

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

**présentée
pour l'obtention du grade de**

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
Discipline : Sciences du vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Valérie GOLDSCHMIDT

**LA RETROTRANSCRIPTION DE HIV-1 : ETUDE
DU COMPLEXE D'INITIATION ET DES
MECANISMES DE RESISTANCE AUX
INHIBITEURS NUCLEOSIDIQUES**

Soutenue le 3 décembre 2004 devant la Commission d'examen

**Dr. R. MARQUET
Prof. B. EHRESMANN
Dr. S. MULLER
Dr. M. GOTTE
Dr. C. BRANLANT
Dr. C. EHRESMANN**

**Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur**

UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1	17
<i>I. Historique, caractéristiques et classification</i>	17
A. Les Retroviridae ou Rétrovirus.....	17
1. Définition et origine des rétrovirus.....	17
2. Caractéristiques générales.....	19
3. Classification.....	19
B. Le genre lentivirus de la famille des Rétroviridae et HIV-1.....	20
1. Caractéristiques morphologiques et moléculaires.....	20
2. Caractéristiques biologiques et cliniques.....	21
a. Communes à tous les lentivirus.....	21
b. Cas de HIV-1.....	21
C. Origine et évolution de HIV.....	23
<i>II. Organisation génétique et structure du virion de HIV-1</i>	25
A. Organisation génétique.....	25
1. L'ADN proviral.....	25
a. Les régions non codantes.....	25
b. Les régions codantes.....	25
i. Les protéines de structure et enzymatique.....	27
ii. Les protéines régulatrices et auxiliaires.....	28
2. L'ARN viral.....	28
a. La région 5'.....	28
i. La séquence R en 5' et 3'.....	28
ii. La séquence PBS.....	30
iii. La région leader.....	30
b. Les signaux internes.....	30
i. Les sites d'épissage.....	30
ii. La séquence RRE.....	30
iii. Les séquences polypuriques PPT 3' et PPTc.....	30
B. Structure du virion.....	31
1. L'enveloppe.....	31
2. La matrice.....	31
3. La capside.....	33
a. La protéine de capside.....	33
b. La nucléocapside.....	33
c. La protéine p6.....	34

d. Le peptide p2	34
e. Les protéines enzymatiques.....	34
i. La protéase	34
ii. La rétrotranscriptase	34
iii. L'intégrase.....	35
f. Les protéines auxiliaires	35
i. La protéine Virale R : Vpr	35
ii. Facteur Négatif : Nef.....	35
iii. Facteur d'Infectivité Virale : Vif.....	37
g. Autres constituants encapsidés	37
III. Le cycle réplcatif de HIV-1.....	39
A. La phase pré-intégrative	39
1. La reconnaissance, la fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule hôte.....	39
2. Les étapes de décapsidation et de rétrotranscription.....	41
3. Le transport intranucléaire de l'ADN proviral	43
4. L'intégration de l'ADN proviral	45
B. La phase post-intégrative	47
1. Expression de l'ADN proviral.....	47
a. La phase précoce.....	47
i. L'initiation de la transcription	47
ii. Epissage des ARNm viraux	48
b. La phase tardive	51
i. Export nucléaire des ARNm viraux mono et non-épissés.....	51
ii. Traduction des ARNm viraux mono et non-épissés	51
2. Assemblage des virions, bourgeonnement et maturation	52
a. Le recrutement des protéines virales dans l'assemblage	52
b. Le recrutement des ARN dans l'assemblage.....	53
i. Le recrutement de l'ARN viral	53
ii. Le recrutement de l'ARN _{t₃^{Lys}}	53
c. Le bourgeonnement et la maturation du virion.....	55
CHAPITRE II : LA RÉTROTRANSCRIPTION CHEZ HIV-1	59
I. La rétrotranscription.....	59
A. L'initiation et la synthèse de l'ADN « Strong-Stop » (-).....	59
B. Le premier transfert de brin	60
C. La synthèse du brin d'ADN (-)	60
D. L'initiation de la synthèse du brin (+).....	61
E. Le second transfert de brin.....	61
F. La terminaison de la rétrotranscription.....	61
II. Le complexe d'initiation	63
A. Structure secondaire du domaine PBS des virus de sous-types A et B de HIV-1	63
B. Le complexe d'initiation de la rétrotranscription <i>in vitro</i>	65
1. Structure du complexe binaire ARN _{t₃^{Lys}} /ARN _v de l'isolat MAL de HIV-1	65
2. Structure du complexe binaire ARN _{t₃^{Lys}} /ARN _v des isolats Hxb2/Lai/NL4-3 de HIV-1.....	67
3. Structure du complexe ternaire ARN _{t₃^{Lys}} /ARN _v : RT	69

4. Spécificité fonctionnelle du complexe d'initiation	69
C. L'initiation de la rétrotranscription	70
1. Réplication de virus mutants	70
2. Les protéines impliquées dans le processus de rétrotranscription	72
a. Les protéines virales impliquées dans la rétrotranscription	72
b. Les protéines cellulaires impliquées dans la rétrotranscription	74
D. La structure du complexe d'initiation chez d'autres rétrovirus et rétroéléments	74
1. HIV-2	74
2. FIV	75
3. RSV	76
4. MLV	77
5. Ty1	78
6. Ty3	78
CHAPITRE III : L'INHIBITION DE LA RÉTROTRANSCRIPTION DE HIV-1	81
I. <i>La rétrotranscriptase</i>	81
A. Structure tridimensionnelle de la RT	81
1. Les domaines structuraux de la RT	83
a. La sous-unité p66	83
b. La sous-unité p51	84
2. Comparaison des structures cristallographiques de la RT libre ou liée	84
3. Structure des duplex ADN/ADN ou ADN/ARN	85
4. Le site de fixation du nucléotide	88
B. Mécanisme de polymérisation par la RT	89
1. Réaction enzymatique d'incorporation de nucléotides	89
2. Processivité de la RT	90
II. <i>Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase</i>	91
A. Les inhibiteurs non nucléosidiques	91
B. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques	92
1. Structure des NRTI	92
2. Mécanisme d'action	94
a. La phosphorylation et l'incorporation dans la chaîne d'ADN	94
III. <i>Résistance aux inhibiteurs de la RT</i>	96
A. Mode d'apparition des virus résistants	96
1. Fidélité de la RT	96
2. La recombinaison	96
B. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la rétrotranscriptase	97
1. Résistance aux NNRTI	97
2. Résistance aux NRTI	97
a. Mécanisme de discrimination	100
b. Mécanisme d'excision	100
c. Cas du Ténofovir	100
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	123
RESULTATS ET DISCUSSION	127

CHAPITRE I : ETUDE DU COMPLEXE D'INITIATION DE LA RÉTROTRANSCRIPTION	129
I. Article I : Etude du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ de l'isolat MAL	129
A. Objectifs	129
B. Méthodologie	129
1. Etude Structurale : cartographie en solution	129
a. Les sondes utilisées	131
i. Les sondes chimiques	131
b. Les sondes enzymatiques	131
2. Détection des clivages et des positions modifiées	131
C. Conclusions	145
II. Article II. Relations entre la structure et la fonction du complexe d'initiation utilisant l' $ARNt^{His}$ comme <i>amorce</i>	147
A. Objectifs	147
B. Résultats-Conclusions	161
III. Article III : Existe-il une interaction alternative PAS/anti-PAS ?	163
A. Objectifs	163
B. Résultats-Discussion-Conclusions	175
IV. Article IV : La versatilité du complexe d'initiation de la rétrotranscription de HIV-1	179
A. Objectifs	179
B. Résultats-Discussion	191
CHAPITRE II : MÉCANISME D'EXCISION DE L'AZTMP : RÔLE DE L'ATP-LYSE ?	199
I. Introduction	199
II. Etat d'avancement des travaux	201
III. Stratégie expérimentale	202
IV. Résultats et discussion	203
A. Activité des enzymes sauvage et résistante	203
B. Incorporation de l'AZTTP	203
C. Mécanisme de résistance par enlèvement	203
1. Enlèvement par PP-lyse	203
2. Enlèvement par ATP-lyse	205
D. Existe-t-il une compétition entre l'ATP et le PPi pour exciser l'AZTMP incorporé ?	207
CHAPITRE III : RÔLES MULTIPLES DE LA CONCENTRATION EN Mg^{2+}	211
I. Introduction	211
II. Résultats et discussion	215
A. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-)	215
1. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'activité polymérase	217
a. Sur la vitesse d'incorporation de nt	217
b. Sur la processivité	219
2. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'activité RNase H polymérase dépendante	219
B. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence de différents NRTI	223

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	231
<i>I. Versatilité du complexe d'initiation</i>	<i>233</i>
<i>II. Rôles de l'ATP-lyse dans le mécanisme de réparation d'une amorce terminée par de l'AZT.....</i>	<i>237</i>
<i>III. Rôles multiples de la concentration en Mg²⁺</i>	<i>238</i>
BIBLIOGRAPHIE	241



ABREVIATIONS

A	adénine
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNt ^{His}	ARN de transfert spécifique de l'histidine
ARNt _{1,2} ^{Lys}	isoaccepteurs 1 et 2 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ARNt ₃ ^{Lys}	isoaccepteur 3 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ARNt ^{Met}	ARN de transfert spécifique de la méthionine
ARNt ^{Glu}	ARN de transfert spécifique de l'acide glutamique
ARNv	ARN viral
ATP	adénosine 5'-triphosphate
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
AZTTP	3'-azido-3'-désoxythymidine 5'-triphosphate
C	cytosine
CA	« capsid protein »
CMCT	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-métho-p-toluène sulfonate
coll.	collaborateurs
CTS	« central termination sequence »
dCTP	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	2', 3'-didésoxyguanosine 5'-triphosphate
DIS	« dimerization initiation site »
DMS	sulfate de diméthyle
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
dTTP	thymidine 5'-triphosphate
E. coli	Escherichia coli
<i>env</i>	« envelope »
G	guanine
<i>gag</i>	« group-specific antigen »
GTP/GDP	guanosine 5'-triphosphate/diphosphate



Abréviations

HMG	« high mobility group »
IN	« integrase »
kb	kilobase
K_d	constante d'équilibre de dissociation
kD	kiloDalton
k_{off}	constante de vitesse de dissociation
k_{pol}	constante de vitesse de polymérisation
LTR	« long terminal repeat »
MA	« matrix protein »
min	minute
Nef	« negative factor »
NC	« nucleocapsid protein »
NES	« nuclear export signal »
NLS	« nuclear localization signal »
NNRTI	inhibiteur non-nucléosidique de la RT
NRTI	inhibiteur nucléosidique de la RT
ODN	oligodésoxyribonucléotide complémentaire des 18 nt du PBS
ORN	oligoribonucléotide complémentaire des 18 nt du PBS
nt	nucléotide
PAS	« primer activation signal »
PBS	« primer binding site »
PIC	« preintegration complex »
<i>pol</i>	« polymerase »
PPi	pyrophosphate inorganique
PPT	« polypurine tract »
PR	« protease »
Psi	« packaging signal »
A/M	amorce/matrice
R	« redundant »
Rev	« regulator of virion expression »
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase H	« ribonuclease H »
RRE	« rev responsive element »
RT	« reverse transcriptase »
SA	« splice acceptor »



Abréviations

SD	« splice donor »
SIDA	syndrome d'immuno-déficience acquise
T	thymine
TAR	« trans-acting responsive element »
TAM	« thymidine analogue mutations »
Tat	« transactivator »
u	unité enzymatique
U	uracile
U3	« unique sequence element at the 3' end of the viral RNA»
U5	« unique sequence element at the 5' end of the viral RNA »
Vif	« viral infectivity factor »
Vpr	« viral protein R »
Vpu	« viral protein U »



Abréviations des noms de rétrovirus

ALV	Virus de la Leucose Aviaire
AMV	Virus de la Myéloblastose Aviaire
BLV	Virus de la Leucémie Bovine
EIAV	Virus de l'Anémie Infectieuse Equine
FeLV	Virus de la Leucémie Féline
FIV	Virus de l'Immunodéficience Féline
HaSV	Virus du Sarcome murin de Harvey
HIV-1, -2	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1, de type 2
HFV/PFV	Virus « spumeux » Humain/Primate
HTLV	Virus de la Leucémie Humaine des cellules T
Mo-MuLV	Virus de la Leucémie Murine de Moloney
MLV	Virus de la Leucémie Murine
MMTV	Virus des Tumeurs Mammaires Murines
MPMV	Virus simien de Mason-Pfizer
PTLV-1, -2	Virus Primate T Lymphotrope de type 1, de type 2
RSV	Virus du Sarcome de Rous
SFV	Virus "spumeux" Simien
SIV	Virus de l'Immunodéficience Simienne
SNV	Virus de la Nécrose de la rate
WDSV	Virus du Sarcome Dermique du Walleye



AVANT-PROPOS

Le HIV/SIDA (Virus de l'Immunodéficience Humaine/Syndrôme d'Immunodéficience Acquise) constitue l'une des crises sanitaires les plus graves à laquelle le monde ait été confronté. La pandémie a provoqué près de 20 millions de décès en deux décennies. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 40 millions de personnes à travers le monde vivent avec le HIV/SIDA, dont 95 % dans les pays en développement, et que durant l'année 2003, il a causé plus de 3 millions de décès et plus de 5 millions de nouvelles infections (d'après le rapport 2003 de l'OMS sur le SIDA, Figure 1).

Chronologie de l'épidémie

* 1980 : découverte du premier rétrovirus humain HTLV (Human T cell Lymphotropic Virus), à l'origine de certains lymphomes et de leucémies des cellules T chez l'adulte, par le professeur Robert Gallo et son équipe.

* 1980-1981 : premières manifestations pathologiques présentant une forme très rare de cancer de la peau (sarcome de Kaposi), de pneumonies, touchant de jeunes homosexuels, mais aussi des toxicomanes, des hémophiles et des hétérosexuels (149). A chaque fois, les patients ont un système immunitaire extrêmement affaibli qui se traduit par une diminution du nombre de lymphocytes T4 circulants ou localisés dans les différents organes lymphoïdes, les sensibilisant à de multiples infections opportunistes. Cette affection est appelée AIDS pour Acquired Immuno Deficiency Syndrome, que les francophones traduisent par SIDA.

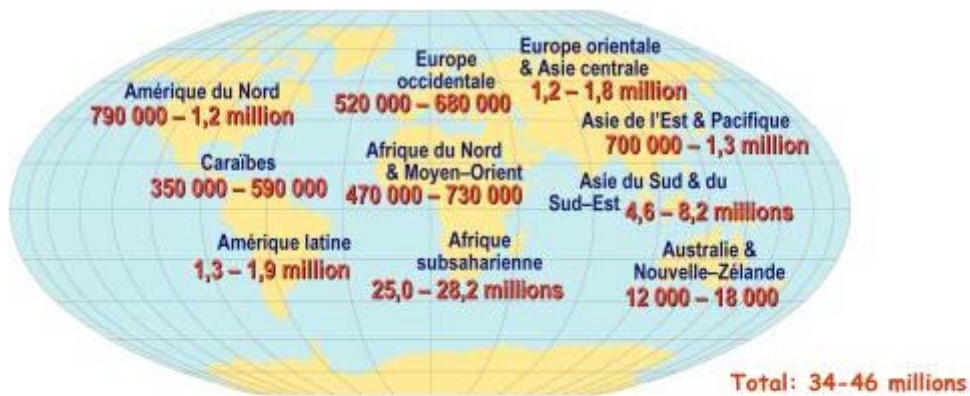
* 1983 : l'équipe du Pr. Montagnier parvient à isoler pour la première fois, à partir de lymphocytes ganglionnaires d'un patient atteint de lymphoadénopathie, l'agent responsable du SIDA auquel il donne le nom de LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) (27). Ce virus présente une activité rétrotranscriptase et ses caractéristiques sont proches de celles du HTLV. La même année, le Pr. Gallo isole un virus qu'il nomme HTLV-III et qui s'avère identique au LAV (133).

* 1985 : le virus de l'immunodéficience du macaque, provoquant des symptômes identiques au SIDA, est isolé (SIVMac).

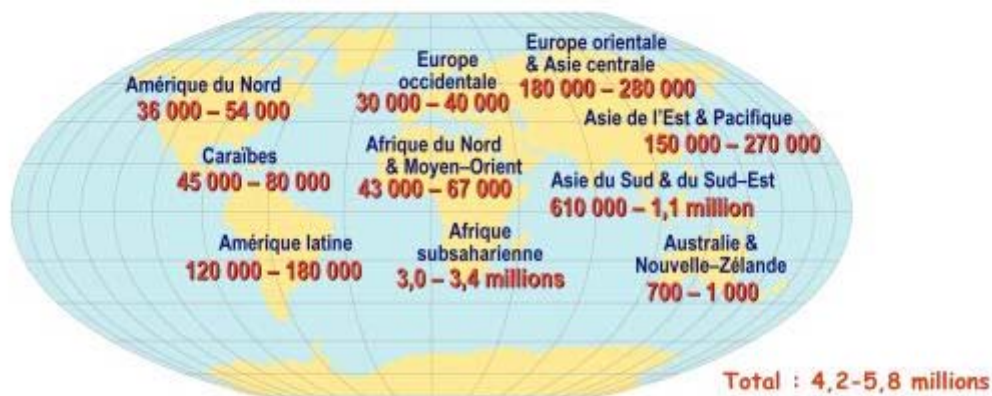
* 1986 : une commission scientifique propose une dénomination commune : le virus



Adultes et enfants vivant avec le HIV/SIDA
Estimations fin 2003



Nombre estimatif d'adultes et d'enfants infectés par le HIV en 2003



Nombre estimatif de décès par SIDA chez l'adulte et l'enfant en 2003



Figure 1 : Estimations mondiales fin 2003 par l' ONUSIDA et l'OMS, du nombre de personnes vivant avec le HIV/SIDA ainsi que du nombre de personnes infectées et décédées durant l'année 2003.

responsable du SIDA est appelé HIV-1. L'équipe du Pr. Montagnier identifie un deuxième virus, HIV-2 à partir de patients originaires d'Afrique de l'Ouest.

* 1987 : commercialisation de l'AZT (Zidovudine) en France.

* 1992 : autorisation de mise sur le marché français du ddi (Didanosine). La FDA (Food and Drug Administration) autorise la mise sur le marché américain du d4T (Stavudine).

* 1994 : autorisation de mise sur le marché français du ddC (Zalcitabine).

* 1996 : découverte des co-récepteurs CCR-5 et CXCR4, de la famille des chimiokines, qui jouent un rôle déterminant dans l'infection par HIV. L'efficacité des trithérapies est confirmée. Deux nouvelles générations de molécules sont disponibles sur le marché français (les anti-protéases : Indinavir, Saquinavir et Ritonavir, les inhibiteurs de la rétrotranscriptase : d4T, 3TC (Lamivudine)).

* 1998 : autorisation de mise sur le marché français de la Névirapine.

* 2003 : nouvelle génération de molécules anti-HIV : les inhibiteurs de fusion, avec le T20 (Fuzéon).

A ce jour, dix inhibiteurs de la rétrotranscriptase sont approuvés par la FDA, trois de type non nucléosidiques (NNRTI) : Nevirapine, Delavirdine, Efavirenz et sept inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques (NRTI) : Zidovudine (AZT), Didanosine (ddI), Zalcitabine (ddC), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Abacavir Succinate (ABC) et Viread (Tenofovir). Six anti-protéases sont également disponibles : Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir. Une dernière génération d'inhibiteurs est utilisée : les inhibiteurs de fusion (T20).

Etat actuel : les inégalités d'accès aux soins

S'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement éradiquant le virus, le développement d'antirétroviraux a permis de prolonger et d'améliorer la vie d'un grand nombre de personnes vivant avec le HIV/SIDA.

Une inégalité est cependant observée entre les pays développés du Nord et les pays pauvres du Sud :

- Dans les pays occidentaux : 500 000 personnes sont traitées et le SIDA est



responsable de 25 000 morts chaque année.

- En Afrique : 50 000 malades seulement bénéficient des médicaments et 2 millions de personnes en meurent par an.

Dans cette situation d'urgence, des mesures immédiates s'imposent. Ainsi, l'OMS et l'ONUSIDA s'engagent, d'ici la fin 2005, à offrir un traitement antirétroviral à 3 millions de personnes vivant avec le HIV/SIDA dans les pays pauvres.

De plus, des programmes de coopération internationale visant à soutenir la lutte contre le HIV/SIDA dans les pays en développement ont été lancés. Leur but est la distribution de médicaments génériques contre le SIDA.

« Pour faire de grandes choses, il ne faut pas être un si grand génie : il ne faut pas être au-dessus des hommes ; il faut être avec eux » (Montesquieu, Pensées).



INTRODUCTION



Chapitre I : Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1)

I. Historique, caractéristiques et classification

A. Les Retroviridae ou Rétrovirus

1. Définition et origine des rétrovirus

C'est en 1953 qu'André Lwoff a défini le concept de virus. Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire ne pouvant se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte et utilisant sa machinerie cellulaire. On peut classer les virus selon la présence ou l'absence d'enveloppe protégeant la nucléocapside, la nature ADN ou ARN de leur génome, simple ou double brin, de polarité positive ou négative. Les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant un génome diploïde de type ARN simple brin de polarité positive, à partir duquel ils peuvent se répliquer. Le nom rétrovirus provient de l'enzyme qu'ils possèdent, appelée rétrotranscriptase, reverse transcriptase ou transcriptase inverse, découverte conjointement en 1970 par H. Temin chez RSV (336) et par D. Baltimore chez MLV et RSV (22), qui permet la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN bicaténaire.

C'est en 1908 que fut découvert le premier rétrovirus par Ellerman et Bang, suite à l'étude de la leucémie du poulet (110). Il sera nommé ALV ou virus de la leucose aviaire. Le virus du sarcome de Rous (RSV), responsable de tumeurs chez le poulet, fut identifié quelques années plus tard, en 1911, par Peyton Rous (295). Par la suite, d'autres rétrovirus associés à différentes formes de cancers furent découverts, tels que le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) en 1936, le virus du sarcome simien (SSV) en 1971, les virus de la leucémie féline (FeLV) ou bovine (BLV) respectivement en 1964 et 1972, et la liste ne cesse d'augmenter (261). Le premier rétrovirus humain fut isolé en 1980 et porte le nom d'HTLV-I (Human T-cell Leukemia Virus I) (265).



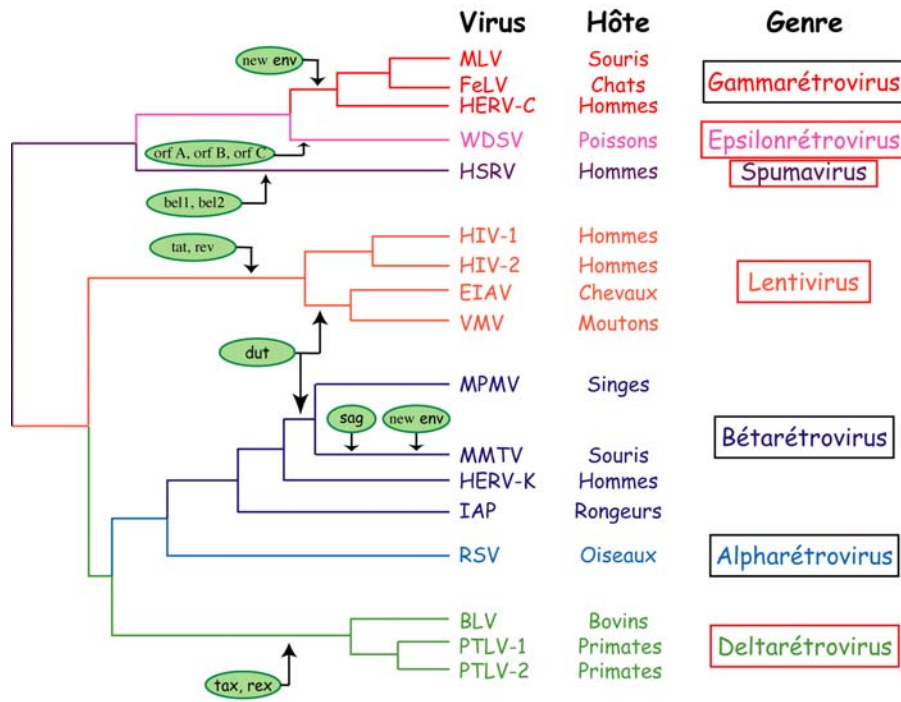


Figure 2 : Arbre phylogénétique des rétrovirus conçu à partir de l'alignement de séquences de la rétrotranscriptase.

La longueur des branches est proportionnelle au degré de divergence. Les rétrovirus dit "simples" sont encadrés en noir, ceux dit "complexes" en rouge. L'ovale vert indique l'acquisition d'un nouveau gène au cours de l'évolution par recombinaison avec le génome de l'hôte ou d'autres virus. HERV-C et HERV-K sont des rétrovirus humains défectueux et IAP un virus-like de rongeur.

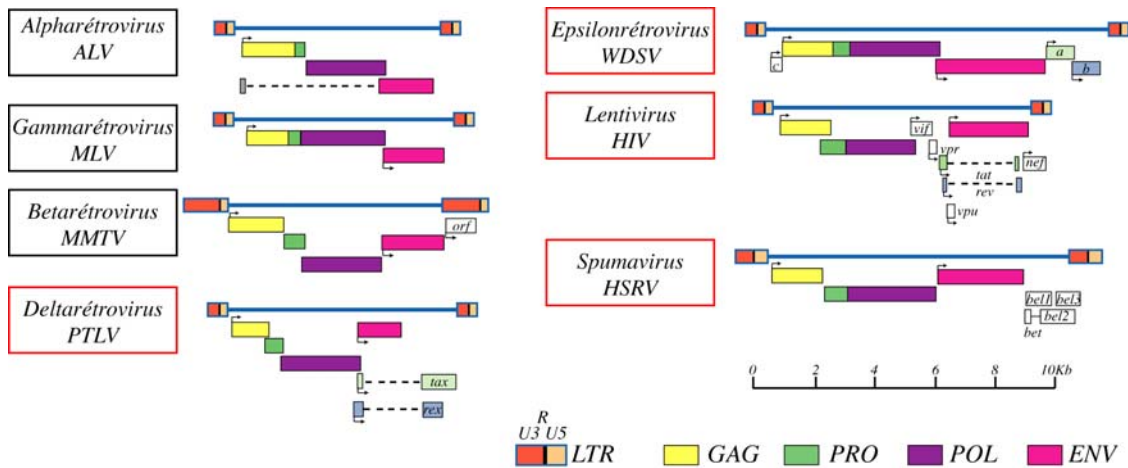


Figure 3 : Régions codantes des différents genres de rétrovirus.

Les rétrovirus dit "simples" sont encadrés en noir, ceux dit "complexes" en rouge. Pour chaque genre, la partie supérieure du schéma représente l'ensemble du génome rétroviral avec les LTR. Les régions codantes sont représentées en dessous, chaque boîte correspond à une phase ouverte de lecture. Les sites d'initiation de la traduction sont représentés par des flèches. Les lignes discontinues indiquent que les phases ouvertes de lecture sont liées après épissage. Les protéines régulatrices et auxiliaires sont indiquées.



L'année 1983 fut marquée par l'identification de l'agent étiologique responsable du SIDA, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), conjointement par les équipes du Pr. Montagnier et du Pr. Gallo (27, 133).

2. Caractéristiques générales

Les rétrovirus possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes :

- * Ce sont des virus enveloppés produits par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette enveloppe contient des glycoprotéines d'origine virale permettant la reconnaissance et l'entrée du virus dans la cellule cible. Leur taille varie de 80 à 120 nm de diamètre.
- * L'enveloppe protège la capsid interne ou « core » du virus, visible par microscopie électronique, qui renferme non seulement le matériel génétique mais également des protéines virales indispensables à la réplication du virus (protéase, rétrotranscriptase et intégrase).
- * Leur génome diploïde est constitué de deux molécules homologues d'ARN simple brin de polarité positive formant un dimère. La taille de l'ARN viral varie entre 7 et 12 kb.
- * L'étape de rétrotranscription convertit l'ARN génomique en une molécule d'ADN double brin linéaire qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Suite à la transcription de cet ADN proviral par la machinerie cellulaire, les nouvelles molécules d'ARN serviront soit à la production des protéines virales, soit à fournir l'information génétique encapsidée dans de nouveaux virions.

3. Classification

Les rétrovirus constituent une famille très diversifiée de virus infectant aussi bien les vertébrés que les invertébrés. Des comparaisons de séquences d'acides aminés de la rétrotranscriptase, la protéine virale la plus conservée de ces virus, a permis au Comité International sur la Taxonomie des Virus d'établir un lien phylogénétique entre les différents rétrovirus et de les classer en 7 genres (Figure 2) : les Alpharétrovirus, Betarétrovirus, Deltarétrovirus, Epsilon-rétrovirus, Gammarétrovirus, Lentivirus et Spumavirus. Ces genres peuvent se diviser en deux catégories : les rétrovirus simples (Alpharétrovirus, Betarétrovirus et Gammarétrovirus), qui ne possèdent que les gènes *gag*, *pol* et *env* (parfois *dut*) et les



rétrovirus complexes (Deltarétrovirus, Epsilon-rétrovirus, Lentivirus et Spumavirus) qui codent également des protéines régulatrices et auxiliaires (Figure 3). Des différences structurales (apparence du noyau, mode de bourgeonnement, apparence des protéines d'enveloppe) sont observées en microscopie électronique et permettent de classer les rétrovirus simples en 4 groupes (140) :

- * Les particules de type A, intracellulaires, non enveloppées et non infectieuses, qui représentent la forme immature des rétrovirus.
- * Les particules de type B, enveloppées, extracellulaires avec un « core » excentré, caractérisant les Betarétrovirus.
- * Les particules de type C, enveloppées, extracellulaires avec un « core » sphérique et centré, regroupant les Alpharétrovirus ainsi que les Gammarétrovirus.
- * Les particules de type D, enveloppées, extracellulaires avec un « core » en forme de cylindre, caractérisant également certains Betarétrovirus.

B. Le genre lentivirus de la famille des Rétroviridae et HIV-1

1. Caractéristiques morphologiques et moléculaires

Les lentivirus (signifiant virus lent, en latin) sont des rétrovirus complexes qui infectent différentes espèces animales, par exemple les primates (HIV-1, HIV-2, SIV), les félins (FIV), les bovins (BIV)... Ils possèdent un certain nombre de caractéristiques communes :

- * Les particules virales ont un diamètre de 80 à 100 nm.
- * Le « core » est de forme conique.
- * Leur génome est de grande taille, supérieure à 9 kb (9,2 kb pour HIV-1).
- * Une phase ouverte de lecture sépare les gènes *pol* et *env*.
- * Les gènes *pol* présentent une très grande homologie.
- * Les protéines d'enveloppe sont glycosylées.
- * Ils possèdent plusieurs protéines auxiliaires et régulatrices (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu dans le cas de HIV-1).



2. Caractéristiques biologiques et cliniques

a. Communes à tous les lentivirus

Les lentivirus sont des rétrovirus qui provoquent la mort des cellules infectées. Toutefois, il existe une phase de latence relativement longue entre l'infection et les premiers symptômes de la maladie (jusqu'à 11 ans chez HIV-1). Ces symptômes sont corrélés à un état d'immunodépression aiguë favorisant le développement de maladies auto-immunes et l'apparition de maladies opportunistes.

b. Cas de HIV-1

HIV-1 s'attaque en particulier aux lymphocytes CD4+, pilier du système de défense immunitaire de l'organisme. D'autres cellules du système immunitaire peuvent être atteintes notamment les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, et les cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux.

Le SIDA représente le stade le plus évolué d'une infection chronique appelée maladie à HIV dont l'évolution s'effectue en 3 temps (Figure 4) :

* La primo-infection par HIV : 3 à 6 semaines après l'infection, 50 à 70 % des personnes présentent des symptômes qui ressemblent à ceux de la grippe ou de la mononucléose. Au cours de cette période, appelée syndrome rétroviral aigu, une virémie élevée dans le plasma et les cellules associées est observée. Elle favorise la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme et le développement d'une réponse immunitaire diminuant le taux de virus plasmatique (80).

* La phase asymptomatique : la réplication virale diminue et se stabilise à un niveau qui varie suivant les personnes. L'infection est dite latente, sans aucune manifestation apparente, c'est-à-dire sans symptôme clinique. Durant cette période, qui peut s'étendre à plusieurs années, il y a un équilibre entre la production de virus et son élimination. Le virus peut également rester à l'état latent, dans des cellules réservoirs de type CD4+ mémoire et macrophages.

* La phase symptomatique/infections opportunistes (SIDA) : le système immunitaire est très affaibli. La diminution rapide du nombre de CD4+ provient d'une augmentation de la réplication virale, liée à l'état d'activation des cellules cibles. En effet, c'est à la suite d'une co-infection par d'autres virus, bactéries, parasites, ou par des stimulations antigéniques que la production et dissémination du virus peut avoir lieu.



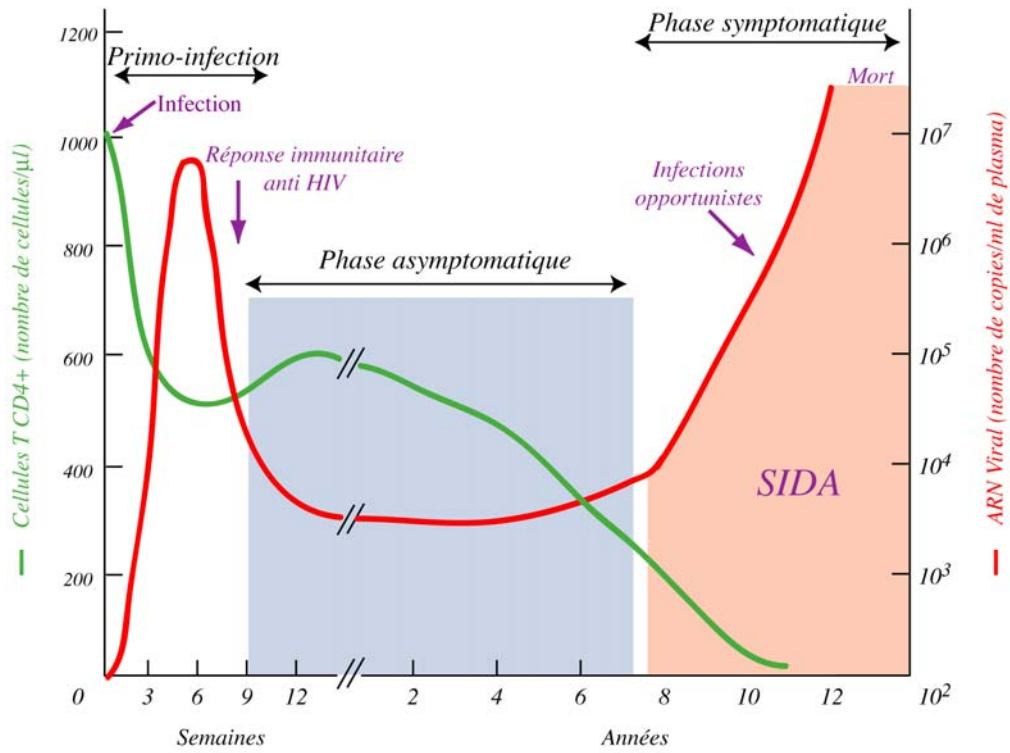


Figure 4 : Profil d'évolution de l'infection par HIV-1.

En vert est représenté la progression de la déplétion des CD4+, en rouge l'évolution de la réplication virale.



Lorsque l'immunodéficience est sévère, le risque d'infections opportunistes est élevé (pneumocystose, candidose oesophagienne, sarcome de Kaposi, toxoplasmose, lymphomes...).

C. Origine et évolution de HIV

Les années 1983 et 1986 furent marquées par la découverte des virus HIV-1 et HIV-2, qui présentent des divergences génétiques. Un autre lentivirus, responsable d'immunodépression chez les macaques d'Asie, SIVmac, fut isolé en 1985. D'autres primates d'Afrique (singes verts d'Afrique, singes de types Mandrill, Sykes...) peuvent être infectés par des virus regroupés sous le nom de SIV pour Simian Immunodeficiency Virus. Récemment, un nouveau lentivirus infectant les singes De Brazza (SIVdeb) a été identifié (41). Des alignements de séquences indiquent que SIVdeb et SIVsyk (SIV de Sykes) auraient un ancêtre commun.

Des études d'alignement de séquences génomiques ont permis d'établir un arbre phylogénétique des lentivirus de primates (Figure 5).

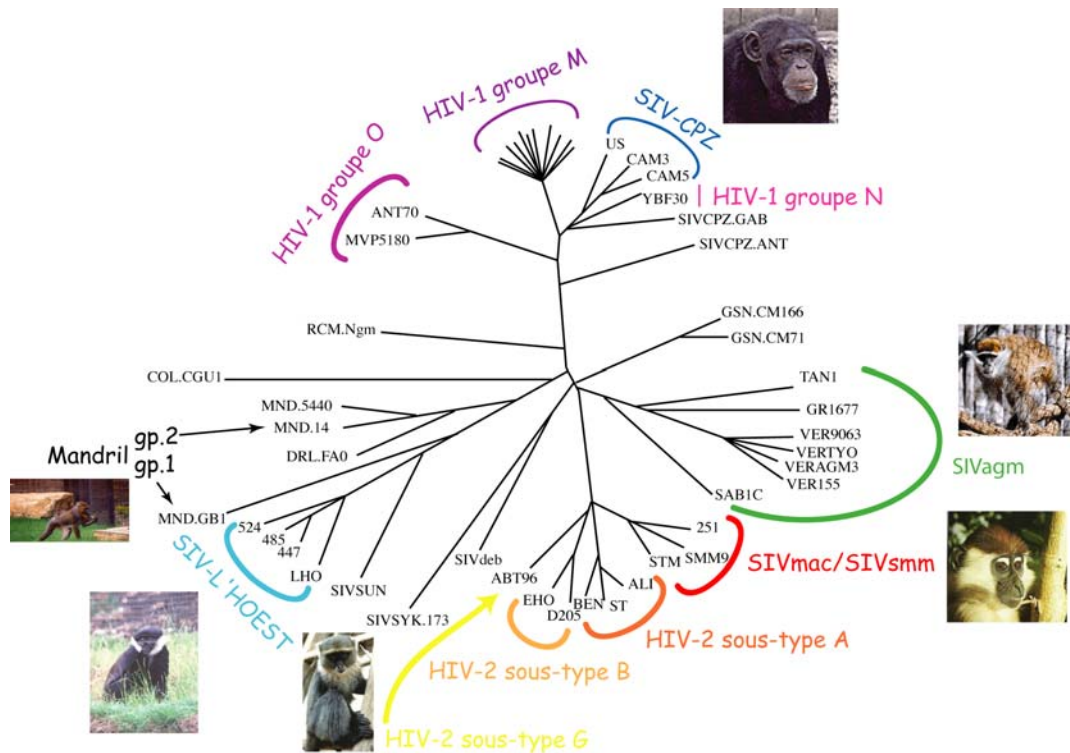


Figure 5 : Arbre phylogénétique des lentivirus de primates établi par comparaison de séquences génomiques complètes (adapté de HIV Sequence Compendium 2002 : <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/HTML/2002compendium.html>).



D'après cette phylogénie, HIV-1 et HIV-2 sont relativement éloignés, traduisant une origine différente. HIV-1 est proche de SIVcpz (SIV du chimpanzé), tandis que HIV-2 est proche de SIVsm/SIVmac (SIV de sooty mangabey/SIV du macaque). Ces comparaisons de séquences laissent supposer une transmission inter-espèces, de différents singes à l'homme (135). Au fil du temps, une diversité génétique s'est développée. En effet, le virus HIV-1 peut être divisé en trois groupes : M, N et O. Neuf sous-types de virus non recombinants composent le groupe M (« Main »), responsable de la pandémie de SIDA : A (A1, A2), B, C, D, F (F1, F2), G, H, J et K. Les sous-types A et D, B, C se retrouvent respectivement dans les populations d'Afrique, d'Europe/Amérique du Nord/Australie, et Afrique du Sud/Inde (Figure 6). Des formes recombinantes ont également été trouvées, résultant d'une recombinaison génétique entre des virus de sous-types différents. Les sous-types à l'intérieur des groupes O (« Outlier ») et N («New » ou Non M-Non O) ne sont, à l'heure actuelle, pas clairement définis. Ils proviennent tous de deux événements distincts de transmission inter-espèces du chimpanzé à l'homme. HIV-2 est quant à lui responsable de cas de SIDA principalement en Afrique de l'Ouest et est composé de sept sous-types : A, B, C, D, E, F et G.

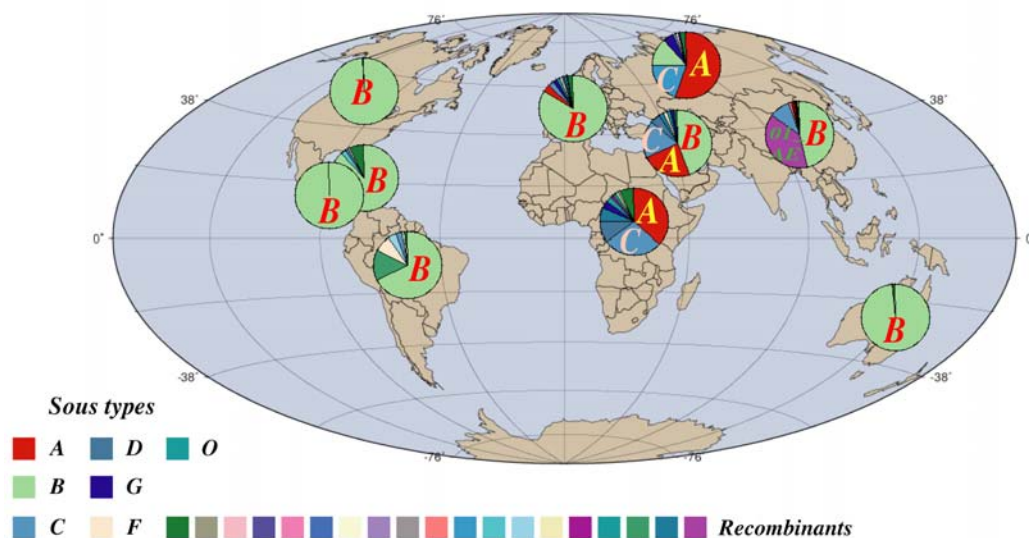


Figure 6 : Répartition géographique des sous-types de HIV-1 dans le monde en 2001.



II. Organisation génétique et structure du virion de HIV-1

A. Organisation génétique (Figure 7)

1. L'ADN proviral

a. Les régions non codantes

Deux séquences non codantes identiques ou LTR (Long Terminal Repeat) bordent le génome de HIV-1. Ces extrémités sont importantes à la fois pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et pour sa transcription (276). Chaque LTR se subdivise en séquences U3 (Unique en 3'), R (Redondante) et U5 (Unique en 5').

La séquence U3 (-454 à -1) contient tous les signaux requis pour la régulation de la transcription du provirus intégré par l'ARN polymérase II cellulaire (138) (Figure 8) :

* Le « core » du promoteur (-78 à -1), dont toute altération diminue très fortement l'efficacité de transcription. Il possède trois sites de fixation du facteur transcriptionnel Sp1 et une boîte TATA. Sa structure est celle d'un promoteur eucaryotique et il fixe l'ARN polymérase II et ses cofacteurs. Il permet la transcription d'ARNv à un taux basal.

