(\tau)$ function (Fig. 4b) was obtained with the above three-parameter exponential, using $\tau_r = 160(\pm 40)\mu$ s. The effective opening, k_{op} , and closing, k_{cl} , rate constants could then be deduced by:

$$k_{op} = \tau_r^{-1} \frac{K_d}{1 + K_d} \quad k_{cl} = \tau_r^{-1} \frac{1}{1 + K_d} \quad (7)$$

Using $K_d=0.25$ (Table 1), values of 1250 s⁻¹ and 5000 s⁻¹ were calculated for k_{op} and k_{cl} , respectively (Table 2). These rate constants are similar to those previously determined with the same sequence but a different couple of chromophores²⁹, suggesting that kinetics were not strongly affected by the nature of the chromophores. Surprisingly, a significant decrease of τ_r , which results in a significant increase of both k_{cl} and k_{op} was observed for cTAR mutants as compared with cTAR DNA.

Addition of NC(12-55) to the singly-labelled TMR-5'-cTAR derivatives yielded a 23 \pm 3% increase of τ_{da} (and thus a corresponding decrease of the diffusion constant), suggesting a significant binding of NC to cTAR. As in the absence of NC, the τ_{da} values of the doubly labeled cTAR derivatives in the presence of NC were significantly lower than the τ_{da} value of NC-coated TMR-5'-cTAR (Table 4), indicating that fluorescence fluctuations related to transient openings of the stem terminus are also observed in the presence of NC. The $G^*(\tau)$ curve appeared to decay much faster than in the absence of NC (Fig. 4b). According to the limitations of the technique, only an upper limit of 30 μ s could be deduced for the reaction time τ_r . Nevertheless, it is likely that τ_r may be close to this upper limit. In the case of cTAR1,2, the small amplitude of $G^*(\tau)$ prevented its fitting and the extraction of relevant parameters. Calculation of the kinetic rate constants from τ_r indicated that NC(12-55) increases k_{op} by about one order of magnitude and k_{cl} by at least a factor of 2.

It thus appears that NCp7 destabilizes the secondary structure of cTAR, mainly by increasing the opening rate constant of the mechanism of fraying.

Discussion

In this study, the destabilization of cTAR stem by NCp7 was investigated by combining steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy with two photon FCS. NCp7 was found to partly melt cTAR secondary structure, by activating the mechanism of fraying, in line with the hypothesis that NC is able to lower the energy barrier for breakage of base pairs (1, 4, 35 de JA). Interestingly, the k_{op} and k_{cl} rate constants in the absence of protein are consistent with those reported for the melting of the terminal G-C base pair of a hairpin (Cain et al, 97), suggesting that the kinetics measured by FCS may be dominated by the kinetics of the terminal base pair. This may especially be true for the cTAR mutants since the addition of one or two additional base pairs in respect to cTAR increases substantially the length of the terminal double-stranded segments. Since these segments are thought to melt at once (Bloomfield, livre), their melting probably requires a much higher activation energy than the terminal base pair, and thus will occur with a much lower frequency. The significantly lower k_{op} value observed for cTAR in comparison with cTAR mutants suggests that a more extended fraying may occur in cTAR. This extended fraying probably involves the three last base pairs of the terminal double-stranded segment and thus may be slower than the fraying of the single terminal base pair of cTAR mutants. This hypothesis is also consistent with the lower k_{cl} value observed for cTAR in respect with the mutants. Indeed, k_{cl} being related to the probability of end-to-end collision for the DNA strand, this suggests that as in the case of long loops⁴⁴, the G⁵² bulge may delay by increasing the number of non productive collisions the finding of the adequate configuration required for nucleating the closing process. Interestingly, the NC-induced k_{cl} increase was not observed with a different couple of dyes²⁹ characterized by a shorter Förster distance (20Å versus 60Å for the (Fl, TMR) couple) and thus an increased sensitivity to shorter interchromophore distances, suggesting that NC does not activate the closing rate constant of the terminal base pair but that of more inner base pairs. Taken together, our data suggest that FCS mainly monitors the melting kinetics of the terminal double-stranded segment in cTAR (Fig. 5).

In the presence of NCp7, since the increase of k_{op} is much larger than the k_{cl} increase, it results that in the presence of NCp7, the cTAR terminus will stay a longer time in the open conformation. Since cTAR is expected to form a loop-loop kissing complex with TAR^{37,38}(JA), the increase of the frequency of the open state may increase the probability of initiating the nucleation of the extended duplex. However, this increase is not the sole favoring event since the NCp7-induced increase of k_{op} is limited to one order of magnitude while the increase of the hybridization kinetics between cTAR and TAR is about three orders of magnitude⁷. It is likely that the neutralization by NC positive charges of the negative phosphate groups of the oligonucleotides^{13,36} reduces the electrostatic repulsion between the complementary sequences and thus further favors their interaction.

From the comparison of cTAR with its mutants, NC melting ability seems to strongly rely on the two terminal bulges that cooperatively destabilize the lower part of the stem. This conclusion is in line with the inability of NC to block self-priming when the lower part of cTAR stem is stabilized⁸ and the inverse correlation between NC destabilizing activity and oligonucleotide stability^{36,37}. Similarly, the NC-induced conversion of the kissing-loop dimerization initiation site (DIS) dimer toward the extended-duplex dimer is prevented when the stem is stabilized by deleting the four-base bulge of DIS leading to a stem with 13 consecutive base pairs⁶⁰. In contrast, this NC-induced conversion can be easily performed with a truncated DIS possessing 8 bp in its stem, suggesting a stability threshold (in terms of number and nature of consecutive base pairs) that prevents an efficient destabilization by NC. This threshold may explain the poor NC effect on cTAR1,2 terminal segment with 11 consecutive base pairs.

From cTAR1 and cTAR2 data, it further appears that NC destabilizing activity does not only depend on the number but also on the position of the bulges. Indeed, though both sequences are characterized by similar thermodynamic parameters in the absence of NC, a more significant NC-induced melting of the terminal part of the stem was observed for cTAR1 (Table 1). This suggests that the strongly conserved terminal bulge is more important for NC destabilizing effect than the less conserved penultimate bulge. This is probably not related to a preferential binding of NC since the parent TAR RNA sequence does not harbor a specific binding site at this level^{61,62}. In fact, the difference between the two sequences may be attributed to a lower local stability of the terminal bulge that may allow an easier access to NC. This lower stability may be related to the base composition (with flanking A-T base pairs for the terminal bulge versus G-C base pairs for the penultimate one) and the shorter length (and thus, the reduced stability) of the flanking double stranded segments. By analogy to the terminal bulges, the strongly conserved three-nucleotide bulge of the internal loop is also required for NCp7 destabilizing activity. In addition, base compositions of the bulge giving the least stable

secondary structure are favoured, confirming the evolutionary relationship between the stability of cTAR and NCp7 destabilizing activity. The requirement of bulges and loops to confer a limited stability to TAR RNA and cTAR DNA structures is in keeping with inspection of natural HIV-1 variants and analysis of mutant-revertant virus indicating that the thermodynamic stability of the R-region hairpins remains within a narrow range to support efficient reverse transcription^{36,67-69} and virus replication^{70,71}. Consequently, bulges and loops evenly distributed along double stranded sections can be viewed as destabilizing initiation sites for NCp7-mediated chaperoning of the two obligatory cDNA strand transfers (TAR and cTAR) and more generally of the forced and unforced recombination reactions (ref 10, 27, 59-65 de HB 04).

Finally, based on our data, a tentative mechanism may be proposed for the destabilization of the lower part of cTAR stem by NC (Fig. 6). First, due to fraying, the 3 to 5 terminal nucleotides on the 5' end and the 4 to 7 terminal nucleotides of the 3' end of cTAR DNA are transiently present as single-stranded segments (step 1). Due to the preferential affinity of NC for single-stranded versus double-stranded sequences^{41,63,64}, this may constitute initial binding sites for NC (step 2). From these sites, NC may then destabilize the neighboring base pairs, allowing the sliding of the peptide⁶⁵ and cooperative binding of additional peptides⁶⁶ (step 3). Due to the limited stability of cTAR stem, the melting may then easily propagate up to the T⁴⁰ bulge (step 4). At this level, the stability of the upper half of cTAR is probably high enough to prevent the full melting of cTAR. Consequently, closure of the opened sequences probably occurs (steps 5 and 6). Since the single-stranded segments are still partially covered by NC (step 5), the resulting neutralization of DNA phosphate charges by the positively charged NC may decrease the repulsive interactions between the single-stranded segments^{26,39} and explain the NC-induced increase in the k_{cl} rate constant. By symmetry to the mechanism of stem opening, its closure is expected to be strongly cooperative and thus rapidly induce NC release (step 6). One important remaining question is to determine the degree of cTAR melting required to initiate the hybridization with TAR RNA. This question is under current investigation.

* mely@pharma.u-strasbg.fr; phone 33 390244263; fax 33 90244263; umr7034.u-strasbg.fr

Références

-
- Aboul-ela, F., J. Karn et G. Varani.** 1996. Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res* **24**:3974-81.
- Aldovini, A. et 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.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy et E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.
- Allain, B., M. Lapadat-Tapolsky, C. Berlioz et J. L. Darlix.** 1994. Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome. *Embo J* **13**:973-81.
- Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu et M. F. Summers.** 2000a. 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.
- Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner et M. F. Summers.** 2000b. NMR structure of stem-loop SL2 of the HIV-1 psi RNA packaging signal reveals a novel A-U-A base-triple platform. *J Mol Biol* **299**:145-56.
- Amarasinghe, G. K., J. Zhou, M. Miskimon, K. J. Chancellor, J. A. McDonald, A. G. Matthews, R. R. Miller, M. D. Rouse et M. F. Summers.** 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**:961-70.
- Andersen, E. S., S. A. Contera, B. Knudsen, C. K. Damgaard, F. Besenbacher et J. Kjems.** 2004. Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J Biol Chem* **279**:22243-9.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., E. N. Chertova, J. L. Rossio, M. T. Esser, R. E. Benveniste, L. E. Henderson et J. D. Lifson.** 1998. Chemical inactivation of retroviral infectivity by targeting nucleocapsid protein zinc fingers: a candidate SIV vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 3**:S311-9.
- Azoulay, J., J. P. Clamme, J. L. Darlix, B. P. Roques et Y. Mely.** 2003. Destabilization of the HIV-1 Complementary Sequence of TAR by the Nucleocapsid Protein Through Activation of Conformational Fluctuations. *J Mol Biol* **326**:691-700.
- Baba, M.** 2004. Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription. *Curr Top Med Chem* **4**:871-82.
- Bacharach, E. et S. P. Goff.** 1998. Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein to the viral RNA encapsidation signal in the yeast three-hybrid system. *J Virol* **72**:6944-9.
- Badea, M. G. et L. Brand.** 1971. Time-resolved fluorescence measurements, p. 378-425, *Methods in enzymology*, vol. 61, London.
- Bajzer, Z. et F. G. Prendergast.** 1993. A model for multiexponential tryptophan fluorescence intensity decay in proteins. *Biophys. J.* **65**:2313-2323.
- Bani, L., D. David, M. Fevrier, G. Pialoux, B. Dupont, K. Sugamura et J. Theze.** 1997. Interleukin-2 receptor beta and gamma chain dysregulation during the inhibition of CD4 T cell activation by human immunodeficiency virus-1 gp120. *Eur J Immunol* **27**:2188-94.
- Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. T. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. F. LeGrice et J. L. Darlix.** 1989. HIV-1 reverse transcriptase
-

- specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *Embo J* **8**:3279-85.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum et L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
- Baudin, F., R. Marquet, C. Isel, J. L. Darlix, B. Ehresmann et C. Ehresmann.** 1993. Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol* **229**:382-97.
- Beerens, N. et B. Berkhout.** 2002. The tRNA primer activation signal in the human immunodeficiency virus type 1 genome is important for initiation and processive elongation of reverse transcription. *J Virol* **76**:2329-39.
- Beltz, H., J. Azoulay, S. Bernacchi, J. P. Clamme, D. Ficheux, B. Roques, J. L. Darlix et Y. Mely.** 2003. Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 cTAR DNA on its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *J Mol Biol* **328**:95-108.
- Beltz, H., E. Piemont, E. Schaub, D. Ficheux, B. Roques, J. L. Darlix et Y. Mely.** 2004. Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol* **338**:711-23.
- Bender, W. et N. Davidson.** 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* **7**:595-607.
- Berg, J. M.** 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**:485-7.
- Berkhout, B., N. L. Vastenhouw, B. I. Klasens et H. Huthoff.** 2001. Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription. *RNA* **7**:1097-114.
- Berkowitz, R. D. et S. P. Goff.** 1994. Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein. *Virology* **202**:233-46.
- Bernacchi, S. et Y. Mely.** 2001. Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res* **29**:E62.
- Bernacchi, S., S. Stoylov, E. Piemont, D. Ficheux, B. P. Roques, J. L. Darlix et Y. Mely.** 2002. HIV-1 Nucleocapsid Protein Activates Transient Melting of Least Stable Parts of the Secondary Structure of TAR and its Complementary Sequence. *J Mol Biol* **317**:385-99.
- Berthoux, L., C. Pechoux, M. Ottmann, G. Morel et J. L. Darlix.** 1997. Mutations in the N-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein affect virion core structure and proviral DNA synthesis. *J Virol* **71**:6973-81.
- Bieniasz, P. D., T. A. Grdina, H. P. Bogerd et B. R. Cullen.** 1998. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *Embo J* **17**:7056-65.
- Bischerour, J., P. Tauc, H. Leh, H. de Rocquigny, B. Roques et J. F. Mouscadet.** 2003. The (52-96) C-terminal domain of Vpr stimulates HIV-1 IN-mediated homologous strand transfer of mini-viral DNA. *Nucleic Acids Res* **31**:2694-702.
- Bischoff, F. R. et D. Gorlich.** 1997. RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett* **419**:249-54.
- Bloomfield, V. A., D. M. Crothers et I. Tinoco, Jr.** 2000. Nucleic acids structures, properties, and functions. University science books.

-
- Bonnet, G., O. Krichevsky et A. Libchaber.** 1998. Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:8602-8606.
- Bour, S., C. Perrin et K. Strebel.** 1999. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem* **274**:33800-6.
- Bour, S., U. Schubert et K. Strebel.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol* **69**:1510-20.
- Braaten, D., E. K. Franke et J. Luban.** 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**:3551-60.
- Bres, V., H. Tagami, J. M. Peloponese, E. Loret, K. T. Jeang, Y. Nakatani, S. Emiliani, M. Benkirane et R. E. Kiernan.** 2002. Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *Embo J* **21**:6811-9.
- Brule, F., G. Bec, G. Keith, S. F. Le Grice, B. P. Roques, B. Ehresmann, C. Ehresmann et R. Marquet.** 2000. In vitro evidence for the interaction of tRNA(3)(Lys) with U3 during the first strand transfer of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res* **28**:634-40.
- Buckman, J. S., W. J. Bosche et 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.
- Bukrinskaya, A. G., A. Ghorpade, N. K. Heinzinger, T. E. Smithgall, R. E. Lewis et M. Stevenson.** 1996. Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:367-71.
- Bukrinsky, M. I. et O. K. Haffar.** 1999. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci* **4**:D772-81.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley et M. Stevenson.** 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6125-9.
- Bushman, F. D.** 2002. Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol* **261**:165-77.
- Cai, M., R. Zheng, M. Caffrey, R. Craigie, G. M. Clore et A. M. Gronenborn.** 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* **4**:567-77.
- Callis, P. R.** 1997. 1La and 1Lb transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins. *Methods Enzymol* **278**:113-50.
- Campbell, S. et V. M. Vogt.** 1995. Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:6487-97.
- Carriere, C., B. Gay, N. Chazal, N. Morin et P. Boulanger.** 1995. Sequence requirements for encapsidation of deletion mutants and chimeras of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor into retrovirus-like particles. *J Virol* **69**:2366-77.
- Carteau, S., R. J. Gorelick et F. D. Bushman.** 1999. Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *J Virol* **73**:6670-9.
- Cen, S., A. Khorchid, H. Javanbakht, J. Gabor, T. Stello, K. Shiba, K. Musier-Forsyth et L. Kleiman.** 2001. Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:5043-8.
-

-
- Chang, K. Y. et I. Tinoco, Jr.** 1997. The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement. *J Mol Biol* **269**:52-66.
- Charneau, P., M. Alizon et F. Clavel.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**:2814-20.
- Charneau, P., G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc et F. Clavel.** 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* **241**:651-62.
- Chen, B. K., R. T. Gandhi et D. Baltimore.** 1996. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *J Virol* **70**:6044-53.
- Chen, Y. et M. D. Barkley.** 1998. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**:9976-82.
- Chertova, E., B. J. Crise, D. R. Morcock, J. W. Bess, Jr., L. E. Henderson et J. D. Lifson.** 2003. Sites, mechanism of action and lack of reversibility of primate lentivirus inactivation by preferential covalent modification of virion internal proteins. *Curr Mol Med* **3**:265-72.
- Clamme, J. P., J. Azoulay et Y. Mély.** 2003. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **84**:1960-1968.
- Clever, J., C. Sasseti et T. G. Parslow.** 1995. RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:2101-9.
- Clever, J. L., D. A. Eckstein et T. G. Parslow.** 1999. Genetic dissociation of the encapsidation and reverse transcription functions in the 5' R region of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**:101-9.
- Clever, J. L., D. Mirandar, Jr. et T. G. Parslow.** 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **76**:12381-7.
- Clever, J. L. et T. G. Parslow.** 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* **71**:3407-14.
- Clever, J. L., M. L. Wong et T. G. Parslow.** 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**:5902-8.
- Coffin, J.** 1985. Genome structure., p. 17-74. *In* C. S. H. L. Press (ed.), *RNA Tumor Viruses*, New York.
- Coffin, J. M., M. L. Wong et H. E. Varmus.** 1997. *Retrovirus*, New York.
- Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger et D. Baltimore.** 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**:661-71.
- Collins, K. L. et D. Baltimore.** 1999. HIV's evasion of the cellular immune response. *Immunol Rev* **168**:65-74.
- Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker et D. Baltimore.** 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397-401.
- Connor, R. I., D. C. Montefiori, J. M. Binley, J. P. Moore, S. Bonhoeffer, A. Gettie, E. A. Fenamore, K. E. Sheridan, D. D. Ho, P. J. Dailey et P. A. Marx.** 1998. Temporal analyses of virus replication, immune responses, and efficacy in rhesus macaques
-