* Le domaine activateur (-104 à -79) et le domaine modulateur (-454 à -105) fixent des facteurs transcriptionnels cellulaires stimulant la transcription. Toutefois une région NRE (Negative Regulatory Element) dans le domaine modulateur régule de façon négative la transcription (316).

Les séquences R (+1 à +97), U5 (+98 à +182), tout comme le PBS et la séquence « leader » situés en dehors des LTR, comportent des signaux (TAR, polyadénylation ...) agissant dans le contexte de l'ARN viral. Leur fonction sera détaillée plus loin.

b. Les régions codantes

L'ADN génomique de HIV-1 (et de tous les rétrovirus) code trois polyprotéines, Gag, Pol et Env, clivées soit par la protéase virale soit par une protéase d'origine cellulaire. Comme tous les rétrovirus complexes dont il fait partie, HIV-1 possède des gènes



additionnels codant des protéines régulatrices (Tat et Rev) et auxiliaires (Nef, Vif, Vpr, Vpr).

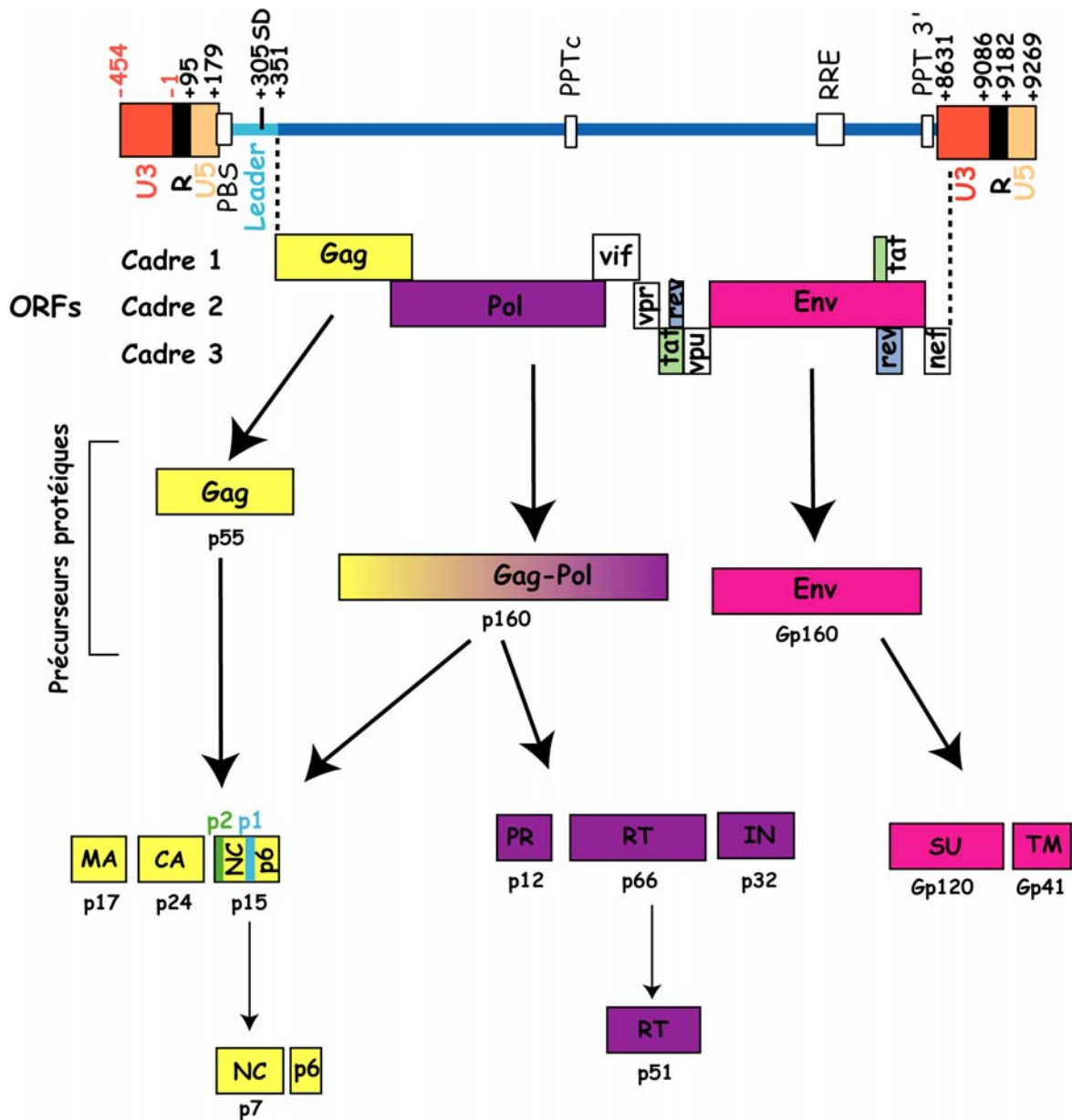


Figure 7 : Organisation génétique de HIV-1.

Le génome rétroviral est encadré de deux séquences appelées LTR, formées des régions U3 (orange), R (noir) et U5 (saumon). En italique sont notés les cadres de lecture codant les différentes protéines virales. La partie inférieure de la figure montre le devenir des trois précurseurs protéiques (Gag, Gag-Pol et Env) protéolysés en protéines de structure et en protéines enzymatiques.



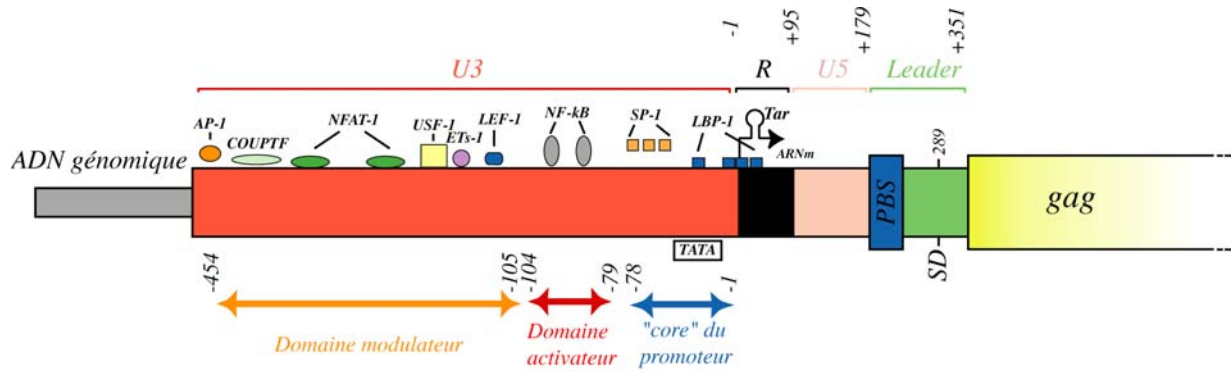


Figure 8 : *Énumération non-exhaustive des facteurs transcriptionnels cellulaires se fixant au promoteur de HIV-1, localisé dans la région LTR 5'.*

Représentation de la région LTR en 5' de l'ADN proviral intégré. Les régions régulatrices et les facteurs cellulaires associés sont indiqués par des ovales et des carrés. Le détail des différents facteurs transcriptionnels est donné dans (224, 263).

i. Les protéines de structure et enzymatique

* Le gène *gag* (« group-specific antigen ») code un précurseur polyprotéique Gag (Pr55^{Gag}) myristyllé, clivé par la protéase virale (PR) au cours de l'étape de maturation de la particule virale. Les protéines structurales de matrice (MAp17), de capsid (CAp24), p2, de nucléocapsid (NCp7) et p6 sont ainsi libérées.

* Le gène *pol* (« polymérase ») permet la synthèse d'une polyprotéine générant trois protéines enzymatiques : la protéase (PRp12) libérée par un mécanisme d'autocatalyse, l'intégrase (INp32) et la rétrotranscriptase (RTp66/p51). Ces deux dernières protéines sont clivées sous l'action de la protéase virale. Le précurseur Pol est obtenu par un décalage -1 du cadre de lecture en fin de synthèse du précurseur Gag aboutissant à la synthèse d'un précurseur Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}).

* Le gène *env* (« envelope ») code un précurseur polyprotéique glycosylé Env (Pr160^{Env}). Son clivage a lieu au cours de son transport vers la membrane plasmique par une protéase d'origine cellulaire. La polyprotéine Env permet la production d'une protéine de surface (SUgp120) et d'une protéine transmembranaire (TMgp41).



ii. Les protéines régulatrices et auxiliaires

Les gènes codant les protéines régulatrices (*tat* et *rev*), tout comme les gènes codant les protéines auxiliaires (*nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*), sont localisés de part et d'autre du gène *env*. Les protéines qui en résultent sont traduites à partir d'ARNm épissés.

* Les gènes régulateurs *tat* et *rev* codent respectivement une protéine de 14 kD : Tat (« TransAcTivator »), et une protéine de 18 kD : Rev (« REgulator of Virion expression »).

* Les gènes auxiliaires *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* codent respectivement une protéine de 25 kD myristylée : Nef (« Negative Factor »), une protéine de 23 kD : Vif (« Virion Infectivity Factor »), une protéine de 15 kD : Vpr (« Viral Protein R »), ainsi qu'une protéine de 16 kD : Vpu (« Viral Protein U »).

Les fonctions de ces protéines régulatrices et auxiliaires, cruciales pour la pathogénicité du virus, seront développées par la suite.

2. L'ARN viral

L'ARN génomique de HIV-1 est diploïde, composé de deux copies d'ARN simple brin homologue de 9,2 kb liées de manière non covalente à proximité de leur extrémité 5'. Cet ARN est coiffé et polyadénylé. Il est produit après l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte et transcription par la machinerie cellulaire. La transcription de l'ARN viral débute en 5' de la séquence R située dans le LTR 5' et prend fin en 3' de la séquence R contenue dans la séquence LTR 3'.

a. La région 5' (Figure 9) (35)

De nombreux motifs en tiges-boucles sont retrouvés en 5' de l'ARN génomique et sont impliqués dans différentes étapes du cycle réplcatif, telles que la transcription, l'épissage, la traduction, la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN génomique, ou encore la rétrotranscription et la recombinaison.

i. La séquence R en 5' et 3'

Cette région très structurée peut se diviser en 2 domaines ayant des fonctions distinctes :

* Une tige-boucle appelée TAR (Trans-Activating Response element) composée des 60 premiers nucléotides de l'ARNv. En 5' de l'ARN viral, TAR joue un rôle essentiel dans



l'activation transcriptionnelle du génome proviral, en association avec différentes protéines cellulaires et la protéine virale Tat (196).

* Une tige-boucle contenant le signal de polyadénylation (AAUAAA), en 3' de la séquence R. Malgré la présence de cette séquence aux deux extrémités du génome, ce motif n'est fonctionnel qu'en 3'. Le clivage du transcrit et l'addition de la queue poly-A se fait précisément à la frontière entre les séquences R et U5.

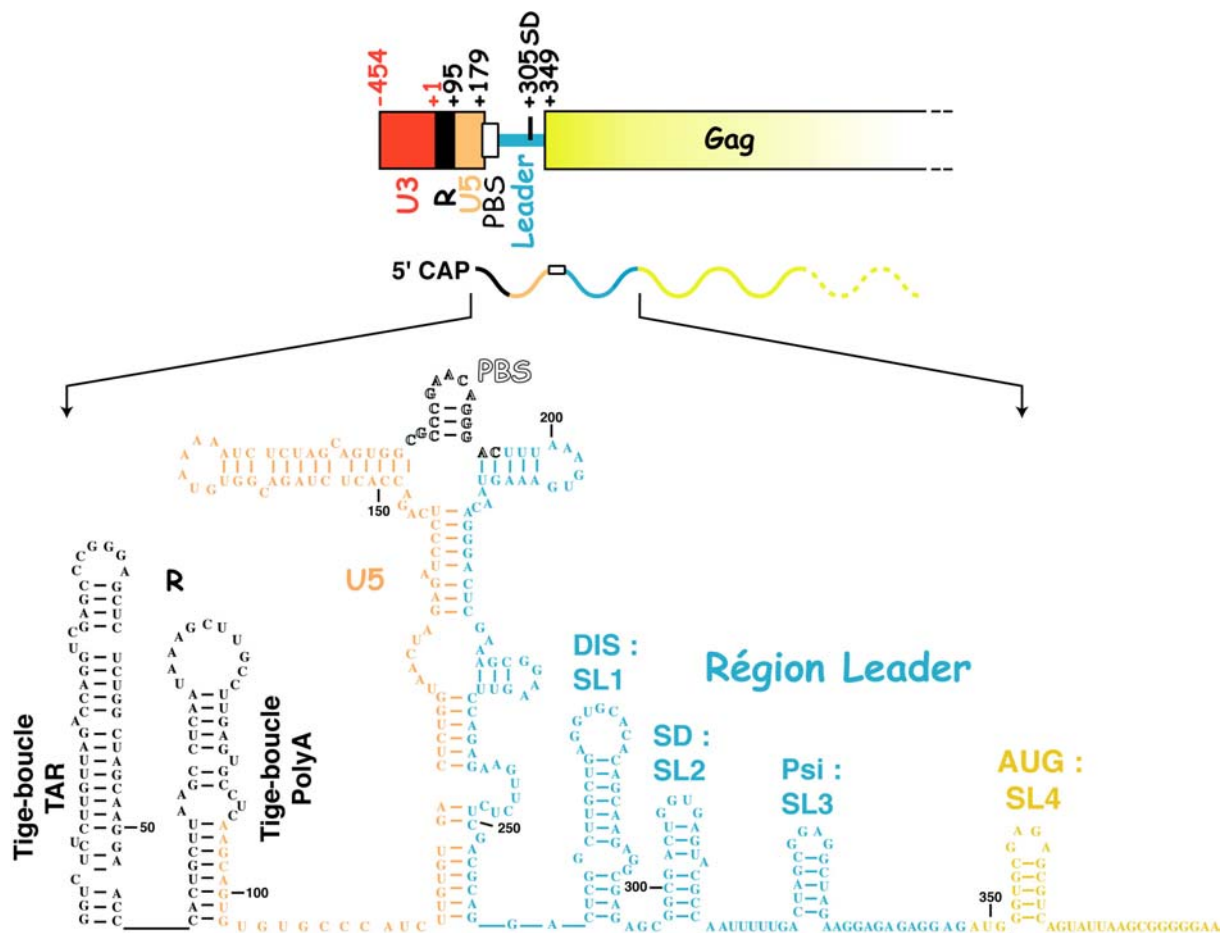


Figure 9 : Structure secondaire de la région 5' de l'isolat MAL d'HIV-1 (adaptée de (35)).



ii. La séquence PBS (Primer Binding Site)

Immédiatement en 3' de la région U5 se trouve une séquence de 18 nucléotides appelée PBS, qui fixe spécifiquement un ARNt cellulaire utilisé comme amorce. Suivant le rétrovirus, la nature de l'amorce utilisée peut être différente (234). Dans le cas de HIV-1, l'ARNt₃^{Lys} s'hybride au PBS et permet l'initiation de la rétrotranscription (204, 227).

iii. La région leader

Elle est comprise entre le PBS et le codon d'initiation de la traduction du gène *gag*. Différents motifs en tiges-boucles se situent dans cette région et sont associés :

- * A la dimérisation de l'ARN génomique, avec la tige-boucle du DIS (Dimerization Initiation Site), contenant une séquence palindromique (GUGCAC dans l'isolat MAL) (255).
- * A l'épissage, avec un site donneur d'épissage majeur : SD (249).
- * A l'encapsidation, avec une structure appelée Psi (Packaging signal) (38).

b. Les signaux internes

i. Les sites d'épissage

L'ARN viral peut être mono ou multi-épissé. Le nombre important de sites donneurs (SD) et accepteurs d'épissage (SA) permet de multiples épissages alternatifs (249, 273), aboutissant à plus de 30 ARN messagers différents.

ii. La séquence RRE (Rev-Responsive Element)

Cette séquence de 234 nt, située au sein du gène *env*, est composée de différentes tiges-boucles importantes pour sa fonction. Elle se retrouve dans tous les ARN viraux non ou mono-épissés et est impliquée dans l'export nucléaire de ces transcrits. Ce mécanisme nécessite la protéine virale Rev (228, 369) et la machinerie de transport de la cellule hôte (114, 247, 335).

iii. Les séquences polypuriniques PPT 3' (PolyPurine Tract 3') et PPTc (PPT central)

L'activité RNase H de la rétrotranscriptase dégrade l'ARN génomique viral au cours de la synthèse d'ADN double brin ou rétrotranscription, à l'exception de deux séquences riches



en purines qui serviront d'amorces à la synthèse du brin d'ADN (+). Le PPT 3' se situe immédiatement en amont de la séquence U3 du LTR en 3' du génome proviral, tandis que le PPTc est localisé dans le cadre ouvert de lecture du gène *pol* (72).

B. Structure du virion (Figure 10) (120, 340)

La morphologie et l'architecture des particules virales immatures et matures ont été étudiées par microscopie électronique et cryoélectromicroscopie (40, 96, 140, 141). Les virions matures et infectieux ont une forme sphérique, d'un diamètre allant de 110 à 130 nm. Ils sont enveloppés d'une membrane phospholipidique cellulaire à l'intérieur de laquelle se trouve un « core » en forme de cône dense aux électrons. Ce « core » contient l'ARN génomique viral, des ARN d'origine cellulaire ainsi que des protéines virales et cellulaires.

1. L'enveloppe

Elle est constituée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule infectée lors du bourgeonnement du virion. Cependant, le taux de cholestérol à l'intérieur de l'enveloppe virale est supérieur à celui retrouvé dans la membrane cellulaire. (11). Des protéines d'origine cellulaire, telles que les molécules HLA, ICAM-1 (253), y sont sélectivement insérées, tout comme les protéines virales d'enveloppe SUgp120 et TMgp41. Ces deux glycoprotéines forment des trimères à la surface de la particule virale, chaque monomère étant constitué de deux sous-unités SUgp120 et TMgp41 associées de façon non covalente. Ce complexe reconnaît spécifiquement des récepteurs cellulaires et permet la fusion des membranes virale et cellulaire.

2. La matrice (MAp17)

La protéine de matrice (MA), myristylée à son extrémité N-terminale, est obtenue après clivage protéolytique du précurseur Gag. Des études de RMN (333) ont montré qu'il existe un équilibre entre une forme monomérique (après clivage protéolytique de Gag) et trimérique (sous forme de précurseur Gag) de cette protéine séquestrant ou exposant respectivement le groupement myristique. Sous la forme trimérique, la myristilation ainsi qu'une région basique conservée, à la surface du domaine matrice de Gag, sont impliquées dans la régulation de la localisation de la polyprotéine Gag au cours de l'assemblage du virion (367, 377). En effet, des centaines de précurseurs protéiques Gag co-localisent à la surface de la membrane



plasmique, au niveau de radeaux lipidiques (lipid rafts), *via* le domaine matrice (248) ce qui peut expliquer la teneur en cholestérol dans le virion. La forme monomérique de MA peut se dissocier de la membrane, interagir avec le complexe de pré-intégration (PIC) (242) et jouer un rôle dans sa localisation nucléaire.

A.



B.

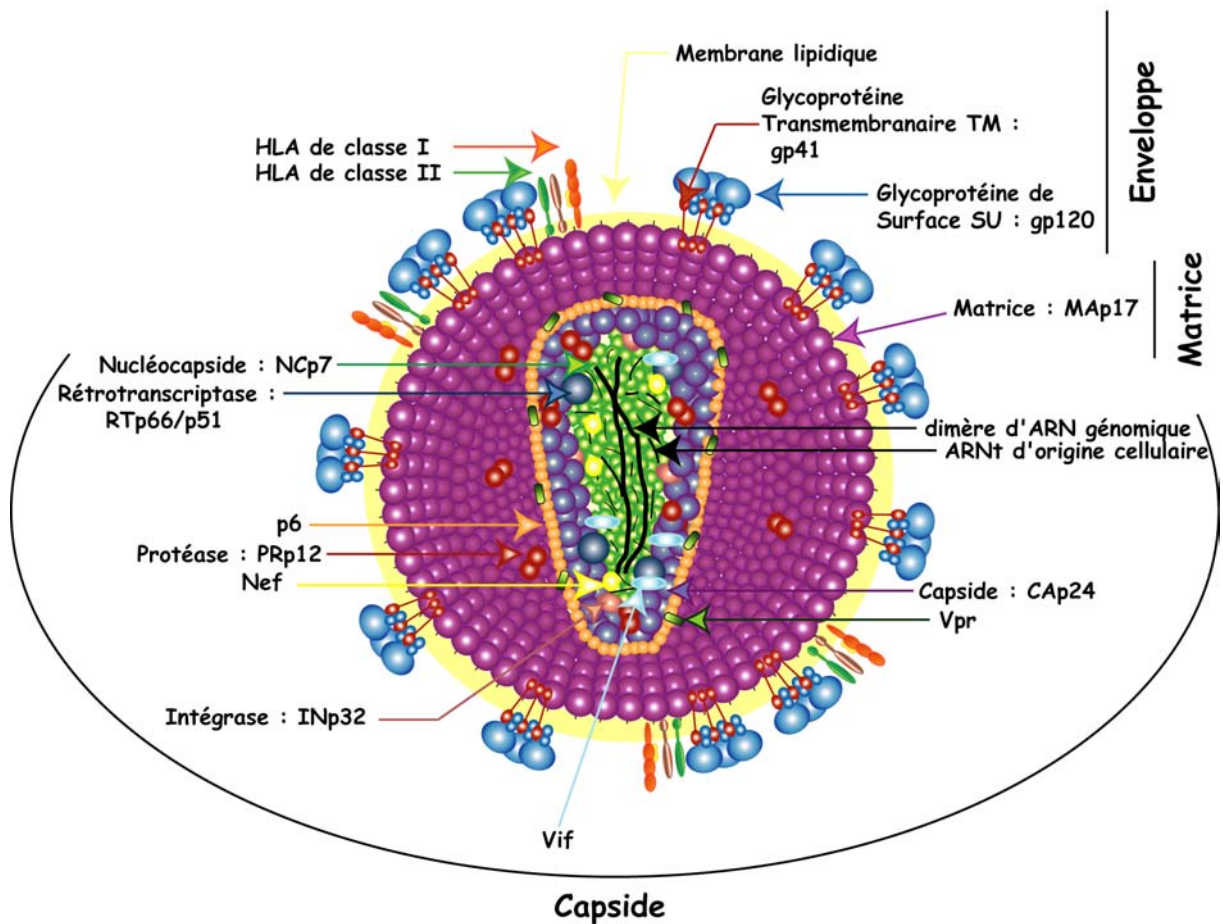


Figure 10 : Structure de la particule virale du HIV-1.



A : Particules virales matures vues en cryomicroscopie électronique ; B : Représentation schématique indiquant les constituants d'une particule virale mature. Les protéines cellulaires encapsidées ne sont pas indiquées.

3. La capsid

Au cours de l'étape de maturation du virus, la protéine virale de capsid (CA) oligomériser et forme une capsid ou « core » du virus, de forme conique, qui entoure un complexe ribonucléoprotéique. On y retrouve les deux molécules d'ARN génomique recouvertes et protégées par la protéine de nucléocapsid (NCp7), et toutes les enzymes nécessaires à la réplication virale comme la rétrotranscriptase (RTp66/p51), la protéase (PRp12) et l'intégrase (INp32). De plus, des protéines et ARNt d'origine cellulaire, dont l'ARNt₃^{Lys}, sont encapsidés.

a. La protéine de capsid (CAp24)

La protéine virale de capsid ou CAp24 est composée de deux domaines structuraux indépendants, le domaine N-terminal d'assemblage (NTD) et le domaine C-terminal de dimérisation (CTD) (134, 143, 243). La capsid joue un rôle à la fois dans les étapes précoces (infectivité, réplication) et tardives du cycle réplcatif (assemblage). L'implication du domaine NTD dans l'infectivité de la particule virale serait liée à son interaction avec une protéine cellulaire, la cyclophiline A (Cyp A, une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase) (100, 298). Cette protéine chaperone (1 Cyp A pour 10 CA), modifie la structure de la capsid (3, 44) et faciliterait l'étape de décapsidation.

b. La nucléocapsid (NCp7) (24)

La protéine virale de nucléocapsid NCp7, obtenue après clivage protéolytique du précurseur Gag, est une petite protéine basique, caractérisée par deux motifs en doigts de zinc très conservés, CX₂CX₄HX₄C, connectés par une séquence basique (293). Se fixant spécifiquement aux acides nucléiques *via* les deux doigts de zinc, cette protéine est impliquée dans de nombreux processus tels que :

* L'encapsidation de l'ARN génomique (39, 105, 146) et l'assemblage de la particule



virale en favorisant l'oligomérisation du précurseur Gag.

* La protection de l'ARN viral des nucléases (89).

* La restructuration de l'ARN génomique, la stabilisation du dimère d'ARN (128) et du « core » des particules virales.

* L'hybridation des acides nucléiques (270, 269, 268) (ARN/ARN : hybridation de l'amorce, l'ARNt₃^{Lys} à l'ARNv (55, 291) et ARN/ADN durant le transfert de brin) grâce à son activité chaperonne (154, 277, 357).

c. La protéine p6

Le domaine p6 se situe à l'extrémité C-terminale du précurseur polyprotéique Gag. La protéine p6 possède un motif riche en proline PTAP qui joue un rôle essentiel dans l'exocytose de la particule virale (151). De plus, p6 permet l'incorporation dans le virion de la protéine virale Vpr.

d. Le peptide p2

Le peptide p2 situé entre la CA et la NC du précurseur polyprotéique Gag, participe à la sélection des ARNv non épissés au cours de l'encapsidation (296).

e. Les protéines enzymatiques (120)

Toutes les protéines virales enzymatiques sont obtenues après maturation du précurseur Gag-Pol.

i. La protéase (PRp12) (241)

Cette aspartyl protéase est active sous forme d'homodimère dont le site actif se situe à l'interface des deux sous-unités et contient une triade catalytique (Asp25, Thr26 et Gly27). Elle est produite à partir du précurseur Gag-Pol par un mécanisme d'autocatalyse, étape cruciale du cycle répliatif. En effet, ce clivage est accompagné de la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol libérant respectivement les protéines de structure (MA, CA, NC, p2 et p6) et enzymatiques (PR, RT et IN) après bourgeonnement du virus. Cette étape entraîne un réarrangement conformationnel des particules virales qui permet de produire des particules virales matures infectieuses.



ii. La rétrotranscriptase (RTp66/p51)

Cette enzyme est tout d'abord produite sous forme d'homodimère composé de deux sous-unités p66 et subit une étape de maturation conduisant à la formation d'un hétérodimère p66/p51 (dont la structure sera développée ultérieurement) (183, 206). La RT est une enzyme multifonctionnelle qui catalyse la synthèse d'ADN proviral à partir d'une matrice ARN. Elle possède une activité ADN polymérase ARN et ADN dépendante ainsi qu'une activité endonucléase (RNase H), polymérase dépendante ou indépendante, qui dégrade spécifiquement l'ARN dans les duplex ARN/ADN formés au cours de la rétrotranscription. La sous-unité p66 possède ces deux sites actifs tandis que la sous-unité p51 résultant du clivage en C-terminal de p66 est dépourvue du domaine RNase H. Dans l'hétérodimère, seule la sous-unité p66 est catalytiquement active, la sous-unité p51 jouant un rôle structural (217).

iii. L'intégrase (INp32)

L'intégrase de HIV-1 est composée de trois domaines structuraux et fonctionnels : un domaine N-terminal fixant le zinc (61) qui facilite l'oligomérisation, un domaine central catalytique et un domaine C-terminal de fixation à l'ADN (75, 350). Elle est essentielle pour l'intégration de l'ADN génomique viral dans le génome de la cellule infectée et reconnaît spécifiquement les extrémités 5' et 3' des deux LTR.

f. Les protéines auxiliaires

A l'inverse des protéines auxiliaires Vpr (1, 207), Nef (208) et Vif (62) qui se retrouvent dans la particule virale, les protéines régulatrices Tat et Rev et la protéine auxiliaire Vpu ne sont pas encapsidées.

i. La protéine Virale R : Vpr

La protéine virale Vpr est très conservée et possède plusieurs fonctions : elle joue un rôle dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et diminue le taux de mutations au cours de la rétrotranscription en recrutant l'uracyl ADN glycosylase (230, 76). De plus, elle conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (144) (en activant la voie ATR, une voie de signalisation stimulée lors de dommages de l'ADN (294)) et augmente l'activité des promoteurs transcriptionnels et ainsi la production virale (2, 351).

ii. Facteur Négatif : Nef

Nef est une protéine virale myristylée et contrairement à sa démonimation initiale, elle



agit comme facteur positif en augmentant la réplication virale et l'infectivité. Elle intervient entre autres :

- * En réduisant le nombre de récepteurs CD4 (5) et CMH-1 (84, 308) à la surface des cellules infectées, soit en inhibant leur transport vers la membrane plasmique, soit par un mécanisme d'endocytose.
- * En augmentant l'incorporation de protéines d'enveloppe dans la membrane plasmique (305).
- * En recrutant un répresseur transcriptionnel (Eed) à la surface de la membrane. Cette interaction stimule la transcription Tat-dépendante (358).

iii. Facteur d'Infectivité Virale : Vif (329)

Vif est une protéine basique, indispensable à la pathogénèse, toutefois son rôle est longtemps resté mystérieux. Récemment il a été montré que Vif empêche l'encapsidation d'une cytidine déaminase, APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G, ou CEM15) et entraîne sa dégradation. Cette enzyme est connue pour sa fonction dans l'édition de l'ADN ($C \Rightarrow U$) (159) et conduit à une hypermutation du matériel génétique viral ($G \Rightarrow A$) au cours de la synthèse du brin (-) de l'étape de rétrotranscription (218, 229, 372). Ces modifications conduisent soit à la dégradation de l'ADN hypermuté par des enzymes cellulaires d'excision-réparation, soit à la production de protéines virales non fonctionnelles. Récemment une deuxième cytidine déaminase, APOBEC3F, a été identifiée (352, 376). Comme pour APOBEC3G, Vif empêche son encapsidation.

Vif, qui interagit spécifiquement avec l'ARN viral (99, 199, 371) et avec les précurseurs protéiques Gag ou Gag-Pol (174), est encapsidée au sein d'un complexe nucléoprotéique. A ce jour, le taux d'encapsidation de Vif reste incertain, entre 1 et 100 protéines par virion. De plus, Vif pourrait stabiliser le « core » du virus (161, 250). Enfin, Vif semble être clivé par la protéase virale au sein du virion (200). Cette coupure pourrait entraîner un changement conformationnel de Vif et dévoiler de nouvelles fonctions.

g. Autres constituants encapsidés (253)

A cause des difficultés techniques de purification des particules virales (distinction entre protéines virales et contaminations par des protéines adhérentes à la surface du virion et par



des microvésicules), la composition exacte des particules virales reste controversée. On y retrouve un grand nombre de protéines cellulaires, interagissant ou non avec des composants viraux :

- * L'actine (interagit avec la NC) (356) avec ses partenaires protéiques (EF-1 α , ezrin, moesin, cofilin et HS-1).
- * Des protéines chaperones, comme la cyclophiline A (interagit avec CA) (53), deux peptidyl-prolyl isomerase, Hsp70...
- * Staufen (interagit avec l'ARN viral) (244).
- * Des ARNt synthétases (la lysyl-ARNt synthétase (70) (interagit avec Pol) et l'histidyl-ARNt synthétase like (HO3) (211) (qui a pour partenaire MA)).



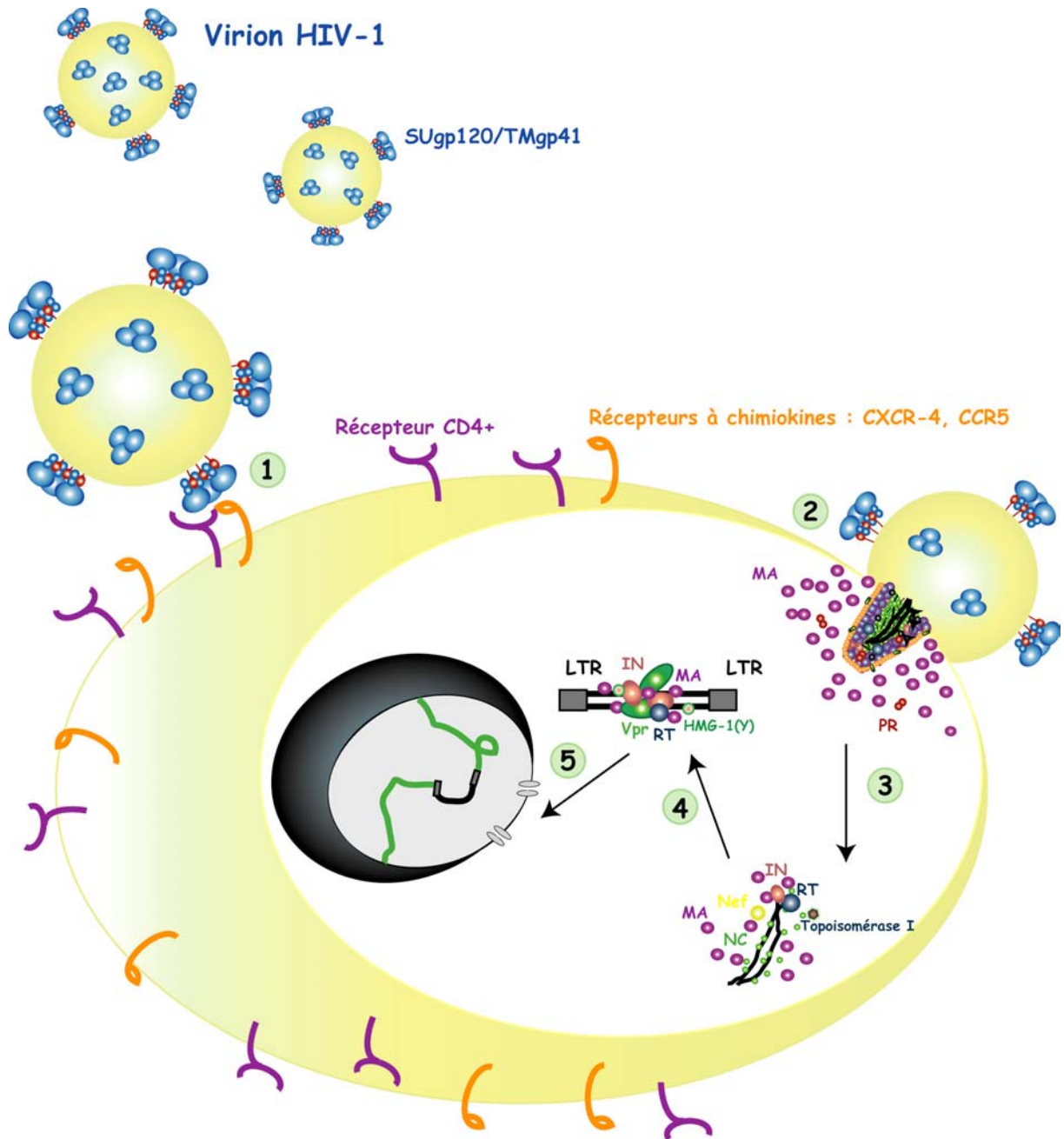


Figure 11 : *Le cycle répliatif : la phase pré-intégrative.*

1 : Fixation SUgp120/CD4⁺-récepteur à chimiokines ; 2 : Fusion des deux enveloppes, entrée du virus dans la cellule et désassemblage ; 3 : Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral double brin ; 4 : Formation du complexe de pré-intégration, PIC ; 5 : Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.



- * L'ubiquitine (sous forme libre ou associé à p6^{Gag} mono ou bi-ubiquitinylé).
- * Une uracyl DNA glycosylase (254, 327, 328).
- * Tsg101 (interagit avec p6) (98).
- * Une thioltransferase...

III. Le cycle répliatif de HIV-1

Le cycle répliatif de HIV-1 peut se diviser en deux phases principales :

* Une phase pré-intégrative, qui débute par la reconnaissance de la cellule hôte, l'entrée du virus, et sa décapsidation se poursuit par l'étape de rétrotranscription, l'import nucléaire du génome viral et se termine par l'intégration de l'ADN proviral. Ces étapes sont principalement réalisées par les protéines virales présentes dans le virion.

* Une phase post-intégrative, comprenant la transcription du provirus intégré, la traduction des protéines virales, l'assemblage jusqu'au bourgeonnement et la maturation du virion. Au cours de cette phase, le virus détourne les machineries cellulaires de transcription, d'épissage, de transport, et de traduction, qui sont régulées par certaines protéines virales (Tat, Rev...).

A. La phase pré-intégrative (Figure 11)

1. La reconnaissance, la fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule hôte (Figure 13)

A la surface de la particule virale, la glycoprotéine d'enveloppe TMgp41 s'associe sous forme de trimère, chaque monomère étant lié de façon non covalente avec une glycoprotéine d'enveloppe SUgp120. La protéine TMgp41 est constituée de trois domaines : intracellulaire (endodomaine), transmembranaire (TM) et extracellulaire (ectodomaine) (Figure 12).

L'entrée du virus et la libération de son matériel génétique dans la cellule cible nécessite trois étapes (86):

* L'attachement du virus à la cellule cible, *via* une reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur cellulaire CD4 principalement présent à la



surface des lymphocytes et des macrophages (88, 225). L'interaction CD4/gp120 seule ne

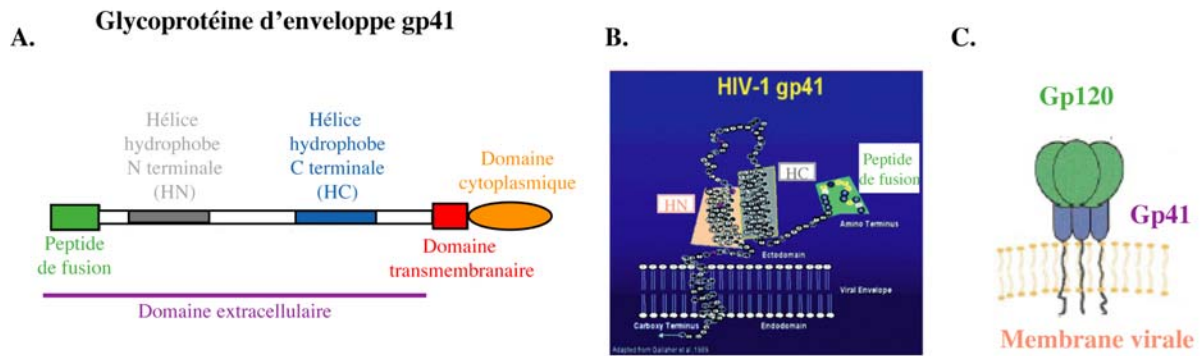


Figure 12 : Structure de la glycoprotéine d'enveloppe gp41.

A : La glycoprotéine d'enveloppe gp41 possède trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire. Le domaine extracellulaire est essentiel pour la fusion membranaire et contient le peptide de fusion, qui s'ancre dans la membrane de la cellule hôte lors de la fusion, et deux séquences hydrophobes, riches en leucine, formant des hélices alpha ; B : Sous forme monomérique, les hélices N et C terminales s'associent et forment une structure secondaire de type "coiled coil" ; C : Sous forme trimérique, les hélices N terminales s'associent entre elles et forment une structure centrale de type "coiled coil", entourée par les trois hélices C terminales. Dans la conformation native du trimère gp120/gp41, le peptide de fusion est inaccessible.

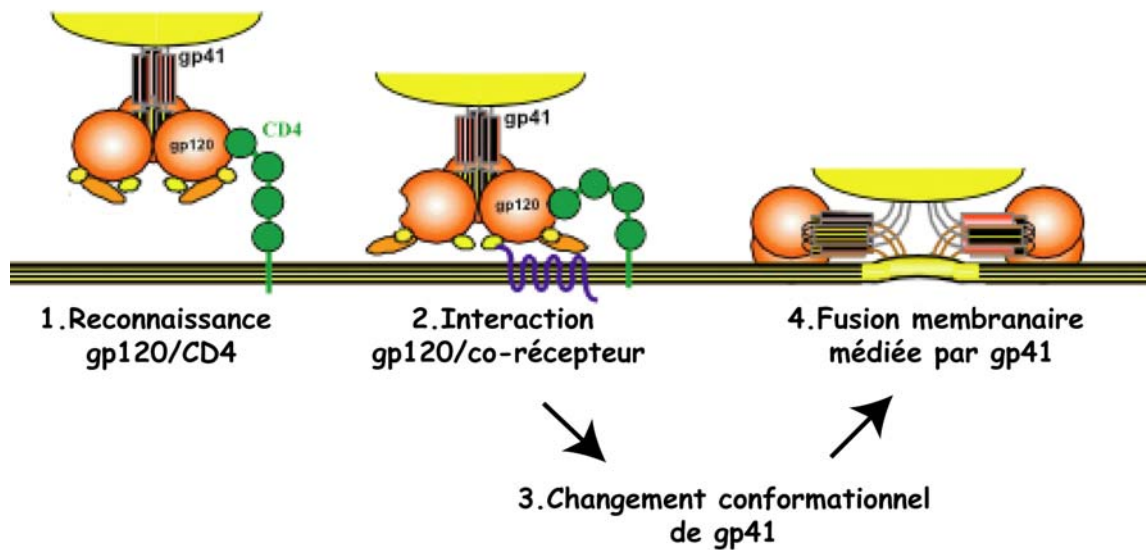


Figure 13 : Représentation schématique des quatre étapes d'entrée du virus dans la cellule cible.

1 : Reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur CD4 présent à la surface de la cellule cible ; 2 : Cette interaction entraîne un changement conformationnel de gp120 requis pour la reconnaissance et l'interaction avec le co-récepteur CCR5 ou CXCR-4 ; 3 : Dans la structure native du trimère gp120/gp41, le peptide de fusion est inaccessible. L'association du complexe gp120/CD4 au co-récepteur aboutit à l'exposition du peptide de fusion de gp41, qui s'ancre dans la membrane de la cellule hôte, et à l'exposition des hélices N terminales ; 4 : Le rapprochement des deux membranes et leur fusion est facilité par un réarrangement conformationnel de gp41, qui conduit à la formation de trois motifs structuraux de type "coiled coil" résultant d'une interaction entre



les hélices N et C terminales de chaque monomère.

suffit pas à l'infection des cellules cibles. Cependant, elle permet un changement conformationnel de la gp120 exposant la boucle V3 enfouie à l'intérieur de la protéine gp120. Ce domaine à séquence hypervariable est responsable du tropisme viral car il interagit de façon sélective avec le co-récepteur de la cellule cible.

* L'association du complexe gp120/CD4 au co-récepteur aboutit à l'exposition du peptide de fusion de gp41, une séquence hydrophobe située à l'extrémité N terminale du domaine extracellulaire. La fusion est induite par l'insertion du peptide de fusion dans la membrane plasmique de la cellule hôte, facilitant ainsi le rapprochement et la fusion des membranes cellulaire et virale. Deux types de co-récepteurs sont impliqués dans l'entrée du virus : CXCR-4 et CCR5 (récepteurs aux chimiokines). Ils vont définir le tropisme des différentes souches d'HIV-1 : les isolats M (Macrophage)-tropiques (R5) utilisent les co-récepteurs CCR5, tandis que CXCR-4 facilite l'entrée des souches T (lymphocytes T)-tropique (X4). Les deux co-récepteurs peuvent être utilisés par des souches dites à double tropisme (R5/X4). Des individus homozygotes $\Delta 32$ -CCR5, possédant un gène CCR5 déficient, présentent une résistance innée contre une infection par des souches à tropisme positif pour les macrophages, transmises le plus fréquemment.

* La fusion des deux membranes est suivie par l'entrée de la capsid dans la cellule infectée.

Il est à noter qu'une interaction peut avoir lieu entre gp120 et les récepteurs nommés DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin) présents à la surface des cellules dendritiques. Cette reconnaissance est impliquée dans le transport des virus vers les ganglions lymphatiques où ils pourront infecter efficacement les cellules CD4⁺ (139, 341).

2. Les étapes de décapsidation et de rétrotranscription

Suite à la fusion entre les membranes virale et cellulaire, la capsid est relarguée dans le cytoplasme de la cellule hôte où elle est déstructurée. Cette étape encore peu connue porte le nom de décapsidation. La cyclophiline A, présente dans les particules virales et associée au « core », jouerait un rôle dans le processus de décapsidation (4, 223). Un complexe viral nucléoprotéique appelé complexe de rétrotranscription est ainsi libéré. Il contient l'ARN génomique viral, l'ARNt₃^{Lys}, et différentes protéines virales et cellulaires. La synthèse de l'ADN proviral double brin à partir de l'ARN viral (servant de matrice) et de l'ARNt₃^{Lys}



(utilisé comme amorce) est réalisée au cours de l'étape nommée rétrotranscription, sous l'action de la rétrotranscriptase virale ou RT. Cette étape sera décrite dans le chapitre II. D'autres protéines virales et cellulaires seraient impliquées dans la régulation de la rétrotranscription, notamment les protéines MA (203), Nef (6), Vif (145), la NC (220), l'IN (362, 378), Tat (157), la cyclophiline A (337), Vpr (325) et la topoisomérase I (330).

3. Le transport intranucléaire de l'ADN proviral (57, 315) (Figure 14)

Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par leur capacité à infecter des cellules qui ne se divisent pas, comme les macrophages. Pour cela, ils transportent leur matériel génétique sous forme de complexe de pré-intégration (ou PIC pour « Pre-Integration Complex ») à travers les pores de l'enveloppe nucléaire. Le PIC est obtenu après l'étape de rétrotranscription et comprend l'ADN proviral néosynthétisé, différentes protéines virales, dont l'intégrase, la MA, la RT, Vpr (58) et des protéines cellulaires HMG-I(Y) (« High Mobility Group ») (115). Des signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été retrouvés dans l'intégrase (49, 132), la MA (59, 155) et Vpr (185). Il semblerait que ces motifs, tout comme le « central DNA flap » (14, 370), un intermédiaire à trois brins généré lors de la terminaison de la rétrotranscription (voir chapitre II.I), facilitent l'import nucléaire du PIC. Cependant de nombreuses controverses subsistent quant au rôle de chacun de ces éléments dans le mécanisme d'import nucléaire (264).

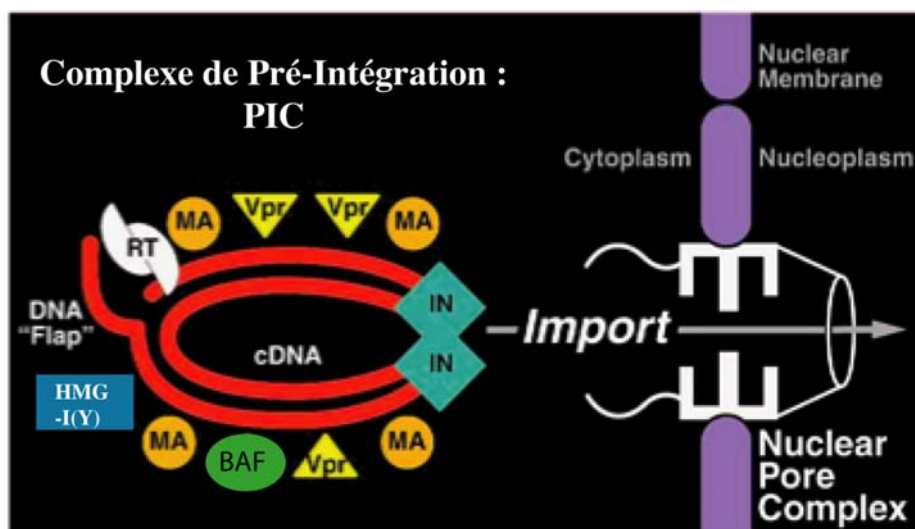


Figure 14 : Le complexe de pré-intégration ou PIC.

Le PIC est composé de l'ADN proviral présentant un "flap" central, de protéines virales (MA, Vpr, IN, RT) et de protéines cellulaires (HMG-I(Y), BAF).



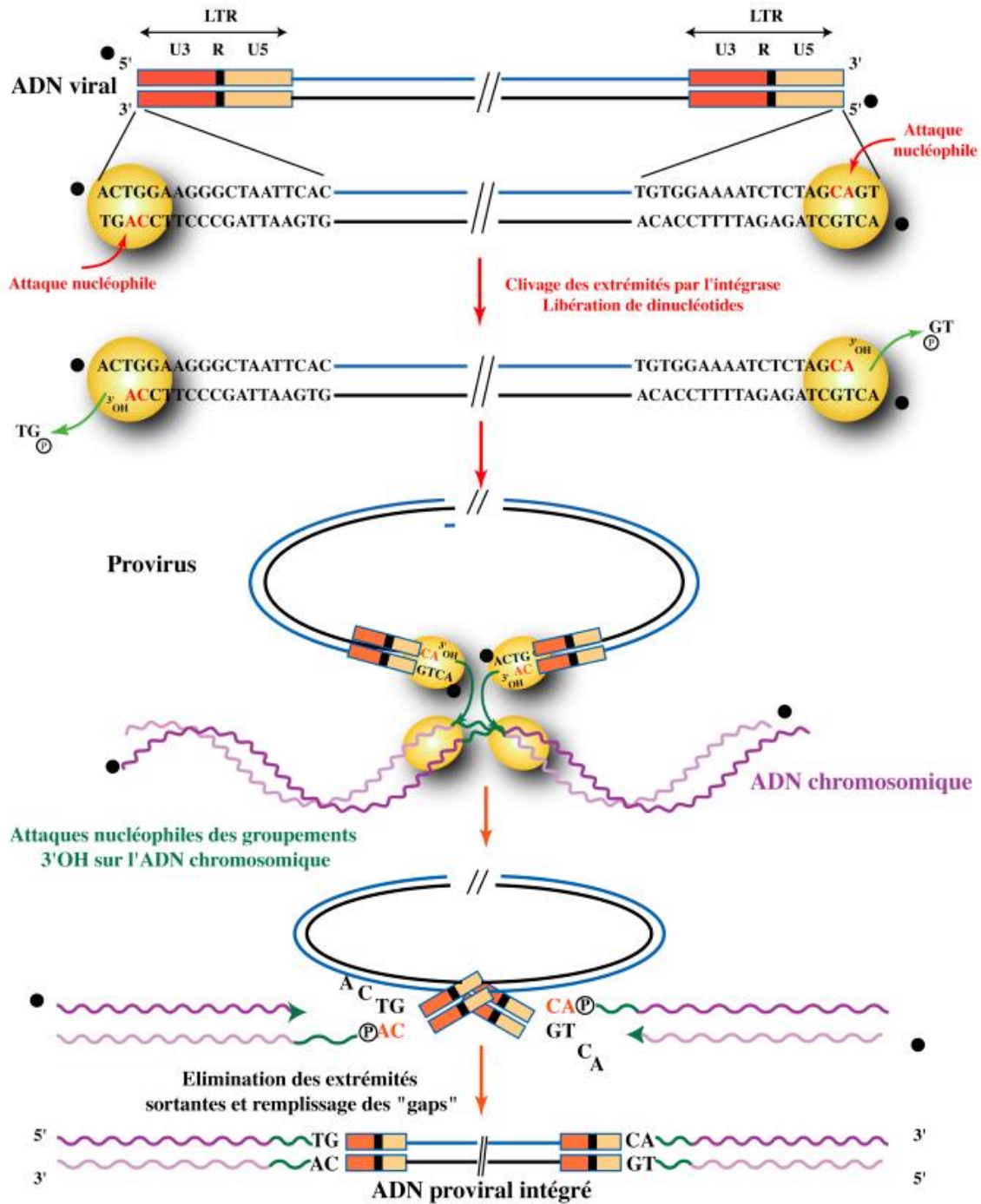


Figure 15 : *Intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.*
 Les extrémités franches de l'ADN proviral sont attaquées par l'intégrase et les deux nt adjacents au dinucléotide CA, hautement conservés, sont éliminés par attaque nucléophile d'une molécule d' H_2O , libérant une extrémité 3'-hydroxyle. L'intégrase clive l'ADN de l'hôte et les extrémités 3'-hydroxyle de l'ADN proviral sont liguées aux extrémités 5' phosphate de l'ADN hôte par l'intégrase. Après élimination des extrémités sortantes, les discontinuités générées au niveau des sites de ligation sont réparées par les enzymes cellulaires. Les extrémités 5' sont représentées par des sphères noires.

4. L'intégration de l'ADN proviral (Figure 15)

Après l'import nucléaire, l'ADN proviral est intégré dans le génome de la cellule hôte. Cette réaction est catalysée par l'intégrase virale qui reconnaît spécifiquement les deux LTR aux extrémités de l'ADN viral. A chaque extrémité 3' l'intégrase clive un dinucléotide GT, libérant un dinucléotide CA porteur d'une extrémité 3'-hydroxyle. Cette étape porte le nom de « 3' processing ». Par la suite, cette enzyme clive l'ADN génomique cellulaire qui est la cible de la deuxième réaction appelée transfert de brin. Elle implique une étape de transestérification au cours de laquelle les extrémités 3'-OH de l'ADN proviral sont liguées par l'intégrase aux extrémités 5' phosphate de l'ADN cellulaire. Après l'élimination des extrémités sortantes, les enzymes cellulaires réparent les discontinuités obtenues au niveau des sites de ligation sans quoi la réplication ne peut avoir lieu. Les protéines cellulaires HMG-I(Y) et BAF (Barrier to autointegration) (74) sont requises pour une intégration efficace, cependant leurs fonctions restent mal connues. Les sites d'intégration de l'ADN proviral sont multiples et la plupart des cellules infectées possèdent plus d'un provirus intégré (191). La présence de sites préférentiels d'intégration (« hotspots ») dans des gènes qui sont activés à la suite d'une infection cellulaire par HIV-1 (306) a récemment été proposée. Comme pour HIV, l'intégration ne se fait pas de façon aléatoire chez les rétrotransposons Ty de levure. Par exemple, le rétrotransposon Ty3 s'intègre de manière quasi-exclusive au site d'initiation de la transcription de gènes dépendant de l'ARN polymérase III (71).

Il est à noter que dans 99% des cas l'ADN proviral soit reste sous forme linéaire et est dégradé, soit se circularise pour former des « cercles » à 1 ou 2 LTR (79). Aucune de ces formes circulaires ne donne de virus infectieux bien que certaines puissent être transcrites de façon modérée et permettre la synthèse de Tat et de Nef (363, 364).



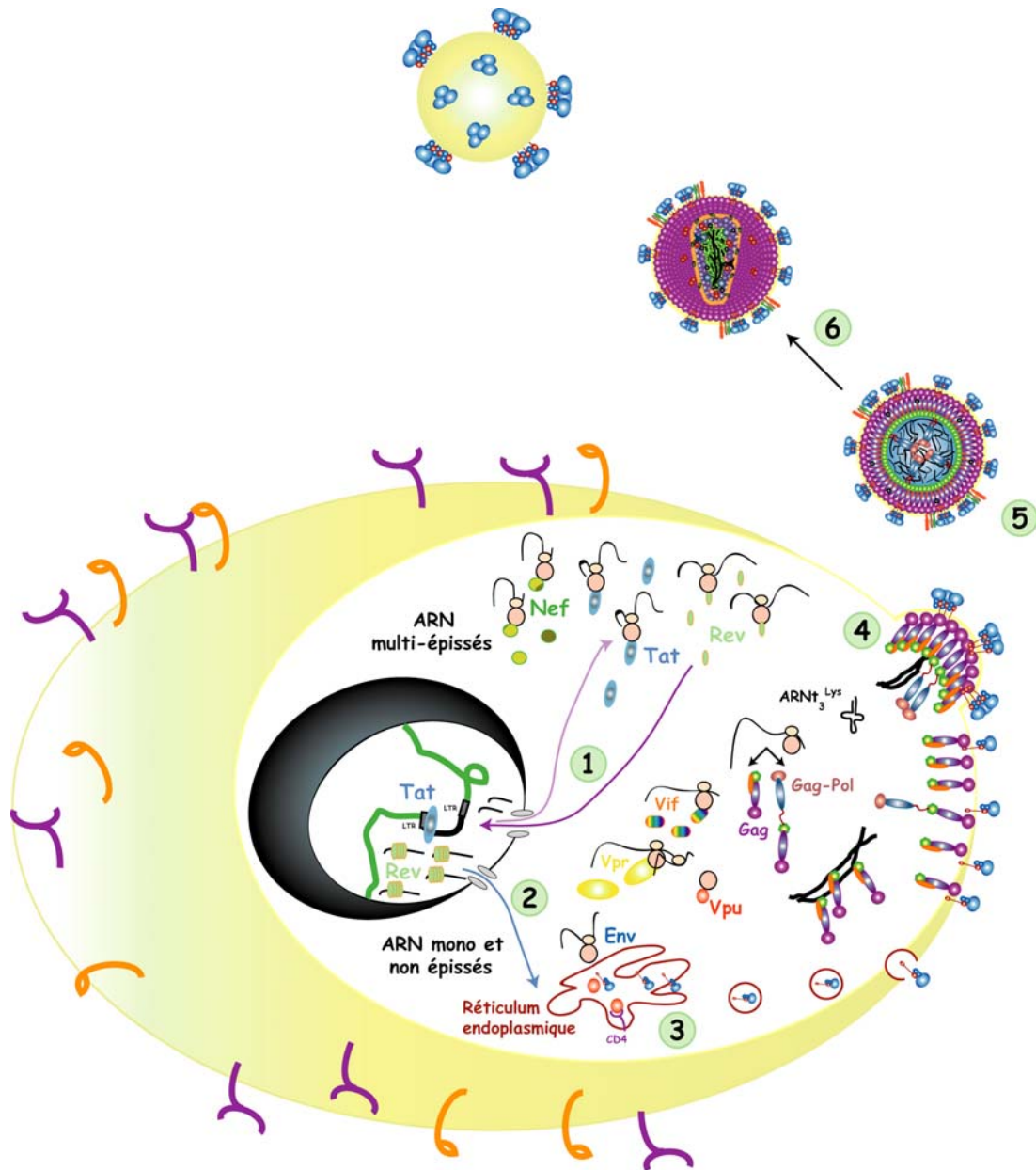


Figure 16 : *Le cycle rétroviral : la phase post-intégrative.*

1 : Expression/traduction des ARNm multi-épissés ; 2 : Expression/traduction des ARNm mono- et non-épissés sous l'influence de Tat et Rev ; 3 : Synthèse dans le réticulum endoplasmique des protéines Env et inhibition de l'expression de CD4 par Vpu ; 4 : Assemblage à proximité de la membrane ; 5 : Bourgeonnement d'une particule immature ; 6 : Maturation et obtention d'un virion infectieux.



B. La phase post-intégrative (Figure 16)

Cette phase débute par la synthèse d'ARN messagers viraux, qui sont éventuellement épissés puis transportés dans le cytoplasme en vue de leur traduction ou encapsidation, et se termine lors du bourgeonnement et de la maturation du virus.

1. Expression de l'ADN proviral

La structure de la chromatine (hétérochromatine) joue un rôle de répresseur transcriptionnel permettant à l'ADN viral de rester sous une forme latente et d'échapper aux traitements anti-rétroviraux. Son expression dépend de l'état d'activation de la cellule hôte (stress, différenciation cellulaire, activation immunitaire...) et d'une protéine virale, Tat.

L'expression du génome viral peut se diviser en deux phases, précoce et tardive, suivant le type d'ARN messagers présents dans le cytoplasme. Ces ARNm viraux conduisent à la synthèse de protéines structurales, enzymatiques, auxiliaires et régulatrices nécessaires à la prolifération du virus.

a. La phase précoce

i. L'initiation de la transcription (196) (Figure 17)

L'ADN proviral intégré fonctionne comme un gène eucaryotique. Il possède des promoteurs transcriptionnels qui favorisent le positionnement de l'ARN polymérase II cellulaire au niveau du site d'initiation de la transcription. La faible efficacité d'élongation de l'ARN polymérase II entraîne la synthèse de transcrits courts, non polyadénylés. L'activation de la cellule (par la présentation d'un antigène...) permet la relocalisation du facteur nucléaire NF- κ B qui se fixe sur le domaine activateur présent dans la région 5' LTR de l'ADN proviral. Il en résulte un remodelage de la chromatine, *via* l'activation d'une histone acétylase ainsi qu'une augmentation du taux d'initiation et d'élongation de la transcription (26). Une quantité minimale d'ARNv est transcrit, multi-épissé et traduit par la machinerie cellulaire permettant la synthèse des protéines régulatrices Tat et Rev. Tat joue un rôle crucial dans l'activation transcriptionnelle des gènes viraux en augmentant la processivité du complexe transcriptionnel formé par l'ARN polymérase II (329). Cette protéine possède plusieurs domaines fonctionnels : un domaine N-terminal d'activation ou de fixation de co-facteurs, un domaine basique de fixation à l'ARN et de transport nucléaire, ainsi qu'un domaine C-terminal impliqué dans la stimulation du « capping » co-transcriptionnel des ARN viraux.



Contrairement à la plupart des activateurs transcriptionnels, Tat ne se lie pas à l'ADN mais reconnaît spécifiquement le renflement existant dans la tige-boucle TAR en 5' de l'ARN viral et recrute P-TEFb. Ce facteur positif d'élongation de la transcription conduit à l'hyperphosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II qui a pour action d'augmenter sa processivité. L'acétylation de Tat et son interaction avec une histone acétylase seraient nécessaire à la dissociation du complexe Tat/P-TEFb-TAR et stimulerait l'élongation de la transcription.

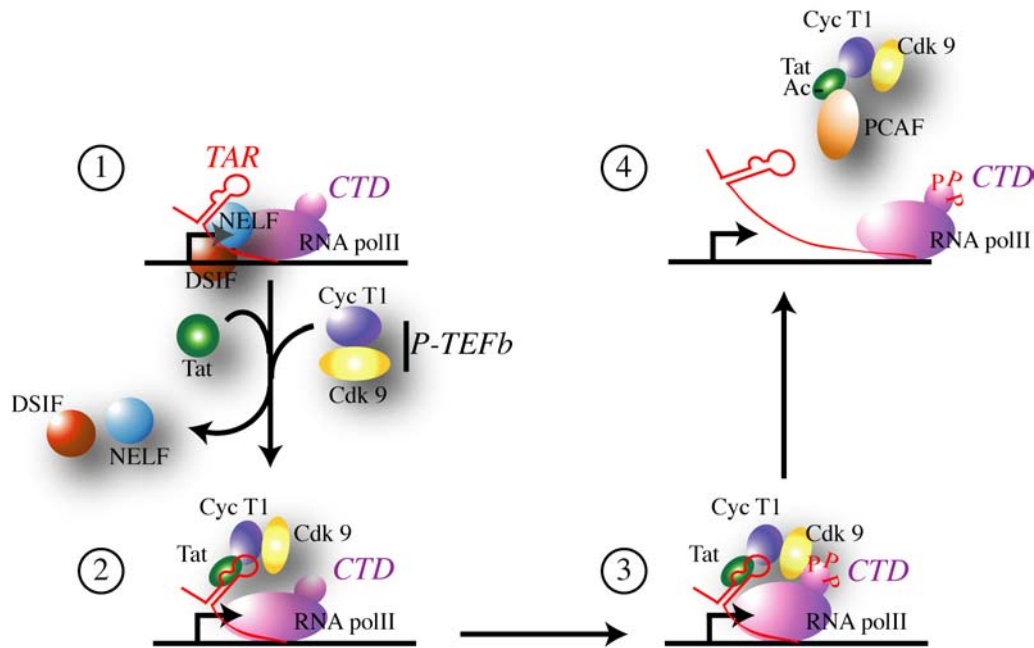


Figure 17 : *Modèle de l'action trans-activatrice de Tat.*

1 : Synthèse d'un faible taux d'ARN messagers viraux non polyadénylés. L'ARN polymérase hypophosphorylée en son domaine C-terminal (CTD) est peu processive et est associée à des facteurs négatifs d'élongation de la transcription (NELF et DSIF) ; 2 : Fixation de Tat sur le bulge de la tige-boucle TAR en 5' de l'ARNv et recrutement du complexe P-TEFb, comprenant la cycline T1 (qui se lie à la boucle de TAR) et une kinase, Cdk9 ; 3 : Hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II par Cdk9 ; 4 : Dissociation du complexe Tat-TAR-Cycline T1:Cdk9 après l'acétylation de Tat et son interaction avec PCAF (p300/CREB binding protein-associated factor) et synthèse de longs transcrits polyadénylés augmentant la production de protéines virales.

ii. Epissage des ARNm viraux (Figure 18)

HIV-1 a la capacité de générer un grand nombre (supérieur à 30) d'ARNm viraux de taille variable, à partir d'un seul transcrit par un mécanisme d'épissage alternatif (309). La présence de plusieurs sites donneurs et accepteurs d'épissage permet l'obtention de trois classes d'ARN :



* L'ARNm non-épissé : codant Gag et Pol et/ou pouvant être encapsidé.

* Les ARN mono-épissés : codant Env, Vif, Vpr et Vpu.

* Les ARN multi-épissés : codant Tat, Rev et Nef.

La phase précoce se termine par l'export nucléaire des ARNm viraux multi-épissés permettant la synthèse des protéines régulatrices Tat, Rev et Nef.

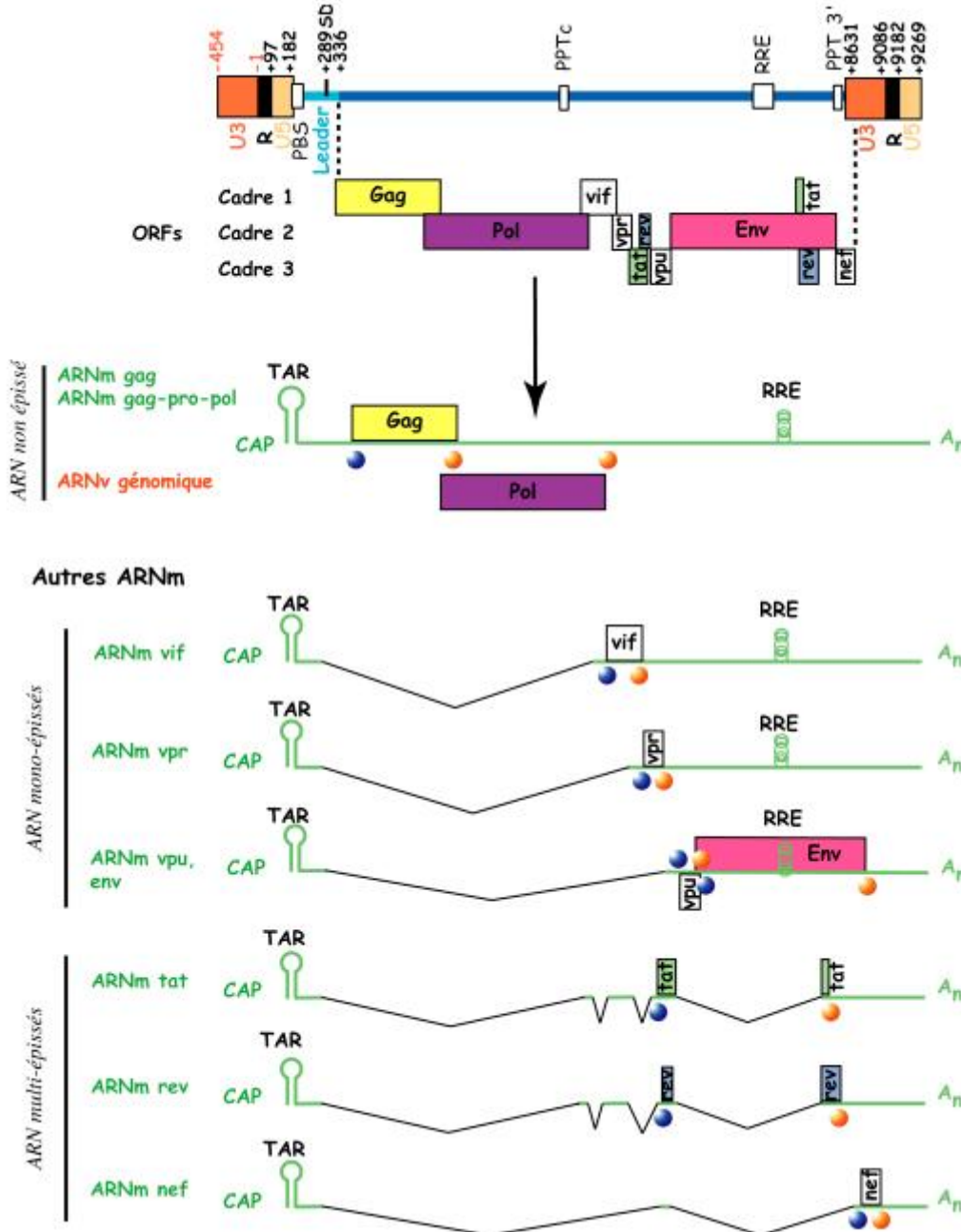


Figure 18 : Profils d'épissage non exhaustif de l'ARN génomique de HIV-1.

Les sites d'initiation et de terminaison de la traduction des ARNm sont symbolisés par des cercles

bleus et oranges respectivement. Les protéines issues de la traduction d'un ARNm particulier sont indiquées sur la représentation de cet ARNm.

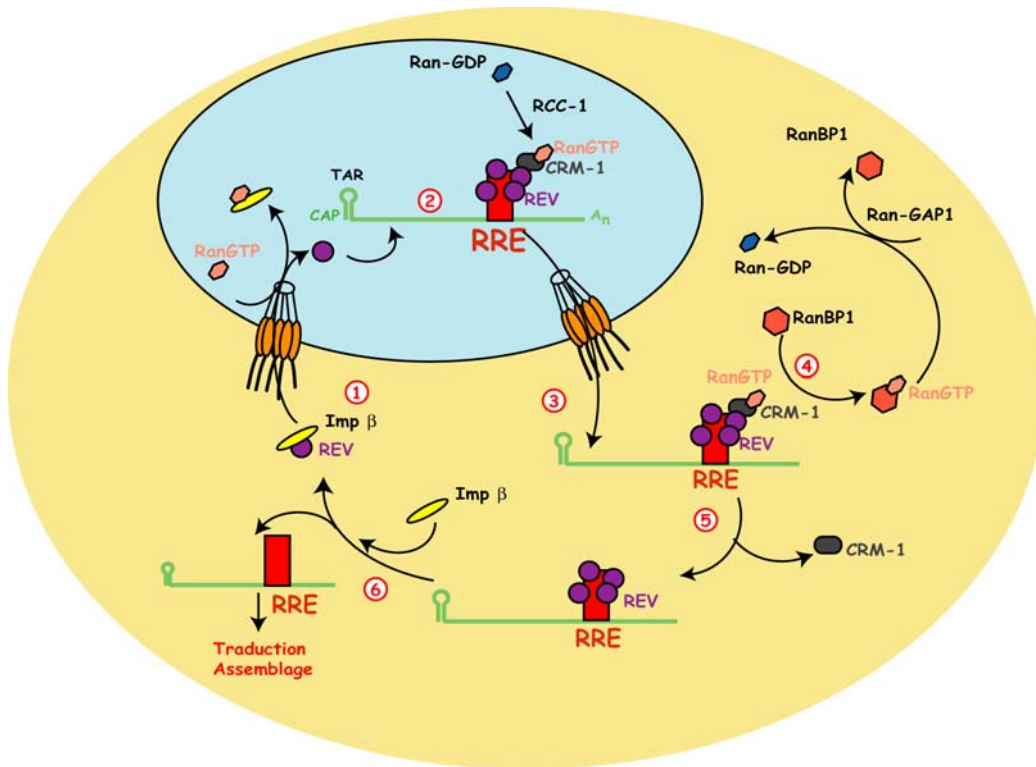


Figure 19 : Régulation de l'export nucléaire des ARN messagers viraux par la protéine virale *Rev*.

1 : Après sa synthèse dans le cytoplasme, Rev interagit via son domaine NLS avec un facteur d'import nucléaire, l'importine β ; 2 : Une fois dans le noyau, Rev se fixe sur une séquence appelée RRE (Rev Response Element) localisée dans le gène *env* présent dans les ARNm viraux non ou mono-épissés. La multimérisation de Rev sur la séquence RRE masque le signal NLS et dévoile en même temps le signal d'export nucléaire ou NES. Ce motif va interagir avec des protéines d'export nucléaire comprenant CRM-1. Ran-GTP, produit dans le noyau grâce à RCC-1 (chromatin-bound exchange factor) régule l'association entre Rev et CRM-1 ; 3-4-5 : Dans le cytoplasme, la fixation de RanBP1 à Ran GTP suivie de son hydrolyse par la Ran GAP-1 (GTPase activating protein) apparaît être la clé pour la dissociation du complexe Rev-CRM-1-Ran-GTP ; 6 : Ainsi les ARNm viraux mono ou non-épissés pourront être utilisés par la machinerie cellulaire de traduction et/ou encapsidés (pour les ARNm non épissés).



b. La phase tardive

i. Export nucléaire des ARNm viraux mono et non-épissés (Figure 19)

Les ARN messagers mono ou non-épissés, contrairement aux ARN messagers multi-épissés, nécessitent l'implication de la protéine virale Rev pour l'export nucléaire (329). Cette protéine de transport possède un domaine NLS (Nuclear Localization Signal) ainsi qu'un domaine NES (Nuclear Export Signal). Elle contient également un domaine de liaison à l'ARN riche en arginines qui lie spécifiquement une structure en tiges-boucles nommée RRE (Rev Responsive Element) localisée dans le gène Env (228, 369). Après l'import nucléaire et la multimérisation de Rev sur le domaine RRE des ARN messagers mono et non-épissés, le signal NLS est masqué tandis que le signal NES devient accessible. Grâce à ce motif, Rev interagit avec des facteurs d'export nucléaire (CRM1 pour « Chromosome Maintenance gene1 » qui interagit avec des constituants des pores nucléaires (247), Ran GTP/GDP qui fournit l'énergie nécessaire à l'export nucléaire (114, 335)) et conduit au transport des ARN messagers vers le cytoplasme où ils sont traduits ou/et encapsidés.

La protéine virale Rev pourrait également jouer un rôle inhibiteur en interagissant avec certains facteurs d'épissage (266).

ii. Traduction des ARNm viraux mono et non-épissés

Dans le cytoplasme, la machinerie cellulaire est détournée par le virus afin de permettre la synthèse des protéines auxiliaires, structurales et enzymatiques. La synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol se fait à partir d'un même transcrit, tout comme la synthèse des protéines d'enveloppe et Vpu (Figure 18). Cependant les mécanismes de régulation de la traduction utilisés diffèrent dans les deux cas :

* La synthèse du précurseur protéique Gag-Pol est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture des ribosomes en fin de traduction du précurseur Gag. La présence d'une séquence « de glissement » associée à une tige-boucle permet un décalage d'un nucléotide vers le 5' du cadre de lecture (182, 42). Le rapport entre la synthèse de Gag et de Gag-Pol (20 :1) est critique pour la propagation du virus (195).

* La synthèse des protéines Env et Vpu est obtenue à partir d'un ARNm bi-cistronique. Il contient deux ORF, Vpu et Env, qui se suivent et se chevauchent. La traduction de la protéine Env dépend d'un mécanisme appelé « leaky scanning », consistant à passer outre le codon initiateur de Vpu qui est rendu possible par la faible efficacité de ce dernier (310, 311).



Vpu favorise la dégradation par le protéasome des CD4 piégés dans un complexe intracellulaire avec gp160, au niveau du réticulum endoplasmique. Cette dégradation permet aux protéines gp160 de rejoindre la membrane plasmique (48). De plus, Vpu favorise le bourgeonnement des particules virales.

2. Assemblage des virions, bourgeonnement et maturation (150, 304)

La formation d'une particule virale mature infectieuse requiert, dans un premier temps, le transport du précurseur Gag au niveau de la membrane plasmique et son association avec différents partenaires viraux et cellulaires. Dans un deuxième temps, les virions immatures, non-infectieux sont relargés et subissent une ultime étape de maturation pour devenir infectieux et se propager.

a. Le recrutement des protéines virales dans l'assemblage

L'assemblage et le bourgeonnement de particules virales impliquent obligatoirement la protéine Gag (de 1500 à 1800 molécules), capable de s'auto-assembler et de former des pseudo-particules virales (virus-like particles ou VLP) en absence des autres constituants du virion (142, 63). Durant la maturation du virion, Gag est protéolysé pour libérer les protéines MA, CA, NC, p2 et p6.

Plusieurs régions de Gag sont impliquées dans l'assemblage :

* La myristilation de l'extrémité N-terminale, ainsi qu'une région fortement basique dans le domaine de la matrice, permettent l'ancrage du précurseur dans la membrane plasmique. La myristilation est indispensable à la formation de virions (56, 152). Plusieurs études montrent une localisation préférentielle de la MA au niveau des radeaux lipidiques (162, 252), expliquant ainsi l'enrichissement en cholestérol et sphingolipides des membranes virales (64). Par ailleurs, MA cristallise sous forme de trimères, cependant le rôle exact de cette oligomérisation dans l'assemblage reste sujet à controverses. Une autre fonction de MA durant l'assemblage est de faciliter l'incorporation de la protéine Env en interagissant avec son domaine TM (87, 121, 122, 365).

* Les domaines CTD (304) et MHR (Major Homology Region) (272) de la CA jouent un rôle capital dans l'assemblage et la stabilité du virion. Ils sont indispensables pour la multimérisation des précurseurs Gag et Gag-Pol (43, 134).

* Le domaine NC encapside l'ARNv *via* ses deux doigts de zinc qui reconnaissent



spécifiquement un site d'encapsidation appelé Psi, composé de plusieurs tiges-boucles (13, 38). Il semblerait que cette interaction protéine-ARNv ait lieu avant l'ancrage de la MA dans la membrane plasmique et favorise la multimérisation de Gag (201).

* Le peptide p2 participerait également à la sélection spécifique des ARNv non épissés au cours de l'encapsidation (296).

* Le domaine p6 est requis pour l'encapsidation de la protéine Vpr (207, 260). Après la maturation du virion, la protéine Vpr se lie à la NC (312).

Vif est une autre protéine virale qui pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'assemblage de la particule virale et dans la stabilisation du « core » du virus (161, 250). Son rôle serait lié à sa capacité à interagir à la fois avec l'ARN viral (99, 199, 371) et avec les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol (174).

b. Le recrutement des ARN dans l'assemblage

i. Le recrutement de l'ARN viral

La présence d'ARN est cruciale pour l'assemblage, si bien qu'en absence d'ARNv le virus recrute des ARN d'origine cellulaire (245).

Une interaction spécifique entre le domaine NC du précurseur Gag et une région localisée en 5' de l'ARNv est responsable de sa sélection et de son encapsidation au cours de l'assemblage (219). Cette région, appelée domaine Psi ou région leader, est composée de quatre tiges-boucles conservées, SL1 à SL4. Elles correspondent respectivement aux tiges-boucles comprenant le site de dimérisation (DIS), d'épissage (SD), d'encapsidation (Psi) et d'initiation de la traduction (AUG) (Figure 9). La tige boucle SL3 est capable d'encapsider sélectivement l'ARNv, cependant d'autres interactions sont nécessaires pour permettre cette sélection. SL1 est impliquée dans la dimérisation de l'ARN viral (255), tandis que SL2 fixe la NC avec la même affinité que SL3 (12). Il a été proposé que SL4 n'interagisse pas avec la NC mais stabilise la structure du domaine Psi (13).

Le signal d'encapsidation est plus étendu et d'autres éléments favorisent le recrutement de l'ARN génomique, tel que la structure secondaire des tiges boucles TAR et Poly(A) (81).

ii. Le recrutement de l'ARNt₃^{Lys}

Tous les rétrovirus utilisent comme amorce un ARNt d'origine cellulaire pour initier la rétrotranscription. L'amorce sélectionnée dans le cas de HIV-1 est l'ARNt₃^{Lys} (227, 282).



Durant l'assemblage du virus, les isoaccepteurs majeurs de l'ARNt^{Lys}, l'ARNt_{1,2}^{Lys} et l'ARNt₃^{Lys}, sont sélectivement encapsidés (20 molécules par virion) (172). Leur concentration relative, par rapport à la population d'ARN de faible poids moléculaire, passe de 5-6 % dans la cellule à 50-60 % dans le virus (226). Le rapport ARNt_{1,2}^{Lys}/ARNt₃^{Lys} est identique dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les particules virales (226), soit 8 molécules d'ARNt₃^{Lys} et 12 molécules d'ARNt_{1,2}^{Lys} pour deux molécules d'ARN génomique. La sélection des ARNt^{Lys} est indépendante de l'incorporation de l'ARNv et de la maturation des précurseurs protéiques (226). Elle dépend de l'incorporation des précurseurs Gag-Pol et plus précisément de l'interaction entre le pouce de la RT et l'ARNt₃^{Lys} (202). Il a été montré que la lysyl-ARNt synthétase (LysRS) est également incorporée dans le virus de façon spécifique (68, 70). Son encapsidation est indépendante de la présence d'ARNt^{Lys} et dépend de son interaction avec le précurseur Gag (70). Il y a approximativement autant de molécules de LysRS encapsidées que d'ARNt^{Lys}, et toute perturbation de l'incorporation de la LysRS se reflète sur la sélection de l'ARNt^{Lys} (130, 153). Comme il a été montré que l'incorporation de l'ARNt^{Lys} dépend non pas de son état d'aminocyclation mais de sa capacité à fixer la LysRS (184), cette synthétase semble être un bon candidat pour faciliter la sélection et l'encapsidation de l'ARNt^{Lys}.

Deux modèles de complexes d'encapsidation spécifique de l'ARNt^{Lys} ont été proposés (205) (Figure 20). Ils comprennent les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol, l'ARNv, l'ARNt^{Lys} et la LysRS et conduisent :

* Soit à la formation d'un complexe Gag/Gag-Pol/ARNv qui interagit avec le complexe LysRS/ARNt^{Lys}.

* Soit à la formation d'un complexe Gag/Gag-Pol/ARNv qui interagit dans un premier temps avec la LysRS libre puis avec l'ARNt^{Lys} non aminocyclé.

Dans ces modèles, la multimérisation de Gag médiée par l'ARNv favorise l'incorporation de Gag-Pol et conduit à la formation d'un complexe Gag/Gag-Pol/ARNv, le domaine RT de Gag-Pol interagit avec l'ARNt^{Lys} stabilisant sa présence dans le complexe, et Gag interagit avec la LysRS néosynthétisée (153).

La sélection de l'ARNt^{Lys} se fait dans le cytoplasme et serait éventuellement couplée à la traduction (198). Paradoxalement, les ARNt^{Lys} sont aminocyclés dans les cellules, alors qu'ils ne le sont pas dans les virions. Cette déacylation est nécessaire pour permettre à l'extrémité 3' de l'ARNt^{Lys} d'être allongée lors de la rétrotranscription (284). La question de la déacylation



reste posée. Existe-t-il un mécanisme spécifique de déacylation de l'ARNt^{Lys} par des enzymes virales ou se fait elle de façon spontanée ? Seuls les ARNt^{Lys} non acylés ou néo-synthétisés sont sélectivement encapsidés ?

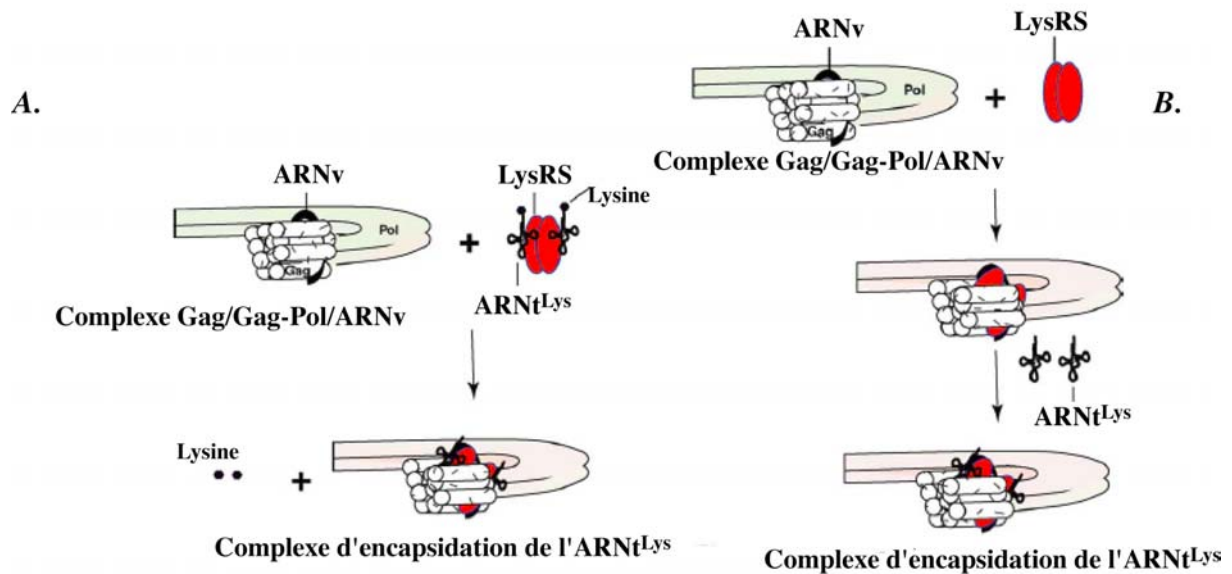


Figure 20 : Représentation schématique de la formation du complexe d'encapsidation de l'ARNt^{Lys}.

La composition du complexe d'encapsidation tient compte de l'interaction entre Gag et l'ARNv qui facilite la multimérisation de Gag, de l'interaction entre Gag et Gag-Pol, de l'interaction entre Gag et la LysRS et de l'interaction entre Gag-Pol et l'ARNt^{Lys}. Le rapport entre Gag/Gag-Pol/LysRS/ARNt^{Lys} est de 60/6/1/1. Deux mécanismes d'encapsidation sont envisageables. A : Le complexe Gag/Gag-Pol interagit avec un ARNt^{Lys} chargé et complexé à la LysRS ; B : Le complexe Gag/Gag-Pol interagit tout d'abord avec la LysRS. Ce nouveau complexe interagit ensuite avec un ARNt^{Lys} non chargé.

c. Le bourgeonnement et la maturation du virion

Le domaine p6 est essentiel pour l'exocytose ou bourgeonnement de la particule virale immature (151) (Figure 21), car il interagit avec une protéine de la machinerie cellulaire d'endocytose, Tsg101 (Tumor Suppressor gene 101) (345, 137, 235). La présence de Tsg101 seule n'est pas suffisante, le complexe ESCRT-1 dont elle fait partie est indispensable (236) pour permettre le relargage de la particule virale.