- immunized with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine. *J Virol* **72**:7501-9.
- Cordingley, M. G., R. L. LaFemina, P. L. Callahan, J. H. Condra, V. V. Sardana, D. J. Graham, T. M. Nguyen, K. LeGrow, L. Gotlib et A. J. Schlabach.** 1990. Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:8985-9.
- Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *Embo J* **15**:5783-8.
- Covey, S. N.** 1986. Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **14**:623-33.
- Craven, R. C. et L. J. Parent.** 1996. Dynamic interactions of the Gag polyprotein. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:65-94.
- Cristofari, G. et J. L. Darlix.** 2002. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**:223-68.
- Dahmus, M. E.** 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* **1261**:171-82.
- Damgaard, C. K., H. Dyhr-Mikkelsen et J. Kjems.** 1998. Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 gag and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res* **26**:3667-76.
- Darlix, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel et F. Barre-Sinoussi.** 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* **216**:689-99.
- Darlix, J. L., A. Vincent, C. Gabus, H. de Rocquigny et B. Roques.** 1993. Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA. *C R Acad Sci III* **316**:763-71.
- Davis, W. R., S. Gabbara, D. Hupe et J. A. Peliska.** 1998. Actinomycin D inhibition of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase and nucleocapsid protein. *Biochemistry* **37**:14213-21.
- Dayam, R. et N. Neamati.** 2003. Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update. *Curr Pharm Des* **9**:1789-802.
- Dayton, A. I. et M. J. Zhang.** 2000. Therapies directed against the Rev axis of HIV autoregulation. *Adv Pharmacol* **49**:199-228.
- De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer et M. F. Summers.** 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**:384-8.
- De Rocquigny, H., D. Ficheux, C. Gabus, M. C. Fournie-Zaluski, J. L. Darlix et B. P. Roques.** 1991. First large scale chemical synthesis of the 72 amino acid HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 in an active form. *Biochem Biophys Res Commun* **180**:1010-1018.
- De Rocquigny, H., C. Gabus, A. Vincent, M. C. Fournie-Zaluski, B. Roques et J. L. Darlix.** 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6472-6.
- Demene, H., C. Z. Dong, M. Ottmann, M. C. Rouyez, N. Jullian, N. Morellet, Y. Mely, J. L. Darlix, M. C. Fournie-Zaluski et S. Saragosti.** 1994. ¹H NMR structure and biological studies of the His23-->Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate

- that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. *Biochemistry* **33**:11707-16.
- Demirov, D. G., J. M. Orenstein et E. O. Freed.** 2002. The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J Virol* **76**:105-17.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman et N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-6.
- Deng, L., C. de la Fuente, P. Fu, L. Wang, R. Donnelly, J. D. Wade, P. Lambert, H. Li, C. G. Lee et F. Kashanchi.** 2000. Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* **277**:278-95.
- DeStefano, J. J., R. A. Bambara et P. J. Fay.** 1994. The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J Biol Chem* **269**:161-8.
- Dib-Hajj, F., R. Khan et D. P. Giedroc.** 1993. Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity. *Protein Sci* **2**:231-43.
- Dingwall, C., I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh et M. A. Skinner.** 1990. HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *Embo J* **9**:4145-53.
- Dingwall, C., I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner et R. Valerio.** 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6925-9.
- Domagala, J. M., J. P. Bader, R. D. Gogliotti, J. P. Sanchez, M. A. Stier, Y. Song, J. V. Prasad, P. J. Tummino, J. Scholten, P. Harvey, T. Holler, S. Gracheck, D. Hupe, W. G. Rice et R. Schultz.** 1997. A new class of anti-HIV-1 agents targeted toward the nucleocapsid protein NCp7: the 2,2'-dithiobisbenzamides. *Bioorg Med Chem* **5**:569-79.
- Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman et R. W. Doms.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:1149-58.
- Dorfman, T., J. Luban, S. P. Goff, W. A. Haseltine et 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.
- Dorr, A., V. Kiermer, A. Pedal, H. R. Rackwitz, P. Henklein, U. Schubert, M. M. Zhou, E. Verdin et M. Ott.** 2002. Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J* **21**:2715-23.
- Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore et W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**:667-73.
- Driscoll, M. D., M. P. Golinelli et S. H. Hughes.** 2001. In vitro analysis of human immunodeficiency virus type 1 minus-strand strong-stop DNA synthesis and genomic RNA processing. *J Virol* **75**:672-86.

-
- Driscoll, M. D. et S. H. Hughes.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein can prevent self-priming of minus-strand strong stop DNA by promoting the annealing of short oligonucleotides to hairpin sequences. *J Virol* **74**:8785-92.
- Druillennec, S., C. Z. Dong, S. Escaich, N. Gresh, A. Bousseau, B. P. Roques et M. C. Fournie-Zaluski.** 1999. A mimic of HIV-1 nucleocapsid protein impairs reverse transcription and displays antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4886-91.
- Dunlap, C. A. et M. D. Tsai.** 2002. Use of 2-aminopurine and tryptophan fluorescence as probes in kinetic analyses of DNA polymerase beta. *Biochemistry* **41**:11226-35.
- Dyda, F., A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie et D. R. Davies.** 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* **266**:1981-6.
- Eftink, M. R.** 1991. Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods Biochem Anal* **35**:127-205.
- Egele, C., E. Schaub, N. Ramalanjaona, E. Piemont, D. Ficheux, B. Roques, J. L. Darlix et Y. Mely.** 2004. HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds to the Viral DNA Initiation Sequences and Chaperones their Kissing Interactions. *J Mol Biol* **342**:453-66.
- Eijkelenboom, A. P., R. Sprangers, K. Hard, R. A. Puras Lutzke, R. H. Plasterk, R. Boelens et R. Kaptein.** 1999. Refined solution structure of the C-terminal DNA-binding domain of human immunovirus-1 integrase. *Proteins* **36**:556-64.
- Eisenfeld, J. et C. C. Ford.** 1979. A systems-theory approach to the analysis of multiexponential fluorescence decay. *Biophys J* **26**:73-83.
- Ellerman, V. et O. Bang.** 1908. Experimentelle Leukämie bei Huhnern. *Zbl. Bakt.* **46**:595-609.
- Emerman, M.** 1996. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr Biol* **6**:1096-103.
- Engelman, A., K. Mizuuchi et R. Craigie.** 1991. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**:1211-21.
- Ennifar, E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann et P. Dumas.** 2001. Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol* **8**:1064-8.
- Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann et P. Dumas.** 1999. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure Fold Des* **7**:1439-49.
- Farnet, C. M. et F. D. Bushman.** 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* **88**:483-92.
- Feng, S. et E. C. Holland.** 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* **334**:165-7.
- Feng, Y. X., T. D. Copeland, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, J. G. Levin et A. Rein.** 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7577-81.
- Fisher, A. G., B. Ensoli, L. Ivanoff, M. Chamberlain, S. Petteway, L. Ratner, R. C. Gallo et F. Wong-Staal.** 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**:888-93.
- Fitzgerald, D. W. et J. E. Coleman.** 1991. Physicochemical properties of cloned nucleocapsid protein from HIV. Interactions with metal ions. *Biochemistry* **30**:5195-201.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida et I. W. Mattaj.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**:1051-60.
- Forster, T.** 1949. *Compara. Z. Naturforsch. A.* **4**:321-327.
-

-
- Fouchier, R. A., B. E. Meyer, J. H. Simon, U. Fischer, A. V. Albright, F. Gonzalez-Scarano et M. H. Malim.** 1998. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* **72**:6004-13.
- Franke, E. K., H. E. Yuan et J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-62.
- Freed, E. O., D. J. Myers et R. Risser.** 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4650-4.
- Fu, W., R. J. Gorelick et A. Rein.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**:5013-8.
- Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida et E. Nishida.** 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**:308-11.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske et B. Safai.** 1983. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
- Gamble, T. R., F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Worthylake, M. Houseweart, W. I. Sundquist et C. P. Hill.** 1996. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**:1285-94.
- Geigenmuller, U. et M. L. Linial.** 1996. Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-derived proteins to a 5' HIV-1 genomic RNA sequence. *J Virol* **70**:667-71.
- Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli et M. A. Koch.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines et M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-12.
- Goebel, F. D., R. Hemmer, J. C. Schmit, J. R. Bogner, E. de Clercq, M. Witvrouw, C. Pannecouque, R. Valeyev, M. Vandevelde, H. Margery et J. P. Tassignon.** 2001. Phase I/II dose escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamide in patients failing on current antiretroviral therapy. *Aids* **15**:33-45.
- Gold, M. O., X. Yang, C. H. Herrmann et A. P. Rice.** 1998. PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo. *J Virol* **72**:4448-53.
- Golinelli, M. P. et S. H. Hughes.** 2003. Secondary structure in the nucleic acid affects the rate of HIV-1 nucleocapsid-mediated strand annealing. *Biochemistry* **42**:8153-62.
- Gorelick, R. J., R. E. Benveniste, T. D. Gagliardi, T. A. Wiltrout, L. K. Busch, W. J. Bosche, L. V. Coren, J. D. Lifson, P. J. Bradley, L. E. Henderson et L. O. Arthur.** 1999a. Nucleocapsid protein zinc-finger mutants of simian immunodeficiency virus strain mne produce virions that are replication defective in vitro and in vivo. *Virology* **253**:259-70.
- Gorelick, R. J., R. E. Benveniste, J. D. Lifson, J. L. Yovandich, W. R. Morton, L. Kuller, B. M. Flynn, B. A. Fisher, J. L. Rossio, M. Piatak, Jr., J. W. Bess, Jr., L. E. Henderson et L. O. Arthur.** 2000a. Protection of *Macaca nemestrina* from disease following pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) challenge: utilization of SIV nucleocapsid mutant DNA vaccines with and without an SIV protein boost. *J Virol* **74**:11935-49.
-

-
- Gorelick, R. J., D. J. Chabot, A. Rein, L. E. Henderson et L. O. Arthur.** 1993. The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *J Virol* **67**:4027-36.
- Gorelick, R. J., W. Fu, T. D. Gagliardi, W. J. Bosche, A. Rein, L. E. Henderson et L. O. Arthur.** 1999b. Characterization of the block in replication of nucleocapsid protein zinc finger mutants from moloney murine leukemia virus. *J Virol* **73**:8185-95.
- Gorelick, R. J., J. D. Lifson, J. L. Yovandich, J. L. Rossio, M. Piatak, Jr., A. J. Scarzello, W. B. Knott, J. W. Bess, Jr., B. A. Fisher, B. M. Flynn, L. E. Henderson, L. O. Arthur et R. E. Benveniste.** 2000b. Mucosal challenge of *Macaca nemestrina* with simian immunodeficiency virus (SIV) following SIV nucleocapsid mutant DNA vaccination. *J Med Primatol* **29**:209-19.
- Gorelick, R. J., S. M. Nigida, Jr., J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur, L. E. Henderson et A. Rein.** 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol* **64**:3207-11.
- Gougeon, M. L., C. Rouzioux, I. Liberman, M. Burgard, Y. Taoufik, J. P. Viard, K. Bouchenafa, C. Capitant, J. F. Delfraissy et Y. Levy.** 2001. Immunological and virological effects of long term IL-2 therapy in HIV-1-infected patients. *Aids* **15**:1729-31.
- Gratton, E. et M. Limkeman.** 1983. A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophys J* **44**:315-24.
- Green, L. M. et J. M. Berg.** 1989. A retroviral Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys peptide binds metal ions: spectroscopic studies and a proposed three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4047-51.
- Greene, W. C. et 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.
- Grinvald, A. et I. Z. Steinberg.** 1974. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal Biochem* **59**:583-98.
- Gross, L.** 1957. Development and serial cell-free passage of a highly strain of mouse leukemia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**:767.
- Guest, C. R., R. A. Hochstrasser, L. C. Sowers et D. P. Millar.** 1991. Dynamics of mismatched base pairs in DNA. *Biochemistry* **30**:3271-9.
- Guo, J., L. E. Henderson, J. Bess, B. Kane et J. G. Levin.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA. *J Virol* **71**:5178-88.
- Guo, J., T. Wu, J. Anderson, B. F. Kane, D. G. Johnson, R. J. Gorelick, L. E. Henderson et J. G. Levin.** 2000. Zinc finger structures in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein facilitate efficient minus- and plus-strand transfer. *J Virol* **74**:8980-8.
- Guo, J., T. Wu, J. Bess, L. E. Henderson et J. G. Levin.** 1998. Actinomycin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 minus-strand transfer in *in vitro* and endogenous reverse transcriptase assays. *J Virol* **72**:6716-24.
- Guo, J., T. Wu, B. F. Kane, D. G. Johnson, L. E. Henderson, R. J. Gorelick et J. G. Levin.** 2002. Subtle alterations of the native zinc finger structures have dramatic effects on the nucleic acid chaperone activity of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **76**:4370-8.
- Haddrick, M., A. L. Lear, A. J. Cann et S. Heaphy.** 1996. Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *J Mol Biol* **259**:58-68.
-

-
- Hargittai, M. R., R. J. Gorelick, I. Rouzina et K. Musier-Forsyth.** 2004. Mechanistic insights into the kinetics of HIV-1 nucleocapsid protein-facilitated tRNA annealing to the primer binding site. *J Mol Biol* **337**:951-68.
- Hargittai, M. R., A. T. Mangla, R. J. Gorelick et K. Musier-Forsyth.** 2001. HIV-1 nucleocapsid protein zinc finger structures induce tRNA(Lys,3) structural changes but are not critical for primer/template annealing. *J Mol Biol* **312**:985-97.
- Harrich, D., C. Ulich et R. B. Gaynor.** 1996. A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* **70**:4017-27.
- Haseltine, W. A.** 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J* **5**:2349-60.
- Heath, M. J., S. S. Derebail, R. J. Gorelick et J. J. DeStefano.** 2003. Differing roles of the N- and C-terminal zinc fingers in human immunodeficiency virus nucleocapsid protein-enhanced nucleic acid annealing. *J Biol Chem* **278**:30755-63.
- Helga-Maria, C., M. L. Hammarskjold et D. Rekosh.** 1999. An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* **73**:4127-35.
- Herschlag, D.** 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem* **270**:20871-4.
- Herschlag, D., M. Khosla, Z. Tsuchihashi et R. L. Karpel.** 1994. An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. *Embo J* **13**:2913-24.
- Hess, S. T., S. Huang, A. A. Heikal et W. W. Webb.** 2002. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry* **41**:697-705.
- Hindmarsh, P., T. Ridky, R. Reeves, M. Andrade, A. M. Skalka et J. Leis.** 1999. HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol* **73**:2994-3003.
- Hoglund, S., A. Ohagen, J. Goncalves, A. T. Panganiban et D. Gabuzda.** 1997. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* **233**:271-9.
- Hong, M. K., E. J. Harbron, D. B. O'Connor, J. Guo, P. F. Barbara, J. G. Levin et K. Musier-Forsyth.** 2003. Nucleic acid conformational changes essential for HIV-1 nucleocapsid protein-mediated inhibition of self-priming in minus-strand transfer. *J Mol Biol* **325**:1-10.
- Hrimech, M., X. J. Yao, F. Bachand, N. Rougeau et E. A. Cohen.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* **73**:4101-9.
- Hu, W. S. et H. M. Temin.** 1990a. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1556-60.
- Hu, W. S. et H. M. Temin.** 1990b. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-33.
- Huang, M. et M. A. Martin.** 1997a. Incorporation of Pr160(gag-pol) into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein. *J Virol* **71**:4472-8.
- Huang, Y., J. Wang, A. Shalom, Z. Li, A. Khorchid, M. A. Wainberg et L. Kleiman.** 1997b. Primer tRNA³Lys on the viral genome exists in unextended and two-base extended forms within mature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**:726-8.
-