La dernière étape du cycle réplcatif est la maturation des virions qui a lieu de façon



concomitante ou juste après le bourgeonnement. La maturation conduit à des changements conformationnels et morphologiques majeurs de la particule virale. En microscopie électronique, on distingue une région en forme de cône dense aux électrons, caractérisant les virions matures. La protéase virale joue un rôle crucial dans cette étape. Durant l'assemblage, l'interaction de deux précurseurs Gag-Pol permet la dimérisation des domaines protéases pour former un homodimère, forme active de la protéase virale. Cette enzyme initie sa propre maturation par un mécanisme autocatalytique (97). Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale libère respectivement les protéines de structure (MA, CA, NC, p2 et p6) et enzymatiques (PR, RT et IN). Un clivage ordonné et contrôlé des précurseurs protéiques Gag est requis pour permettre la formation d'un virion infectieux (353). Le premier clivage libère la protéine NC qui forme un complexe ribonucléoprotéique en se fixant sur le dimère d'ARN génomique. Le clivage suivant, entre la CA et la MA, libère la CA et permet la formation de la capsidie ou « core » du virion. Récemment il a été montré que Vif pouvait, à forte concentration, inhiber l'infectivité du virus en bloquant une étape précise de la maturation des précurseurs protéiques (9). Vif n'agirait pas comme inhibiteur de protéases mais empêcherait spécifiquement le clivage entre la NC et la CA.

L'ARN génomique de HIV-1 est encapsidé sous forme dimérique. La formation d'un complexe boucle-boucle dans la région 5' de l'ARN génomique, entre les séquences autocomplémentaires de chacun des deux ARN monomères, constitue l'étape initiale de la dimérisation (317). Des dimères isolés à partir de virus mutés au niveau de la protéase présentent une stabilité thermique réduite et une mobilité sur gel différente des ARN extraits de virions sauvage (128). Une étape de maturation du dimère dépendant des produits de clivage de Gag est envisageable. La NC pourrait favoriser la formation d'un duplex étendu par propagation des appariements intermoléculaires. Ce passage de complexe boucle-boucle au duplex étendu n'a pas encore été montré *in vivo*, cependant deux formes de dimères d'ARN, correspondant au complexe boucle-boucle et au duplex étendu ont été résolues par cristallisation aux rayons X à partir de substrats ARN de 23 nts (112).



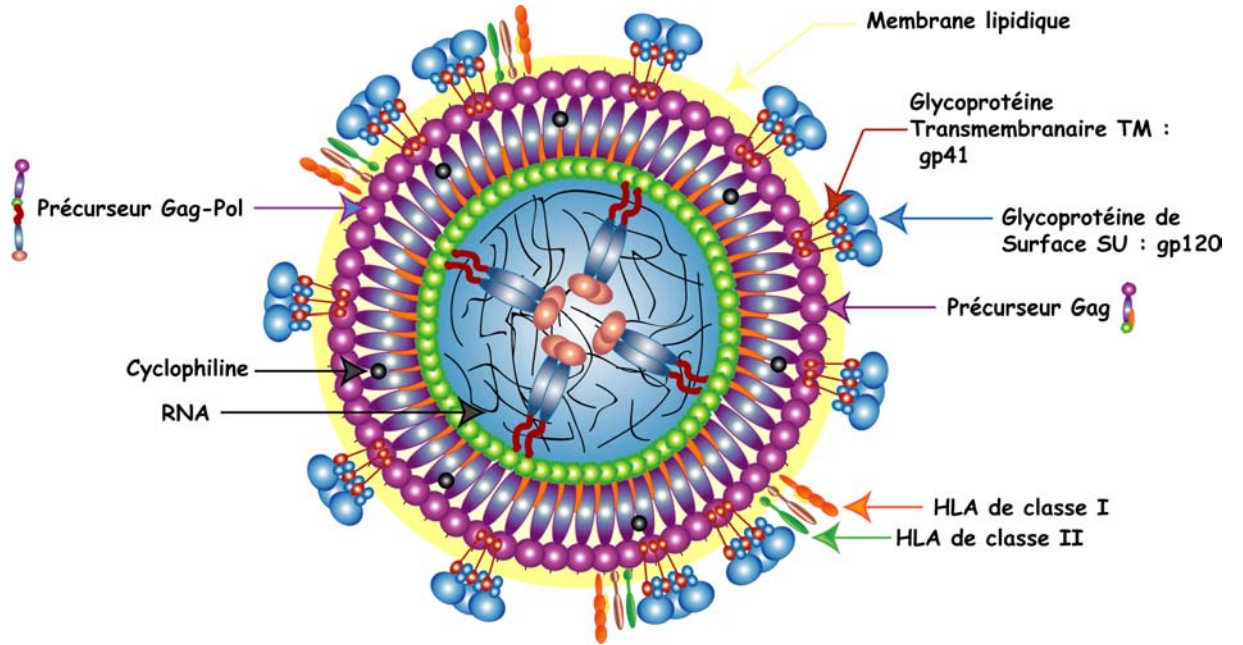


Figure 21 : *Forme immature du virus HIV-1.*



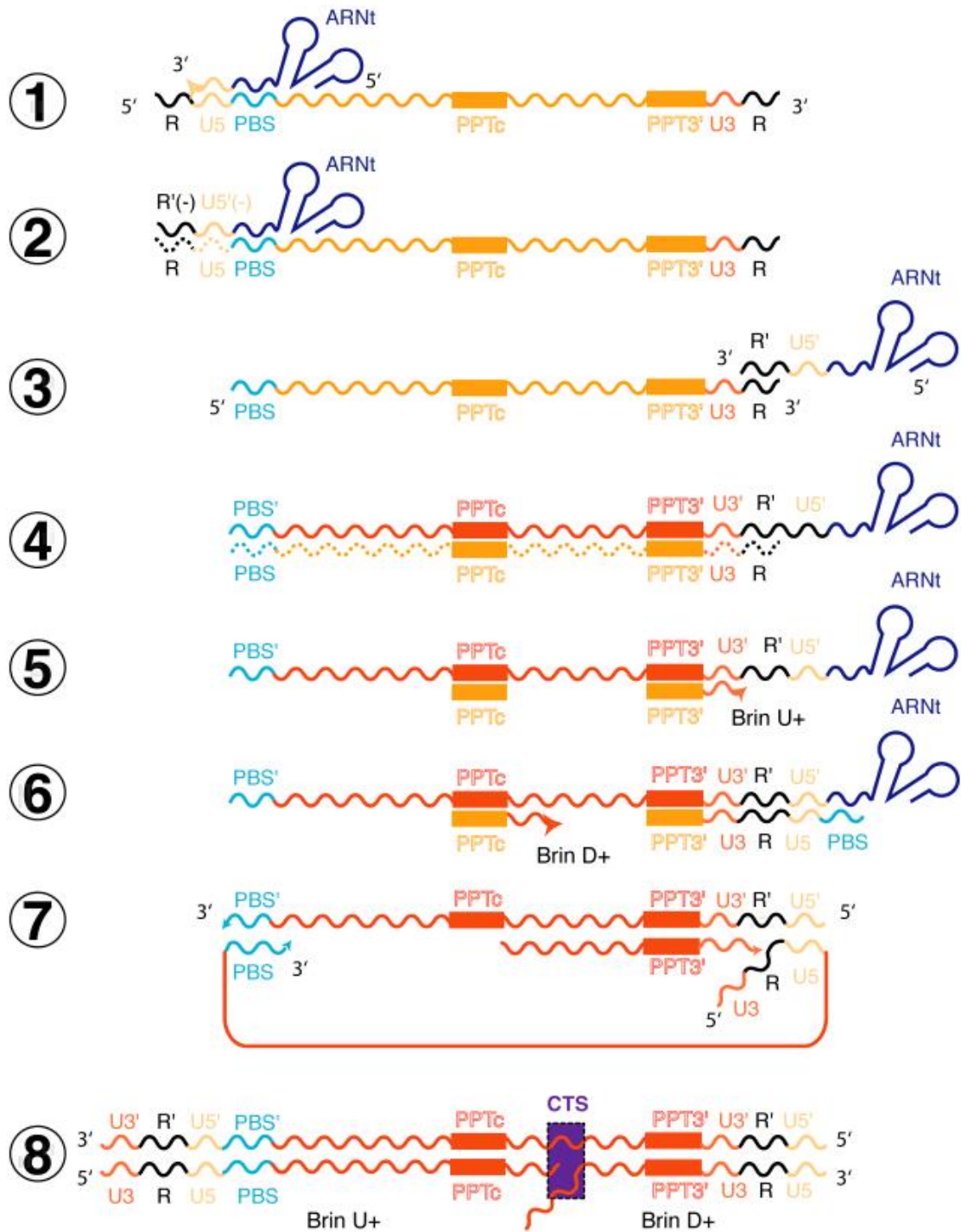


Figure 22 : La rétrotranscription de l'ARN génomique de HIV-1.

1 : Initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) ; 2 : Synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (-) et dégradation par la RNase H de l'ARN matrice ; 3 : Saut du brin d'ADN "Strong-Stop" (-) ; 4 : Fin de la synthèse du brin d'ADN (-) et dégradation par la RNase H de la matrice ; 5 : Initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPT3' ; 6 : Synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (+) et initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPTc ; 7 : Dégradation des amorces ARN et ARNt et saut de brin de l'ADN "Strong-Stop" (+) ; 8 : Terminaison de la synthèse des deux brins d'ADN et synthèse d'un "DNA flap" au niveau du CTS.

Chapitre II : La rétrotranscription chez HIV-1

I. La rétrotranscription (Figure 22) (148)

La rétrotranscription est une étape centrale du cycle répliatif de HIV-1. Elle requiert la présence de trois partenaires : l'ARN viral qui sert de matrice, l'ARNt₃^{Lys} cellulaire qui sert d'amorce, et la rétrotranscriptase. La RT est une enzyme multifonctionnelle qui possède à la fois une activité ADN polymérase ADN et ARN dépendante ainsi qu'une activité RNase H qui dégrade sélectivement le brin ARN dans un hybride ADN/ARN. Toutes ces activités sont nécessaires à l'étape de rétrotranscription, au cours de laquelle l'ARN génomique simple brin est converti en ADN proviral double brin. La synthèse de l'ADN proviral est essentiellement cytoplasmique, au sein d'un complexe nucléoprotéique. Toutefois de courts produits de rétrotranscription peuvent être synthétisés à l'intérieur du virion (173, 373) et cette étape peut se terminer après le transfert du PIC dans le noyau. En plus de ces trois partenaires, des facteurs cellulaires et viraux contribuent à l'efficacité de la rétrotranscription.

A. L'initiation et la synthèse de l'ADN « Strong-Stop » (-)

L'initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) requiert comme amorce un ARNt d'origine cellulaire, l'ARNt₃^{Lys} chez HIV-1, encapsidé sélectivement dans les particules virales (186, 226). Les 18 nt 3'-terminaux de cet ARNt sont complémentaires de la séquence PBS, située en aval de la région U5 de l'ARNv, à environ 200 nts de son extrémité 5' (227) (Figure 22-1). La synthèse du brin (-) d'ADN démarre à l'extrémité 3' de l'ARNt et se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNv, tandis que la RNase H polymérase dépendante dégrade de manière concomitante la matrice ARN (Figure 22-2). L'homoduplex ARN/ARN contenant l'ARNt₃^{Lys} est quant à lui résistant à la dégradation par la RNase H et permettra dans une étape ultérieure de copier le PBS. Une fois l'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé, les fragments d'ARN encore hybridés à l'ADN sont dégradés par l'activité RNase H polymérase indépendante de la RT. Sans dégradation complète de ces fragments, le transfert de brin est inhibé.



B. Le premier transfert de brin

L'ADN « Strong-Stop » (-) est ensuite transféré à l'extrémité 3' du génome, grâce à la présence de séquences répétées R aux deux extrémités de celui-ci (Figure 22-3). Compte tenu de la nature dimérique du génome viral, le premier transfert de brin peut être intra- ou intermoléculaire (168, 344, 354). Cette étape fait l'objet de controverses. En effet, certains groupes suggèrent un transfert de brin intra-et intermoléculaire dans des proportions équivalentes (168, 344, 354), tandis que d'autres montrent un transfert exclusivement intermoléculaire (256).

Très peu d'informations concernant spécifiquement cette étape sont disponibles à l'heure actuelle. Toutefois il semblerait que le transfert de brin ait préférentiellement lieu après la synthèse complète du brin d'ADN « Strong-Stop » (-) (251). *In vitro*, le transfert est plus efficace lorsque l'ARNt₃^{Lys} est utilisé comme amorce, au lieu d'un oligonucléotide complémentaire du PBS (ODN) (19). Ce résultat pourrait s'expliquer par une interaction entre l'ARNt₃^{Lys} et une région présente dans la région U3 de l'ARN viral, permettant le rapprochement entre l'ADN "Strong-Stop" (-) et l'extrémité 3' de l'ARNv (54). De plus, la structure anti-TAR en 3' de l'ADN « Strong-Stop » (-) pourrait soit favoriser la séparation de l'ADN néosynthétisé de la matrice, soit faciliter le transfert de brin en interagissant *via* des interactions boucle-boucle avec la séquence TAR en 3' de l'ADN viral (37). Récemment un modèle de transfert de brin impliquant un mécanisme d'invasion du brin accepteur, c'est-à-dire la séquence R en 3' de l'ARNv, a été proposé (77). Lors de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-), l'activité RNase H dégrade partiellement la matrice ARN et génère des régions ADN simple brin dans l'hybride ARNv/ADN « Strong-Stop » (-). L'invasion et l'hybridation du brin accepteur à l'ADN « Strong-Stop » (-) se ferait au niveau de ces régions puis s'étendrait en déplaçant les fragments de matrice ARN encore hybridés. Après hybridation totale, la synthèse du brin d'ADN (-) peut continuer. La protéine NCp7 (90, 262) et éventuellement l'actine (163) facilitent le transfert de brin.

C. La synthèse du brin d'ADN (-)

Une fois transféré à l'extrémité 3' du génome viral, l'ADN « Strong-Stop » (-) servira d'amorce à la synthèse du brin d'ADN (-) qui se poursuit jusqu'au PBS (Figure 22-4). Au cours de la synthèse de ce brin, l'activité RNase H de la RT dégrade la matrice d'ARN à l'exception de deux séquences résistantes identiques, riches en purines et longues de 15 nt, appelées PPT3' et PPTc.



D. L'initiation de la synthèse du brin (+)

L'activité ADN polymérase ADN-dépendante de la RT assure la synthèse du brin (+), à partir des deux amorces riches en purines (Figure 22-5). Les deux fragments d'ADN (+) initiés à partir du PPT3' et du PPTc sont respectivement appelés brin U(+) ou ADN « Strong-Stop » (+) et brin D(+). Parmi les 15 nt du PPT3' (ou PPTc), six résidus G en 3' sont importants pour l'excision correcte du PPT après l'initiation du brin U(+) (267). Cette coupure en 3' du PPT doit être très précise car elle définit l'extrémité gauche de l'ADN linéaire (Figure 22-6 et 7), qui sert de site de reconnaissance et de clivage par l'intégrase virale (111).

E. Le second transfert de brin

La synthèse du brin U(+) à partir du PPT 3' se termine après avoir rétrotranscrit une partie de l'ARNt₃^{Lys} encore attaché à l'ADN (-). Les 18 nt 3'-terminaux de l'ARNt₃^{Lys} complémentaires au PBS sont rétrotranscrits et la synthèse est bloquée par la méthylation en position 1 du nt A₅₈ de l'ARNt₃^{Lys} (Figure 22-6) (21, 60, 281, 368). Cette méthylation est primordiale pour éviter l'obtention de produits trop longs. De tels produits empêchent la poursuite de la synthèse d'ADN après le transfert de brin. Le clivage de l'ARNt₃^{Lys} par l'activité RNase H de la RT (360) s'effectue entre les ribonucléotides A et C de l'extrémité 3' de l'ARNt, laissant le A lié à l'ADN (320, 321). Cette excision conduit au second saut de brin. Il implique l'ADN « Strong-Stop » (+) qui est transféré et s'hybride à l'extrémité 3' de l'ADN (-) *via* la reconnaissance spécifique de deux PBS (Figure 22-7). L'absence de dégradation de l'ARNt₃^{Lys} ou l'utilisation d'un ADN complémentaire au PBS comme amorce pour initier la rétrotranscription diminue ou empêche respectivement le transfert de brin (21).

F. La terminaison de la rétrotranscription

Suite au second transfert de brin, l'extrémité 5' du brin U(+) sert de matrice pour terminer la synthèse du brin d'ADN (-), tout comme le brin d'ADN (-) sert de matrice à la synthèse complète des brins D(+) et U(+). La synthèse du brin U(+) se termine après le déplacement du brin D(+) par la RT sur une centaine de nucléotides au niveau d'une région appelée CTS (séquence de terminaison centrale), riche en AT et localisée au centre du génome (73). Il en résulte un ADN double brin présentant un recouvrement d'une centaine de nucléotides appelé « DNA flap ». La présence de deux sites de terminaison ter1 et ter2 dans le



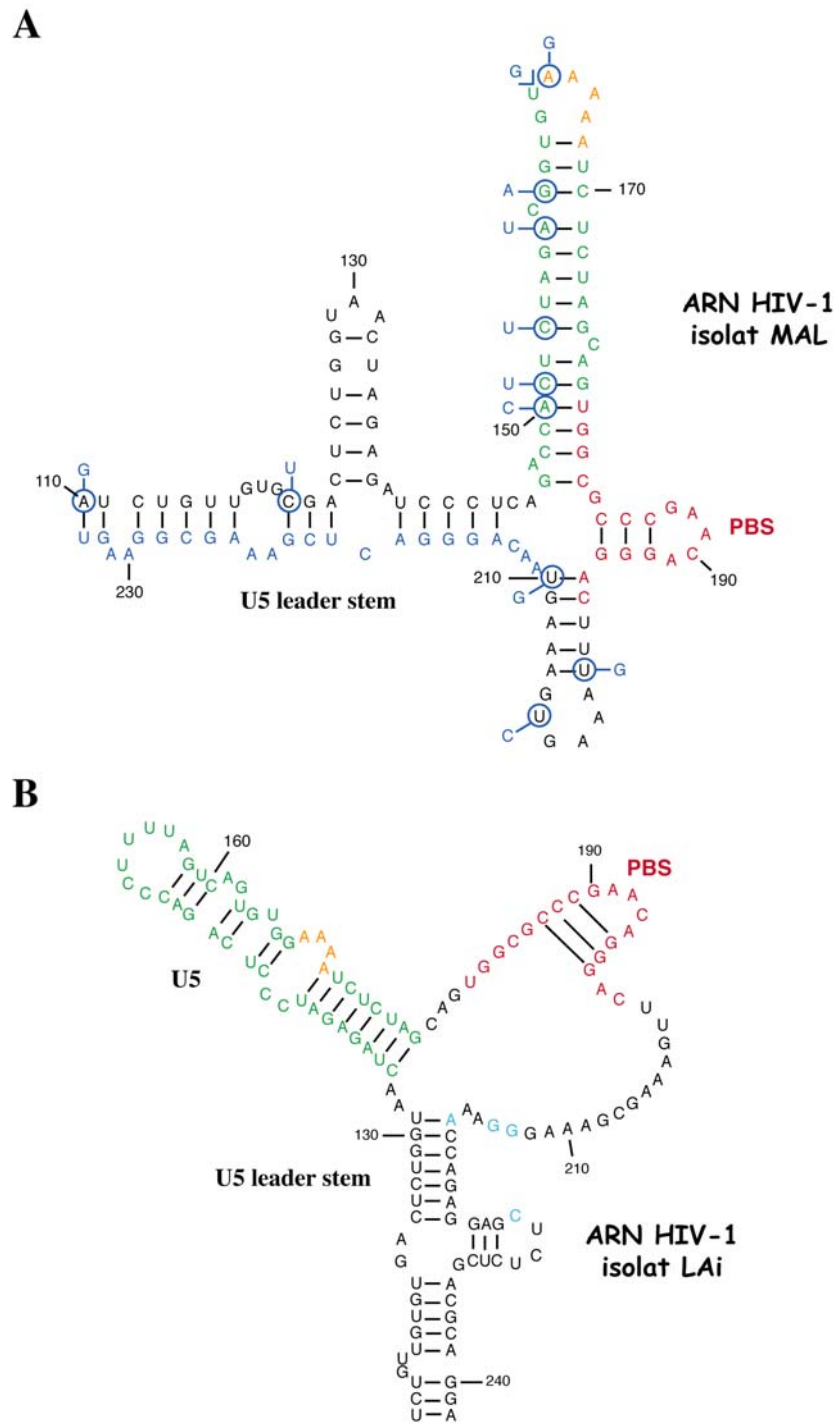


Figure 23 : Structure secondaire du domaine PBS des isolats MAL (A) et Lai (B) de HIV-1.

A : Structure secondaire du domaine PBS de l'isolat MAL de HIV-1. La duplication de 23 nt est représentée en bleu. Les variations de séquence avec Lai sont cerclées en bleu et le nt correspondant de Lai est en bleu. Le PBS est rouge et la tige boucle en amont du PBS en vert (adaptée de (28)). La séquence riche en A est indiquée en orange ; B : Structure secondaire du domaine PBS de l'isolat Lai de HIV-1 (d'après (31)). Les nucléotides indiqués en bleu correspondent à des substitutions entre les isolats Lai/Hxb2 et NL4-3.



CTS favorise une courbure de l'ADN qui diminue l'affinité entre la RT et le complexe A/M et facilite leur dissociation (215, 216).

Le produit final de la rétrotranscription est une molécule d'ADN double brin linéaire contenant un « DNA flap » central et deux extrémités identiques comprenant les séquences U3-R-U5 ou LTR.

II. Le complexe d'initiation

Les rétrovirus utilisent pour initier la rétrotranscription un ARNt d'origine cellulaire encapsidé de façon sélective dans les virions (204, 227, 234) : l'ARNt₃^{Lys} dans le cas de HIV, l'ARNt^{Trp} et l'ARNt^{Pro} respectivement dans le cas de RSV et MLV. Les 18 nt 3'-terminaux des différents ARNt s'hybrident spécifiquement à une séquence complémentaire située dans la région 5' de l'ARN viral, appelée PBS. Dans le cas de HIV-1, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'outre cette interaction de 18 nucléotides entre l'amorce et la matrice, des interactions additionnelles sont nécessaires à une initiation efficace de la rétrotranscription.

A. Structure secondaire du domaine PBS des virus de sous-types A et B de HIV-1

Les sous-types A et B sont les plus utilisés dans la littérature. L'isolat MAL est issu de recombinaisons entre virus de sous types A, D et I, tandis que les isolats Hxb2, Lai et NL4-3 appartiennent au sous-type B. La région PBS de l'isolat MAL correspond à celle des isolats de sous-type A.

Les différents isolats présentent de fortes homologues de séquence. Cependant de nombreuses mutations sont observées de part et d'autre de la région PBS entre Hxb2, Lai et NL4-3 d'une part et MAL d'autre part. Les isolats Lai et Hxb2 possèdent la même séquence autour du domaine PBS, tandis que l'isolat NL4-3 présente 4 substitutions en aval du PBS. L'isolat MAL diffère des isolats Hxb2/Lai/NL4-3 par la présence d'une insertion de 23 nucléotides en aval du PBS, en plus de mutations ponctuelles. Cette insertion résulte de la duplication d'une séquence comprenant une partie du PBS (Figure 23). Des études de cartographie en solution, menées sur les ARN viraux libres (non hybridés à l'ARNt₃^{Lys}) des isolats MAL (28) et Lai (31), ont permis d'établir des modèles de structure secondaire du



du domaine PBS. Les différences observées au niveau des séquences virales conduisent à

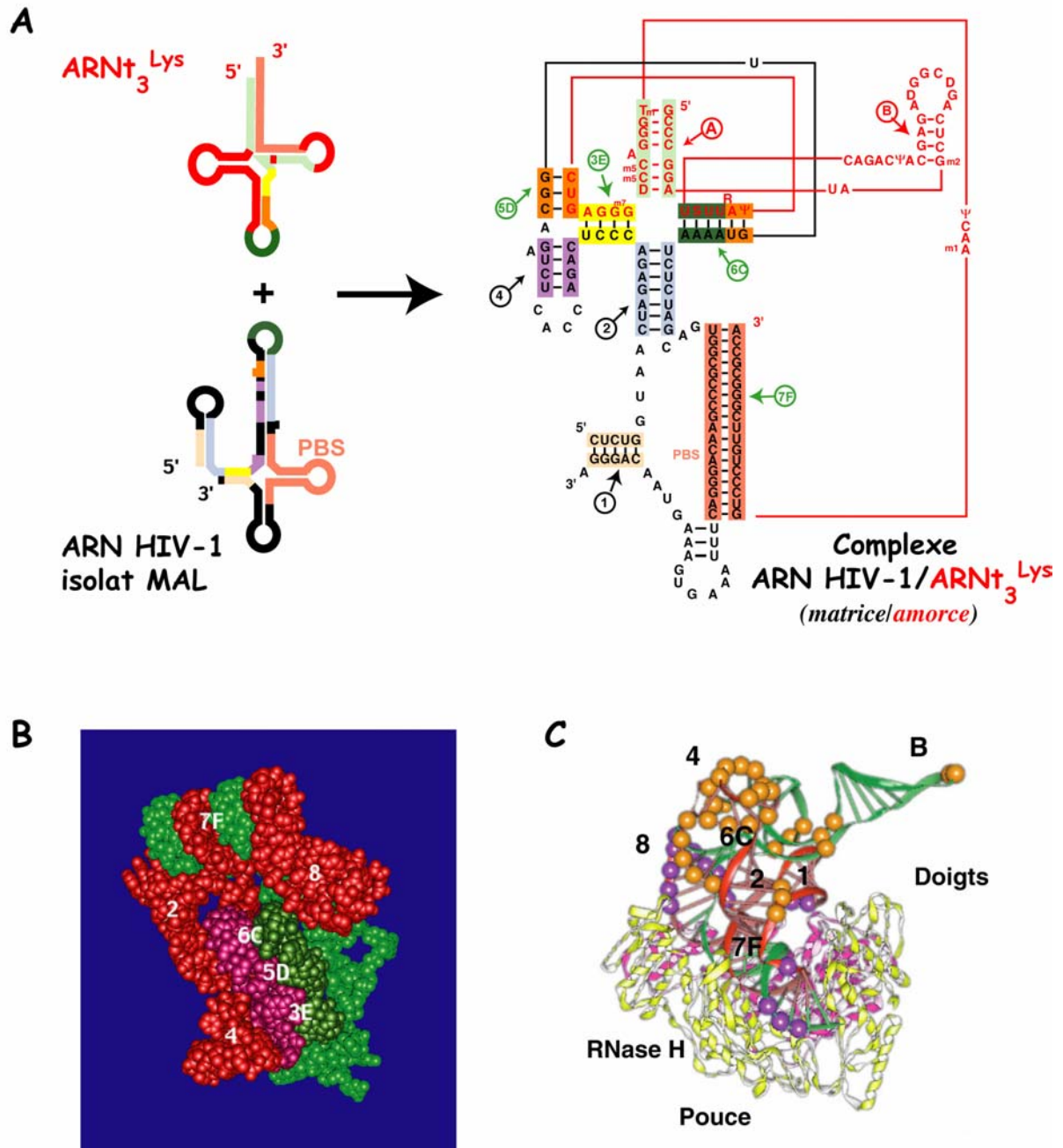


Figure 24 : Modèles de structure secondaire et tertiaire des complexes ARNt₃^{Lys}/ARNv et ARNt₃^{Lys}/ARNv : RT du complexe d'initiation de HIV-1 (isolat Mal).

A : Interactions dans le complexe binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv. Les réarrangements intra- et intermoléculaires sont représentés par des couleurs identiques. Les hélices du complexe binaire sont numérotées d'après (175) ; B : Modèle 3D du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv. L'ARNt₃^{Lys} est représenté en rouge et l'ARNv en vert ; C : Modèle de structure 3D du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv:RT. La RT est représentée en jaune (p66) et mauve (p51). Les sphères mauves correspondent aux sites protégés des



coupures enzymatiques par les RNases. Les sphères oranges correspondent aux sites de clivage non protégés dans le complexe tertiaire ((180)).

des différences structurales importantes du domaine PBS (Figure 23). La différence majeure entre ces deux modèles est la localisation de la séquence conservée riche en A, qui se situe dans une boucle apicale dans le cas de l'isolat MAL et dans une boucle interne pour les isolats Hxb2/Lai/NL4-3.

B. Le complexe d'initiation de la rétrotranscription *in vitro*

1. Structure du complexe binaire $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ de l'isolat MAL de HIV-1

Une étude détaillée du complexe d'initiation de la rétrotranscription de l'isolat MAL de HIV-1 a été menée dans notre laboratoire. Les travaux de cartographie en solution (au moyen de sondes chimiques et enzymatiques) et de mutagenèse dirigée ont mis en évidence des remaniements conformationnels intra- et intermoléculaires importants lors de la formation du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv$, et ont permis d'établir un modèle de structure secondaire du complexe binaire (Figure 24-A). Outre l'interaction canonique entre les 18 nt de l'extrémité 3' de l' $ARNt_3^{Lys}$ et le PBS, formant l'hélice 7F, une partie de la tige-boucle de l'anticodon et de la boucle variable interagissent avec l' $ARNv$ pour former les hélices 6C, 5D et 3E du modèle de structure secondaire (Figure 24-A) (175). Ces trois hélices se forment et se défont de manière coopérative. Ainsi, une mutation détruisant l'hélice 6C déstabilise les hélices 5D et 3E (177). Ces données de cartographie en solution, associées aux contraintes stéréochimiques, ont permis de construire un modèle de structure 3D du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ (Figure 24-B) (180). Dans ce modèle, l'hélice 7F est située à la périphérie du complexe favorisant son interaction avec la RT et les 3 premiers nucléotides qui servent de matrice sont empilés dans la continuité de l'hélice 7F. De plus, les hélices 6C, 5D et 3E résultant d'interactions intermoléculaires forment une surface unique permettant d'expliquer leur coopérativité de formation.

Les résultats de cartographie en solution ont été obtenus sur le complexe formé par hybridation thermique entre l'amorce et la matrice. Cependant *in vivo*, l'hybridation entre l' $ARNt_3^{Lys}$ et l'ARN viral est réalisée par le biais du domaine NC du précurseur polyprotéique Pr55^{gag} (67, 69). De ce fait, une nouvelle étude de cartographie en solution, à partir d'un hybride formé à 37°C en présence de NC, a été menée et confirme les résultats structuraux précédents (55).



L'interaction formant l'hélice 6C, entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence riche en

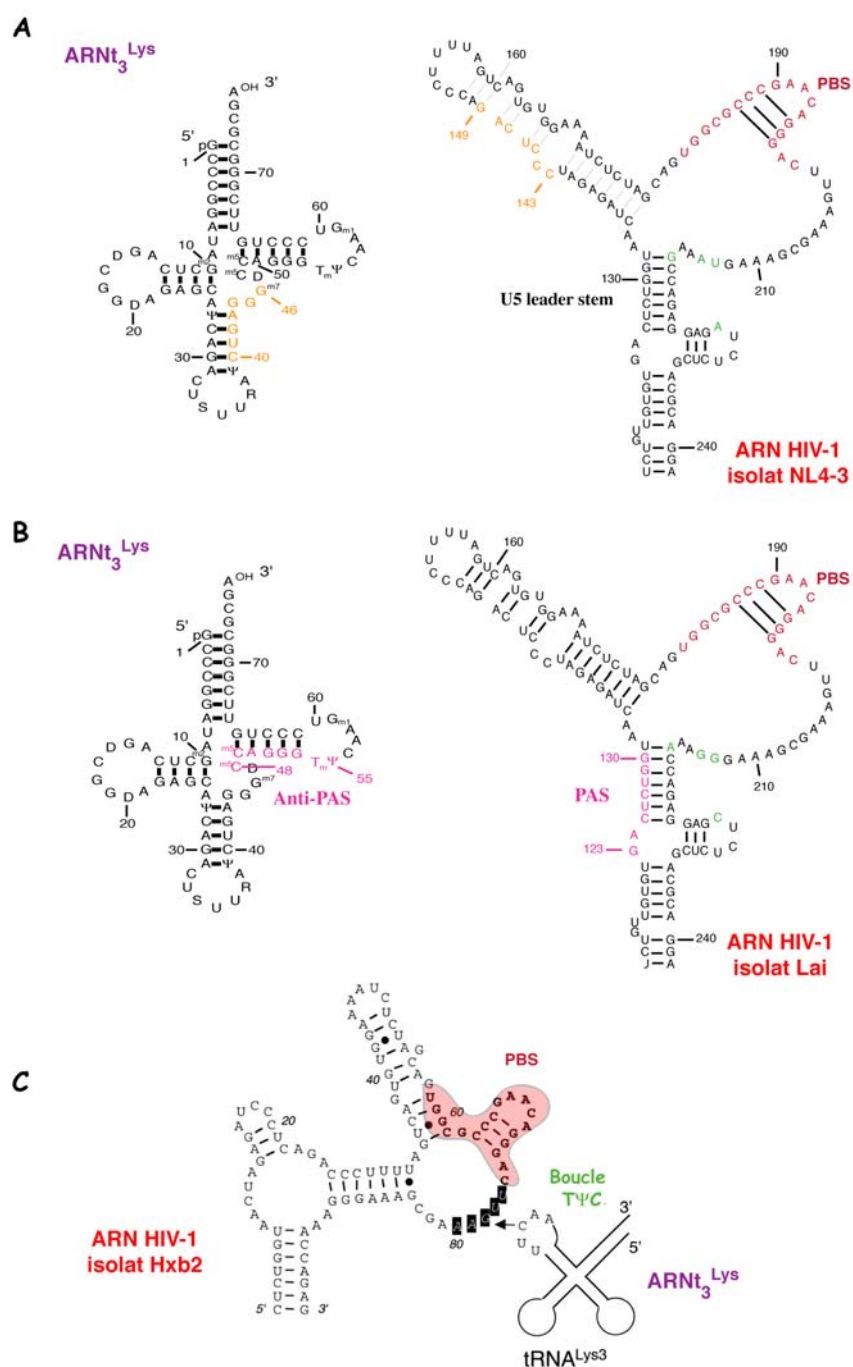


Figure 25 : Interactions intermoléculaires proposées entre l'ARNt₃^{Lys} et les ARNv de sous type B.

A : Interaction entre l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de l'isolat NL4-3 (d'après (181)). Les séquences impliquées dans cet appariement sont indiquées en orange ; B : Interaction PAS/anti PAS entre l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de l'isolat Lai (d'après (32)). Les séquences impliquées dans cet appariement sont indiquées en rose. Les différences de séquence entre les deux isolats NL4-3 et Lai sont représentées en vert ; C : Interaction entre la boucle TψC de l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de l'isolat Hxb2 (d'après (366)).



A située en amont du PBS, est nécessaire pour une initiation efficace de la rétrotranscription *in vitro* (178). Cette interaction anticodon/séquence riche en A est stabilisée par les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt₃^{Lys} (175, 179). En effet, la déthiolation sélective de la thiouridine 34 (mcm⁵s² U₃₄) de l'ARNt₃^{Lys} diminue fortement la formation de l'hélice 6C, déstabilisant le complexe binaire (179).

Au cours de ma thèse, j'ai testé l'importance relative des différents éléments de structure secondaire du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv MAL dans le processus d'initiation. Les résultats de cette étude seront donnés et discutés dans la partie « Résultat ».

2. Structure du complexe binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv des isolats Hxb2/Lai/NL4-3 de HIV-1

Aucune étude détaillée de cartographie en solution sur le complexe binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv des isolats de sous-type B n'avait été réalisée. Cependant des travaux *in vitro* (17, 20) et des études de réplication virale en culture cellulaire étayaient l'existence de l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence riche en A de l'ARNv (347, 374, 194, 375, 193, 108). En effet, HIV-1 peut utiliser un autre ARNt que l'ARNt₃^{Lys} comme amorce, seulement si le PBS et la séquence impliquée dans l'interaction avec l'anticodon sont mutés simultanément pour être complémentaires de cet ARNt (347, 374, 194, 375, 193, 108). La seule mutation du PBS conduit à une reversion qui restaure la complémentarité avec l'ARNt₃^{Lys} (voir paragraphe II.C.1).

Toutefois, d'autres groupes ont proposé d'autres interactions intermoléculaires entre l'ARNv des isolats NL4-3/Lai et l'ARNt₃^{Lys}, non compatible avec le modèle proposé précédemment. Le groupe de J.G. Levin a proposé une interaction entre les nucléotides 143 à 149 de l'ARNv NL4-3 et la séquence allant de la partie 3' de la tige de l'anticodon à la boucle variable de l'ARNt₃^{Lys} (nucléotides 40 à 46, Figure 25-A), formant une hélice analogue à l'hélice 3E du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv MAL (181). Toutefois, elle est plus étendue et empêche les hélices 4 et 5D de se former. Cette interaction intermoléculaire serait stabilisée par la NC et requise pour une initiation efficace de la rétrotranscription en absence des 24 nucléotides en aval du PBS. En effet, dans un ARNv contenant uniquement les 200 premiers nucléotides, c'est-à-dire s'arrêtant juste en 3' du PBS, la substitution de la séquence 143-149 conduit à une diminution importante de la rétrotranscription, spécialement en présence de NC (181). Lorsque l'ARNv possède 44 nucléotides supplémentaires en aval du PBS, l'effet de



cette mutation est moins marquée. Cette étude étaye la présence de l'hélice 1 dans le complexe binaire et contredit la formation et l'importance de l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence riche en A de l'ARNv.

Le groupe de B. Berkhout a également proposé une interaction alternative entre l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de l'isolat Lai. Cette interaction implique la séquence 123 à 130 de l'ARNv, appelée PAS (Primer Activation Signal) et le bras T Ψ C (nucléotides 48 à 55) de l'ARNt₃^{Lys}, appelé anti-PAS (32) (Figure 25-B). Comme son nom l'indique, cette interaction active l'initiation de la rétrotranscription en facilitant l'incorporation du premier nucléotide et n'intervient pas dans l'hybridation de l'amorce à la matrice. Cette séquence PAS, séquestrée dans une hélice intramoléculaire lorsque l'ARNt₃^{Lys} n'est pas hybridé, jouerait un rôle de régulateur à la fois positif et négatif dans l'initiation de la rétrotranscription. En effet, une substitution de la séquence PAS diminue fortement le taux d'initiation de la rétrotranscription, tandis que l'ouverture de l'hélice intramoléculaire l'augmente en favorisant l'accessibilité de la séquence PAS. Les auteurs rejettent l'implication de la structure de l'hélice intramoléculaire dans les variations de taux de rétrotranscription car un mutant compensatoire, restructurant cette hélice, ne restaure pas l'initiation de la rétrotranscription. Deux interactions semblables ont été proposées, impliquant le bras T Ψ C de l'ARNt^{Trp} et l'ARNv de RSV (7) et le bras T Ψ C de ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de HIV-2 (36, 123). Ce résultat suggère qu'il existe un mécanisme de régulation de la rétrotranscription unique pour les rétrovirus. L'interaction PAS/anti-PAS ayant fait l'objet d'une étude durant ma thèse, celle ci sera développée dans la partie « Résultat ».

Afin d'identifier les déterminants de l'ARNt₃^{Lys} requis pour une infectivité maximale, le groupe de C. Morrow a utilisé un système dans lequel le PBS de HIV a été muté pour être complémentaire à l'ARNt^{Phe} de levure (366). Une nouvelle interaction potentielle entre la boucle T Ψ C de l'ARNt^{Phe} et 5 nt en aval du PBS a été proposée (Figure 25-C). Une mutation empêchant cette interaction conduit à une diminution de l'infectivité qui peut provenir d'une mauvaise encapsidation de l'ARNt, d'un défaut d'hybridation entre l'amorce et la matrice ou d'une initiation inefficace de la rétrotranscription. Une complémentarité de séquence entre la boucle T Ψ C de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence en aval du PBS de l'ARNv de HIV-1 permet d'envisager une telle interaction.

De nombreuses études structurales et fonctionnelles ont été menées sur les complexes d'initiation des isolats de sous-types A et B. Cependant les résultats obtenus sont



contradictoires. Afin de clarifier cette situation, j'ai entrepris une étude structurale *ex vivo* de l'ARN génomique des isolats MAL et NL4-3 issu soit de cellules infectées (avant hybridation de l'ARNt₃^{Lys}) soit de particules virales (après hybridation de l'ARNt₃^{Lys}). Cette étude a été complétée par une étude structurale et fonctionnelle des deux complexes d'initiation *in vitro* et sera discutée dans la partie « Résultat ».

3. Structure du complexe ternaire ARNt₃^{Lys}/ARNv : RT

Les études de cartographie en solution et d'empreinte de la RT sur le complexe amorce/matrice, menées au laboratoire, ont permis d'élaborer un modèle tridimensionnel du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv : RT (180) (Figure 24-C). Pour ce faire, le modèle du complexe binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv (Figure 24-B) a été ancré à la structure cristallographique de la RT résolue par Jacobo-Molina et coll. (1993) en présence d'un duplex d'ADN. Le modèle du complexe ternaire suggère que la RT interagit avec les hélices 1, 7F et 8, et avec la jonction entre les hélices 7F et 2 du complexe matrice/amorce. Elle pourrait également interagir avec l'hélice 2. Curieusement, la RT ne reconnaît pas les hélices intermoléculaires 6C, 5D et 3E. Celles-ci joueraient un rôle crucial en empêchant les heurts stériques et en assurant la bonne orientation des éléments nucléiques fixant la RT (180).

4. Spécificité fonctionnelle du complexe d'initiation

Depuis plusieurs années, notre laboratoire a entrepris une étude fonctionnelle détaillée de l'initiation de la synthèse du brin d'ADN « Strong-Stop » (-) de l'isolat MAL de HIV-1. L'initiation de la rétrotranscription nécessite la reconnaissance spécifique entre l'ARNv, l'ARNt₃^{Lys} et la RT de HIV-1. En effet, l'utilisation de différentes RT (RT de HIV-1, RT d'AMV, RT de MLV) et de différentes amorces (ARNt₃^{Lys}, ARNt₃^{Lys} transcrit, ORN (oligo-ARN complémentaire au PBS)) a montré que seul l'ARNt₃^{Lys} naturel permet une initiation efficace de la rétrotranscription en présence de la RT de HIV-1. Il semble y avoir une adaptation mutuelle entre l'ARNt₃^{Lys}, l'ARNv et la RT de HIV-1. Toutefois, l'utilisation d'une amorce de type ODN (oligo-ADN complémentaire au PBS) permet une synthèse efficace d'ADN (-) quelque soit la RT étudiée (178).

Pour comprendre les différences résultant de l'utilisation des amorces ARNt₃^{Lys} et ODN, une étude cinétique de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence d'un piège, le poly(rA)/(dT)₁₅, a été menée. Ce compétiteur fixe la RT libre et empêche le recyclage de la



RT se dissociant du complexe avant ou après extension de l'amorce. Dans ces conditions, seul l'ODN est capable de synthétiser le produit final (178). Des produits correspondant à l'addition de 3 et 5 nucléotides sont retrouvés majoritairement après l'extention de l'ARNt₃^{Lys}. Ces résultats indiquent que la RT se dissocie rapidement du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv après addition de quelques nucléotides. Ce résultat est corrélé avec les pauses observées aux mêmes positions dans les conditions normales de rétrotranscription. La synthèse de l'ADN « Strong-Stop » (-) se décompose par conséquent en deux étapes : l'initiation et l'élongation. La phase d'initiation de la rétrotranscription correspond à l'addition des six premiers nucléotides à l'ARNt₃^{Lys}. Cette étape est distributive (la vitesse de polymérisation est lente, tandis que la RT se dissocie rapidement du complexe d'initiation) et spécifique : elle requiert la formation du complexe ternaire homologue ARNt₃^{Lys}/ARNv : RT pour être efficace (178, 212, 213). L'addition à l'ARNt₃^{Lys} du septième nucléotide provoque une augmentation brutale du k_{pol} et le passage à la phase d'élongation, qui est processive (la vitesse de polymérisation est rapide et la dissociation de la RT est lente) et non spécifique (212, 213). De plus, une augmentation d'affinité de la RT pour le complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv est observée après l'addition d'environ 17 nts (213).