-
- Huthoff, H. et B. Berkhout.** 2002. Multiple secondary structure rearrangements during HIV-1 RNA dimerization. *Biochemistry* **41**:10439-45.
- Huthoff, H., K. Bugala, J. Barciszewski et B. Berkhout.** 2003. On the importance of the primer activation signal for initiation of tRNA(lys3)-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome. *Nucleic Acids Res* **31**:5186-94.
- Isel, C., J. M. Lanchy, S. F. Le Grice, C. Ehresmann, B. Ehresmann et R. Marquet.** 1996. Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA^{3Lys}. *Embo J* **15**:917-24.
- Isel, C., R. Marquet, G. Keith, C. Ehresmann et B. Ehresmann.** 1993. Modified nucleotides of tRNA(3Lys) modulate primer/template loop-loop interaction in the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **268**:25269-72.
- Isel, C., E. Westhof, C. Massire, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann et R. Marquet.** 1999. Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Embo J* **18**:1038-48.
- Izaurralde, E., U. Kutay, C. von Kobbe, I. W. Mattaj et D. Gorlich.** 1997. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**:6535-47.
- Jacks, T. et H. E. Varmus.** 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* **230**:1237-42.
- Janssens, L. D., N. Boens, M. Ameloot et F. C. DeSchryver.** 1990. A systematic study of the global analysis of multiexponential fluorescence decay surfaces using reference convolution. *J. Phys. Chem.* **94**:3564-3576.
- Jaynes, E. T.** 1983. Collected works, papers on probability, statistics and statistical physics. D. Reidel, Dordrecht, The Netherlands.
- Ji, X., G. J. Klarmann et B. D. Preston.** 1996. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity in vitro. *Biochemistry* **35**:132-43.
- Johnson, P. E., R. B. Turner, Z. R. Wu, L. Hairston, J. Guo, J. G. Levin et M. F. Summers.** 2000. A mechanism for plus-strand transfer enhancement by the HIV-1 nucleocapsid protein during reverse transcription. *Biochemistry* **39**:9084-91.
- Jowett, J. B., D. J. Hockley, M. V. Nermut et I. M. Jones.** 1992. Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J Gen Virol* **73 (Pt 12)**:3079-86.
- Kalpana, G. V., S. Marmon, W. Wang, G. R. Crabtree et S. P. Goff.** 1994. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* **266**:2002-6.
- Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-White et K. Strebel.** 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**:11398-407.
- Karn, J.** 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**:235-54.
- Karpel, R. L., L. E. Henderson et S. Oroszlan.** 1987. Interactions of retroviral structural proteins with single-stranded nucleic acids. *J Biol Chem* **262**:4961-7.
- Kasha, M.** 1991. Energy transfer, charge transfer and proton transfer in molecular composite systems. *Basic Life Sci.* **58**:231-251.
- Katlama, C.** 2003. [Promising results with the anti-HIV vaccine]. *Presse Med* **32**:964.
-

-
- Kaye, J. F. et A. M. Lever.** 1998. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol* **72**:5877-85.
- Ke, S. H. et R. M. Wartell.** 1995. Influence of neighboring base pairs on the stability of single base bulges and base pairs in a DNA fragment. *Biochemistry* **34**:4593-600.
- Kerwood, D. J., M. J. Cavaluzzi et P. N. Borer.** 2001. Structure of SL4 RNA from the HIV-1 packaging signal. *Biochemistry* **40**:14518-29.
- Khorchid, A., H. Javanbakht, S. Wise, R. Halwani, M. A. Parniak, M. A. Wainberg et L. Kleiman.** 2000. Sequences within Pr160gag-pol affecting the selective packaging of primer tRNA(Lys3) into HIV-1. *J Mol Biol* **299**:17-26.
- Kichler, A., J. C. Pages, C. Leborgne, S. Druillennec, C. Lenoir, D. Coulaud, E. Delain, E. Le Cam, B. P. Roques et O. Danos.** 2000. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* **74**:5424-31.
- Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane et C. Van Lint.** 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *Embo J* **18**:6106-18.
- Kim, H. J., K. Lee et J. J. O'Rear.** 1994. A short sequence upstream of the 5' major splice site is important for encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Virology* **198**:336-40.
- Kim, J. K., C. Palaniappan, W. Wu, P. J. Fay et R. A. Bambara.** 1997. Evidence for a unique mechanism of strand transfer from the transactivation response region of HIV-1. *J Biol Chem* **272**:16769-77.
- Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin et J. M. Orenstein.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-9.
- Kohl, N. E., E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick et I. S. Sigal.** 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4686-90.
- Kovacic, R. T. et K. E. van Holde.** 1977. Sedimentation of homogeneous double-strand DNA molecules. *Biochemistry* **16**:1490-8.
- Krausslich, H. G., M. Facke, A. M. Heuser, J. Konvalinka et H. Zentgraf.** 1995. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J Virol* **69**:3407-19.
- Krishnamoorthy, G., G. Duportail et Y. Mely.** 2002. Structure and dynamics of condensed DNA probed by 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-diazaundecamethylene)bis[4-[[3-methylbenz-1,3-oxazol-2-yl]methylidene]-1,4-dihydroquinolinium] tetraiodide fluorescence. *Biochemistry* **41**:15277-87.
- Krishnamoorthy, G., B. Roques, J. L. Darlix et Y. Mely.** 2003. DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acids Res* **31**:5425-32.
- Kung, H. J., J. M. Bailey, N. Davidson, M. O. Nicholson et R. M. McAllister.** 1975. Structure subunit composition, and molecular weight of RD-114 RNA. *J Virol* **16**:397-411.
- Lackowicz, J. R.** 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed, New York.
- Lakowicz, J. R. et B. P. Maliwal.** 1985. Construction and performance of a variable-frequency phase-modulation fluorometer. *Biophys Chem* **21**:61-78.
- Lama, J., A. Mangasarian et D. Trono.** 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* **9**:622-31.
-

-
- Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka et S. R. Petteway, Jr.** 1996. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2186-91.
- Lami, H. et E. Piémont.** 1992. Fluorescence decay analysis by iterative reconvolution based on the estimated covariance matrix. *Chem. Phys.* **163**:149-159.
- Lapadat-Tapolsky, M., H. De Rocquigny, D. Van Gent, B. Roques, R. Plasterk et J. L. Darlix.** 1993. Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res* **21**:831-9.
- Lapadat-Tapolsky, M., C. Pernelle, C. Borie et J. L. Darlix.** 1995. Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic Acids Res* **23**:2434-41.
- Laughrea, M. et L. Jette.** 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* **33**:13464-74.
- Laughrea, M. et L. Jette.** 1996. Kissing-loop model of HIV-1 genome dimerization: HIV-1 RNAs can assume alternative dimeric forms, and all sequences upstream or downstream of hairpin 248-271 are dispensable for dimer formation. *Biochemistry* **35**:1589-98.
- Lawrence, D. C., C. C. Stover, J. Noznitsky, Z. Wu et M. F. Summers.** 2003. Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol* **326**:529-42.
- LeBlanc, D. A. et K. M. Morden.** 1991. Thermodynamic characterization of deoxyribooligonucleotide duplexes containing bulges. *Biochemistry* **30**:4042-7.
- Lee, B. M., R. N. De Guzman, B. G. Turner, N. Tjandra et M. F. Summers.** 1998. Dynamical behavior of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **279**:633-49.
- Lee, N., R. J. Gorelick et K. Musier-Forsyth.** 2003. Zinc finger-dependent HIV-1 nucleocapsid protein-TAR RNA interactions. *Nucleic Acids Res* **31**:4847-55.
- Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine et J. Sodroski.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**:4085-7.
- Levy, Y., C. Durier, R. Krzysiek, C. Rabian, C. Capitant, A. S. Lascaux, C. Michon, E. Oksenhendler, L. Weiss, J. A. Gastaut, C. Goujard, C. Rouzioux, J. Maral, J. F. Delfraissy, D. Emilie et J. P. Aboulker.** 2003. Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *Aids* **17**:343-51.
- Li, J. J., X. Fang, S. M. Schuster et W. Tan.** 2000a. Molecular Beacons: A Novel Approach to Detect Protein - DNA Interactions This work was partially supported by a U.S. NSF Career Award (CHE-9733650) and by a U.S. Office of Naval Research Young Investigator Award (N00014-98-1-0621). *Angew Chem Int Ed Engl* **39**:1049-1052.
- Li, J. J., R. Geyer et W. Tan.** 2000b. Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **28**:E52.
- Li, Q. G., J. X. Liang, G. Y. Luan, Y. Zhang et K. Wang.** 2000c. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for diagnosis of infectious diseases. *Analytical Sciences* **16**:245-248.
- Liszewicz, J., G. Zeng, C. Gratas, J. N. Weinstein et F. Lori.** 2000. Combination gene therapy: synergistic inhibition of human immunodeficiency virus Tat and Rev functions by a single RNA molecule. *Hum Gene Ther* **11**:807-15.
- Livesey, A. K. et J. C. Brochon.** 1987. Analyzing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method. *Biophys J* **52**:693-706.
-