Une étude fonctionnelle menée dans notre laboratoire a montré (résultats non publiés) que la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence du complexe d'initiation ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat Hxb2 peut également se diviser en 2 étapes : une phase distributive suivie d'une phase processive. De plus, l'initiation est caractérisée par la présence de pauses aux positions +3 et +5.

C. L'initiation de la rétrotranscription en culture cellulaire

De nombreux travaux ont été menés afin de déterminer les domaines importants pour une initiation efficace de la rétrotranscription, à l'aide de mutants de l'ARNv ou de l'ARNt₃^{Lys}. D'autres études ont porté sur les facteurs protéiques impliqués dans ce processus.

1. Réplication de virus mutants

La région 5' non traduite du génome de HIV-1 contient de nombreux motifs très structurés qui régulent différentes étapes de la réplication virale (35). D'après les résultats obtenus *in vitro*, la région U5 contient des signaux importants pour la sélection de l'ARNt₃^{Lys} et l'initiation de la rétrotranscription. Plusieurs groupes ont étudié l'importance des motifs



flanquant le PBS et des interactions additionnelles au niveau de la réplication du virus *ex vivo*. Ces travaux font l'objet de nombreuses controverses.

L'interaction entre la boucle des A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} proposée dans le complexe binaire ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat MAL, augmente l'infectivité du virus en stimulant l'initiation de la rétrotranscription (221) de l'isolat Hxb2. En effet, la délétion de la séquence riche en A conduit à une diminution de la synthèse d'ADN « strong-stop » (-) (221). Cette délétion n'affecte cependant en rien le placement de l'ARNt₃^{Lys} au PBS (171). De plus, des substitutions apparaissent lors d'une culture prolongée de ce mutant et conduisent à une initiation de la rétrotranscription et une infectivité virale comparables à celles du virus sauvage. Ces substitutions de deux ou trois nt restaurent une séquence riche en A à l'emplacement exact de la délétion opérée (221). Ces résultats sont critiqués, car la région délétée est également impliquée dans l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Par conséquent, toute mutation peut entraîner un défaut de l'infectivité virale, indépendamment de la rétrotranscription.

Le groupe de C. Morrow a également noté l'importance de l'interaction entre la boucle des A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}. La construction de virus mutants montre que HIV-1 peut utiliser un autre ARNt (l'ARNt^{Lys1,2} (193), l'ARNt^{His} (348, 347), l'ARNt^{Met} (194), l'ARNt^{Glu} (108)) comme amorce à condition que le PBS et la séquence riche en A soient simultanément rendus complémentaires de ce nouvel ARNt. Une simple mutation du PBS conduit à une instabilité des virus mutants et à une réversion vers le PBS sauvage. Les mutants utilisant de façon stable ces amorces non conventionnelles voient apparaître, lors de cultures prolongées, des mutations additionnelles augmentant leur capacité répliquative. L'importance de certaines substitutions dans le cas des doubles mutants utilisant l'ARNt^{His} sera développée dans la partie « Résultat ». De toute évidence, ces mutations adaptatives renforcent l'utilisation d'ARNt hétérologues comme amorce et l'efficacité de rétrotranscription. Ces résultats suggèrent que les déterminants nécessaires à l'utilisation d'un ARNt comme amorce sont situés dans la région U5-PBS de l'ARNv.

N. Beerens et collaborateurs ont étudié le rôle d'une petite tige boucle U5-PBS (constituée de la séquence en amont du PBS et d'une partie du PBS, où la séquence riche en A se trouve dans une boucle apicale) de l'isolat Hxb2 dans la réplication virale (29, 34). Sa structure serait impliquée dans le placement correct de l'amorce lors de la rétrotranscription. Cependant un nouveau modèle de structure secondaire de l'ARNv excluant la formation de cette tige boucle U5-PBS a été décrit et confirmé par différents groupes (Figure 23 B).



D'autres données démontrent que la stabilisation de l'hélice U5-leader diminue la capacité répliquative du virus en inhibant à la fois l'initiation et l'élongation de la rétrotranscription (33). L'ouverture de cette hélice favorise l'accessibilité de la séquence PAS qui stimule l'initiation de la rétrotranscription *ex vivo*, tout en inhibant la réplication virale (31, 32).

Enfin, la tige boucle TAR, connue pour son rôle dans la régulation de la transcription du génome viral, pourrait réguler l'étape de rétrotranscription. En effet, des mutations dans TAR conduisent à une diminution de l'initiation de la rétrotranscription. TAR pourrait stimuler cette étape en interagissant *via* la région +18 à +42 avec les composants du complexe d'initiation (81, 156, 158, 343), ou en recrutant un facteur cellulaire.

2. Les protéines impliquées dans le processus de rétrotranscription

La rétrotranscription se déroule essentiellement dans le cytoplasme, au sein d'un complexe nucléoprotéique (50, 117, 116) perméable uniquement aux petites molécules comme les dNTP et empêchant de ce fait la dilution ou la perte de la RT ou d'autres facteurs essentiels dans le cytoplasme (116). Ce complexe nucléoprotéique présente un environnement idéal qui empêche également la dégradation de l'ARNv et des produits de rétrotranscription par des nucléases cellulaires. La rétrotranscription est couplée à l'étape de décapsidation qui suit l'entrée du virus dans la cellule hôte (116). En effet, le complexe de rétrotranscription contient très peu de protéines de capsid (116). De plus, des changements structuraux de la particule virale s'opèrent : le complexe possède une structure large et allongée, très différente de celle du « core ». L'efficacité de la rétrotranscription est affectée par un certain nombre de protéines encapsidées ou non dans le virion incluant Nef (307, 6), Tat (157), Vif (322, 145), Vpr (325), la protéine de la matrice (203), la NCp7 (25, 220), l'intégrase (362, 339, 378), la cyclophiline A (337) et la topoisomérase I (330).

a. Les protéines virales impliquées dans la rétrotranscription

La protéine chaperonne NCp7 est impliquée dans l'hybridation de l'ARNt₃^{Lys} au domaine PBS de l'ARNv (67, 171, 214, 270, 292). Elle déstabilise également les structures secondaires en amont du site de polymérisation conduisant à une progression plus rapide de la RT le long de la matrice (107, 361) et à une diminution des pauses lors de l'initiation de la rétrotranscription (222). La NCp7 facilite également les deux sauts de brins au cours du processus de rétrotranscription (10, 90, 92).

Une interaction directe entre la RT et l'intégrase a été mise en évidence *in vitro* (334,



362). Le domaine C-terminal de l'intégrase interagit avec la RT au sein du complexe nucléoprotéique, sans formation de ponts disulfures (378). Il a récemment été montré qu'une cystéine présente dans le « core » de l'intégrase joue un rôle essentiel durant l'initiation de la rétrotranscription. La mutation de cette cystéine, qui n'affecte pas l'activité catalytique de l'intégrase, conduit à un virus non infectieux (164). Ce virus présente une déficience dans la production de produits précoces de rétrotranscription. Il a été proposé que la mutation de la cystéine pourrait perturber l'interface du domaine C-terminal et abolir l'interaction avec la RT, essentielle dans le mécanisme de rétrotranscription.

La protéine virale Vif empêche l'encapsidation de deux cytidine déaminase, APOBEC3G et APOBEC3F, et entraîne leur dégradation via le protéasome (85, 233, 314). L'absence d'APOBEC3G et d'APOBEC3F dans le virion évite une hypermutation du matériel génétique viral au cours de la synthèse du brin (-) de l'étape de rétrotranscription et sa dégradation par des enzymes cellulaires d'excision-réparation ou la production de protéines virales non fonctionnelles (218, 229, 352, 372, 376). De plus, Vif se lie à l'ARN et pourrait interagir avec le complexe ARN_v/ARNt₃^{Lys} et jouer un rôle dans l'initiation de la rétrotranscription (99).

La protéine Nef est un cofacteur important de la rétrotranscription. En effet, des virus Nef-déficients synthétisent des quantités réduites de cinq à dix fois d'ADN viral, par rapport au virus sauvage (307). Nef pourrait influencer l'efficacité de la rétrotranscription en agissant, soit sur la décapsidation, soit en permettant une compartimentation cellulaire appropriée du complexe de rétrotranscription (307, 6). Récemment, il a été montré que Nef peut interagir *in vitro* avec la RT et augmenter son affinité pour l'ARN_v, sans pour autant modifier son activité catalytique (119). De ce fait, la RT pourrait se dissocier moins vite du complexe de rétrotranscription et ainsi augmenter la synthèse d'ADN viral.

La présence de la protéine virale Vpr diminue le taux de mutations au cours de la rétrotranscription d'un facteur quatre. Vpr agit en recrutant l'uracyl ADN glycosylase, une protéine impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN, au sein du virion (76, 230).

La protéine virale Tat possède, outre sa fonction cruciale dans l'activation transcriptionnel des gènes viraux, un rôle dans l'étape de rétrotranscription. En absence du gène *tat*, le virus est incapable d'initier efficacement la rétrotranscription (157). Ce défaut peut être compensé par l'expression en *trans* de la protéine Tat uniquement dans la cellule productrice. En effet, la complémentation de Tat dans la cellule cible ne restaure pas l'initiation de la rétrotranscription. Ce résultat est surprenant : il suggère que Tat est



encapsidé, cependant à l'heure actuelle aucune protéine Tat n'a été détectée à l'intérieur du virus (157). Il a été montré que Tat possède deux fonctions initialement insoupçonnées : elle faciliterait l'hybridation de l'ARN_{t₃^{Lys}} sur le PBS de l'ARNv et empêcherait la synthèse de produits prématures de rétrotranscription dans le cytoplasme, durant la phase tardive du cycle répliatif (192). Ces produits seraient obtenus à partir de l'ARNv et d'une faible activité de la RT au sein du précurseur Gag-Pol ou d'un faible taux de RT sous forme libre dans le cytoplasme, après une protéolyse précoce du précurseur Gag-Pol. De plus, Tat possède un effet pléiotropique et peut réguler l'expression de cytokines, de récepteurs à cytokines... Il est possible que Tat possède d'autres effets sur les composants cellulaires, influençant l'efficacité de la rétrotranscription.

b. Les protéines cellulaires impliquées dans la rétrotranscription

La cyclophiline A est indispensable à l'infectivité du virion. Elle est encapsidée et intervient dans le désassemblage du « core » viral après l'entrée du virus. Son absence conduit à une initiation inefficace de la rétrotranscription (53).

La topoisomérase I se lie aux structures en tiges boucles de l'ARNv (331) et serait encapsidée par ce biais. La topoisomérase I augmente le taux d'ADN viral synthétisé, en agissant sur la processivité de la RT (330, 332).

D. La structure du complexe d'initiation chez d'autres rétrovirus et rétroéléments

Outre l'interaction de 18 nt entre l'extrémité 3' de l'ARN_{t₃^{Lys}} et l'ARNv de HIV-1, de nombreuses interactions intra- et intermoléculaires ont été proposées dont le rôle serait de faciliter une initiation efficace de la rétrotranscription (voir chapitre II.II.B.4) Ce type d'interactions additionnelles a été mis en évidence dans d'autres rétrovirus et rétroéléments, notamment dans RSV (7, 8, 82, 83), HIV-2 (46, 123), FIV (240), Ty1 (124, 127, 355) et Ty3 (131). En revanche, aucune interaction additionnelle n'a été identifiée dans le cas de MLV (118).

1. HIV-2

HIV-2 possède deux séquences riches en A susceptibles d'interagir avec la boucle de l'anticodon de l'ARN_{t₃^{Lys}} (36). Ces deux séquences sont situées en 5' du PBS, soit dans la boucle interne, soit dans la boucle apicale de la structure en tige boucle du domaine PBS. Une étude de cartographie enzymatique et de mutagenèse dirigée a permis d'établir un modèle de



structure secondaire du complexe $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ (123) (Figure 26). Contrairement à l'isolat MAL de HIV-1, aucun remaniement intramoléculaire n'est observée dans l'ARNv de HIV-2. Toutefois, deux interactions intermoléculaires ont été proposées. La boucle de l'anticodon de l' $ARNt_3^{Lys}$ interagirait avec la région riche en A (nt 287-290) localisée dans la boucle interne en amont du PBS. De plus, le bras TΨC de l' $ARNt_3^{Lys}$ pourrait interagir avec une séquence simple brin dans la région U5 (nt 240-247) de l'ARNv. Cet appariement est semblable à l'interaction PAS/anti-PAS proposée par le groupe de Berkhout pour HIV-1. Il semble que, comme dans le complexe binaire de l'isolat MAL de HIV-1, seul le bras D de l' $ARNt_3^{Lys}$ ne subisse pas de réarrangements.

HIV-1 et HIV-2 présentent des caractéristiques communes d'un point de vue structural mais également fonctionnel. La synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) peut aussi être divisée en deux étapes : une phase d'initiation suivie d'une phase d'élongation. L'initiation est caractérisée par la présence de deux pauses majeures en +5 et +7 (47).

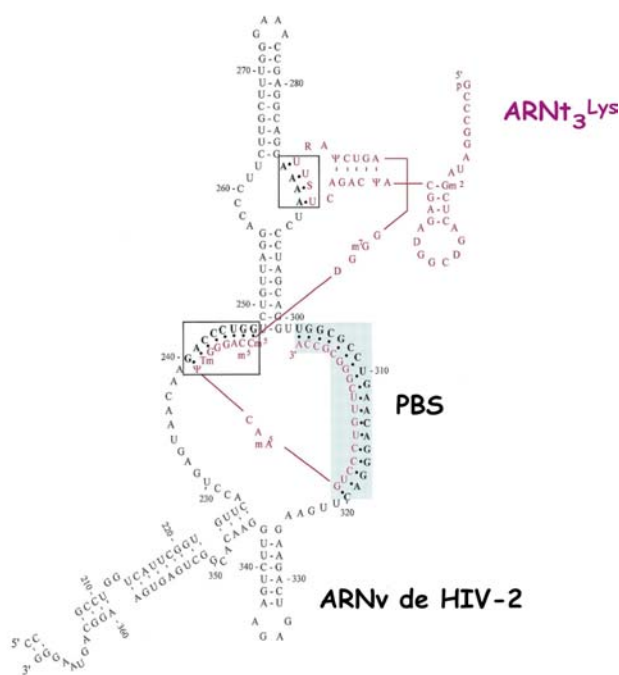


Figure 26 : *Modèle de structure secondaire du complexe binaire $ARNt_3^{Lys}/ARNv$ de HIV-2 (123).*

L'ARNv est représenté en noir et l' $ARNt_3^{Lys}$ en mauve. La région correspondant au PBS est surlignée en bleu.



2. FIV

L'initiation de la rétrotranscription de FIV nécessite l'utilisation de l'ARNt₃^{Lys} comme amorce. Contrairement à HIV-1 et HIV-2, l'ARNv de FIV ne possède pas de séquence riche en A dans une structure en tige boucle, en amont du PBS. Un appariement avec l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} est par conséquent impossible. L'apparition de pauses en position +14 au cours de la synthèse d'ADN «Strong-Stop» (-), en présence de RT homologue (RT FIV) ou hétérologue (RT HIV-1) a été constatée. Cet arrêt a été attribué par le groupe de Le Grice (240) à une interaction intermoléculaire entre l'extrémité 5' de l'ARNt₃^{Lys} et la boucle apicale de la région U5-IR de l'ARNv, 14 nt en amont du PBS. Cette interaction serait indépendante des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt₃^{Lys}.

3. RSV

L'extrémité 5' de l'ARNv de RSV est très structurée (Figure 27) : deux structures secondaires U5-IR (U5-inverted repeat) et U5-leader entourent le PBS. Des études suggèrent que ces motifs mais également leur orientation, qui dépend de la taille de la région « spacer » non appariée, sont impliqués pour une initiation efficace de la rétrotranscription (8). Entre ces deux motifs se trouve une séquence de 7 nt qui interagirait avec la boucle TΨC de l'ARNt^{Trp} utilisé comme amorce. Cette interaction semble essentielle pour une initiation efficace de la rétrotranscription *in vitro* et *ex vivo* (83, 7, 8). En effet, une substitution dans la région U5 empêchant cette interaction intermoléculaire diminue fortement l'initiation de la rétrotranscription. Ce défaut peut être restauré par une mutation compensatoire au niveau de l'amorce (7, 82).



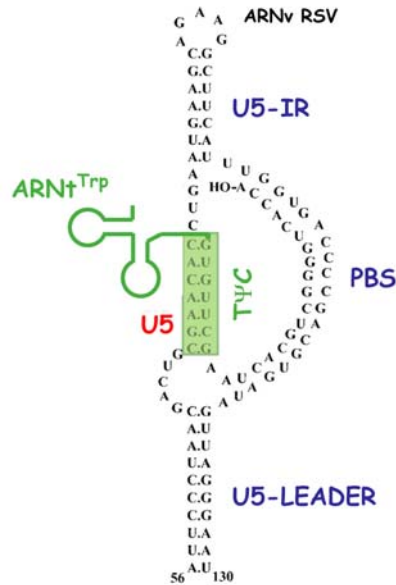


Figure 27 : Structure secondaire du complexe binaire $ARNt^{Trp}/ARNv$ de RSV (242).

4. MLV

MLV utilise l' $ARNt^{Pro}$ pour initier la rétrotranscription. Ce rétrovirus a la particularité de pouvoir utiliser un autre ARNt comme amorce à condition que le PBS soit muté pour être complémentaire à cet ARNt, sans conduire à une réversion du PBS qui restaure la complémentarité avec l' $ARNt^{Pro}$. Des études de cartographie en solution ont permis d'établir un modèle de structure secondaire du complexe binaire $ARNt^{Pro}/ARNv$ (Figure 28). L'interaction entre les deux molécules est limitée au PBS et aux 18 nt 3'-terminaux de l' $ARNt^{Pro}$ (118). Dans le complexe binaire, l' $ARNv$ subit de fortes contraintes structurales, et l' $ARNt^{Pro}$ présente des réarrangements structuraux à l'exception du bras de l'anticodon qui garde sa structure initiale. De façon surprenante, l'utilisation d'un $ARNt^{Pro}$ synthétique comme amorce conduit à des interactions plus étendues entre l' $ARNv$ et l'amorce (118). Contrairement à l'isolat MAL de HIV-1, les modifications post-transcriptionnelles de l' $ARNt^{Pro}$ défavorisent toute interaction additionnelle entre l' $ARNt^{Pro}$ et la région U5 de l' $ARNv$ de MLV.

MLV et HIV présentent des différences d'un point de vue structural. Cependant des ressemblances d'un point de vue fonctionnel sont observées. En effet, la synthèse d'ADN



« Strong-Stop » (-) de MLV se décompose également en une phase d'initiation suivie d'une phase d'élongation (176).



Figure 28 : *Modèle de structure secondaire du complexe binaire ARNt^{Pro}/ARNv de MLV (118).*

L'ARNt^{Pro} est représenté en vert et l'ARNv de MLV en noir.

5. Ty1

Les rétrotransposons présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles comparables aux rétrovirus. La rétrotranscription du rétrotransposon Ty1 est initiée à partir de l'ARNt_i^{Met}. Des études de cartographie en solution et de comparaison de séquences ont permis de proposer un modèle de structure secondaire du complexe ARNt_i^{Met}/ARN de Ty1 (126, 125) (Figure 29). Outre l'interaction de 10 nt entre le PBS de l'ARN de Ty1 et l'extrémité 3' de l'ARNt_i^{Met}, trois courtes régions de l'ARN de Ty1, appelées boîtes 0, 1 et 2.1 interagissent avec les bras TΨC et D de l'ARNt_i^{Met} (125). Toute mutation empêchant la formation de ces hélices intermoléculaires affecte l'initiation de la synthèse de l'ADN « Strong-Stop » (-) (125, 124, 355). La boîte 0 permet également, en interagissant avec l'ARNt_i^{Met}, d'allonger l'hélice double brin du PBS jusqu'à 17 appariements, taille comparable à la région ARNt/ARNv des rétrovirus (125, 126).



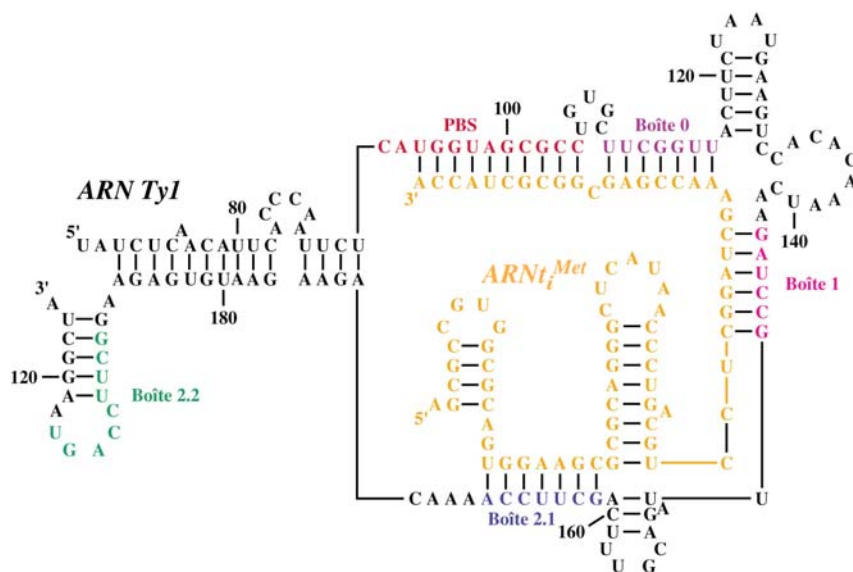


Figure 29 : Modèle de structure secondaire du complexe $ARNt_i^{Met}/ARN$ de Ty1 (124).

L'ARN de Ty1 est représenté en noir et l' $ARNt_i^{Met}$ en orange. Les boîtes 0, 1, 2.1 et 2.2 de l'ARN de Ty1 sont respectivement en violet, rose, bleu et vert. Le PBS est en rouge.

6. Ty3

Dans le cas du rétrotransposon Ty3, l'initiation de la rétrotranscription nécessite également l'utilisation de l' $ARNt_i^{Met}$ comme amorce. Cependant à la différence de Ty1, le PBS de Ty3 est bipartite (131). Les deux séquences formant le PBS sont localisées aux extrémités 5' et 3' de l'ARN de Ty3 (Figure 30). Le PBS en 3' initie l'hybridation de l'amorce tandis que le PBS en 5' est requis comme site d'initiation de la rétrotranscription. Bien que l'ARN de Ty3 soit incapable de dimériser seul, des dimères du complexe binaire sont observés (131). Ils résulteraient de l'interaction des extrémités 5' de deux $ARNt_i^{Met}$ initiant la rétrotranscription, sur deux molécules d'ARN différentes. Cette structure particulière, rapprochant les extrémités 5' et 3' de l'ARN génomique pourrait faciliter le premier transfert de brin.



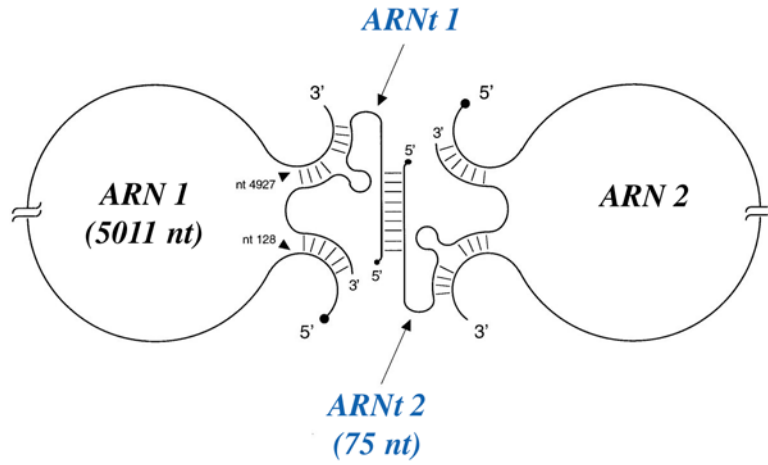


Figure 30 : Modèle schématique de la structure du complexe ARNt_i^{Met}/ARN de Ty3 (131).



Chapitre III : L'inhibition de la rétrotranscription de HIV-1

Différentes classes de molécules anti-HIV sont actuellement testées. Elles sont dirigées contre la plupart des étapes du cycle répliatif, à savoir la fusion, la décapsidation, la rétrotranscription, l'intégration, la transcription, le transport des ARNm non épissés, l'encapsidation de la cyclosporine A, la glycosylation de gp120/gp41, la maturation des précurseurs protéiques par la protéase... Cependant, seules trois classes d'inhibiteurs sont approuvées par la FDA (Food and Drug Administration). Les anti-rétroviraux commercialisés ciblent la fusion, la protéase virale et la rétrotranscriptase. Deux types d'inhibiteurs dirigés contre la RT sont employés : les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNRTI) et les inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques (NRTI). Nous allons nous focaliser uniquement sur les anti-rétroviraux dirigés contre la RT.

I. La rétrotranscriptase

Les différents éléments structuraux caractérisant la RT (183) ont été déterminés grâce à de nombreuses structures cristallographiques de la RT libre, complexée avec différents inhibiteurs ou en interaction avec un complexe amorce/matrice (A/M) sans ou avec un dNTP « entrant » (169, 183, 206, 258, 279, 290, 342).

A. Structure tridimensionnelle de la RT

La RT est un hétérodimère composé de deux sous-unités : p66 et p51. La sous-unité p66 se structure en cinq domaines distincts : le domaine RNase H, qui correspond à la partie C-terminale de p66 et qui est absent de p51, et quatre domaines dont trois forment le site catalytique de polymérisation (169, 183, 206). Par analogie entre la structure tridimensionnelle de la RT et une main droite, ces trois domaines structuraux ont été nommés pouce, paume et doigts (206). Le quatrième domaine relie le site de polymérisation au domaine RNase H et est appelé connexion. Bien que les quatre domaines soient structurellement très proches dans les deux sous-unités, leur position

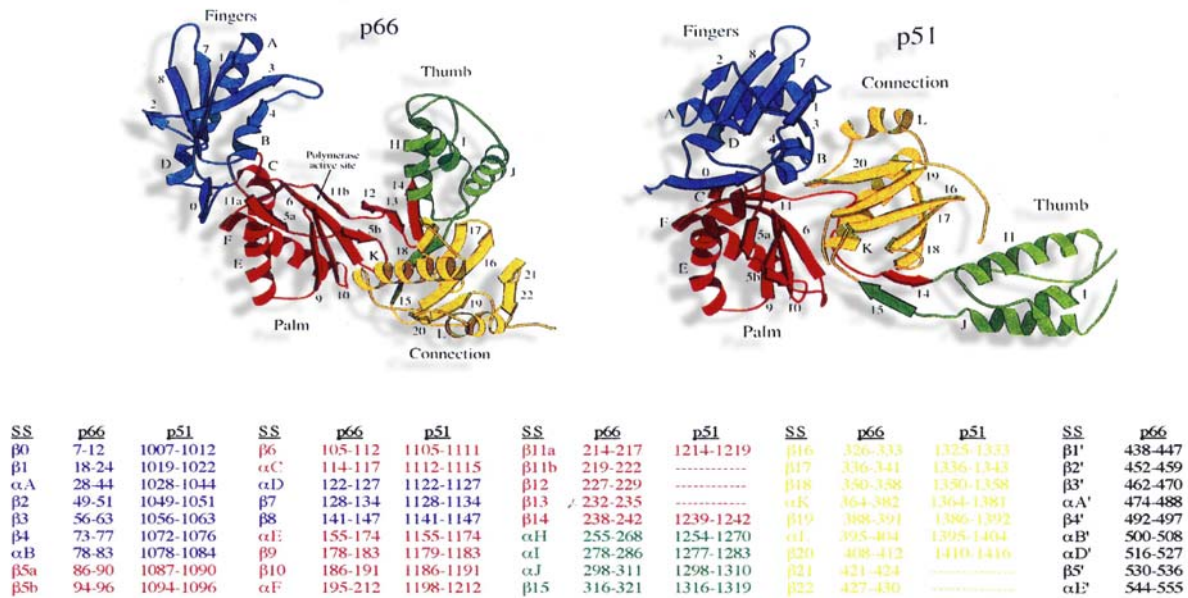


Figure 31 : Structure tridimensionnelle des sous-unités p66 et p51 de la RT de HIV-1.

Les doigts sont représentés en bleu, la paume en rouge, le pouce en vert et le domaine de connexion en jaune. Les hélices α et les feuillets β sont indiqués respectivement par des lettres (αA , αB ...) et des chiffres ($\beta 0$, $\beta 1$...). Le tableau donne la localisation des différents domaines structuraux dans p66 et p51 (d'après (183)).



Figure 32 : Structure tridimensionnelle de la RT de HIV-1.

Les domaines structuraux de la sous-unité p66 sont représentés dans différents coloris : les doigts sont en bleu, la paume en rouge, le pouce en vert, la connexion en mauve et le domaine RNase H en jaune. La sous-unité p51 est colorée en orange.

relative diffère d'une sous-unité à l'autre, si bien que p51 ne possède pas d'activité polymérase.

1. Les domaines structuraux de la RT (Figures 31,32)

a. La sous-unité p66

- *Les doigts* (aa 1-84 et 120-150) : ils sont formés d'un feuillet β mixte et de trois hélices α et sont impliqués dans le contact avec le brin matrice (51, 183).

- *La paume* (aa 85-119 et 151-244) : elle est constituée de deux feuillets β anti-parallèles interrompus par trois hélices α et contient le site catalytique de polymérisation avec la séquence YMDD (Tyr183, Met184, Asp185 et Asp186) conservée dans les rétrotranscriptases (189). Trois résidus aspartiques (Asp110, Asp185, et Asp186) impliqués dans l'interaction avec deux ions Mg^{2+} et la partie 5' triphosphate du dNTP, forment le site catalytique (102, 169, 259). Le motif "primer grip" impliqué dans le positionnement du complexe A/M, est également localisé dans la paume de la RT (aa 229-232 : feuillets β 12 et β 13).

- *Le pouce* (aa 245-322) : il est constitué de trois hélices α et d'un brin β et intervient dans la fixation du complexe A/M. Comme dans beaucoup d'autres polymérases, un motif conservé ("helix clamp"), riche en résidus basiques, participe à la liaison du squelette ribose-phosphate des acides nucléiques (160, 170, 183).

- *Le domaine de connexion* (aa 323-437) : il est composé de deux feuillets β et de deux hélices α et relie le domaine de polymérisation au domaine RNase H. Il contient un grand nombre de résidus hydrophobes responsables de la dimérisation de la RT (104, 349).

- *Le domaine RNase H* (aa 438-460) : il est constitué d'un feuillet β anti-parallèle et de quatre hélices α . Sa structure s'avère être très proche de celle de la RNase H d'*E. coli* et de *T. thermophilus* (91, 165). Le domaine RNase H n'adopte sa conformation active qu'en interaction avec la sous-unité p51, dont le pouce (en particulier l'hélice α I) forme le plancher du site catalytique RNase H. Cinq aa constituent ce site catalytique : Asp443, Glu478, Asp498, et dans une moindre mesure, His539 et Asp549.

b. La sous-unité p51

L'organisation spatiale de la sous-unité p51 est beaucoup plus refermée que celle de p66, expliquant pourquoi p51 ne possède pas de cavité de liaison du substrat et ne porte pas d'activité catalytique. La différence majeure avec p66 se situe au niveau du domaine de connexion qui vient s'intercaler entre la paume et le pouce (183, 206). Le domaine de connexion peut alors interagir avec les trois autres domaines de p51 ainsi qu'avec le domaine de connexion de p66 pour permettre l'hétérodimérisation de la RT (104). De plus, il forme avec le domaine de connexion de p66 et le pouce de p51 le plancher pour la fixation de complexe A/M (183). Cette conformation empêche le regroupement des aa catalytiques (Asp110, Asp185 et Asp186) qui forment le site actif (18, 217).

2. Comparaison des structures cristallographiques de la RT libre ou liée (Figure 33)

L'obtention et la superposition de différentes structures cristallographiques de la RT libre, complexée à un inhibiteur non-nucléosidique (la Névirapine) ou liée à un duplex ADN/ADN en présence du dNTP entrant (ADN/ADN : dNTP ou complexe catalytique) a permis d'observer des changements conformationnels au sein de la sous-unité p66.

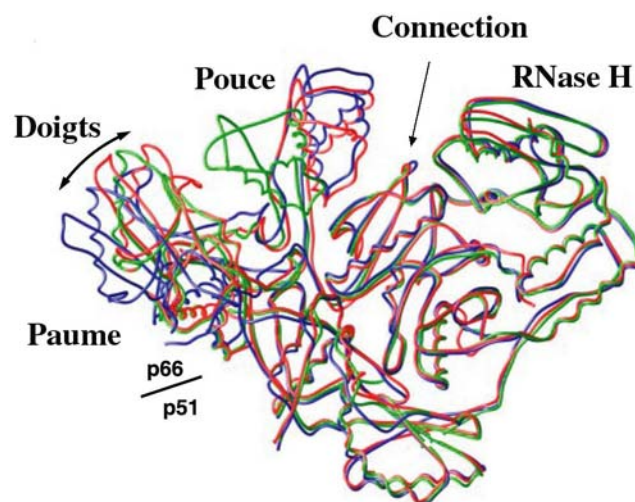


Figure 33 : Superposition des structures cristallographiques de la RT libre (en vert) (286), complexée à un inhibiteur non-nucléosidique, la Névirapine, (en bleu) (275) ou en interaction avec un duplex ADN/ADN : dNTP (en rouge) (169) (d'après (169)).

Cette flexibilité s'observe surtout au niveau du pouce et des doigts (169). Au sein de la RT libre, le pouce de p66 est replié vers la paume, au dessus du site de polymérisation et entre en contact avec des résidus des doigts (279, 290). La fixation de la Névirapine entraîne un mouvement du pouce, s'écartant des doigts ainsi qu'un léger mouvement de l'unité doigts-paume. Dans le complexe catalytique, un déplacement des doigts vers la paume est observé (170, 183, 280). La paume, quant à elle, ne subit que très peu de modifications (169). Le complexe catalytique est dit « fermé ».

Récemment, la première structure cristallographique de la RT complexée à un duplex ADN en présence d'un analogue de nucléotide a été résolue (342). Le Tenofovir se trouve dans le site de fixation du dNTP. La conformation de la RT dans ce complexe est similaire à celle obtenue en présence d'un duplex ADN/ADN : dTTP. De plus, la structure cristallographique de la RT complexée à un nouvel NNRTI, CP-94,707, a été résolue (258). Elle suggère que la conformation de la poche hydrophobe en présence de CP-94,707 ressemble d'avantage à celle observée en présence d'une RT libre qu'à celle obtenu en présence d'une RT liée aux autres NNRTI.

3. Structure des duplex ADN/ADN ou ADN/ARN (Figures 34-36)

L'ADN double brin complexé à la RT de HIV-1 possède une structure hybride (Figure 34-A) (102). Il s'étend du site actif de polymérisation au site RNase H et contient 18 paires de bases. Les 5 premières paires de bases du côté du site de polymérisation adoptent une conformation de type A et les 9 paires de bases proches du site RNase H adoptent une conformation de type B. Une courbure de 41° impliquant 4 paires de bases permet de faire la jonction entre les deux formes d'ADN. Cette jonction n'adopte ni une conformation A, ni une conformation B.

Les structures cristallographiques de la RT ont permis d'identifier les régions interagissant avec le duplex ADN/ADN et permettant son positionnement correct au niveau du site de polymérisation ou RNase H. Les trois aa essentiels formant la triade catalytique (Asp110, Asp185 et Asp186) sont localisés à proximité de l'extrémité 3' de l'amorce. Une liaison hydrogène entre l'extrémité 3'OH de l'amorce et la chaîne latérale de Asp185 facilite l'attaque nucléophile au cours de la polymérisation (101, 102). De plus, de nombreuses interactions entre le duplex et le site de fixation de la RT ont lieu et impliquent à la fois des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques (Figure 34-B). Des changements

conformationnels du motif YMDD accompagnent la fixation du duplex A/M. Cette nouvelle conformation positionne les aa Asp185 et Asp186 pour une catalyse efficace.

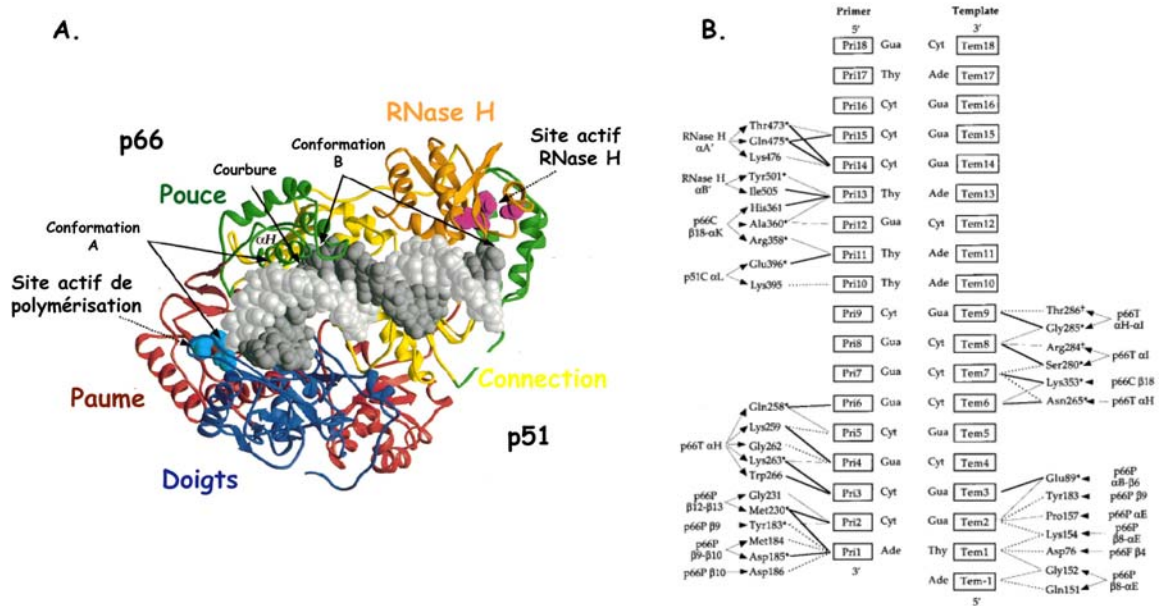


Figure 34 : Structure de la RT de HIV-1 complexée à un duplex A/M (101).

A : Le duplex A/M complexé à la RT de HIV-1 avec le site actif de polymérisation à gauche et le domaine RNase H à droite. On peut noter le changement de conformation et la courbure du duplex ADN/ADN. Les domaines pouce, paume, doigts et connection des sous-unité p66 et p51 sont colorés respectivement en vert, rouge, bleu et jaune. Le domaine RNase H de la sous-unité p66 est en orange. La matrice est représentée en gris foncé et l'amorce en gris clair ; B : Interactions entre les acides aminés de la RT et le duplex ADN/ADN. Les liaisons hydrogènes sont représentées par des astérisques, les autres types d'interactions en noir.

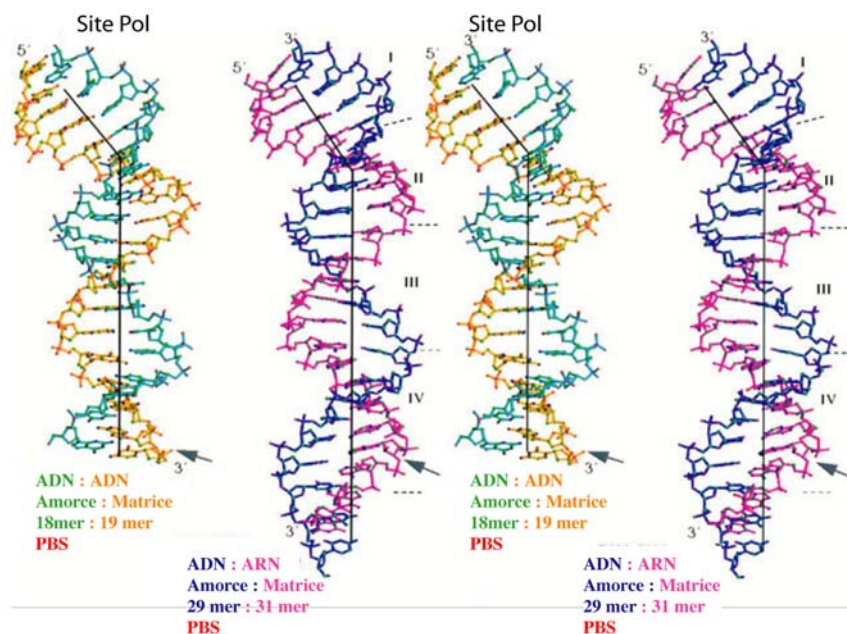


Figure 35 : Vue stéréo croisée des duplex A/M dans les complexes RT:A/M ADN/ADN (102)

et RT RT:A/M ADN/ARN (302) (d'après (302)).

La structure cristallographique de la RT liée à un complexe ADN/ARN contenant la séquence PPT a été résolue (302). Des changements modestes sont observés dans la structure de la RT complexée à l'hybride ADN/ADN ou ADN/ARN. Les contacts entre la RT et l'amorce (ADN) sont similaires dans les deux cas. En revanche, quelques différences de contacts entre la matrice ARN ou ADN et la RT sont observées. La structure adoptée par les acides nucléiques varie légèrement (Figure 35). La courbure en aval du site de polymérisation est présente dans les deux cas, cependant le complexe ADN/ARN possède une structure proche de la conformation de type A dans le site catalytique (région I de 4 paires de bases) et n'adopte ni une conformation A, ni une conformation B de l'ADN dans le site RNase H, mais une forme intermédiaire, H (302). La différence majeure entre les duplex ADN/ADN et ADN/ARN se situe aux environs du site catalytique de la RNase H (302). En effet, une région surprenante sur environ 7 paires de bases au niveau du stretch de T de l'amorce, comprenant des nt non appariés, un mésappariement et des interactions faibles, est observée dans la structure cristallographique du duplex ADN/ARN. Un mésappariement au niveau de la 16^{ème} paire de base à partir du site polymérase permet de retrouver un appariement correct du duplex ADN/ARN (Figure 36). Ce mésappariement n'affecte cependant pas la structure générale du duplex (302).