-
- Lodi, P. J., J. A. Ernst, J. Kuszewski, A. B. Hickman, A. Engelman, R. Craigie, G. M. Clore et A. M. Gronenborn.** 1995. Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry* **34**:9826-33.
- Longfellow, C. E., R. Kierzek et D. H. Turner.** 1990. Thermodynamic and spectroscopic study of bulge loops in oligoribonucleotides. *Biochemistry* **29**:278-85.
- Louie, A. Y. et T. J. Meade.** 1998. A cobalt complex that selectively disrupts the structure and function of zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6663-8.
- Luban, J.** 1996. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**:1157-9.
- Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana et S. P. Goff.** 1993a. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-78.
- Luban, J. et S. P. Goff.** 1991. Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J Virol* **65**:3203-12.
- Luban, J., C. Lee et S. P. Goff.** 1993b. Effect of linker insertion mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene on activation of viral protease expressed in bacteria. *J Virol* **67**:3630-3634.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss et R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-48.
- Mak, J. et L. Kleiman.** 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* **71**:8087-95.
- Malim, M. H. et B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **13**:6180-9.
- Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel et B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
- Margottin, F., S. Benichou, H. Durand, V. Richard, L. X. Liu, E. Gomas et R. Benarous.** 1996. Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation. *Virology* **223**:381-6.
- Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel et R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**:565-74.
- Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon et N. R. Landau.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
- Maurer, B., H. Bannert, G. Daral et R. Flugel.** 1988. Analysis of the primary structure of the LTR and the Gag and Pol genes of the human spumaretrovirus. *J Virol* **62**:1590-1597.
- Mayasundari, A., W. G. Rice, J. B. Diminnie et D. C. Baker.** 2003. Synthesis, resolution, and determination of the absolute configuration of the enantiomers of cis-4,5-dihydroxy-1,2-dithiane 1,1-dioxide, an HIV-1NCp7 inhibitor. *Bioorg Med Chem* **11**:3215-9.
- Maynard, A. T., M. Huang, W. G. Rice et D. G. Covell.** 1998. Reactivity of the HIV-1 nucleocapsid protein p7 zinc finger domains from the perspective of density-functional theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11578-83.
-

-
- McBride, M. S., M. D. Schwartz et A. T. Panganiban.** 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. *J Virol* **71**:4544-54.
- McDonnell, N. B., R. N. De Guzman, W. G. Rice, J. A. Turpin et M. F. Summers.** 1997. Zinc ejection as a new rationale for the use of cystamine and related disulfide-containing antiviral agents in the treatment of AIDS. *J Med Chem* **40**:1969-76.
- Mely, Y., H. De Rocquigny, N. Morellet, B. P. Roques et D. Gerard.** 1996. Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **35**:5175-82.
- Mely, Y., H. de Rocquigny, M. Sorinas-Jimeno, G. Keith, B. P. Roques, R. Marquet et D. Gerard.** 1995. Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific. *J Biol Chem* **270**:1650-6.
- Mely, Y., N. Jullian, N. Morellet, H. De Rocquigny, C. Z. Dong, E. Piemont, B. P. Roques et D. Gerard.** 1994. Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **33**:12085-91.
- Mihailescu, M. R. et J. P. Marino.** 2004. A proton-coupled dynamic conformational switch in the HIV-1 dimerization initiation site kissing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1189-94.
- Miller, M. D., C. M. Farnet et F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**:5382-90.
- Morellet, N., H. de Rocquigny, Y. Mely, N. Jullian, H. Demene, M. Ottmann, D. Gerard, J. L. Darlix, M. C. Fournie-Zaluski et B. P. Roques.** 1994. Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by ¹H NMR. *J Mol Biol* **235**:287-301.
- Morellet, N., H. Demene, V. Teilleux, T. Huynh-Dinh, H. de Rocquigny, M. C. Fournie-Zaluski et B. P. Roques.** 1998. Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J Mol Biol* **283**:419-34.
- Morellet, N., N. Jullian, H. De Rocquigny, B. Maigret, J. L. Darlix et B. P. Roques.** 1992. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by ¹H NMR. *Embo J* **11**:3059-65.
- Moumen, A., L. Polomack, B. Roques, H. Buc et M. Negroni.** 2001. The HIV-1 repeated sequence R as a robust hot-spot for copy-choice recombination. *Nucleic Acids Res* **29**:3814-21.
- Muriaux, D., H. De Rocquigny, B. P. Roques et J. Paoletti.** 1996a. NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J Biol Chem* **271**:33686-92.
- Muriaux, D., P. Fosse et J. Paoletti.** 1996b. A kissing complex together with a stable dimer is involved in the HIV-1Lai RNA dimerization process in vitro. *Biochemistry* **35**:5075-82.
- Muriaux, D., P. M. Girard, B. Bonnet-Mathoniere et J. Paoletti.** 1995. Dimerization of HIV-1Lai RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *J Biol Chem* **270**:8209-16.
- Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin et A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-51.
-

-
- Muriaux, D., J. Mirro, K. Nagashima, D. Harvin et A. Rein.** 2002. Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *J Virol* **76**:11405-13.
- Negroni, M. et H. Buc.** 2000. Copy-choice recombination by reverse transcriptases: reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6385-90.
- Nguyen, D. H. et J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-72.
- Nordlund, T. M., S. Andersson, L. Nilsson, R. Rigler, A. Graslund et L. W. McLaughlin.** 1989. Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI recognition sequence: fluorescence, molecular dynamics, and NMR studies. *Biochemistry* **28**:9095-103.
- O'Brien, W. A., M. Sumner-Smith, S. H. Mao, S. Sadeghi, J. Q. Zhao et I. S. Chen.** 1996. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of an oligocationic compound mediated via gp120 V3 interactions. *J Virol* **70**:2825-31.
- O'Connor, D. V. et D. Phillips.** 1984. Time correlated single photon counting. Academic Press, London.
- Omichinski, J. G., G. M. Clore, K. Sakaguchi, E. Appella et A. M. Gronenborn.** 1991. Structural characterization of a 39-residue synthetic peptide containing the two zinc binding domains from the HIV-1 p7 nucleocapsid protein by CD and NMR spectroscopy. *FEBS Lett* **292**:25-30.
- Paillart, J. C., L. Berthou, M. Ottmann, J. L. Darlix, R. Marquet, B. Ehresmann et C. Ehresmann.** 1996a. A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J Virol* **70**:8348-54.
- Paillart, J. C., R. Marquet, E. Skripkin, B. Ehresmann et C. Ehresmann.** 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Biol Chem* **269**:27486-93.
- Paillart, J. C., R. Marquet, E. Skripkin, C. Ehresmann et B. Ehresmann.** 1996b. Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie* **78**:639-53.
- Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet et J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-72.
- Pappalardo, L., D. J. Kerwood, I. Pelczar et P. N. Borer.** 1998. Three-dimensional folding of an RNA hairpin required for packaging HIV-1. *J Mol Biol* **282**:801-18.
- Paul, M., S. Mazumder, N. Raja et M. A. Jabbar.** 1998. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu transmembrane domain that promotes the enhanced release of virus-like particles from the plasma membrane of mammalian cells. *J Virol* **72**:1270-9.
- Paxton, W., R. I. Connor et N. R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* **67**:7229-37.
- Peliska, J. A. et S. J. Benkovic.** 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **258**:1112-8.
- Peterlin, B. M., P. A. Luciw, P. J. Barr et M. D. Walker.** 1986. Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9734-8.
-

-
- Peterlin, B. M. et D. Trono.** 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**:97-107.
- Pigault, C. et D. Gerard.** 1984. Influence of the location of tryptophanyl residues in proteins on their photosensitivity. *Photochem Photobiol* **40**:291-7.
- Poisez, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna et R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:7415-7419.
- Poljak, L., S. M. Batson, D. Ficheux, B. P. Roques, J. L. Darlix et E. Kas.** 2003. Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *J Mol Biol* **329**:411-21.
- Pomerantz, R. J. et D. L. Horn.** 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* **9**:867-73.
- Poon, B., K. Grovit-Ferbas, S. A. Stewart et I. S. Chen.** 1998. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science* **281**:266-9.
- Poon, D. T., J. Wu et A. Aldovini.** 1996. Charged amino acid residues of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p7 protein involved in RNA packaging and infectivity. *J Virol* **70**:6607-16.
- Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel et M. Bukrinsky.** 1998a. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* **273**:13347-52.
- Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel et M. Bukrinsky.** 1998b. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* **17**:909-17.
- Portman, D. S. et G. Dreyfuss.** 1994. RNA annealing activities in HeLa nuclei. *Embo J* **13**:213-21.
- Prats, A. C., L. Sarih, C. Gabus, S. Litvak, G. Keith et J. L. Darlix.** 1988. Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. *Embo J* **7**:1777-83.
- Puglisi, J. D., R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel et J. R. Williamson.** 1992. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* **257**:76-80.
- Pullen, K. A. et J. J. Champoux.** 1990. Plus-strand origin for human immunodeficiency virus type 1: implications for integration. *J Virol* **64**:6274-7.
- Purohit, V., N. D. Grindley et C. M. Joyce.** 2003. Use of 2-aminopurine fluorescence to examine conformational changes during nucleotide incorporation by DNA polymerase I (Klenow fragment). *Biochemistry* **42**:10200-11.
- Raiborg, C., T. E. Rusten et H. Stenmark.** 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**:446-55.
- Ramboarina, S., N. Srividya, R. A. Atkinson, N. Morellet, B. P. Roques, J. F. Lefevre, Y. Mely et B. Kieffer.** 2002. Effects of temperature on the dynamic behaviour of the HIV-1 nucleocapsid NCp7 and its DNA complex. *J Mol Biol* **316**:611-27.
- Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, J. A. Rafalski, E. A. Whitehorn et K. Baumeister.** 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**:277-84.
- Rein, A., L. E. Henderson et J. G. Levin.** 1998. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**:297-301.
-

-
- Resnick, R., C. A. Omer et A. J. Faras.** 1984. Involvement of retrovirus reverse transcriptase-associated RNase H in the initiation of strong-stop (+) DNA synthesis and the generation of the long terminal repeat. *J Virol* **51**:813-21.
- Rice, W. G., D. C. Baker, C. A. Schaeffer, L. Graham, M. Bu, S. Terpening, D. Clanton, R. Schultz, J. P. Bader, R. W. Buckheit, Jr., L. Field, P. K. Singh et J. A. Turpin.** 1997a. Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral nucleocapsid proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:419-26.
- Rice, W. G., C. A. Schaeffer, B. Harten, F. Villinger, T. L. South, M. F. Summers, L. E. Henderson, J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur et J. S. McDougal.** 1993. Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds. *Nature* **361**:473-5.
- Rice, W. G., J. G. Supko, L. Malspeis, R. W. Buckheit, Jr., D. Clanton, M. Bu, L. Graham, C. A. Schaeffer, J. A. Turpin et J. Domagala.** 1995. Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science* **270**:1194-7.
- Rice, W. G., J. A. Turpin, M. Huang, D. Clanton, R. W. Buckheit, Jr., D. G. Covell, A. Wallqvist, N. B. McDonnell, R. N. DeGuzman, M. F. Summers, L. Zalkow, J. P. Bader, R. D. Haugwitz et E. A. Sausville.** 1997b. Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nat Med* **3**:341-5.
- Rice, W. G., J. A. Turpin, C. A. Schaeffer, L. Graham, D. Clanton, R. W. Buckheit, Jr., D. Zaharevitz, M. F. Summers, A. Wallqvist et D. G. Covell.** 1996. Evaluation of selected chemotypes in coupled cellular and molecular target-based screens identifies novel HIV-1 zinc finger inhibitors. *J Med Chem* **39**:3606-16.
- Richter, S., H. Cao et T. M. Rana.** 2002. Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* **41**:6391-7.
- Rist, M. J. et J. P. Marino.** 2002. Mechanism of nucleocapsid protein catalyzed structural isomerization of the dimerization initiation site of HIV-1. *Biochemistry* **41**:14762-70.
- Rodriguez-Rodriguez, L., Z. Tsuchihashi, G. M. Fuentes, R. A. Bambara et P. J. Fay.** 1995. Influence of human immunodeficiency virus nucleocapsid protein on synthesis and strand transfer by the reverse transcriptase in vitro. *J Biol Chem* **270**:15005-11.
- Ross, T. M., A. E. Oran et B. R. Cullen.** 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* **9**:613-21.
- Rossio, J. L., M. T. Esser, K. Suryanarayana, D. K. Schneider, J. W. Bess, Jr., G. M. Vasquez, T. A. Wiltrout, E. Chertova, M. K. Grimes, Q. Sattentau, L. O. Arthur, L. E. Henderson et J. D. Lifson.** 1998. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* **72**:7992-8001.
- Rous, P.** 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **17**:397-411.
- Rouzina, I. et V. A. Bloomfield.** 1999a. Heat capacity effects on the melting of DNA. 1. General aspects. *Biophys J* **77**:3242-51.
- Rouzina, I. et V. A. Bloomfield.** 1999b. Heat capacity effects on the melting of DNA. 2. Analysis of nearest-neighbor base pair effects. *Biophys J* **77**:3252-5.
- Ruprecht, R. M., T. W. Baba et V. Liska.** 1996a. Attenuated HIV vaccine: caveats. *Science* **271**:1790-2.
-

-
- Ruprecht, R. M., T. W. Baba, V. Liska, R. Bronson, D. Penninck et M. F. Greene.** 1996b. "Attenuated" simian immunodeficiency virus in macaque neonates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:459-60.
- Ruprecht, R. M., Y. Hu, V. Liska, R. Rasmussen et P. Sharma.** 1996c. Correlates of immune protection after vaccination with attenuated live murine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:375-7.
- Sattentau, Q. J.** 1998. HIV gp120: double lock strategy foils host defences. *Structure* **6**:945-9.
- Schmalzbauer, E., B. Strack, J. Dannull, S. Guehmann et K. Moelling.** 1996. Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J Virol* **70**:771-7.
- Schols, D., S. Struyf, J. Van Damme, J. A. Este, G. Henson et E. De Clercq.** 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* **186**:1383-8.
- Schubert, U., L. C. Anton, I. Bacik, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orlowski, K. Strebel et J. W. Yewdell.** 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* **72**:2280-8.
- Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarell et K. Strebel.** 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**:809-19.
- Sharmeen, L., T. McQuade, A. Heldsinger, R. Gogliotti, J. Domagala et S. Gracheck.** 2001. Inhibition of the early phase of HIV replication by an isothiazolone, PD 161374. *Antiviral Res* **49**:101-14.
- Shen, N., L. Jette, C. Liang, M. A. Wainberg et M. Laughrea.** 2000. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *J Virol* **74**:5729-35.
- Sherman, D. S. et D. N. Fish.** 1999. Hydroxyurea in the treatment of HIV infection. *AIDS Read* **9**:18-9, 23-4.
- Sherman, P. A. et J. A. Fyfe.** 1990. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5119-23.
- Shih, T. Y. et G. D. Fasman.** 1972. Circular dichroism studies of histone-deoxyribonucleic acid complexes. A comparison of complexes with histone I (f-1), histone IV (f2al), and their mixtures. *Biochemistry* **11**:398-404.
- Shinitzky, M. et R. Goldman.** 1967. Fluorometric detection of histiine-tryptophan complexes in peptides and proteins. *Eur J Biochem* **3**:139-44.
- Simons, K. et E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-72.
- Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann et C. Ehresmann.** 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4945-9.
- Sokol, D. L., X. Zhang, P. Lu et A. M. Gewirtz.** 1998. Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11538-43.
- Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie et K. Weis.** 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041-50.
- Stoylov, S. P., C. Vuilleumier, E. Stoylova, H. De Rocquigny, B. P. Roques, D. Gerard et Y. Mely.** 1997. Ordered aggregation of ribonucleic acids by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Biopolymers* **41**:301-312.
-

-
- Strickland, E. H.** 1974. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **2**:113-75.
- Stuhlmann, H. et P. Berg.** 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* **66**:2378-88.
- Summers, M. F., L. E. Henderson, M. R. Chance, J. W. Bess, Jr., T. L. South, P. R. Blake, I. Sagi, G. Perez-Alvarado, R. C. Sowder, 3rd et D. R. Hare.** 1992. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci* **1**:563-74.
- Swingler, S., P. Gallay, D. Camaur, J. Song, A. Abo et D. Trono.** 1997. The Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances serine phosphorylation of the viral matrix. *J Virol* **71**:4372-7.
- Takahashi, K., S. Baba, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, H. Takaku et G. Kawai.** 2001. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J Biol Chem* **276**:31274-8.
- Takahashi, K. I., S. Baba, P. Chattopadhyay, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, H. Takaku et G. Kawai.** 2000. Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Rna* **6**:96-102.
- Tanchou, V., D. Decimo, C. Pechoux, D. Lener, V. Rogemond, L. Berthoux, M. Ottmann et J. L. Darlix.** 1998. Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication. *J Virol* **72**:4442-7.
- Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski et H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-5.
- Theilleux-Delalande, V., F. Girard, T. Huynh-Dinh, G. Lancelot et J. Paoletti.** 2000. The HIV-1(Lai) RNA dimerization. Thermodynamic parameters associated with the transition from the kissing complex to the extended dimer. *Eur J Biochem* **267**:2711-9.
- Tirado, M. M. et J. Garcia de la Torre.** 1979. Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. *J. Chem. Phys.* **71**:2581-2588.
- Tisne, C., M. Rigourd, R. Marquet, C. Ehresmann et F. Dardel.** 2000. NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA(Lys)₃ expressed in *Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. *Rna* **6**:1403-12.
- Tisne, C., B. P. Roques et F. Dardel.** 2001. Heteronuclear NMR studies of the interaction of tRNA(Lys)₃ with HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **306**:443-54.
- Tisne, C., B. P. Roques et F. Dardel.** 2004. The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J Biol Chem* **279**:3588-95.
- Truant, R. et B. R. Cullen.** 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**:1210-7.
- Tsuchihashi, Z. et P. O. Brown.** 1994. DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **68**:5863-70.
- Tummino, P. J., P. J. Harvey, T. McQuade, J. Domagala, R. Gogliotti, J. Sanchez, Y. Song et D. Hupe.** 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein zinc ejection activity of disulfide benzamides and
-