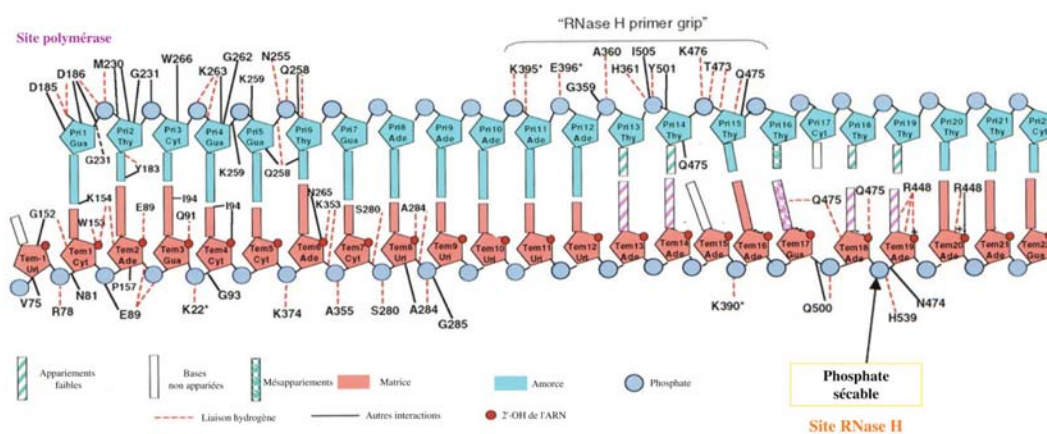


Figure 36 : Schéma du complexe matrice/amorce ADN/ARN PPT.

La matrice est représentée en rose et l'amorce en bleu et sont désignées respectivement par Tem et Pri. Les nt sont numérotés à partir du site polymérase. Les aa de la sous-unité p51 sont désignés par une

astérisque ; les autres appartiennent à la sous-unité p66.

4. Le site de fixation du nucléotide (Figure 37)

La structure de la RT de HIV-1 complexée à un duplex ADN/ADN où l'amorce est terminée par un didésoxynucléotide, en présence d'un dNTP entrant, a été résolue (169). L'amorce dépourvue d'extrémité 3'-hydroxyle bloque toute polymérisation. Dans cette structure, le dTTP entrant est apparié avec la base de la matrice et est empilé sur la base de l'extrémité 3' de l'amorce. Cette structure permet d'identifier les aa impliqués dans l'activité catalytique et confirme les résultats antérieurs de mutagenèse dirigée (303) et de modélisation à partir des structures cristallographiques (259).

La partie triphosphate du nucléotide est coordonnée par la Lys65, l'Arg72, les groupements amino des chaînes peptidiques des résidus 113 et 114, et par les deux ions magnésiums du site catalytique. Le repositionnement des doigts vers la paume permet aux groupes guanidium de l'Arg72 et amino de la Lys65 d'interagir respectivement avec les phosphates α et γ du dTTP.

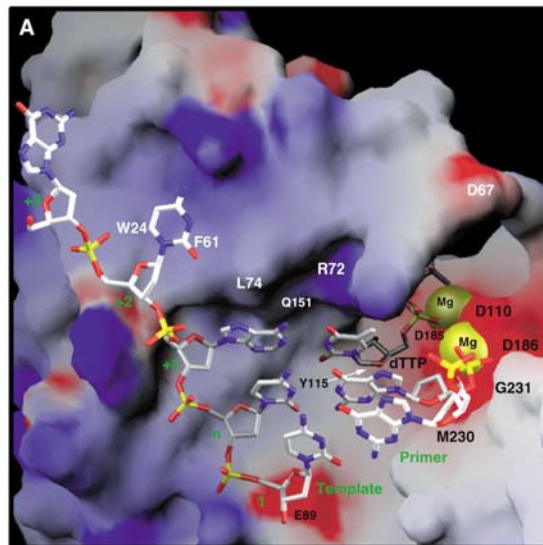


Figure 37 : Structure du site actif de la RT de HIV-1.

Les régions électrostatiquement négatives et positives de la RT sont représentées respectivement en bleu et en rouge. Les ions Mg^{2+} sont représentés par des boules jaunes (d'après (169)).

Le 3'-hydroxyle du nucléotide entrant se retrouve dans une petite poche formée des chaînes latérales de l'Asp113, la Tyr115, la Phe116 et la Gln151, ainsi que par la chaîne peptidique des résidus 113 et 115. Le groupement amino de la Tyr115 forme une liaison

hydrogène avec l'oxygène du phosphate γ . La structure de cette poche est primordiale pour comprendre les relations entre la structure et l'activité des analogues de nucléosides (169).

B. Mécanisme de polymérisation par la RT

1. Réaction enzymatique d'incorporation de nucléotides (Figure 38)

La réaction de polymérisation par la RT de HIV-1 permet d'allonger une amorce ARN ou ADN hybridée à une matrice. L'incorporation d'un nucléotide est accompagnée de la libération de PPi. La polymérisation est un mécanisme de type bi-bi ordonné qui nécessite en premier lieu la reconnaissance et la fixation du complexe A/M, puis des dNTP. Elle est accompagnée de changements conformationnels de la RT. L'attaque nucléophile par l'extrémité 3'-hydroxyle de l'amorce du phosphate α du nucléotide entrant forme une liaison phosphodiester et permet son incorporation. Ce mécanisme nécessite la chélation de deux ions Mg^{2+} (287), impliqués dans des interactions avec le nucléotide entrant et l'extrémité 3'OH de l'amorce (169).

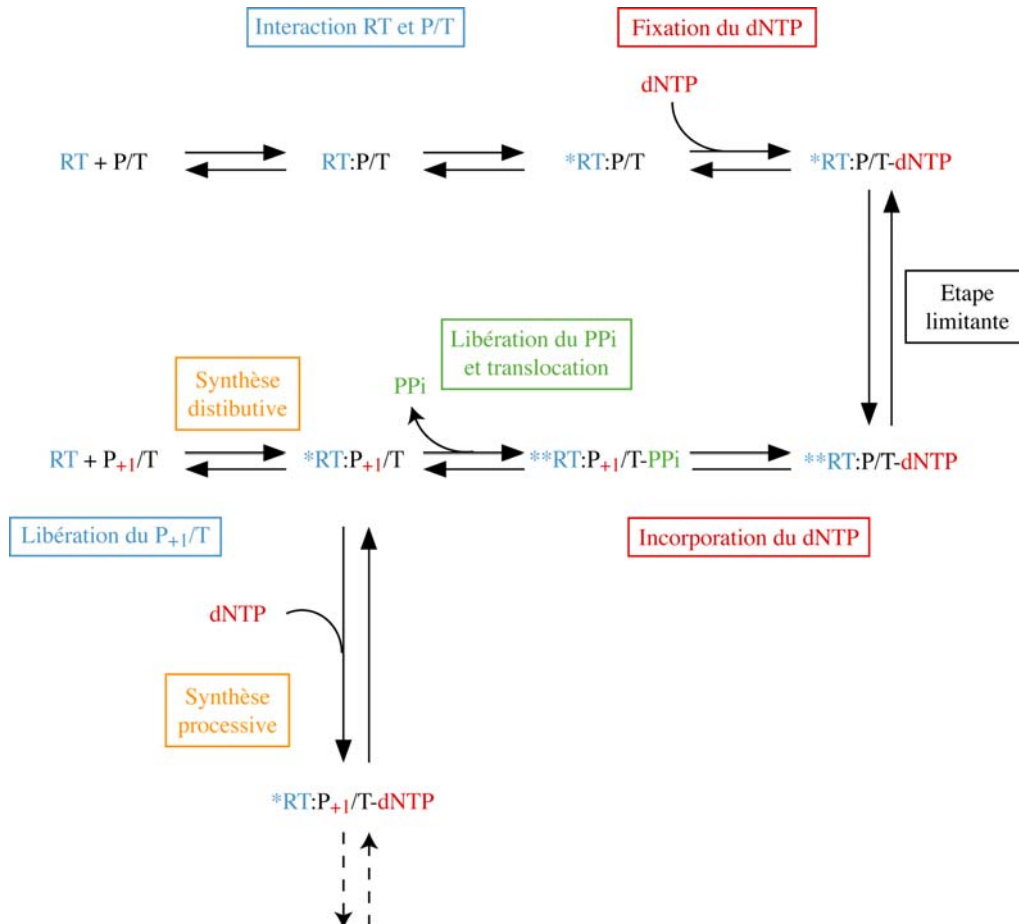


Figure 38 : Schéma des étapes de polymérisation d'un nucléotide par la RT de HIV-1.

Les astérisques symbolisent les changements conformationnels liés à la fixation des substrats.

La réaction de polymérisation peut se diviser en plusieurs étapes :

* La fixation du complexe A/M à l'enzyme libre est suivie d'une étape lente d'isomérisation (103, 210). Elle entraîne un mouvement du pouce qui permet le placement correct du complexe A/M au niveau du site catalytique (169, 183).

* La fixation du dNTP est également un mécanisme biphasique. La reconnaissance du dNTP se fait tout d'abord de manière non-sélective et est suivie du placement correct du nucléotide complémentaire à la base de la matrice (187, 287). Ce placement est suivi d'un changement conformationnel qui précède la catalyse et qui est l'étape limitante de ce processus (166, 197). Elle pourrait correspondre à la fermeture des doigts, comme c'est le cas chez d'autres polymérases (106).

* L'étape catalytique aboutit à la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH de l'amorce et le dNTP entrant. L'amorce est allongée d'un nucléotide et permet l'obtention d'un complexe RT-P₊₁/T-PPi. Le PPi est ensuite relargué, libérant ainsi un complexe RT-P₊₁/T. Ce complexe peut alors suivre deux directions : soit la RT se dissocie et libère le complexe P₊₁/T, soit elle entre dans un nouveau cycle catalytique. Afin de permettre un second cycle catalytique, la RT subit une translocation afin de positionner la nouvelle extrémité 3'-hydroxyle dans le site catalytique. La translocation se fait soit de manière concomitante à la libération du PPi (197), soit juste après (232). Le relargage du PPi pourrait favoriser l'ouverture des doigts et l'obtention d'un complexe ouvert.

2. Processivité de la RT

La synthèse d'ADN est dite processive lorsque la RT incorpore plusieurs nt sans se dissocier du complexe A/M. Elle est dite distributive lorsque la RT se dissocie du complexe A/M après addition de chaque nt. Le rapport k_{pol}/k_{off} détermine le type de polymérisation. Une vitesse de polymérisation (k_{pol}) très supérieure à la vitesse de dissociation (k_{off}) de la RT du complexe A/M ($k_{pol} \gg k_{off}$) traduit une polymérisation de type processif. Par opposition, une polymérisation de type distributif se traduit par un rapport k_{pol}/k_{off} inférieur à 1.

Un troisième type de polymérisation correspond à la terminaison forcée, induite par la présence d'un seul nucléotide pouvant être incorporé, ou par l'incorporation d'un terminateur de chaîne. Dans ce cas, la RT ne peut incorporer le nucléotide suivant, même si le k_{pol} est

supérieur au k_{off} .

II. Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase

Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase peuvent se diviser en deux catégories qui présentent des caractéristiques distinctes :

- * Les inhibiteurs non-nucléosidiques ou NNRTI.
- * Les inhibiteurs nucléosidiques ou NRTI.

L'efficacité des trithérapies pour la majorité des personnes infectées par HIV ne fait plus aucun doute. Le schéma thérapeutique de première intention reste essentiellement l'association de 2 NRTI et d'un antiprotéase ou d'un NNRTI. Ce traitement est lourd et de nombreux effets secondaires sont observés. Toutefois, ces traitements permettent d'obtenir une charge virale indétectable et une assez bonne restauration du système immunitaire diminuant le risque d'infections opportunistes. Cependant même un traitement thérapeutique prolongé ne permet pas l'éradication du virus. Des provirus intégrés et latents subsistent et des mutations de résistance peuvent apparaître.

A. Les inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTI)

Actuellement, trois inhibiteurs non nucléosidiques sont approuvés par la FDA : la Névirapine, la Delavirdine et l'Efavirenz.

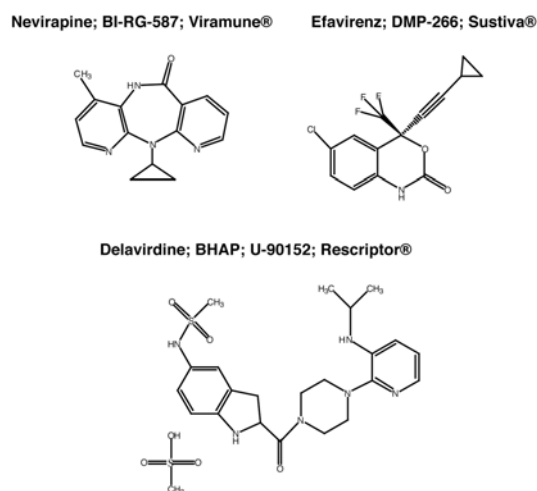


Figure 39 : Inhibiteurs non-nucléosidiques de la rétrotranscriptase de HIV-1 approuvés par

la FDA.

Les NNRTI se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques substitués par des groupements divers (Figure 39) (94, 95). Bien que leur structure soit fondamentalement différente, ils inhibent spécifiquement la RT de HIV-1 (93).

Ils agissent en se fixant dans une poche hydrophobe proche du site actif de polymérisation de la RT de HIV-1. Cette poche est constituée principalement de résidus appartenant à la paume et au pouce de la sous-unité p66. Les NNRTI établissent de nombreuses interactions hydrophobes avec les aa aromatiques de la poche hydrophobe notamment Tyr181, Tyr188 et Trp229. La fixation de l'inhibiteur entraîne des réarrangements structuraux, dont un changement conformationnel des aa clés Tyr181 et Tyr188 (113, 323). Les NNRTI sont inactifs contre la RT de HIV-2. Bien que la RT de HIV-2 présente une poche hydrophobe très semblable à celle de HIV-1, la substitution des résidus 101, 181 et 188 par des résidus conférant une résistance aux NNRTI chez la RT de HIV-1 est observée (Lys101Ala, Tyr181Ile et Tyr188Leu) (278).

Les NNRTI sont des inhibiteurs allostériques non compétitifs (323). Ils diminuent la vitesse d'incorporation de nucléotides en entraînant un changement conformationnel de la RT qui déplace les résidus aspartates catalytiques (113). Ils ne modifient pas l'affinité du dNTP et du complexe A/M pour la RT.

Il a récemment été proposé un autre mécanisme d'inhibition par un nouveau NNRTI, CP-94,707, actif contre la plupart des RT résistantes aux NNRTI (258). Bien que cet inhibiteur se fixe dans la poche hydrophobe de la RT, il adopte une position différente des autres NNRTI. Par conséquent, la conformation de la poche hydrophobe ressemble à celle de la RT libre. L'inhibition de la synthèse d'ADN est liée à un réarrangement conformationnel d'un résidu localisé dans le site de fixation du dNTP entrant, empêchant sa fixation.

B. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (NRTI)

1. Structure des NRTI (Figure 40)

L'AZT (Zidovudine) a été la première molécule anti-HIV approuvée par la FDA en 1987. L'AZT est un analogue de la thymidine possédant un groupement azido à la place du groupement hydroxyle en 3' du ribose. Les ddI (Didanosine) et ddC (Zalcitabine), deux didésoxynucléotides, ont été approuvés respectivement en 1991 et 1992. Plus récemment, la

famille d'inhibiteurs nucléosidiques s'est étendue aux composés comprenant une double liaison entre les positions 2' et 3' du didésoxyribose : ils incluent le d4T ou Stavudine et l'ABC ou Abacavir. D'autres molécules avec un groupement β -L-oxathiolane à la place du groupement ribose, le 3TC ou Lamivudine et le FTC ou Emtricitabine, ont été approuvées. Le PMPA ou Ténofovir, est le seul analogue de nucléotide commercialisé. Tous ces composés ont un point commun : ce sont des terminateurs de chaîne, puisqu'ils ne possèdent pas de groupement hydroxyle en position 3' du ribose.

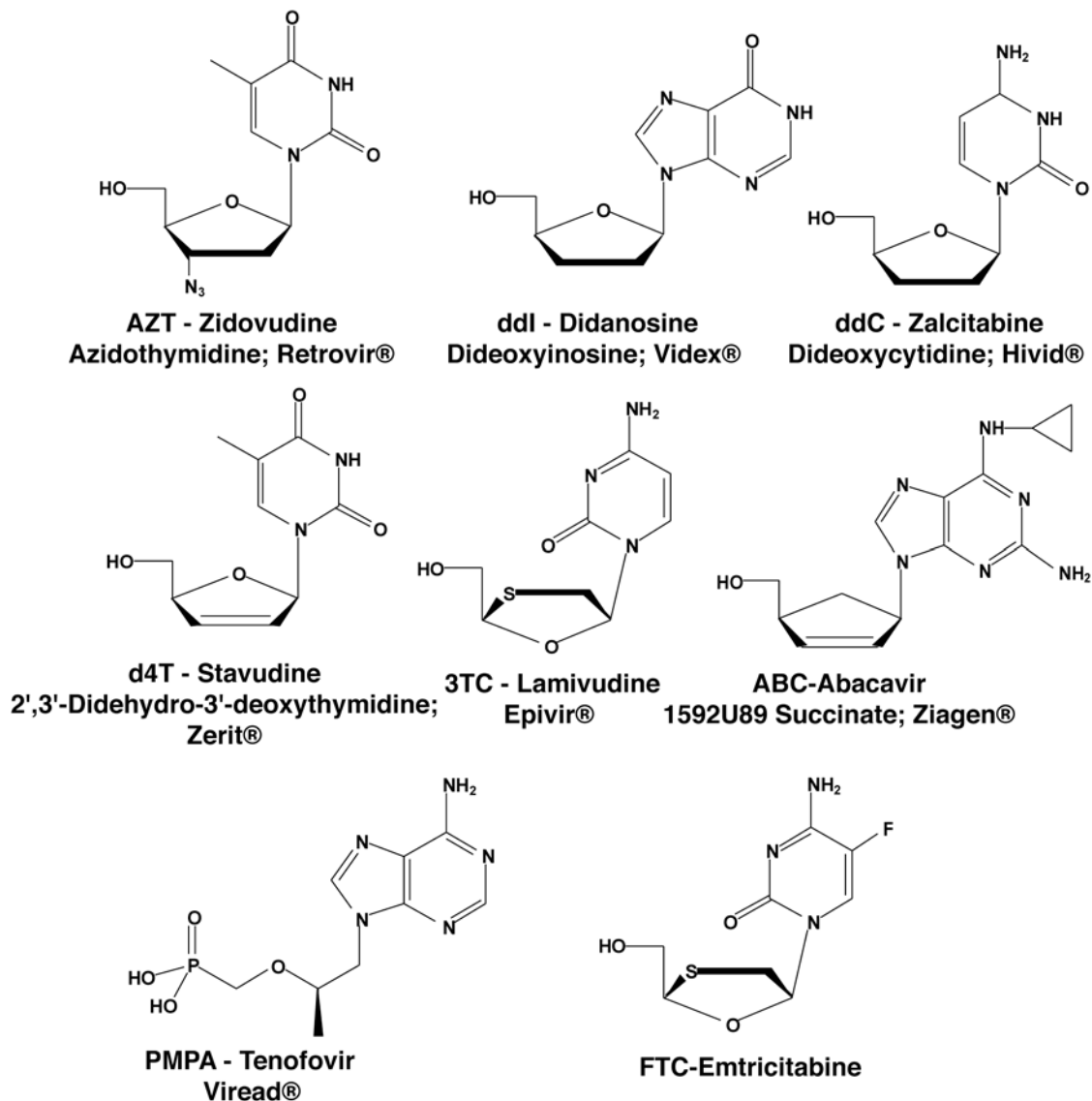


Figure 40 : Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidique de la rétrotranscriptase de HIV-1.

2. Mécanisme d'action

a. La phosphorylation et l'incorporation dans la chaîne d'ADN (Figures 41-42)

Contrairement aux NNRTI qui interagissent avec la RT directement après leur pénétration intracellulaire, les NRTI sont délivrés sous forme de pro-drogues. En effet, ils sont administrés sous forme nucléosidique aux patients (exception faite du Ténofovir) et nécessitent plusieurs étapes d'activation afin d'agir en tant que terminateurs de chaîne. Ils doivent être phosphorylés par des enzymes cellulaires. Contrairement aux nucléosides qui doivent être triphosphorylés (23, 129), le PMPA, qui possède un groupement phosphonate, doit être diphosphorylé (109) (Figure 41). Ce dernier sera converti plus facilement en drogue active. Dans la plupart des cellules, l'étape limitante est la première phosphorylation du composé par une kinase, à l'exception de l'AZT, où la phosphorylation du nucléoside monophosphate est limitante. Un problème majeur est la faible affinité des analogues de nucléosides ou de nucléotides pour les kinases cellulaires, dont l'activité varie d'une cellule à l'autre. Par exemple, les kinases présentes dans les monocytes et les macrophages sont peu actives, empêchant les NRTI d'inhiber la RT et de prévenir toute transmission juste après une exposition à HIV. Par ailleurs, le ddI et l'Abacavir doivent subir une étape de modification afin d'être transformés respectivement en ddAMP et CBVMP (carbovir monophosphate) (188, 275). A l'heure actuelle, les voies de phosphorylation du Ténofovir ne sont pas encore élucidées.

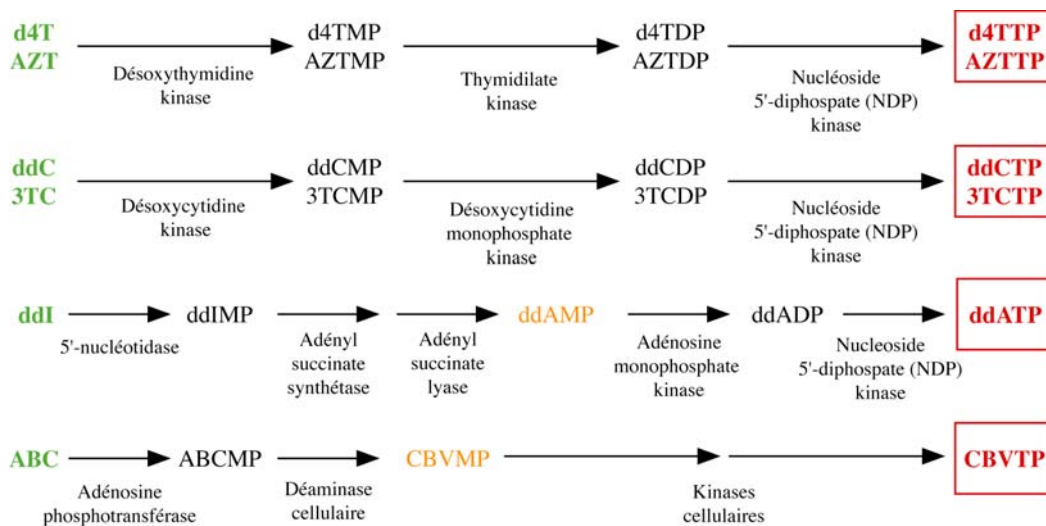


Figure 41 : Etapes de phosphorylation des NRTI.

CBV signifie carbovir qui est la forme active de l'Abacavir (ABC). -MP pour monophosphate, -DP pour diphosphate et -TP pour triphosphate. L'enzyme responsable du passage du 3TCDP au 3CTP n'est sans doute pas la NDP-kinase.

Les NRTI triphosphorylés se fixent dans le site actif de la polymérase, où ils entrent en compétition avec les dNTP naturels. Leur incorporation dans la chaîne d'ADN naissante conduit à un arrêt de synthèse provoqué par l'absence de 3'-hydroxyle sur le ribose. Ils empêchent ainsi la formation de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant et agissent comme terminateurs de chaîne (Figure 42).

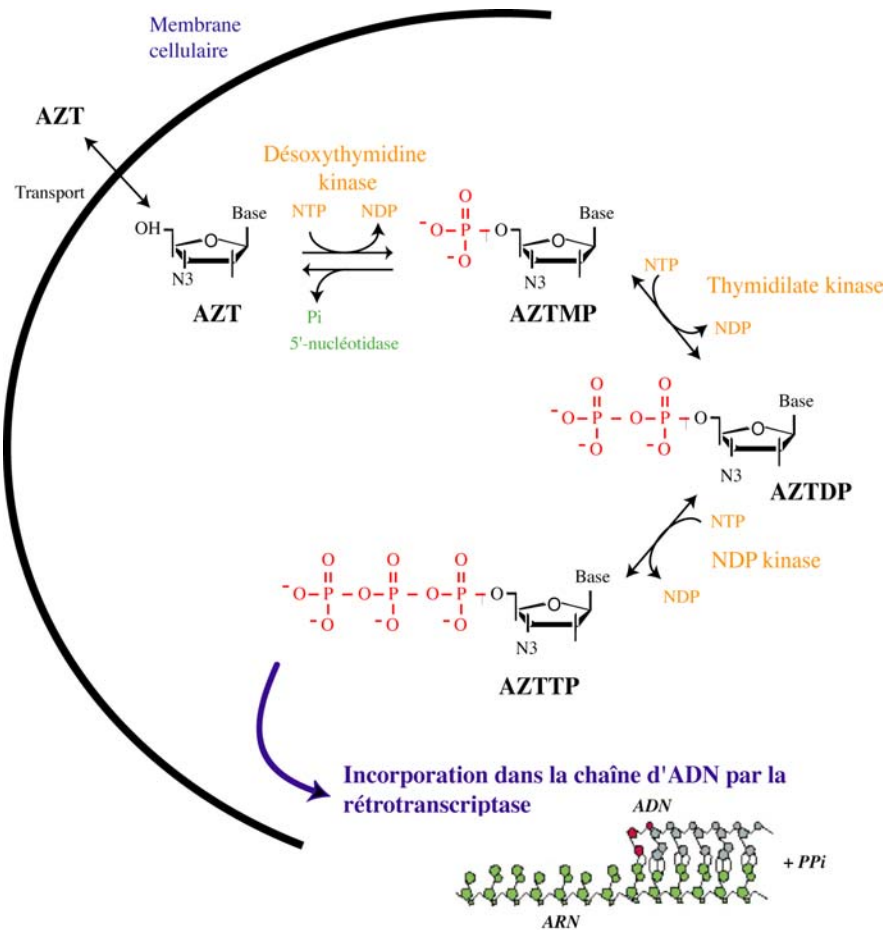


Figure 42 : *Phosphorylation et incorporation : cas de l'AZT.*

Après la phosphorylation par des kinases cellulaires, l'AZT est incorporé dans la chaîne d'ADN par la rétrotranscriptase.

Les limitations majeures des NRTI sont leur toxicité, leur manque d'activité dans certaines cellules et l'apparition de virus résistants. Leur activité et leur efficacité d'action dépend à la fois de leur taux de phosphorylation, qui détermine la concentration intracellulaire de la forme active, et de leur capacité à être compétitif vis-à-vis du dNTP naturel. Idéalement, les NRTI devraient avoir une meilleure affinité et une vitesse d'incorporation supérieure à celle des nucléotides naturels.

III. Résistance aux inhibiteurs de la RT

L'émergence de virus résistants aux NRTI, NNRTI ou inhibiteurs de protéase peut être très rapide. Des mutations de résistance spécifiques peuvent être associées à chaque composé et leurs modes d'action sont actuellement étudiés. Elles apparaissent au cours de l'étape de rétrotranscription à des fréquences élevées et se situent principalement dans le gène codant pour la RT et la protéase virale (319). Cette variabilité génétique peut s'expliquer par la faible fidélité de la RT et par une fréquence élevée de recombinaison (246).

A. Mode d'apparition des virus résistants

1. Fidélité de la RT

La RT de HIV-1 est une ADN polymérase peu fidèle. La fréquence d'incorporation d'un dNTP mal apparié est élevée : entre 1/1700 et 1/4000 (231, 271, 283, 288). L'absence d'activité 3'-exonucléasique (correctrice ou « proofreading ») ne permet pas d'expliquer entièrement ce manque de fidélité. En effet, d'autres RT (AMV, MuLV) ne possédant pas cette activité correctrice, présentent une fidélité 10 à 18 fois plus élevée (289). La RT de HIV-1 a la faculté de poursuivre la synthèse d'ADN au delà des mésappariements. La faible fidélité de la RT présente à la fois un avantage et un inconvénient lors du traitement par les NRTI. En effet, elle favorise l'incorporation de composés de structures différentes de celles des nucléotides naturels dans l'ADN, mais permet également l'émergence rapide de virus résistants aux NRTI.

2. La recombinaison

La variabilité génétique peut également être générée par une recombinaison qui est rendue possible par le caractère dimérique du génome viral. La recombinaison a lieu au cours de la rétrotranscription, lorsque la RT utilise les deux brins alternativement comme matrice, par transfert ou déplacement de brin (246). La co-infection par des souches différentes, qui a lieu fréquemment chez les patients (191), permet la co-encapsidation d'ARN génomiques non identiques. Ce mécanisme de recombinaison qui génère un ADN proviral hybride augmente d'autant plus la variabilité génétique et pourra aboutir à la formation d'un virus multirésistant.

A l'initiation d'un traitement thérapeutique, la charge virale diminue, mais des virus peuvent résister à l'action d'agents antirétroviraux et conduire à un échec thérapeutique.

En effet, la faible fidélité de la RT de HIV-1 et la recombinaison peut conduire à l'apparition plus ou moins rapide de mutations de résistance. Seuls les virus porteurs de mutations de résistance et présentant un avantage répliatif sont sélectionnés et forment progressivement une population dominante par rapport au virus sauvage. Toutefois, ces mutations de résistance s'accompagnent en général d'une diminution du « fitness », c'est à dire de la capacité du virus à s'adapter à un organisme ou un environnement pour se répliquer.

B. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la rétrotranscriptase

1. Résistance aux NNRTI

La sélection rapide de virus résistants aux NNRTI est inévitable. Un grand nombre de mutations de résistance ont été décrites. La plupart de ces mutations sont situées dans le site de fixation du NNRTI ou interagissent avec l'inhibiteur (190). Par exemple, les premières mutations associées à une forte résistance à la Néviparine sont les substitutions des résidus Tyr181 et Tyr188. Ces deux aa aromatiques se situent dans la poche hydrophobe de la RT et interagissent avec le cycle aromatique des NNRTI (279). Leur mutation diminue l'affinité du NNRTI pour la RT. Un autre mutant, Lys103Asn est résistant à tous les NNRTI. Cette mutation permet la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes latérales des résidus 103 et 188, maintenant la poche hydrophobe en position fermée et diminuant la fixation des NNRTI (167).

2. Résistance aux NRTI

Des substitutions d'aa observées après traitement de patients ou de cultures prolongées peuvent être corrélées avec une résistance aux NRTI. Les mutations les plus souvent retrouvées ont été répertoriées dans le Tableau 1 en fonction du NRTI administré.

Une même mutation peut conduire à des résistances croisées, mais également resensibiliser un virus mutant à un autre NRTI.

La structure cristallographique de la RT complexée à un duplex ADN/ADN en présence d'un dNTP a permis de localiser les mutations de résistance (Figure 43). Elles se situent autour du site de fixation du dNTP (169) et plus précisément à l'avant de ce site dans le cas de mutations de résistance aux didésoxynucléotides (3TC, ddC...) et en arrière de cette poche dans le cas de l'AZT.

NRTI	Résidus de la RT											
	41	65	67	69	70	74	75	151	184	210	215	219
AZT	M41L		D67N		K70R					L210W	T215F	K219Q
ddC		K65R		T69D			V75T		M184V			
3TC		K65R			K70R				M184V			
ddI		K65R				L74V	V75T					
d4T				69ii70			V75T					
ABC		K65R				L74V			M184V			
PMPA		K65R			K70E							

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principales mutations de résistance associées à chacun des NRTI utilisés en thérapie.

Dans le cas de l'AZT, deux mutations ou plus sont nécessaires au phénotype de résistance. La mutation Q151M est présente chez des patients infectés par des virus résistant à plusieurs NRTI (résistances multiples). La mutation 69ii70, qui correspond à une insertion de deux aa, se retrouve également dans des cas de résistances multiples aux NRTI.

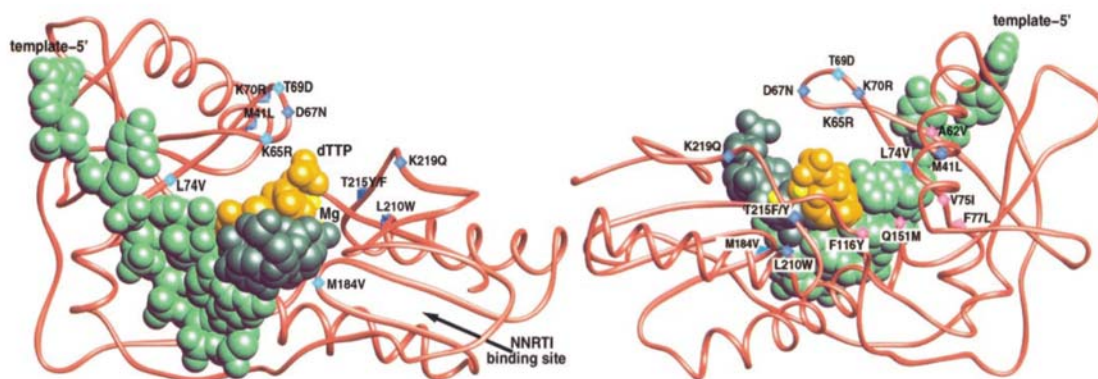


Figure 43 : Localisation des mutations conférant une résistance aux différents NRTI.

La chaîne polypeptidique des doigts et de la paume est en rouge. Les mutations de résistance sont indiquées par des losanges bleus clairs (résistance aux ddI, ddC et 3TC), bleus foncés (résistance à l'AZT) et violet (résistance croisée à l'AZT). Le complexe A/M est en vert, le dTTP en orange et les ions Mg^{2+} en jaune (d'après (169)).

Deux mécanismes différents de résistance aux NRTI sont proposés :

* Une discrimination de l'analogue de nucléotide soit par une diminution de l'affinité de la RT pour le NRTI, soit en diminuant sa vitesse de catalyse (Figure 44).

* Un enlèvement ou excision de l'analogue incorporé par pyrophosphorolyse ou ATP lyse (Figure 45).

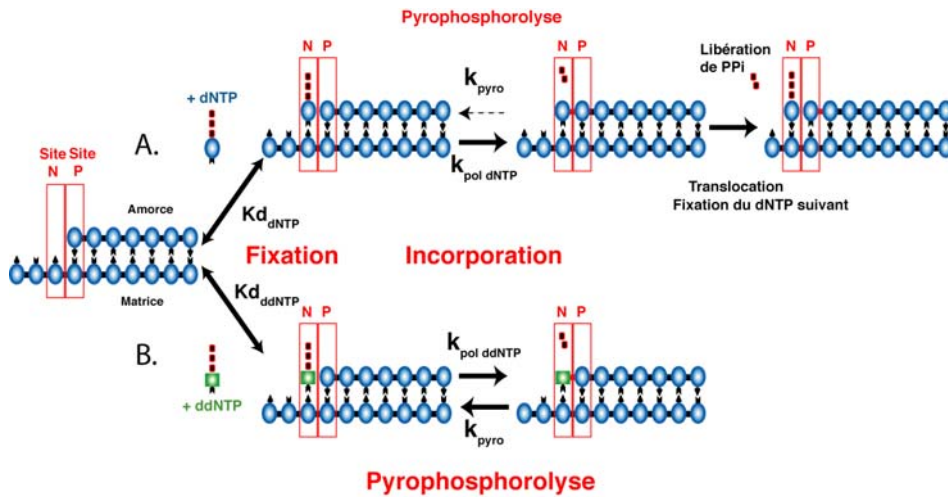


Figure 44 : Incorporation de dNTP (A) ou de ddNTP (B) par la RT.

Le site N correspond au site de fixation du nucléotide et le site P au site de polymérisation de la RT. L'efficacité d'incorporation d'un dNTP ou d'un ddNTP dépend de son affinité pour le complexe Amorce/Matrice : RT (K_d) et de la vitesse d'incorporation (k_{pol}).

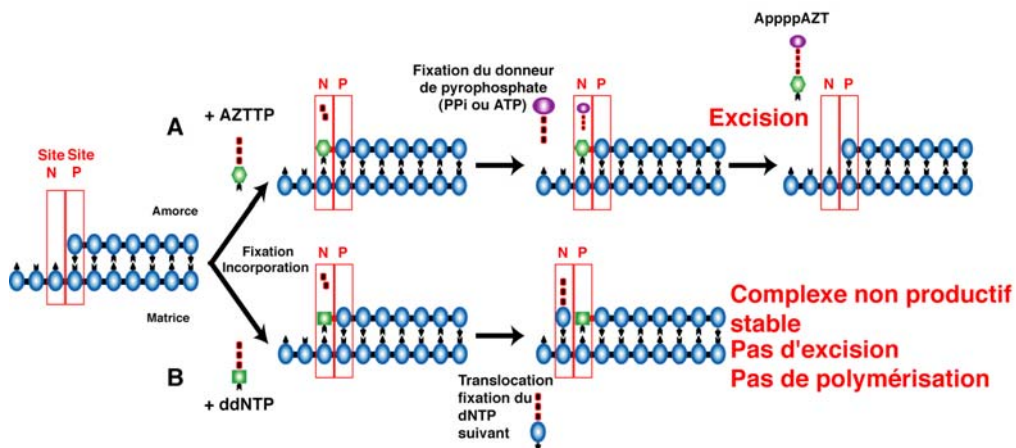


Figure 45 : Modèle d'excision par ATPlyse d'une amorce terminée par de l'AZT (A) et modèle d'inhibition de l'excision d'une amorce terminée par un ddNTP suite à la formation d'un complexe non productif ou "Dead End Complex"(B).

a. Mécanisme de discrimination

Après quelques mois de traitement au 3TC, des virus résistants émergent et sont associés à la substitution d'un aa : M184V (ou M184I qui est rapidement remplacée par la mutation M184V) (45, 338). Cette substitution est localisée au niveau du motif conservé YMDD du site catalytique de la RT de HIV-1 qui interagit avec l'extrémité 3' de l'amorce, le dNTP et les ions magnésiums. La structure cristallographique de la RT M184V en présence d'un duplex ADN/ADN suggère un encombrement stérique entre le soufre du sucre β -L-oxathiolane du 3TCTP entrant et la chaîne latérale de la valine ou de l'isoleucine en position 184 (136, 169, 301), repositionnant ainsi le complexe A/M. Il faut noter que dans la RT sauvage, le résidu M184 est impliqué dans le positionnement du complexe A/M, puisqu'il forme une liaison hydrogène avec le sucre de la base en 3' de l'amorce (169, 359). Le repositionnement du complexe A/M diminue l'efficacité d'incorporation du 3TC de 140 fois par rapport à son incorporation par de la RT sauvage (136, 209, 301). L'incorporation du dNTP naturel est très peu affectée par cette mutation (209).

La mutation K65R entraîne une résistance à plusieurs NRTI (ddC, ddI, 3TC et ABC). La structure cristallographique du complexe P/T:RT en présence du dNTP entrant, montre que le résidu K65 interagit avec le phosphate γ du dNTP entrant (169). Par conséquent, la mutation de résistance K65R affecte le positionnement du NRTI à l'intérieur du site catalytique et son incorporation (318). Cependant, cette mutation n'altère pas la position du dNTP naturel. Les dNTP naturels forment d'autres interactions leur permettant de se fixer correctement dans le site catalytique, notamment la liaison du 3'hydroxyle et du phosphate α du dNTP avec le résidu 151 de la RT (169).

b. Mécanisme d'excision

Pour ce mécanisme, se référer à l'article de revue : « Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs) », Goldschmidt V. et Marquet R. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Sep;36(9):1687-705.

c. Cas du Ténofovir

L'absence de désoxyribose rend le Ténofovir plus petit et plus flexible que les autres NRTI. De ce fait, il est difficile de sélectionner des mutants qui confèrent une forte résistance au Ténofovir (346). De plus, il conserve une action contre les virus portant des mutations de résistances multiples aux autres NRTI (324).

Récemment, deux structures cristallographiques de complexes ADN/ADN : RT avant et après incorporation de Ténofovir ont été résolues (342). La superposition des structures ADN/ADN :RT en présence d'un dTTP ou du Ténofovir montre que le Ténofovir occupe moins de place qu'un dNTP naturel dans le site actif. De ce fait, toute mutation de résistance conduisant à un conflit stérique entre la RT et le Ténofovir affecterait également la fixation du dNTP naturel. De plus, peu de différences concernant les interactions entre les résidus du site actif et le nucléotide entrant sont observées entre le complexe ADN/ADN :RT en présence d'un dTTP ou du Ténofovir. Cependant, les chaînes latérales des résidus Lys65 et Lys219 forment des ponts salins avec le phosphate α du Ténofovir, tandis qu'en présence d'un dNTP naturel, le résidu Lys65 interagit avec le phosphate γ du dNTP, et le résidu Lys219 forme un pont salin avec le résidu Asp67. Après incorporation du Ténofovir, la translocation positionne le Ténofovir dans le site P où il peut adopter deux conformations. Le rôle biologique de ces conformations alternatives est à déterminer. Elles pourraient affecter la formation d'un complexe ternaire stable en présence d'un dNTP entrant (« Dead End Complex »), inhiber le retour vers le site N ou diminuer l'efficacité d'excision du Ténofovir qui serait mal positionné.



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

Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs)

Valérie Goldschmidt and Roland Marquet

The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2004, Vol. 36, Pages 1687-1705

Pages 1687-1705:

- 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.biocel.2004.02.028>

- 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

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années aux particularités structurales et fonctionnelles du complexe d'initiation de la rétrotranscription du virus HIV-1. Les premiers travaux ont porté sur l'isolat MAL, dont la région PBS dérive du sous-type A. Des études structurales menées au laboratoire ont permis d'établir la structure secondaire du complexe d'initiation ARN_{t₃^{Lys}/ARN_v. Dans ce modèle, le complexe binaire est organisé autour d'une jonction tétrahélicoïdale impliquant des interactions inter et intra-moléculaires. La plus étudiée implique l'anticodon de l'ARN_{t₃^{Lys} et une séquence riche en A située en amont du PBS. Le modèle tridimensionnel du complexe ARN_{t₃^{Lys}/ARN_v : RT, construit au laboratoire, suggère que la RT interagit avec l'hélice intermoléculaire du PBS, les trois premiers nucléotides de la matrice en simple brin en amont du PBS, ainsi que les trois hélices intramoléculaires formées par l'ARN_v. Un des buts de notre laboratoire est de déterminer les éléments structuraux indispensables à l'initiation de la rétrotranscription, qui pourraient servir de base à la conception rationnelle d'agents anti-viraux ciblant spécifiquement cette étape. La caractérisation des éléments structuraux du complexe ARN_{t₃^{Lys}/ARN_v MAL favorisant la fixation de la RT et permettant une rétrotranscription efficace a été le premier objectif de mon travail de thèse (Chapitre I, Article 1).}}}}

Cette étude a été complétée par l'analyse structurale et fonctionnelle de complexes d'initiation dérivés de virus Hxb2 mutants, capables de se répliquer en utilisant une amorce inhabituelle, l'ARN_{t^{His} (collaboration avec le groupe de C. Morrow, Birmingham, USA) (Chapitre I, Article 2). L'isolat Hxb2 peut utiliser cette amorce seulement si le PBS et la séquence impliquée dans l'interaction avec l'anticodon sont mutés simultanément pour être complémentaires de cet ARN_t. La mutation du PBS seul conduit à une réversion qui restaure la complémentarité avec l'ARN_{t₃^{Lys}. L'objectif de ce travail a été de définir s'il existe un lien entre la structure du complexe Amorce/Matrice (A/M), notamment l'interaction entre la boucle de l'anticodon de l'ARN_{t^{His} et la région complémentaire de l'ARN_v, l'initiation de la rétrotranscription et la stabilité des virus en culture cellulaire.}}}

Si nos travaux *in vitro* et les études de répllication virale en culture cellulaire (par le groupe de C. Morrow) étayent l'existence de l'interaction entre l'anticodon de l'ARN_{t₃^{Lys} et la séquence riche en A de l'ARN_v, d'autres interactions entre l'ARN_v des isolats de sous type B (Lai/NL4-3/Hxb2) et l'ARN_{t₃^{Lys} ont été proposées par les groupes de B. Berkhout et J. Levin. Ces interactions intermoléculaires sont incompatibles avec le modèle décrit précédemment pour l'isolat MAL. Bien que les isolats de sous type A et B présentent une forte homologie de séquence, ils diffèrent par de nombreuses mutations ponctuelles autour du PBS et une insertion de 23 nucléotides en 3' de celui-ci dans l'isolat MAL. Afin de}}

déterminer s'il existe un complexe d'initiation unique, faisant intervenir des interactions entre l'ARNv et l'ARNt₃^{Lys} conservées entre les différents isolats, ou si des structures alternatives peuvent exister, j'ai entrepris une étude comparative des isolats MAL et Hxb2/NL4-3. Dans un premier temps, j'ai testé la validité de l'interaction proposée par le groupe de B. Berkhout en étudiant l'effet de mutations sur les propriétés structurales et fonctionnelles des différents complexes d'initiation (Chapitre I, Article 3). J'ai ensuite mené une étude structurale *in vitro* et *in situ*, sur l'ARN génomique au sein des cellules infectées et des particules virales, qui a été complétée par une étude fonctionnelle de l'initiation de la rétrotranscription, chez les isolats MAL et Hxb2/NL4-3 (Chapitre I, Article 4).

La deuxième partie de mon travail porte sur le mécanisme de rétrotranscription et son inhibition par l'AZT. Le mécanisme de résistance à l'AZT a récemment été élucidé. Différents groupes ont montré que les mutations de résistance à l'AZT augmentent l'efficacité d'enlèvement de l'AZTMP incorporé par ATP-lyse. Une étude permettant de déterminer les paramètres cinétiques de pyrophosphorolyse et d'ATP-lyse des RT sauvage et résistante a été entreprise dans notre laboratoire. Les résultats obtenus nous ont conduit à étudier la réparation d'amorces terminées par de l'AZTMP dans un contexte se rapprochant des conditions physiologiques, en présence des deux donneurs de pyrophosphate (ATP et PPi). Dans ce but, nous avons utilisé une matrice synthétique correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNv MAL permettant l'incorporation d'AZTMP à différents sites (Chapitre II).

Enfin, les études de rétrotranscription *in vitro* sont généralement effectuées à une concentration en Mg²⁺ de 6 mM permettant une activité optimale pour les deux fonctions enzymatiques de la RT, polymérase et RNase H. Toutefois, la concentration intracellulaire de Mg²⁺ libre est certainement inférieure à 6 mM car une partie du Mg²⁺ lie l'ARN, l'ADN, les NTP et les dNTP. Ainsi, la concentration en Mg²⁺ libre retrouvée dans les muscles striés est d'environ 0,9 mM et d'environ 0,2 mM dans le cerveau. Nous avons voulu évaluer l'effet de la concentration en Mg²⁺ libre sur l'activité polymérase de la RT de HIV-1 lors de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-), sur l'activité RNase H et sur l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) par des inhibiteurs nucléosidiques (Chapitre III).

**RESULTATS ET
DISCUSSION**

Chapitre I : Etude du complexe d'initiation de la rétrotranscription

I. Article I : Etude du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat MAL

A. Objectifs

Par mutagenèse dirigée, combinée à des études fonctionnelles de la rétrotranscription, nous avons déterminé l'importance relative des différents éléments de structure secondaire dans le processus d'initiation. Pour cela, une série de mutants de délétion ou de substitution dans l'ARNv a été construit, en nous basant sur le modèle de structure tridimensionnelle du complexe d'initiation (Figure 24). Nous avons testé des éléments structuraux interagissant directement avec la RT ou non reconnus par l'enzyme. La structure des complexes ARNt₃^{Lys}/ARNv mutants a été testée à l'aide d'une sonde chimique (DMS) lorsque cela était nécessaire. De plus, pour chaque mutant, nous avons mesuré la constante d'affinité à l'équilibre (K_d) de la RT pour le complexe A/M et les constantes cinétiques d'extension de l'ARNt₃^{Lys}. Nous avons également suivi les cinétiques de synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (-).

B. Méthodologie

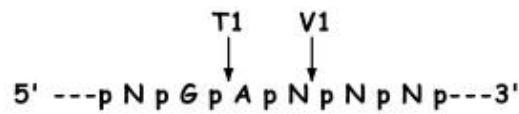
1. Etude Structurale : cartographie en solution

Les méthodes de cartographie chimique et enzymatique apportent des informations sur l'implication ou non de groupements fonctionnels dans le maintien des structures secondaire et tertiaire des ARN. La spécificité d'action des sondes (Figure 46) permet de tester la réactivité de chaque nt et de déterminer le site de liaison d'un ligand sur l'ARN par visualisation de la région protégée de leur action. Les conditions expérimentales de cartographie chimique ou enzymatique doivent introduire statistiquement moins d'une modification ou coupure par molécule. Les expériences ont été faites dans des conditions

« natives », à haute force ionique et en présence de magnésium, pour stabiliser la structure de l'ARN.

Sondes	Cibles	PM	Détection
Enzymatiques			
RNase V1	N apparié	15900	Rétrotranscription ou Détection directe
RNase T1	G non apparié	11000	Rétrotranscription ou Détection directe

Position de coupures des RNases



Chimiques

DMS	● N1A	126	Rétrotranscription
	● N3C		Rétrotranscription ou Détection directe
	● N7G		Rétrotranscription ou Détection directe
DEPC	● N7A	174	Rétrotranscription ou Détection directe
CMCT	● N3U>N1G	424	Rétrotranscription
Kethoxal	● N1,N2G	148	Rétrotranscription

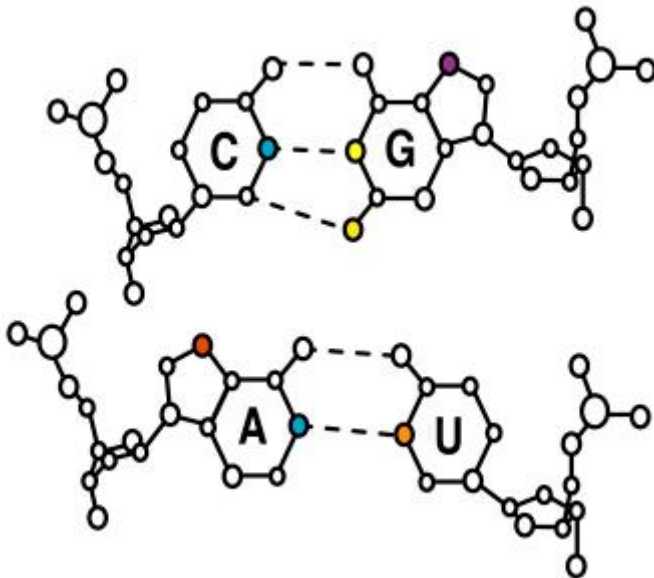


Figure 46 : Caractéristiques et spécificité d'action des sondes chimiques et enzymatiques utilisées en cartographie.

Les études de cartographie en solution ont été menées à la fois sur l'ARN_v et l'ARN_{t3}^{Lys} des différents complexes d'initiation *in vitro* mais également sur les ARN_v à l'intérieur des cellules infectées ou des particules virales (voir chapitre IV).

a. Les sondes utilisées

i. Les sondes chimiques

Différentes sondes chimiques ont été utilisées. Le DMS (sulfate de diméthyle), la CMCT (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-*p*-toluène sulfonate) et le kéthoxal ont été employés pour tester la structure des ARN_v et le DEPC (pyrocarbonate de diéthyle) pour déterminer la conformation de l'ARN_{t3}^{Lys}. Ces sondes de petites tailles permettent de tester spécifiquement les positions Watson-Crick des bases et la position N7 des purines. Le DMS méthyle spécifiquement les positions N3 des cytosines et N1 des adénines si celles-ci ne sont pas appariées. Il méthyle également la position N7 des guanines. La CMCT est spécifique de la position N1 des guanines et N3 des uraciles non appariées. Le kéthoxal modifie les positions N1 et N2 des guanines si celles-ci ne sont pas impliquées dans des appariements. Le DEPC est spécifique de la position N7 des adénines. Cette sonde est très sensible à l'empilement des bases et les adénines appartenant à une hélice ne sont pas réactives au DEPC. L'absence de réactivité en N7 d'une adénine non-appariée indique que celle-ci est impliquée dans un autre type d'interaction faisant intervenir cette position.

b. Les sondes enzymatiques

Les sondes enzymatiques sont plus volumineuses et donc plus sensibles à l'encombrement stérique. Elles donnent un renseignement global sur le repliement de l'ARN. Les sondes utilisées pour ces études sont la ribonucléase (RNase) T1, spécifique des guanines non appariées et la RNase V1, spécifique des régions en double brin.

2. Détection des clivages et des positions modifiées (Figure 47)

La détection des positions clivées par coupure enzymatique ou par traitement chimique peut se faire directement avec un ARN marqué en 5' ou en 3'. Une hydrolyse alcaline ménagée et une digestion à la RNase T1 en conditions dénaturantes permettent de localiser les positions clivées. Un contrôle consistant à déposer l'ARN marqué sans traitement par la sonde permet de visualiser les coupures spontanées. Les sites de clivage de l'ARN sont ensuite

détectés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

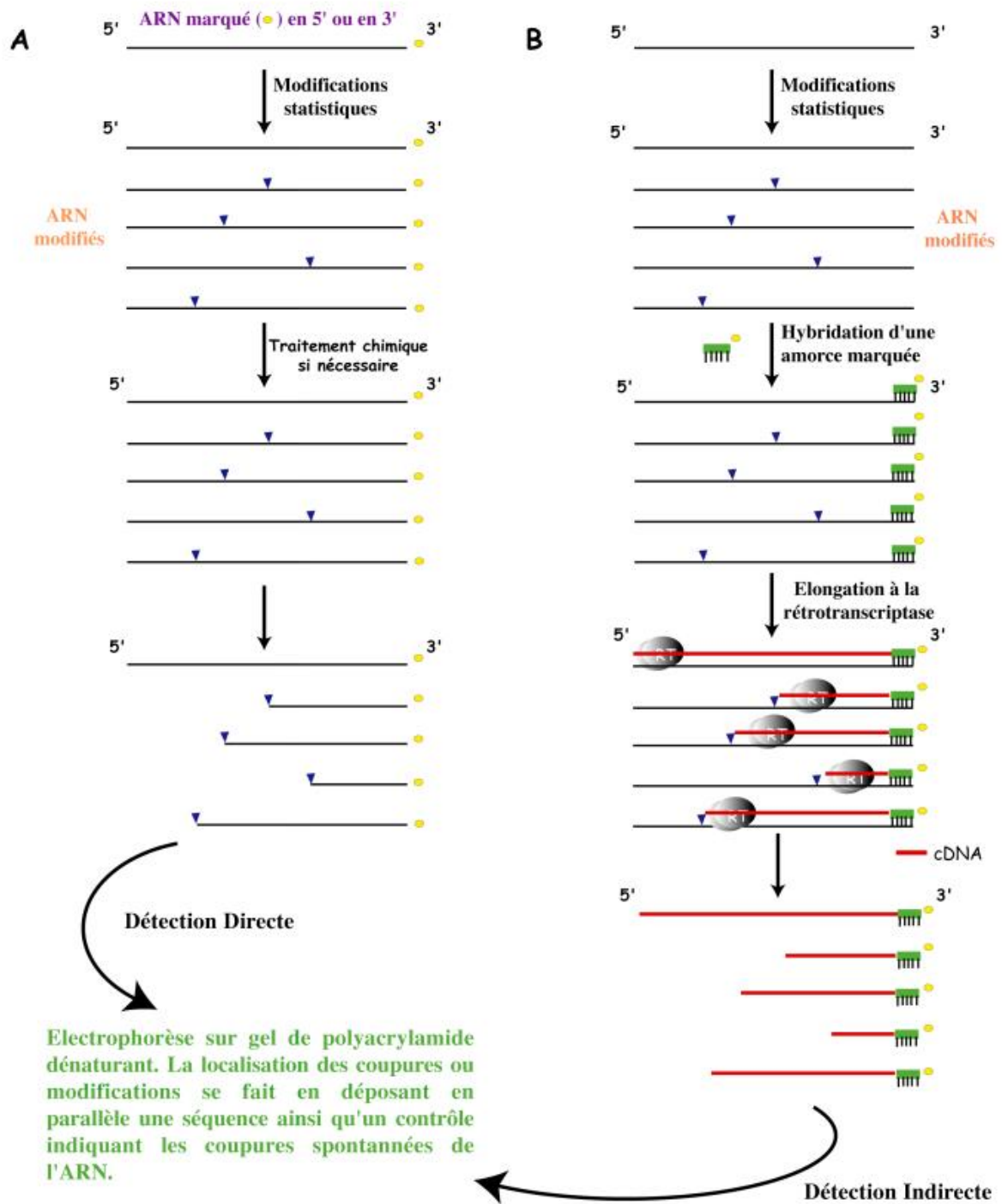


Figure 47 : *Principes de la cartographie chimique ou enzymatique.*

Stratégie expérimentale pour l'identification des sites de coupures et de modifications de l'ARN de façon directe sur un ARN marqué en 5' ou 3' (A), ou par élévation d'amorce par la rétrotranscriptase (B). Les ronds jaunes représentent l'extrémité marquée radioactivement de l'ARN ou de l'amorce. Les pointes de flèches indiquent les positions des modifications et des coupures sur l'ARN.

La technique d'élongation d'amorce par la rétrotranscriptase, ou détection indirecte, permet aussi de détecter les positions Watson-Crick modifiées chimiquement qui ne donnent pas lieu à des coupures. L'élongation de l'amorce marquée radioactivement s'arrête au nt précédant le nt modifié. Les ADNc générés sont soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. La position des nt modifiés est localisée par référence à un séquençage effectué selon la technique de Sanger (297). Un contrôle d'élongation sur l'ARN non modifié permet de détecter les pauses de la RT dues à des structures stables ou des coupures spontanées de l'ARN.



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

Direct and Indirect Contributions of RNA Secondary Structure Elements to the Initiation of HIV-1 Reverse Transcription

Valérie Goldschmidt, Mickaël Rigourd, Chantal Ehresmann, Stuart F. J. Le Grice, Bernard Ehresmann, and Roland Marquet

The Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol. 277, N° 45, Pages 43233-43242

Pages 43233-43242:

- 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://intl.jbc.org/cgi/content/full/277/45/43233>
- 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

C. Conclusions

Nous avons montré que la perturbation des interactions intermoléculaires du complexe d'initiation, qui ne sont pas reconnues directement par la RT, affecte plus fortement la rétrotranscription que la délétion ou la déstabilisation d'une interaction intramoléculaire reconnue directement par la RT. De plus, la longueur de la jonction en amont du PBS, tout comme les hélices intramoléculaires 1 et 2 jouent un rôle important pour la fixation de la RT au complexe amorce/matrice et dans l'extension de l'ARN_{t3}^{Lys}. Ces résultats montrent le rôle essentiel de la structure tridimensionnelle globale dans le processus d'initiation (Figure 48).

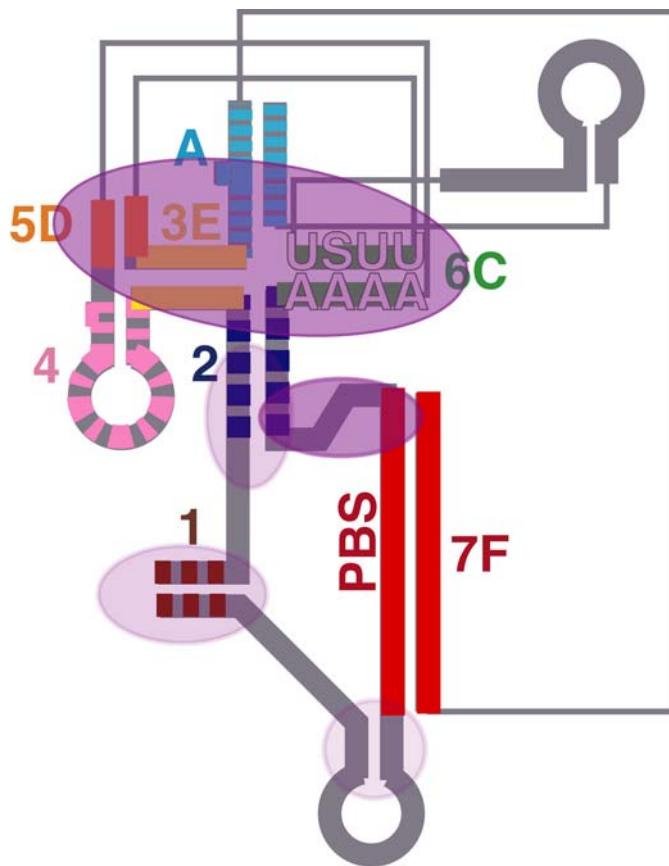


Figure 48 : Importance relative des différents éléments structuraux du complexe d'initiation de la rétrotranscription de l'isolat MAL de HIV-1.

L'intensité de la coloration violette est corrélée à l'importance relative des éléments structuraux pour une initiation efficace de la rétrotranscription.

II. Article II. Relations entre la structure et la fonction du complexe d'initiation utilisant l'ARNt^{His} comme amorce

A. Objectifs

Pour déterminer si l'utilisation de l'ARNt₃^{Lys} comme amorce dépend des spécificités structurales du complexe d'initiation, nous avons entrepris une étude structurale et fonctionnelle des mutants utilisant l'ARNt^{His} pour initier la rétrotranscription.

En plus de virus mutants possédant un PBS complémentaire de la région 3' de l'ARNt^{His}, le groupe de C. Morrow a construit des virus Hxb2 mutants dont la région interagissant avec la boucle de l'anticodon de l'ARNt est rendue complémentaire à l'ARNt^{His}. Une culture prolongée de ces mutants a permis de tester leur capacité à maintenir une séquence PBS complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARNt^{His} (Tableau 2). Les virus dont seul le PBS est complémentaire à l'ARNt^{His} sont instables et restaurent rapidement un PBS complémentaire de l'ARNt₃^{Lys} (Tableau 2, mutant His). Les virus doublement mutés dans la séquence PBS et dans la séquence complémentaire de la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{His} (Tableau 2, mutant His-AC) maintiennent une séquence PBS complémentaire à l'ARNt^{His}. Cependant, la répllication de ces virus est ralentie et des mutations additionnelles apparaissent après 15 jours de culture (Tableau 2, mutants His-AC-GAC et His-AC-AT-GAC). Ces mutations supplémentaires sont situées autour de la séquence PBS et permettent de restaurer une vitesse de répllication similaire à celle du virus sauvage.

Ces mutants avaient été construits afin de tester le modèle de structure secondaire du complexe d'initiation proposé par notre laboratoire pour l'isolat MAL de HIV-1 (Figure 24A) et en particulier de confirmer ou d'infirmer l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence riche en A de l'ARNv. Cependant aucune donnée ne permettait de confirmer que le maintien du PBS^{His} est corrélé à une initiation efficace de la rétrotranscription. En effet, la réversion vers le phénotype sauvage peut dépendre d'un dysfonctionnement au niveau d'une autre étape du cycle rétroviral, en particulier de l'intégration, car les séquences en amont du PBS jouent un rôle clé en déterminant l'extrémité droite de l'ADN proviral.

L'objectif de ce travail a été de tester l'efficacité de ces mutants à initier la rétrotranscription et à synthétiser l'ADN "Strong-Stop" (-) *in vitro*, afin de déterminer si le maintien de l'amorce non naturelle est bien corrélé à une initiation efficace de la rétrotranscription. Nos résultats nous ont permis de sélectionner trois clones sur lesquels nous

avons ensuite réalisé une étude structurale (le clone sauvage et les mutants His-AC et His-AC-GAC, Tableau 2). La structure adoptée par les différents ARNv a été étudiée à l'aide de sondes chimiques (DMS et CMCT), et la conformation de l'ARNt^{His} a été déterminée à l'aide de sondes enzymatiques (ribonucléases V1 et T1) et chimique (kéthoxal).

Nom du sous-clône	Séquence PBS	"Boucle des A"	Mutations additionnelles	Phénotype
ARN Hxb2 Wt	ARNt ₃ ^{Lys}	GAAAAT (Lys3)	-	-
ARN His	ARNt ^{His}	GAAAAT (Lys3)	-	Réversion vers le type sauvage
ARN His-AC	ARNt ^{His}	CCACAA (His)	-	Réplication ralentie Evolution vers l'ARN HIS-AC-GAC
ARN His-AC-GAC	ARNt ^{His}	CCACAA (His)	T174->G; G181->A; T200->C	Stable en culture Possibilité d'évolution vers l'ARN His-AC-AT-GAC
ARN His-AC-AT-GAC	ARNt ^{His}	CCACAA (His)	T174->G; G181->A; T200->C C152->A; C160->T	Stable en culture

Tableau 2 : *Caractéristiques des virus sauvage et mutants de l'isolat Hxb2.*



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

Structure–function relationships of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription: the case of mutant viruses using tRNA^{His} as primer

Mickaël Rigourd, **Valérie Goldschmidt**, Fabienne Brulé, Casey D. Morrow, Bernard Ehresmann, Chantal Ehresmann and Roland Marquet

Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 19, Pages 5764-5775

Pages 5764-5775:

- 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://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/19/5764?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=goldschmidt&andorexactfulltext=and&searchid=1112096938724_1636&stored_search=&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=1&journalcode=nar

- 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

B. Résultats-Conclusions

Les cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) ont permis d'établir un lien direct entre l'efficacité de rétrotranscription et le maintien du virus en culture cellulaire prolongée. Les virus possédant un PBS^{His} sont instables en culture cellulaire et restaurent rapidement un PBS^{Lys} sauvage. Ce résultat peut s'expliquer par une initiation de la rétrotranscription inefficace *in vitro*. L'apparition des mutations additionnelles, obtenues après une culture prolongée de virus mutant His-AC, coïncident avec la restauration d'une vitesse de réplication virale similaire à celle du virus sauvage. Elles ont un rôle essentiel et permettent l'utilisation de manière stable de l'ARNt^{His} et conduisent à une initiation de la rétrotranscription efficace, même supérieure à celle observée en présence de l'ARNv et de l'amorce sauvages. Sans mutations additionnelles, le virus mutant His-AC initie inefficacement la rétrotranscription conduisant à un ralentissement de la réplication virale. Ces résultats démontrent la grande capacité d'adaptation du virus et l'importance de l'initiation de la rétrotranscription, qui peut devenir l'étape limitante de la réplication virale.

L'étude structurale a permis de comprendre l'apparition de mutations additionnelles autour du PBS et le maintien de l'ARNt^{His} comme amorce. La mutation de la séquence complémentaire à l'anticodon de l'ARNt^{His} ne permet pas à elle seule une interaction stable avec l'anticodon de l'ARNt^{His}. Les mutations supplémentaires sont indispensables à cet appariement en étendant la complémentarité entre les deux séquences.

En conclusion, l'utilisation d'un ARNt non conventionnel comme amorce est dictée par l'efficacité de l'initiation de la rétrotranscription qui dépend de la stabilité de l'interaction entre l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt^{His}.

Dans ce système utilisant une amorce non naturelle, les bases modifiées de l'ARNt^{His} jouent un rôle moins important que les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt₃^{Lys} au sein du complexe d'initiation sauvage. Ces modifications stabilisent l'interaction entre l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}. Lorsque l'ARNt^{His} est utilisé comme amorce, l'interaction entre l'anticodon et la séquence complémentaire de l'ARNv fait intervenir un plus grand nombre de paire de bases G : C, la stabilisant de façon naturelle, sans modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt^{His}.

Ces résultats suggèrent que l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv est conservée entre les isolats de sous-types A (MAL) et B (Hxb2/NL4-3). Ils sont cependant contradictoires avec ceux des groupes de B. Berkhout et de J.G. Levin qui proposent d'autres

interactions entre l'ARNv de sous-type B et l'ARNt₃^{Lys}. L'analyse de l'interaction PAS/Anti-PAS proposée par B. Berkhout et l'analyse comparative des structures secondaires des complexes binaires adoptées par les isolats MAL et Hxb2/NL4-3 font l'objet de deux autres études.

III. Article III : Existe-il une interaction alternative PAS/anti-PAS ?

A. Objectifs

Le groupe de B. Berkhout a étudié, par mutagenèse dirigée, le rôle de la structure U5-leader de l'isolat Lai dans la réplication virale et la rétrotranscription (32). Leurs mutants suggèrent qu'une séquence, et non la structure de la tige U5-leader, est essentielle pour une initiation efficace de la rétrotranscription *in vitro* et *in vivo*, uniquement lorsque l'ARNt₃^{Lys} est utilisé comme amorce. En effet, quelle que soit la mutation testée, l'initiation de la rétrotranscription à partir d'une amorce de type ODN complémentaire au PBS n'est pas perturbée *in vitro*. Ces résultats militent en faveur d'une interaction entre l'ARNv et l'ARNt₃^{Lys}. Les auteurs ont proposé une nouvelle interaction impliquant la séquence 123 à 130 de l'ARNv de l'isolat Lai, appelée PAS (Primer Activation Signal) et le bras TψC (nucléotides 48 à 55) de l'ARNt₃^{Lys}, appelé anti-PAS (Figures 25-B, 49), qui est incompatible avec le modèle du complexe binaire de l'isolat MAL. La séquence PAS, séquestrée dans une hélice intramoléculaire lorsque l'ARNt₃^{Lys} n'est pas hybridé, jouerait un rôle de régulateur positif et négatif dans l'initiation de la rétrotranscription. En effet, une substitution de la séquence PAS (mutant 2L, Figure 49) diminue fortement le taux d'initiation de la rétrotranscription, tandis que l'ouverture de l'hélice intramoléculaire (mutant 2R, Figure 49) l'augmenterait en favorisant l'accessibilité de la séquence PAS. Pour les auteurs, la structure de l'hélice intramoléculaire ne semble pas impliquée dans les variations de taux de rétrotranscription car un mutant compensatoire (mutant 2LR, Figure 49), qui peut reformer cette hélice, ne restaure pas l'initiation de la rétrotranscription. De plus, une mutation de la séquence PAS, renforçant ou déstabilisant l'interaction PAS/Anti-PAS, module l'efficacité de l'initiation de la rétrotranscription. Elle pourrait également jouer un rôle dans l'étape d'élongation en augmentant la processivité de la RT. Deux interactions semblables, impliquant le bras TψC de l'ARNt^{Trp} et l'ARNv de RSV (7) et le bras TψC de ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de HIV-2 (36, 123), ont été proposées. Une analyse phylogénétique de différents rétrovirus, dont certains utilisent l'ARNt_{1,2}^{Lys} ou l'ARNt^{Pro} comme amorce, révèle que des séquences de type PAS sont présentes dans tous les génomes rétroviraux. De ce fait, les auteurs suggèrent qu'il existe un mécanisme unique de régulation de la rétrotranscription chez les rétrovirus. Enfin, ils proposent que l'interaction PAS/Anti-PAS serait impliquée dans l'utilisation de l'amorce. En effet, un autre ARNt peut être utilisé comme amorce à condition

que le PBS et la séquence complémentaire à l'Anti-PAS soient mutés simultanément. Cependant, le taux de rétrotranscription de ce double mutant est très faible (30), indiquant que d'autres interactions sont requises pour la sélection de l'amorce et une initiation efficace de la rétrotranscription.

L'objectif de cette étude est de valider ou d'infirmer cette nouvelle interaction intermoléculaire PAS/Anti-PAS dans l'isolat Hxb2, et déterminer s'il existe un complexe d'initiation unique, conservé entre les différents isolats.

Pour cette étude, des mutants de l'isolat Hxb2 favorisant ou empêchant l'interaction PAS/Anti-PAS et un mutant compensatoire restructurant l'hélice contenant la séquence PAS (identiques à ceux utilisés par le groupe de B. Berkhout), ont été construits. Une étude cinétique de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) a été réalisée à partir de l'amorce naturelle, l'ARNt₃^{Lys}, ou d'un ARN de 18 nucléotides (ORN₃^{Lys}) complémentaire au PBS. En parallèle, l'existence de cette interaction et la conformation des mutants ont été testées par cartographie en solution à l'aide de réactifs chimiques.

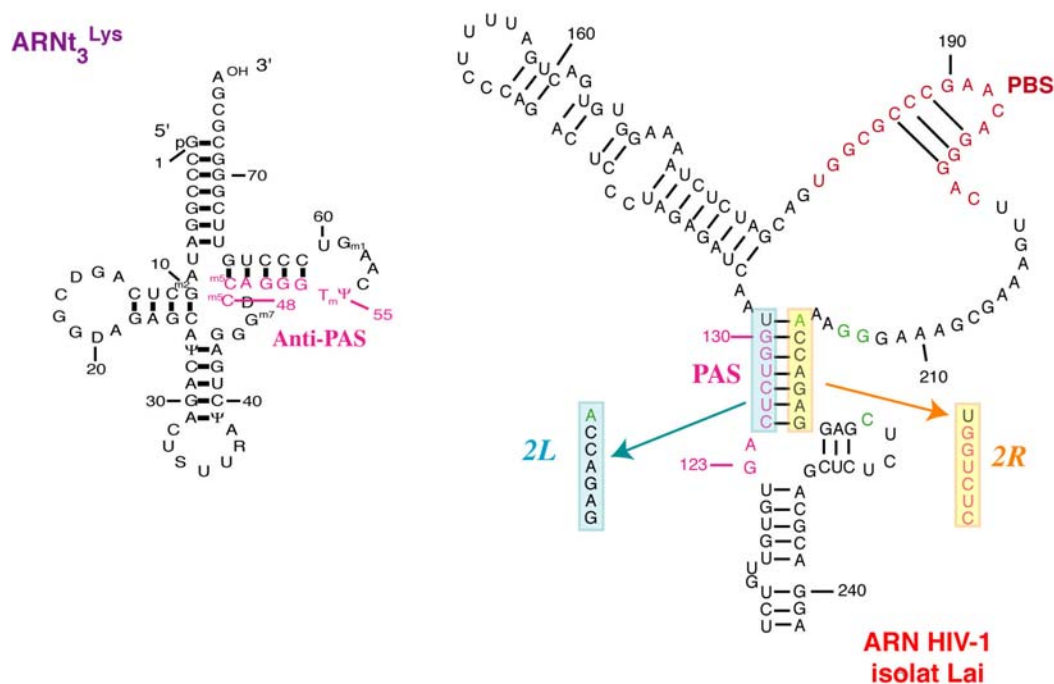


Figure 49 : Mutants permettant de tester l'interaction PAS/Anti-PAS.



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

Does the HIV-1 primer activation signal interact with tRNA₃^{Lys} during the initiation of reverse transcription?

Valérie Goldschmidt, Chantal Ehresmann, Bernard Ehresmann and Roland Marquet

Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 3, Pages 850-859

Pages 850-859:

- 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://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/3/850?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=goldschmidt&andorexactfulltext=and&searchid=1112097513280_1671&stored_search=&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resource=1&journalcode=nar

- 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

B. Résultats-Discussion-Conclusions

Les interprétations de certains résultats obtenus au cours des différentes études menées par le groupe de B. Berkhout sur l'interaction PAS/Anti-PAS nous ont conduits à douter de son existence et de son rôle dans l'initiation de la rétrotranscription.

Par exemple, bien que le mutant 2R augmente l'initiation de la rétrotranscription *in vitro* d'un facteur 3, et que les mutants 2L et 2LR la diminuent d'un facteur 10 (32), l'effet est nettement moins marqué en utilisant un complexe ARNv/ARNt₃^{Lys} isolé à partir de particules virales (31). Certes une régulation positive et négative de la rétrotranscription est observée respectivement en présence des mutants 2R et 2L. Cependant les taux de rétrotranscription obtenus correspondent à 60 % et 125 % du taux obtenu en présence du virus sauvage (31).

Malgré l'effet positif observé *in vitro* et *ex vivo* sur l'initiation de la rétrotranscription, le mutant favorisant l'accessibilité de la séquence PAS ne se réplique pas efficacement en culture. D'après les auteurs, il semblerait que l'étape de rétrotranscription nécessite un contrôle précis et sa stimulation aurait un effet négatif sur la réplication du virus. La séquestration de la séquence PAS dans une hélice régulerait cette étape. Cependant, d'autres résultats vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, d'autres mutants ((32) : 3R et 1LR) initient plus efficacement la rétrotranscription que le virus sauvage *in vitro* et leur réplication est similaire à celle du virus sauvage *in vivo* (32).

La réplication du mutant 2L empêchant l'interaction PAS/Anti-PAS est ralentie. Après plus de trois mois de culture, une mutation dans la séquence substituée est observée, augmentant la capacité répliquative du virus. Dans le mutant 2L, une interaction de 4 paires de bases peut avoir lieu entre la séquence Anti-PAS de l'ARNt₃^{Lys} et la séquence substituée de l'ARNv. La mutation obtenue n'étend pas cette interaction à 8 paires de bases, comme pour l'appariement PAS/Anti-PAS sauvage, mais permet uniquement la conversion d'une interaction G : U en A : U (31). Pour les auteurs, cette mutation est suffisante pour conforter leur modèle et l'importance de l'interaction entre l'ARNv et le bras T ψ C de l'ARNt₃^{Lys}. Cette conclusion va cependant à l'encontre d'une autre de leurs études (30) qui suggère que l'efficacité de l'initiation de la rétrotranscription est dictée par la stabilité de l'interaction PAS/Anti-PAS. Dans le cas précis du mutant 2L, possédant ou non la substitution après une culture prolongée, la faible stabilité de l'interaction Anti-PAS/séquence substituée de l'ARNv devrait, au contraire, ralentir très fortement l'initiation de la rétrotranscription.

Comme l'initiation de la rétrotranscription n'est pas restaurée dans le mutant

compensatoire, les auteurs suggèrent que la séquence et non la structure de l'hélice contenant la séquence PAS est primordiale pour une initiation efficace (32). Les gels de cartographie en solution présentés dans cette publication montrent l'absence de réactivité au DEPC de la partie droite de l'hélice du mutant compensatoire (32). Cependant, aucune adénine (cible du DEPC) n'est présente dans cette séquence. La séquence du brin 5' de l'hélice contient bien trois adénines, toutefois l'accessibilité de ces nucléotides n'a pas été testée.

Les auteurs ont montré que les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt₃^{Lys} sont requises pour optimiser l'initiation de la rétrotranscription. Cependant elles ne sont pas nécessaires pour former l'interaction PAS/Anti-PAS (30). De ce fait un ARNt₃^{Lys} synthétique peut être utilisé et muté pour étudier cette étape. De façon étonnante, la mutation de la séquence du bras TψC de l'ARNt₃^{Lys} la rendant complémentaire à la séquence mutée de l'ARN 2L, permettant une interaction de type «PAS/Anti-PAS», ne permet pas de restaurer une initiation efficace de la rétrotranscription. Ces résultats semblent contradictoires et ne confortent pas le rôle fonctionnel de l'interaction PAS/Anti-PAS dans le processus d'initiation de la rétrotranscription.

Enfin, les auteurs affirment pouvoir utiliser un autre ARNt que l'ARNt₃^{Lys} pour initier la rétrotranscription à condition de muter simultanément le PBS et la séquence PAS, les rendant complémentaire à ce nouveau ARNt (30). Cependant les résultats indiquent que l'initiation de la rétrotranscription du double mutant PAS/PBS est relativement inefficace et correspond à moins de 5% du taux obtenu en présence du virus sauvage. De plus, ce double mutant n'améliore que d'environ deux fois l'initiation de la rétrotranscription, comparé à un mutant simple du PBS (30).

Tous ces résultats semblent remettre en question l'existence et la fonction de l'interaction PAS/Anti-PAS.

Nos propres résultats, bien que confirmant certaines observations du groupe de B. Berkhout, ne sont pas en faveur de l'interaction PAS/Anti-PAS.

Les résultats de cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) utilisant l'ARNt₃^{Lys} comme amorce s'opposent à l'existence d'une telle interaction. En effet, bien qu'une diminution plus importante du taux d'ADN « Strong-Stop » (-) soit obtenue avec le mutant empêchant l'interaction PAS/Anti-PAS, et que le mutant compensatoire ne restaure pas une initiation efficace de la rétrotranscription, l'accessibilité de la séquence PAS ne stimule pas la

rétrotranscription. Au contraire, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est inférieur à celui obtenu en présence de l'ARNv sauvage. De plus, les taux de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) ne sont pas corrélés aux cinétiques d'extension de l'ARNt₃^{Lys} et dépendent des pauses obtenues au cours de la rétrotranscription. L'étude de cartographie en solution permet d'envisager un lien direct entre ces pauses et un repliement aberrant des ARNv mutés.

La comparaison des profils de réactivités de l'ARNv sauvage et de l'ARNt₃^{Lys} libres et au sein du complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv suggère fortement qu'aucune interaction PAS/Anti-PAS n'a lieu. En effet, la séquence complémentaire au PAS (nt 217 à 223), qui devrait être en simple brin après la formation du complexe binaire et l'interaction PAS/Anti-PAS, n'est pas réactive. De plus, l'adénine A50 de l'ARNt₃^{Lys}, impliquée dans l'appariement PAS/Anti-PAS proposé, est réactive au DEPC et ne peut par conséquent être localisée dans une hélice.

L'un des arguments les plus convaincants est que les mêmes effets des mutations sur la rétrotranscription sont obtenus en utilisant l'ORN₃^{Lys} comme amorce. Cette amorce synthétique empêche toute interaction intermoléculaire d'avoir lieu. Nos résultats montrent clairement que l'interaction PAS/Anti-PAS n'existe pas ou seulement de façon transitoire. Si cette interaction a lieu transitoirement, elle ne semble posséder aucun rôle fonctionnel, tout du moins *in vitro*.

Enfin, l'analyse des séquences des virus mutants utilisant l'ARNt^{His} ou l'ARNt^{Met} comme amorce, dont les séquences Anti-PAS sont différentes de celle de l'ARNt₃^{Lys}, ne révèle aucune mutation adaptative restaurant l'interaction PAS/Anti-PAS au cours de cultures cellulaires prolongées. L'interaction PAS/Anti-PAS dans ces mutants est sous optimale et indique qu'une telle interaction, si elle existe dans le virus sauvage, possède un effet mineur sur la réplication.

En conclusion, cette étude n'étaye pas la formation d'une interaction PAS/Anti-PAS au sein du complexe d'initiation ARNt₃^{Lys}/ARNv de l'isolat Hxb2. L'effet des différentes mutations sur le taux de rétrotranscription est lié, non pas à la présence ou l'absence d'une interaction PAS/Anti-PAS, mais à la formation d'une conformation aberrante de l'ARNv.

IV. Article IV : La versatilité du complexe d'initiation de la rétrotranscription de HIV-1

A. Objectifs

L'étude structurale la plus détaillée, menée *in vitro* dans notre laboratoire, est celle du complexe binaire ARN_t^{Lys}/ARN_v de l'isolat MAL, dont le PBS dérive du sous-type A. Le complexe d'initiation des isolats de sous-type B (Hxb2, NL4-3, Lai) a essentiellement été étudié d'un point de vue fonctionnel. Cependant les résultats obtenus sont très controversés. En effet, certaines équipes soutiennent l'existence de l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARN_v de l'isolat Hxb2 et l'anticodon de l'ARN_t^{Lys}, aussi bien *in vitro* (17, 20) qu'*ex vivo* (347, 374, 375) et laissent supposer un modèle unique de complexe d'initiation, tandis que d'autres proposent des interactions alternatives entre l'amorce et la matrice (181, 31, 32).

Des changements de séquence et de structure secondaire sont observés entre les différents isolats en amont du PBS et dans la région en aval de U5. Ainsi l'ARN MAL diffère des isolats de sous type B (Hxb2, NL4-3, Lai) par une insertion de 23 nt en aval du PBS et des mutations ponctuelles. Ces changements favorisent la formation d'une boucle des A apicale ou latérale (Figure 23). On peut donc légitimement se poser les questions suivantes :

- * Cette variabilité est-elle à l'origine des résultats contradictoires ?
- * Des interactions sont-elles conservées d'un isolat à l'autre dans le complexe d'initiation ARN_v/ARN_t^{Lys}?
- * Peut-on expliquer ces divergences par des conditions expérimentales différentes ?

Pour répondre à ces questions de manière claire et objective, nous avons mené une étude de cartographie en solution (au DMS) *in situ* sur l'ARN_v de l'isolat NL4-3 sauvage et de l'isolat chimérique NL4-3/MAL, dont le domaine PBS NL4-3 est substitué par celui de l'isolat MAL. Nous avons dû construire un clone moléculaire chimérique NL4-3/MAL car l'isolat MAL se réplique très faiblement en culture cellulaire et une grande quantité de matériel est requise pour l'étude structurale. Cette étude structurale *in situ* (Figure 50) se révèle être la première réalisée non seulement sur l'ARN génomique de HIV-1 dans les cellules infectées (non hybridé à l'ARN_t^{Lys}) mais également dans les particules virales (après hybridation de l'ARN_t^{Lys} et maturation du virion). Elle est accompagnée d'une étude

structurale et fonctionnelle *in vitro* sur les isolats de sous-type A (MAL) et B (NL4-3/Hxb2). Les mutants de l'isolat Hxb2 utilisant l'ARNt^{His} comme amorce ont aussi été étudiés du point de vue fonctionnel.

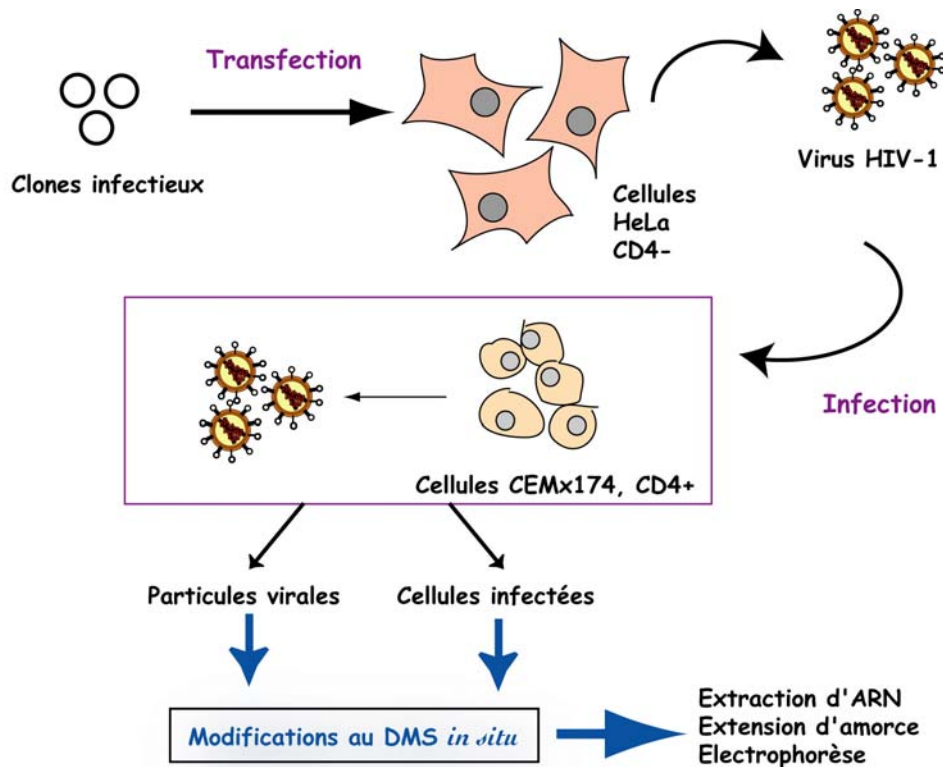


Figure 50 : Stratégie expérimentale de modification *in situ* de l'ARNv de HIV-1.