- benzothiazolones: correlation with anti-HIV and virucidal activities. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:394-400.
- Tummino, P. J., J. D. Scholten, P. J. Harvey, T. P. Holler, L. Maloney, R. Gogliotti, J. Domagala et D. Hupe.** 1996. The in vitro ejection of zinc from human immunodeficiency virus (HIV) type 1 nucleocapsid protein by disulfide benzamides with cellular anti-HIV activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:969-73.
- Tyagi, S. et F. R. Kramer.** 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**:303-308.
- Urbaneja, M. A., B. P. Kane, D. G. Johnson, R. J. Gorelick, L. E. Henderson et J. R. Casas-Finet.** 1999. Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J Mol Biol* **287**:59-75.
- Urbaneja, M. A., M. Wu, J. R. Casas-Finet et R. L. Karpel.** 2002. HIV-1 nucleocapsid protein as a nucleic acid chaperone: spectroscopic study of its helix-destabilizing properties, structural binding specificity, and annealing activity. *J. Mol. Biol.* **318**:749-764.
- Valeur, B. et G. Weber.** 1977. Resolution of the fluorescence excitation spectrum of indole into the 1La and 1Lb excitation bands. *Photochem Photobiol* **25**:441-4.
- Vallone, P. M., T. M. Paner, J. Hilario, M. J. Lane, B. D. Faldasz et A. S. Benight.** 1999. Melting studies of short DNA hairpins: influence of loop sequence and adjoining base pair identity on hairpin thermodynamic stability. *Biopolymers* **50**:425-42.
- van Wamel, J. L. et B. Berkhout.** 1998. The first strand transfer during HIV-1 reverse transcription can occur either intramolecularly or intermolecularly. *Virology* **244**:245-51.
- Vandevelde, M., M. Witvrouw, J. C. Schmit, S. Sprecher, E. De Clercq et J. P. Tassignon.** 1996. ADA, a potential anti-HIV drug. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:567-8.
- Veronese, F. D., R. Rahman, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo et M. G. Sarngadharan.** 1987. Immunological and chemical analysis of P6, the carboxyl-terminal fragment of HIV P15. *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**:253-64.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis et C. A. Carter.** 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7724-9.
- Vink, C., E. Yeheskiely, G. A. van der Marel, J. H. van Boom et R. H. Plasterk.** 1991. Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic Acids Res* **19**:6691-8.
- Vix, A. et H. Lami.** 1995. Protein fluorescence decay: discrete components or distribution of lifetimes? Really no way out of the dilemma? *Biophys J* **68**:1145-51.
- Vuilleumier, C., E. Bombarda, N. Morellet, D. Gerard, B. P. Roques et Y. Mely.** 1999. Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry* **38**:16816-25.
- Vuilleumier, C., C. Maechling-Strasser, D. Gerard et Y. Mely.** 1997. Evidence and prevention of HIV-1 nucleocapsid protein adsorption onto fluorescence quartz cells. *Anal Biochem* **244**:183-5.
- Wahl, P.** 1975. Nanosecond Pulse Fluorimetry, p. 233-285. *In* H. P. B. S. Eds. (ed.), *New Techniques in biophysics and cell biology*. Wiley, London.
- Ward, D. C., E. Reich et L. Stryer.** 1969. Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. I. Formycin, 2-aminopurine riboside, 2,6-diaminopurine riboside, and their derivatives. *J Biol Chem* **244**:1228-37.

-
- Ware, W. R.** 1971. Transient luminescence measurements, p. 213-302. *In* A. A. L. Eds. (ed.), Creation and detection of the excited state, vol. 1A. Marcel Dekker, New York.
- Weeks, K. M.** 1997. Protein-facilitated RNA folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**:336-42.
- Wetlauffer, D. B.** 1962. *Adv Prot Chem* **17**:303-306.
- Whitney, J. B. et R. M. Ruprecht.** 2004. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr Opin Infect Dis* **17**:17-26.
- Williams, M. C., I. Rouzina, J. R. Wenner, R. J. Gorelick, K. Musier-Forsyth et V. A. Bloomfield.** 2001. Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6121-6.
- Windbichler, N., M. Werner et R. Schroeder.** 2003. Kissing complex-mediated dimerisation of HIV-1 RNA: coupling extended duplex formation to ribozyme cleavage. *Nucleic Acids Res* **31**:6419-27.
- Woodson, S. A. et D. M. Crothers.** 1987. Proton nuclear magnetic resonance studies on bulge-containing DNA oligonucleotides from a mutational hot-spot sequence. *Biochemistry* **26**:904-12.
- Wu, K. J., T. A. Shaler et C. H. Becker.** 1994. Time-of-flight mass spectrometry of underivatized single-stranded DNA oligomers by matrix-assisted laser desorption. *Anal Chem* **66**:1637-45.
- Wu, T., J. Guo, J. Bess, L. E. Henderson et J. G. Levin.** 1999. Molecular requirements for human immunodeficiency virus type 1 plus-strand transfer: analysis in reconstituted and endogenous reverse transcription systems. *J Virol* **73**:4794-805.
- Wu, W., B. M. Blumberg, P. J. Fay et R. A. Bambara.** 1995. Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation. *J Biol Chem* **270**:325-32.
- Wu-Baer, F., D. Sigman et R. B. Gaynor.** 1995. Specific binding of RNA polymerase II to the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA is regulated by cellular cofactors and Tat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7153-7.
- Wyatt, R. et J. Sodroski.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-8.
- You, J. C. et C. S. McHenry.** 1993. HIV nucleocapsid protein. Expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *J Biol Chem* **268**:16519-27.
- You, J. C. et C. S. McHenry.** 1994. Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription. *J Biol Chem* **269**:31491-5.
- Yu, E. et D. Fabris.** 2003. Direct probing of RNA structures and RNA-protein interactions in the HIV-1 packaging signal by chemical modification and electrospray ionization fourier transform mass spectrometry. *J Mol Biol* **330**:211-23.
- Yu, X., Y. Hathout, C. Fenselau, R. C. Sowder, 2nd, L. E. Henderson, W. G. Rice, J. Mendeleyev et E. Kun.** 1995. Specific disulfide formation in the oxidation of HIV-1 zinc finger protein nucleocapsid p7. *Chem Res Toxicol* **8**:586-90.
- Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier et P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
- Zhang, Y. et E. Barklis.** 1997. Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J Virol* **71**:6765-76.
- Zhu, J. et R. M. Wartell.** 1999. The effect of base sequence on the stability of RNA and DNA single base bulges. *Biochemistry* **38**:15986-93.
-

- Znosko, B. M., S. B. Silvestri, H. Volkman, B. Boswell et M. J. Serra.** 2002.
Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for the formation of RNA duplexes with single nucleotide bulges. *Biochemistry* **41**:10406-17.
- Zuber, G., J. McDermott, S. Karanjia, W. Zhao, M. F. Schmid et E. Barklis.** 2000.
Assembly of retrovirus capsid-nucleocapsid proteins in the presence of membranes or RNA. *J Virol* **74**:7431-41.

Résumé :

La NCp7 est impliquée dans de nombreuses étapes du cycle viral notamment la rétrotranscription. Ceci en fait une cible potentielle pour un traitement anti-HIV. Par son activité chaperonne, elle permet de stimuler le premier saut de brin. Ce dernier consiste en la déstabilisation et l'hybridation des séquences TAR et cTAR du génome viral. C'est à l'aide de séquences cTAR marquées à leurs extrémités 3' et 5' par des chromophores et différentes techniques de spectroscopie de fluorescence et d'absorption que nous avons pu mettre en évidence l'importance des structures primaire et secondaire de la NCp7 et de cTAR dans le premier saut de brin.

L'activité déstabilisatrice est fortement dépendante des bulges et de la boucle interne de cTAR. D'autre part, cette activité dépend également de la présence du Trp³⁷ ainsi que de la présence des deux doigts de zinc de la NCp7 dans leur conformation native.

Ensuite, nous avons pu mettre en évidence que la NCp7 favorisait la formation de l'homodimère de mutants de la partie haute de cTAR par formation d'un complexe boucle-boucle.

Finalement, nous avons étudié une nouvelle sonde fluorescente analogue à l'adénine (la 8-vinyl-déoxyadénosine) qui est une solution alternative à la 2-aminopurine.

Mots clés : VIH, fluorescence, TAR, NCp7, activité chaperonne, complexe boucle-boucle, 2-AP

Abstract :

NCp7 is implied in many stages of the viral cycle in particular the retrotranscription. This makes NCp7 a potential target for an anti-HIV treatment. By its chaperone activity, it stimulates the first strand-transfer. It consists of the destabilization and hybridization of the TAR and cTAR sequences of the viral genome. It is by using cTAR sequence labelled to their 3' and 5' ends and various techniques of fluorescence spectroscopy and absorption that we could highlight the importance of the primary and secondary structures of NCp7 and cTAR in the first strand-transfer.

The destabilizing activity is strongly dependent on the bulges and the internal loop of cTAR. In addition, this activity also depends on the presence of the Trp³⁷ and on the presence of the two zinc fingers in their native form.

Then, we could highlight that NCp7 supported the formation of the homodimer of the top half of cTAR by formation of a kissing complex.

Finally, we studied a new fluorescent probe analogue to the deoxyadenosine (the 8-vinyl-déoxyadénosine) which is an alternative probe to the 2-aminopurine.

Key words : HIV, fluorescence, TAR, NCp7, chaperone activity, kissing complex, 2-AP