Après transfection de cellules HeLa (CD4⁻), les virions sauvages et mutants récoltés sont normalisés quant à leur taux de RT et utilisés pour infecter des cellules lymphoïdes (CEMx174, CD4⁺). La production de virus est contrôlée régulièrement par détermination de l'activité RT dans le milieu extracellulaire. Trois jours après l'infection, l'ARN génomique de HIV-1 dans les cellules infectées et dans les particules virales est soumis à un traitement chimique au DMS. Après extraction de l'ARN, les bases modifiées de l'ARN génomique de HIV-1 sont détectées par la technique d'élongation d'amorce à la rétrotranscriptase et les produits obtenus sont analysés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.



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

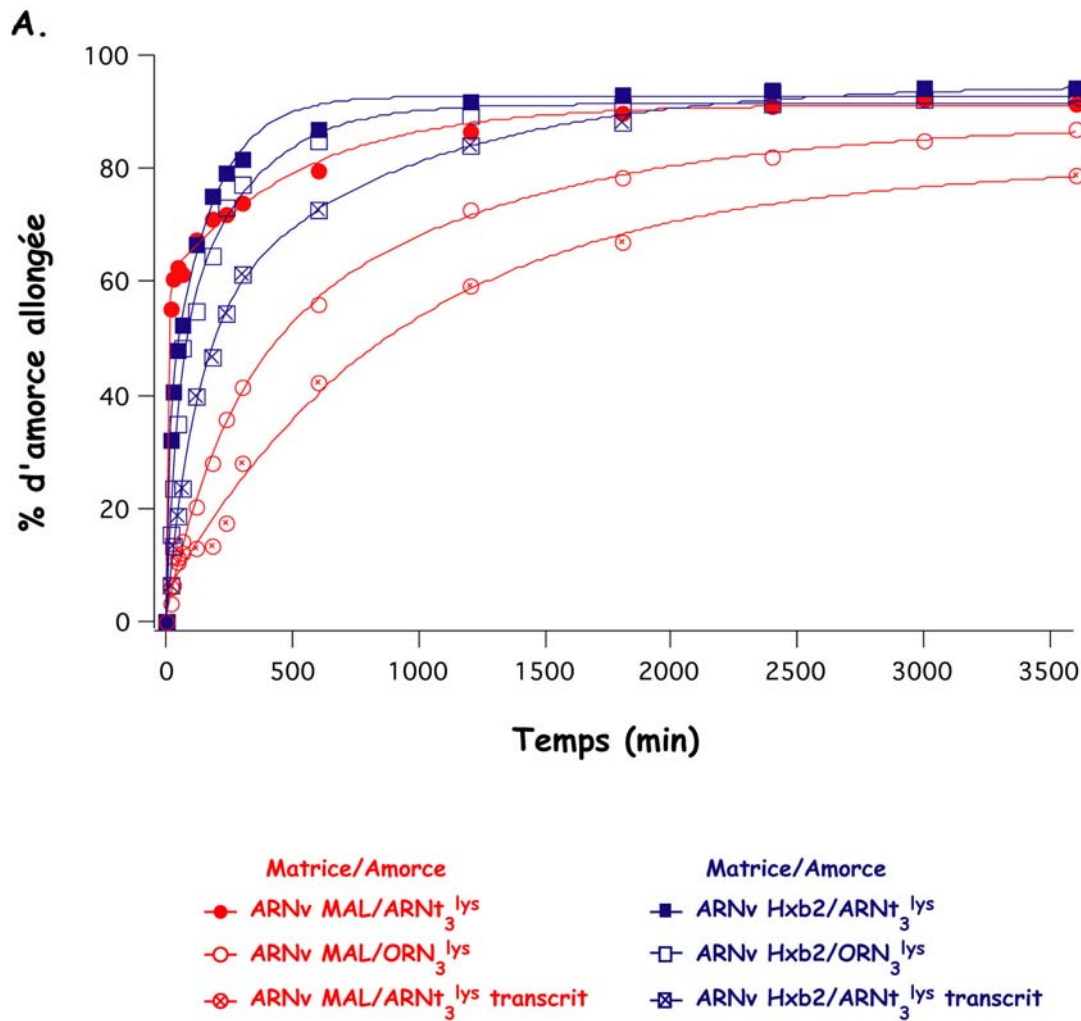
Structural Variability of the Initiation Complex of HIV-1 Reverse Transcription

Valérie Goldschmidt, Jean-Christophe Paillart, Mickaël Rigourd, Bernard Ehresmann Anne-Marie Aubertin, Chantal Ehresmann, and Roland Marquet

The Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol. 279, N° 34, Pages 35923-35931

Pages 35923-35931:

- 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://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M404473200v1>
- 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



B.

Matrice/Amorce utilisées	ARNv MAL/ARNt ₃ ^{Lys}	ARNv MAL/transcrit ARNt ₃ ^{Lys}	ARNv MAL/ORN ₃ ^{Lys}	ARNv Hxb2/ARNt ₃ ^{Lys}	ARNv Hxb2/transcrit ARNt ₃ ^{Lys}	ARNv Hxb2/ORN ₃ ^{Lys}
Taux d'ADN «Strong-Stop» (-) synthétisé (%)	24	12	16	30	20	30

Figure 51 : Comparaison de cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en fonction des amorces utilisées.

A. Comparaison de cinétiques d'extension de différentes amorces, hybridées à l'ARN viral MAL ou Hxb2, lors de la synthèse de l'ADN « Strong-Stop » (-) ; B. Taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé en fonction des différents couples Matrice/Amorce utilisés, après 60 min de reverse transcription.

B. Résultats-Discussion

La cartographie au DMS de l'ARN génomique de HIV dans les cellules infectées et les particules virales permet d'éviter des biais liés aux études *in vitro*, tels que la renaturation de l'ARNv, les conditions ioniques, l'utilisation d'ARN de taille variable ou l'absence de cofacteurs cellulaires ou viraux.

Les données de cartographie des ARNv MAL et NL4-3 dans les cellules infectées (avant hybridation de l'amorce) confirment les modèles de structures secondaires établis à l'aide de données de cartographie *in vitro* (Figure 1, article IV). La conformation de l'ARN adoptée par ces deux isolats diffère radicalement. De plus, il existe une bonne corrélation entre les profils de réactivités au DMS obtenus *in situ* et *in vitro*. Cette étude *in situ* confirme aussi le modèle de structure secondaire du complexe d'initiation de la rétrotranscription de l'isolat MAL, dans lequel de nombreux remaniements conformationnels intra- et intermoléculaires s'opèrent. Contrairement à l'isolat MAL, l'ARN viral de l'isolat NL4-3 subit peu de réarrangements structuraux lors de l'hybridation de l'ARNt₃^{Lys}. Seul le PBS est protégé. La région riche en A complémentaire à l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} reste accessible. L'interaction entre cette séquence et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} n'a donc pas lieu dans l'isolat NL4-3/Hxb2, alors qu'elle joue un rôle essentiel dans l'isolat MAL.

En plus des résultats de cartographie *in situ*, nous avons montré par des études cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop (-), que l'initiation de la rétrotranscription de l'ARN MAL est très affectée lorsque l'amorce naturelle est remplacée par un ARNt₃^{Lys} transcrit *in vitro*, ne possédant aucune modification post-transcriptionnelle, ou par l'ORN₃^{Lys} complémentaire aux 18 nt du PBS (Figure 51). Ces résultats confirment le rôle des bases modifiées de l'ARNt₃^{Lys} et l'importance des interactions intermoléculaires du complexe d'initiation de l'isolat MAL. Cependant, la substitution de l'ARNt₃^{Lys} naturel par un ARNt₃^{Lys} transcrit *in vitro* (Figure 51) ou par l'ORN₃^{Lys} affecte peu l'initiation de la rétrotranscription de l'ARN Hxb2. Ainsi, les interactions intermoléculaires ne sont pas requises pour l'initiation de la rétrotranscription de l'ARNv de l'isolat Hxb2.

Ces études structurales et fonctionnelles menées *in vitro* et *in situ* montrent la versatilité du complexe d'initiation de HIV-1 puisque d'un isolat à l'autre (MAL et Hxb2/NL4-3) des différences importantes sont observées. Contrairement à l'isolat MAL, l'interaction entre le PBS de l'ARNv Hxb2/NL4-3 et les 18 nucléotides 3'-terminaux de l'ARNt₃^{Lys} est suffisante pour initier efficacement la reverse transcription, sans qu'aucun remaniement conformationnel

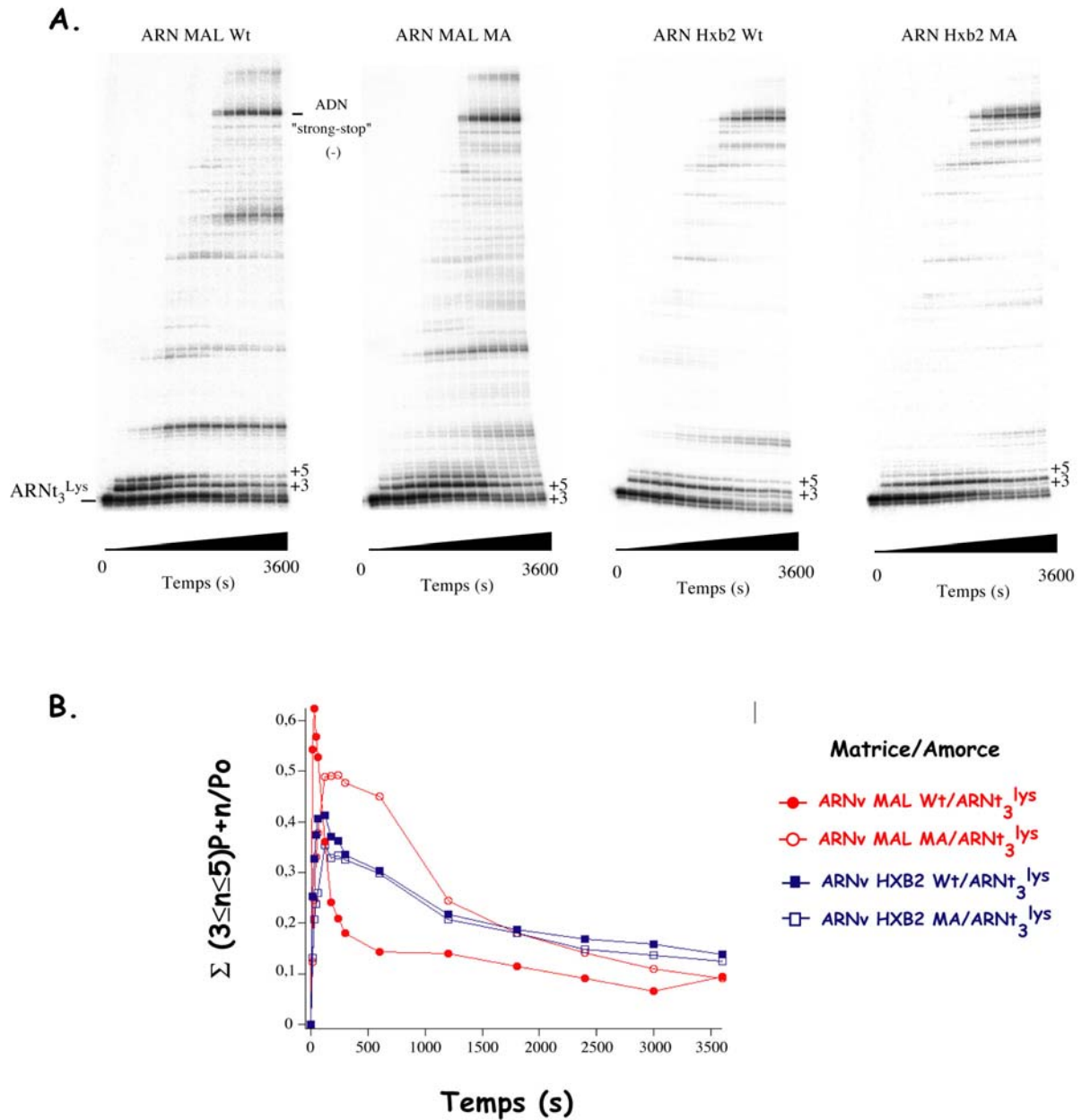


Figure 52 : Importance de l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} sur la transition de l'étape d'initiation à l'étape d'élongation.

A. 10 nM de complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv sauvage (Wt) de l'isolat MAL ou Hxb2 ou de complexe ARNt₃^{Lys}/ARNv muté dans la séquence riche en A (MA) sont incubés en présence de 25 nM de RT de HIV-1. La réaction est initiée par l'ajout de 50 μM de chaque dNTP. Des quantités aliquotes sont prélevées aux temps : 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 600, 1200, 1800, 2400, 3000 et 3600 s, et déposées sur un gel de polyacrylamide 8% ; B. Quantification des produits intermédiaires +3 à +5. La somme des produits intermédiaires +3 à +5 est comparée à la quantité initiale d'amorce (Po). Les rapports $\Sigma (3 \leq n \leq 5)P+n/Po$ sont reportés en fonction du temps.

n'ait lieu. Ces différences peuvent s'expliquer par les différentes structures adoptées par les ARN viraux avant l'hybridation à l'ARNt₃^{Lys}. Nous avons montré qu'au sein du complexe d'initiation de l'isolat MAL, l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et les trois nt de la jonction entre les hélices 2 et 7F sont des éléments indispensables pour une initiation efficace de la rétrotranscription (Article I). De plus, les hélices 1 et 2 jouent un rôle important et sont directement reconnues par la RT, tout comme la jonction entre les hélices 2 et 7F. Aucun de ces éléments structuraux n'est présent dans l'ARNv MAL libre. A l'inverse, les hélices 1 et 2 et les 3 nt de la jonction entre les hélices 2 et 7F préexistent dans l'ARNv Hxb2/NL4-3, avant son hybridation à l'ARNt₃^{Lys}. Nous supposons que l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv MAL et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} est cruciale pour conduire à un réarrangement structural permettant de former les éléments structuraux reconnus par la RT et initier efficacement la rétrotranscription. Ces éléments pré-existant dans l'ARNv Hxb2/NL4-3 avant son hybridation à l'amorce, l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} n'est pas requise.

Une analyse de séquences révèle qu'environ 14% des isolats de HIV-1, essentiellement des isolats d'Afrique et d'Asie, possèdent une insertion en 3' du PBS et une structure similaire à celle obtenue pour l'ARNv MAL.

Une étude cinétique comparative réalisée sur les ARNv MAL et HxB2 sauvage ou mutés dans la séquence riche en A, confirme l'importance de l'interaction intermoléculaire avec l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} dans l'isolat MAL uniquement. Elle favoriserait le passage de la phase d'initiation vers la phase d'élongation. (Figure 52). En effet, l'étude cinétique de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) révèle un profil de pauses aux positions +3 et +5 différant d'une matrice à l'autre. Le taux de produits intermédiaires décroît avec le temps en présence de l'ARNv de l'isolat MAL sauvage, tandis que la pause en +3 apparaît plus tardivement et persiste plus longtemps en présence de l'ARNv de l'isolat MAL muté dans la séquence riche en A. La pause en position +5 est moins intense, cependant elle est accompagnée des pauses en position +6, +7... L'interaction intermoléculaire entre l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv facilite la transition de la phase d'initiation à la phase d'élongation. On peut supposer que cet appariement facilite la refixation de la RT qui s'est dissociée aux positions +3 et +5. En revanche, le même profil de pauses en position +3 et +5 est obtenu en présence des ARNv sauvage ou muté de l'isolat Hxb2. A nouveau, ces résultats suggèrent que l'interaction anticodon/boucle des A entre l'amorce et la matrice n'existe pas dans l'isolat Hxb2.

Ces résultats semblent contradictoires avec les études menées par le groupe de C. Morrow et notre laboratoire concernant l'utilisation d'un ARNt non naturel pour initier la rétrotranscription chez Hxb2. Nos résultats démontrent clairement que l'utilisation d'une amorce non conventionnelle est dictée par l'efficacité de l'étape d'initiation de la rétrotranscription (Article II), qui dépend de la stabilité de l'interaction entre la séquence complémentaire à l'anticodon et l'ARNt^{His}. En d'autres termes, l'initiation de la rétrotranscription est inefficace en absence de cette interaction intermoléculaire lorsque l'ARNt^{His} est utilisé comme amorce. Cependant, des études de cinétique de synthèse d'ADN «Strong-Stop» (-) sur différents ARNv mutés ont montré que lorsque l'amorce naturelle est remplacée par un ORN^{His}, l'initiation de la rétrotranscription est très efficace, quelle que soit la matrice utilisée, possédant ou non une séquence complémentaire à l'anticodon de l'ARNt^{His} (Figure 5, Article IV). Il semble que l'interaction entre l'anticodon de l'ARNt^{His} et l'ARNv soit nécessaire pour compenser un effet négatif lié à la structure de l'ARNt^{His} hybridé.

Des résultats non publiés confortent l'hypothèse que des heurts stériques, liés au repliement de l'ARNt^{His}, ralentiraient l'initiation de la rétrotranscription. Pour cette étude, nous avons utilisé les ARNv His-AC et His-AC-GAC. Rappelons que l'ARNv His-AC initie inefficacement la rétrotranscription et évolue vers le mutant His-AC-GAC, après une culture cellulaire prolongée. Le mutant His-AC-GAC possède trois mutations adaptatives qui lui confèrent une capacité répliquative comparable au virus sauvage. Deux matrices, l'ARN Lys-AC et l'ARN Lys-AC-GAC, correspondant respectivement aux ARN His-AC et His-AC-GAC où le PBS^{His} est remplacé par le PBS^{Lys}, ont été construit. Nous pouvons considérer ces ARN comme des mutants de la boucle des A dans le système Hxb2. De manière surprenante, l'ARN Lys-AC initie plus efficacement la rétrotranscription que l'ARN His-AC et tout aussi bien que l'ARN sauvage (Figure 53). Ce résultat sous-entend que le problème d'initiation de l'ARN His-AC se situe au niveau de l'ARNt^{His}, puisque son remplacement par l'ARNt₃^{Lys} permet de palier ce problème. Nous supposons que ce virus ne restaure pas un PBS^{Lys}, car il ne lui faut que trois mutations additionnelles pour muter vers le virus His-AC-GAC qui initie efficacement la rétrotranscription, tandis qu'il lui faut 7 mutations pour restaurer le PBS^{Lys}. L'ARN Lys-AC-GAC initie correctement la rétrotranscription, cependant un peu moins bien que l'ARN His-AC-GAC. Ceci confirme que le virus s'est bien adapté et trouve un avantage

Nom du sous-clône	Séquence PBS	"Boucle des A"
ARN Hxb2 Wt	ARNt ₃ ^{Lys}	GAAAAT (Lys3)
ARN His-AC	ARNt ^{His}	CCACAA (His)
ARN Lys-AC	ARNt ₃ ^{Lys}	CCACAA (His)
ARN His-AC-GAC	ARNt ^{His}	CCACAA (His)
ARN Lys-AC-GAC	ARNt ₃ ^{Lys}	CCACAA (His)

Tableau 3 : Caractéristiques des virus sauvages et mutants de l'isolat Hxb2, utilisant l'ARNt₃^{Lys} ou l'ARNt^{His} comme amorce.

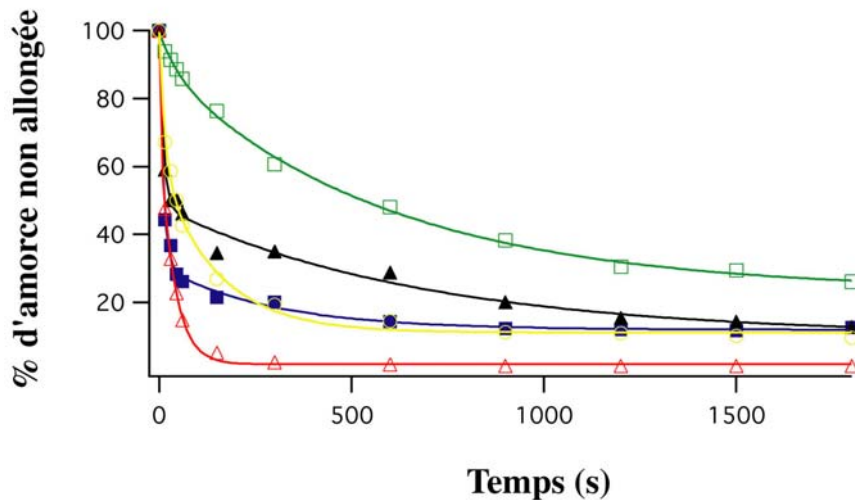


Figure 53 : Comparaison des cinétiques de disparition d'amorce lors de la synthèse de l'ADN "Strong-Stop" (-) à partir de différentes matrices utilisant l'ARNt₃^{Lys} ou l'ARNt^{His} comme amorce.

Deux nM de complexe ARNt₃^{Lys} naturel/ARN Hxb2 sauvage (jaune), ARNt^{His}/ARN HIS-AC (vert), ARNt^{His}/ARN His-AC-GAC (rouge), ARNt₃^{Lys}/ARN Lys-AC (bleu) ou ARNt₃^{Lys}/ARN Lys-AC-GAC (noir), sont incubés en présence de 20 nM de RT de HIV-1. La réaction est initiée par l'ajout de 50 μM de chaque dNTP. Après quantification, le pourcentage d'amorce non allongée est représenté en fonction du temps.

réplicatif plus important en acquérant ces trois mutations additionnelles plutôt que de

restaurer un PBS sauvage. Enfin, si l'ORN^{Lys} est utilisé comme amorce, la rétrotranscription est efficace en présence des deux matrices, Lys-Ac et Lys-AC-GAC, ce qui confirme que l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv de l'isolat Hxb2 et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} n'est pas indispensable pour une initiation efficace de la rétrotranscription.

En conclusion, il est dangereux de vouloir interpréter les effets fonctionnels des mutations sans contrôler leur incidence sur la conformation de l'ARN et de vouloir transposer la structure du complexe d'initiation adoptée par un isolat à un autre. En effet, cette étude a permis de mettre en évidence deux complexes d'initiation différents, l'un nécessitant des remaniements conformationnels importants médiés par l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv de l'isolat MAL et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}, l'autre se contentant de l'interaction canonique entre l'ARNv de l'isolat NL4-3/Hxb2 et l'ARNt₃^{Lys}. La nécessité d'interactions intermoléculaires et de changements conformationnels est dictée par la structure initiale de l'ARNv libre, contenant ou non les éléments indispensables à la reconnaissance du complexe d'initiation par la RT. D'autres interactions intermoléculaires ont été proposées entre l'ARNv de l'isolat Hxb2 et l'ARNt₃^{Lys}. Nos résultats de cartographie en solution *in vitro* et *in situ*, et les cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) vont à l'encontre de l'interaction PAS/Anti-PAS proposée par le groupe de B. Berkhout. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'une telle interaction ait lieu de façon transitoire, sans pour autant avoir un rôle fonctionnel dans l'efficacité d'initiation de la rétrotranscription. L'interaction additionnelle proposée par le groupe de J.G. Levin ne semble pas avoir lieu *in vitro*, cependant *in situ* une faible protection est observée. Des études supplémentaires devront être entreprises afin de pouvoir conclure à l'existence de cet appariement. De plus, cette étude démontre que l'utilisation de mutants pour comprendre le système sauvage, et plus particulièrement l'existence et l'importance d'une interaction entre l'amorce et la matrice peut induire en erreur. En effet, les études menées par le groupe de C. Morrow et notre laboratoire sur des mutants de l'isolat Hxb2 utilisant une amorce non conventionnelle, suggèrent qu'une interaction entre l'anticodon de l'amorce et l'ARNv a lieu et conduit à une initiation de la rétrotranscription efficace. Cependant dans le système sauvage, cette interaction n'existe pas. Ces résultats s'expliquent par le fait que tous les ARNt ne peuvent pas servir d'amorce au même titre que l'ARNt₃^{Lys}. La structure adoptée par l'ARNt après son hybridation à l'ARNv peut devenir un facteur négatif, qui peut être contrée par l'apparition d'une interaction stable entre l'anticodon de l'ARNt et l'ARNv. L'adaptation du virus passe par un réarrangement structural qui permet une initiation efficace de la rétrotranscription et le maintien du virus

mutant en culture cellulaire.

Chapitre II : Mécanisme d'excision de l'AZTMP : rôle de l'ATP-lyse ?

I. Introduction

Les premiers traitements avec l'AZT n'ont été encourageants que sur le court terme, puisque très rapidement sont apparus des virus résistants à l'AZT. Cette résistance est associée à l'apparition de mutations appelées TAM (Thymidine Analogue Mutations) comprenant une série de 6 substitutions M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y et K219Q. Ces dernières années, plusieurs éléments ont permis de comprendre le mécanisme de résistance à l'AZT, qui n'est pas lié à une discrimination de l'analogue lors de la polymérisation, mais à un mécanisme d'enlèvement de l'AZTMP incorporé dans la chaîne d'ADN. Cette excision serait favorisée par une augmentation d'affinité de la RT pour le complexe A/M où l'amorce est terminée par l'AZTMP (65). De plus, les TAM augmenteraient la réaction inverse de la polymérisation, c'est-à-dire la pyrophosphorolyse. Lors de cette réaction, deux donneurs de pyrophosphate sont envisageables : le PPi (16, 147) et l'ATP (237, 238). La pyrophosphorolyse médiée par le PPi sera reprise sous le terme de PP-lyse et la pyrophosphorolyse médiée par l'ATP sous le terme d'ATP-lyse.

Le rôle exact du PPi dans la résistance à l'AZT reste controversé. En effet, certains groupes ont montré que les mutations de résistance augmentent la vitesse de PP-lyse (16), tandis que d'autres équipes ont démontré l'inverse (52, 66, 237, 274). L'ATP-lyse est un mécanisme de résistance spécifique à la RT résistante puisque cette réaction est très peu efficace en présence de la RT sauvage (237). Comme la PP-lyse, l'ATP-lyse est spécifique de la phase d'élongation de la rétrotranscription. (285). Il semblerait, dans un contexte physiologique, que le donneur de pyrophosphate utilisé dans les réactions d'enlèvement de l'AZTMP soit l'ATP, puisque son K_m (4,8 mM) est proche de la concentration intracellulaire en ATP (3,5 mM).

Boyer et coll. ont proposé un modèle pouvant expliquer le mode d'excision de l'AZTMP. Dans ce modèle, le site actif de la RT possède deux sites distincts : le site N (Nucleotide binding site) fixant le dNTP entrant et le site P (Priming site) ou site de polymérisation. Au

cours de la synthèse d'ADN, le dernier nt de l'amorce se situe dans le site P, permettant au nt entrant de se positionner dans le site N. Suite à l'attaque nucléophile de l'extrémité 3' OH de l'amorce sur le phosphate α du nt entrant, générant une liaison phosphodiester, une étape de translocation permet au dernier nt incorporé de se positionner dans le site P et de poursuivre la polymérisation. Toutefois, il existe un état d'équilibre entre le positionnement du dernier nt incorporé dans les sites N et P. Ce modèle a été confirmé tout d'abord par l'obtention de structures cristallines de la RT complexée avec une amorce terminée par l'AZTMP dans les sites N et P (300, 299), mais également par la caractérisation de l'étape de translocation par une technique d'empreinte d'ADN site-spécifique (232). Pour permettre l'excision, l'amorce terminée par l'AZTMP doit impérativement se situer dans le site N, proche du donneur de pyrophosphate. Meyer (237) a montré que la fixation d'un nt entrant dans le site N en présence d'une amorce terminée par un didésoxynucléotide dans le site P, aboutit à un complexe non productif ou DEC (Dead End Complex). Ce complexe est très stable et empêche la rétrotranslocation du didésoxynucléotide incorporé dans le site N, et par conséquent son enlèvement. Le DEC formé en présence d'une amorce terminée par l'AZTMP est moins stable. Il a récemment été démontré (299) qu'il existe un conflit stérique entre le phosphate α du dNTP entrant et le groupement azido de l'AZTMP, favorisant la rétrotranslocation de l'AZTMP dans le site N. La RT sauvage possède donc un mécanisme de résistance inné permettant l'enlèvement de l'AZTMP incorporé par PP-lyse. Les TAM amplifient ce mécanisme en permettant la formation d'un complexe quaternaire RT résistante : A-AZTMP/M : dNTP (Amorce terminée par l'AZT/Matrice : dNTP) moins stable qu'en présence de la RT sauvage (237) et en déplaçant l'équilibre entre les sites N et P du dernier nt incorporé vers l'état pré-transloqué (232). Enfin, la modélisation de l'ATP, du PPi et du dNTP entrant dans le site catalytique indique que les phosphates β et γ de l'ATP et du PPi se positionneraient au niveau des phosphates γ et β du dNTP entrant (52). Les mutations de résistance, principalement la mutation T215Y/F qui interagirait *via* son cycle aromatique avec le sucre de l'ATP, pourraient augmenter l'affinité de l'ATP pour la RT résistante (52) et favoriser l'ATP-lyse. Cependant ce sujet est controversé car il a été montré dans notre laboratoire que l'affinité de la RT sauvage ou résistante pour l'ATP est identique (Résultats non publiés). Les TAM pourraient ainsi permettre la fixation de l'ATP dans une orientation facilitant l'excision (274).

II. Etat d'avancement des travaux

Les constantes cinétiques d'excision de l'AZTMP par la RT sauvage ou AZT résistante (D67N, K70R, T215F et K219K), déterminées dans notre laboratoire par M. Rigourd, aboutissent à des valeurs similaires de constantes de PP-lyse ($k_{\text{pyro}} = 1.3 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$) et d'affinité du PPi ($K_d^{\text{PPi}} = 21 \pm 12 \text{ mM}$) (Résultats non publiés). Ces valeurs vont à l'encontre des résultats obtenus par l'équipe de W. Scott (237) et S. Hughes (52), qui montrent que la PP-lyse est supérieure en présence de l'enzyme sauvage, et s'opposent également aux résultats de l'équipe de M. Parniak (16) qui suggèrent que les mutations de résistance augmentent la PP-lyse. Cependant, tout comme les résultats des équipes de W. Scott et S. Hughes, les constantes de PP-lyse et d'affinité du PPi ne permettent pas d'expliquer la résistance à l'AZT puisqu'elles ne varient pas suite à l'apparition de mutations de résistance.

Le mécanisme d'excision de l'AZTMP se fait vraisemblablement par ATP-lyse. En effet, l'AZTMP n'est enlevé efficacement par ATP-lyse qu'en présence de RT résistante, à des concentrations physiologiques d'ATP (3,5 mM), et uniquement durant la phase d'élongation. La vitesse d'ATP-lyse déterminée par M. Rigourd est de $0,009 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ (Résultat non publié), et est en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes montrant que l'excision par ATP-lyse est nettement plus lente que l'enlèvement par PP-lyse en présence des enzymes sauvage ou résistante (52), (313). Il a été proposé que les mutations de résistance à l'AZT augmentent l'affinité de la RT résistante pour l'ATP (52). Cependant, une étude menée au laboratoire, comparant la fixation de l'ATP au complexe A/M : RT sauvage ou résistante, a montré que les deux RT sont capables de fixer l'ATP avec la même affinité. En effet, les K_d^{ATP} des RT sauvage et résistante sont respectivement de $12 \pm 2 \text{ mM}$ et de $12 \pm 3 \text{ mM}$. Ces résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse proposée par Boyer et coll. (52). La RT sauvage fixe probablement l'ATP dans une conformation ne permettant pas une attaque du phosphate situé entre les deux derniers nucléotides de l'amorce. Les mutations de résistance permettent soit un placement correct de l'ATP dans le site catalytique, soit le repositionnement du complexe A/M dans une conformation permettant l'attaque de la dernière liaison phosphodiester par l'ATP. Le meilleur moyen de comprendre le rôle des mutations de résistance serait de résoudre les structures cristallographiques de complexes quaternaires A-AZTMP/M : RT : ATP avec les enzymes sauvage et résistante.

Les données du laboratoire montrent que la vitesse d'ATP-lyse par la RT résistante ($0,009 \text{ s}^{-1}$) est 140 fois inférieure à la vitesse de PP-lyse par les RT sauvage et résistante

(1,3 s⁻¹). Cependant les constantes d'affinité pour le PPi et l'ATP obtenues pour les RT sauvage ou résistante sont relativement proches (21 mM pour le PPi et 12 mM pour l'ATP). L'efficacité absolue d'enlèvement par PP-lyse ($k_{\text{pyro}}/K_d^{\text{PPi}} = 62 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les enzymes sauvage et résistante) est 80 fois plus élevée que l'ATP-lyse ($k_{\text{ATP-lyse}}/K_d^{\text{ATP}} = 0,77 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'enzyme résistante). Dans les conditions physiologiques (3,5 mM ATP et 150 μM PPi), elle reste trois fois supérieure pour la PP-lyse (0,0061 s⁻¹) comparée à l'ATP-lyse (0,0021 s⁻¹). Comme le mécanisme de réparation innée par PP-lyse est plus efficace et reste inchangé en présence des RT sauvage et résistante, comment expliquer la sélection des mutations de résistance favorisant l'ATP-lyse et l'avantage répliatif qu'elles confèrent ? Les constantes cinétiques ont été obtenues en étudiant une position unique d'excision de l'AZTMP. Les groupes de M. Götte (232) et de W. A. Scott (239) ont montré que la sequence de la matrice pouvait influencer l'efficacité d'excision de l'AZTMP par ATP-lyse. Nous avons voulu nous placer dans un contexte plus proche du système réel et vérifier les données de M. Rigourd en étudiant l'effet du PPi et/ou de l'ATP sur l'excision de l'AZTMP au cours de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence des RT sauvage ou AZT résistante.

III. Stratégie expérimentale

Nous avons suivi la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en fonction du temps, à partir d'un complexe ODN/ARNv1-311 (correspondant aux 311 premiers nt de l'ARNv MAL) et en présence des enzymes sauvage ou AZT résistante (D67N, K70R, T215F et K219K), provenant du laboratoire de M. A. Parniak. L'utilisation d'une amorce marquée radioactivement permet une quantification directe des produits allongés ainsi que la visualisation des sites d'incorporation d'AZTTP et d'excision d'AZTMP. Dix nM de complexe ODN/ARNv1-311 (hybridé à plus de 95%) sont mis en présence d'un milieu réactionnel contenant 50 μM de chaque dNTP, additionné ou non d'AZTTP (3 μM), d'ATP (3,5 mM) et/ou de PPi (150 μM). Ces différentes conditions expérimentales permettent d'étudier la polymérisation, l'incorporation de l'AZT et son excision. Il est important de noter que l'AZTTP et l'ATP ont été préalablement traités à la pyrophosphatase afin d'éviter les artéfacts dûs à des contaminations par le PPi dans les milieux réactionnels. De plus, des contrôles ont été effectués pour s'assurer que les stocks de dNTP ne contenaient pas de PPi. La réaction est initiée par l'addition de 25 nM de RT sauvage ou résistante. Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps et déposées sur un gel de polyacrylamide 15%-Urée 8M. Le

produit final de la rétrotranscription (ADN « Strong-Stop » (-) et produits de self-priming) a été quantifié à l'aide du BIOimager Bas 2000 (Fuji) et du logiciel d'analyse MacBAS et sera repris sous le terme d'ADN "Strong-Stop" (-).

IV. Résultats et discussion

A. Activité des enzymes sauvage et résistante

Lors de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-), les cinétiques d'extension d'amorce en présence des RT sauvage ou résistante sont très similaires (Résultats non présentés). Toutefois, la RT résistante est légèrement plus active que la RT sauvage lors de la synthèse de longs produits de rétrotranscription. En effet, au bout de 120 min de polymérisation, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé par la RT sauvage est de 32% alors qu'il est de 37,9% avec la RT résistante.

B. Incorporation de l'AZTTP

L'AZTTP présent dans le milieu réactionnel peut s'incorporer à de nombreuses positions lors de la rétrotranscription et ainsi inhiber la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-). Des exemples de sites d'incorporation de l'AZTTP sont indiqués sur les Figures 54 et 55. Nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales où la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) est inhibée à plus de 90% (Figures 54 et 55, Tableau 4). Les gels montrent que les deux enzymes incorporent l'AZTTP avec la même efficacité lors de la rétrotranscription. En effet, l'ajout d'AZTTP inhibe la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) de 97% et 94% en présence respectivement de la RT sauvage et résistante, en accord avec les résultats obtenus précédemment (209).

C. Mécanisme de résistance par enlèvement (Figures 54 et 55, Tableau 4)

1. Enlèvement par PP-lyse

Des cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) ont été menées en présence

d'AZTTP et de PPi, dont la concentration est proche des concentrations intracellulaires (150 μM). L'excision par PP-lyse permet de réparer une quantité non négligeable d'amorce

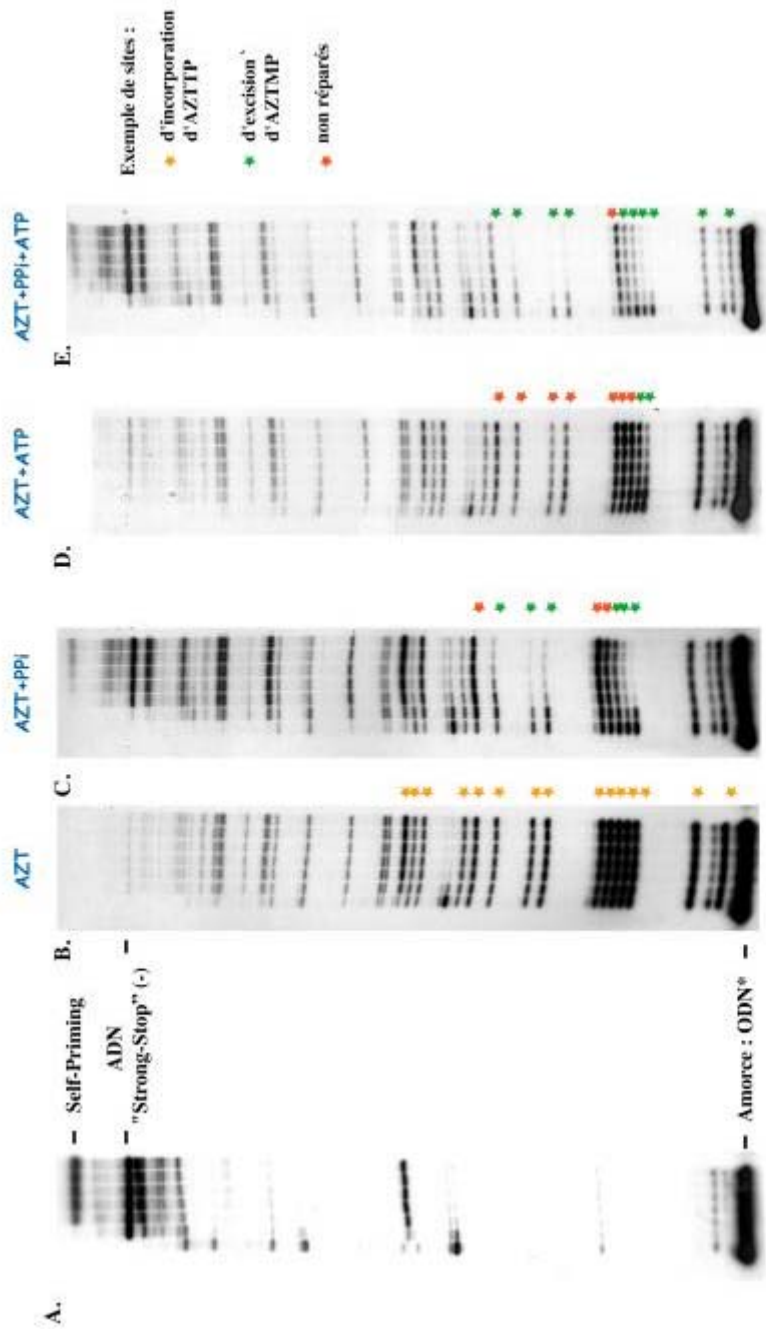


Figure 54 : Cinétiques d'incorporation d'AZTTP par la RT sauvage et effets du PPi et/ou de l'ATP sur l'enlèvement du NRTI lors de la synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-).

Dix nM de complexe ODN/ARNI-311 sont incubés en présence de 50 μM de chaque dNTP en absence (A) ou en présence d'AZTTP (3μM) (B, C, D et E). Le milieu contient également du PPi (150 μM) (C et E) et /ou de l'ATP (3,5 mM) (D et E). La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage. Des aliquotes sont prélevées aux temps 1, 5, 20, 40, 60, 90 et 120 min, puis déposées sur gel dénaturant de polyacrylamide 15%- Urée 8M.

terminée par de l'AZTMP et ainsi de poursuivre la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-). Le taux de produit final est de 13,6% en présence de l'enzyme sauvage et de 14,3% en présence de l'enzyme résistante, soit 40,8 et 33,9 % des produits obtenus en absence d'AZTTP. Les mutations de résistance n'améliorent donc pas la réaction de réparation par PP-lyse. Ces résultats corroborent ceux obtenus précédemment par les équipes de W. Scott, S. Hughes et B. Canard (237), (52), (313).

Un point important est à soulever : l'efficacité d'excision varie considérablement selon les sites d'incorporation de l'AZTTP. En effet, au niveau de la séquence riche en A de l'ARN_v, 5 sites d'incorporation d'AZTTP se succèdent. Cependant, la réparation par PP-lyse n'est observée qu'au niveau des deux premiers sites (Figures 54 et 55). Ces résultats montrent qu'il est très délicat d'obtenir des constantes cinétiques d'excision traduisant l'ensemble du phénomène, puisque suivant le site étudié, les données peuvent varier considérablement.

2. Enlèvement par ATP-lyse

Des cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) ont été menées en présence d'AZTTP et d'ATP, dont la concentration est proche de la concentration intracellulaire (3,5 mM). Comme attendu, la réparation par ATP-lyse est plus efficace en présence de la RT résistante. En effet, le taux de produit final est de 11,4% et de 3,1% respectivement pour les RT résistante et sauvage, correspondant à une récupération de 25,7% et de 7,1%. Les mutations de résistance à l'AZT favorisent effectivement le mécanisme de réparation par ATP-lyse. A nouveau, l'efficacité de réparation par ATP-lyse varie considérablement d'un site d'incorporation de l'AZTTP à l'autre, mais globalement les mêmes sites permettent une excision par PP-lyse ou par ATP-lyse. Ces résultats corroborent ceux du groupe de M. Götte qui suggèrent que l'efficacité de réparation par ATP-lyse dépend de la séquence de la matrice (232) et vont à l'encontre de ceux de P. Meyer (239) qui montrent que contrairement à l'excision du ddA, du ddC ou du ddG, la réparation d'une amorce terminée par de l'AZT ou un ddT dépend moins de la séquence. Le taux de récupération obtenu en présence de la RT résistante et d'ATP (25,7%) est inférieur à celui obtenu en présence de la RT sauvage et de PPi (40,8%). Ces valeurs confirment les efficacités d'enlèvement par PP-lyse ou ATP-lyse déterminées par M. Rigourd et indiquent que la PP-lyse est plus efficace que l'ATP-lyse. On peut donc se demander pourquoi le virus sélectionne des mutations de résistance favorisant l'ATP-lyse, si la résistance innée de la RT sauvage permet un enlèvement plus efficace par

PP-lyse. Des résultats similaires ont été obtenus par différents groupes (52, 237, 313) sans

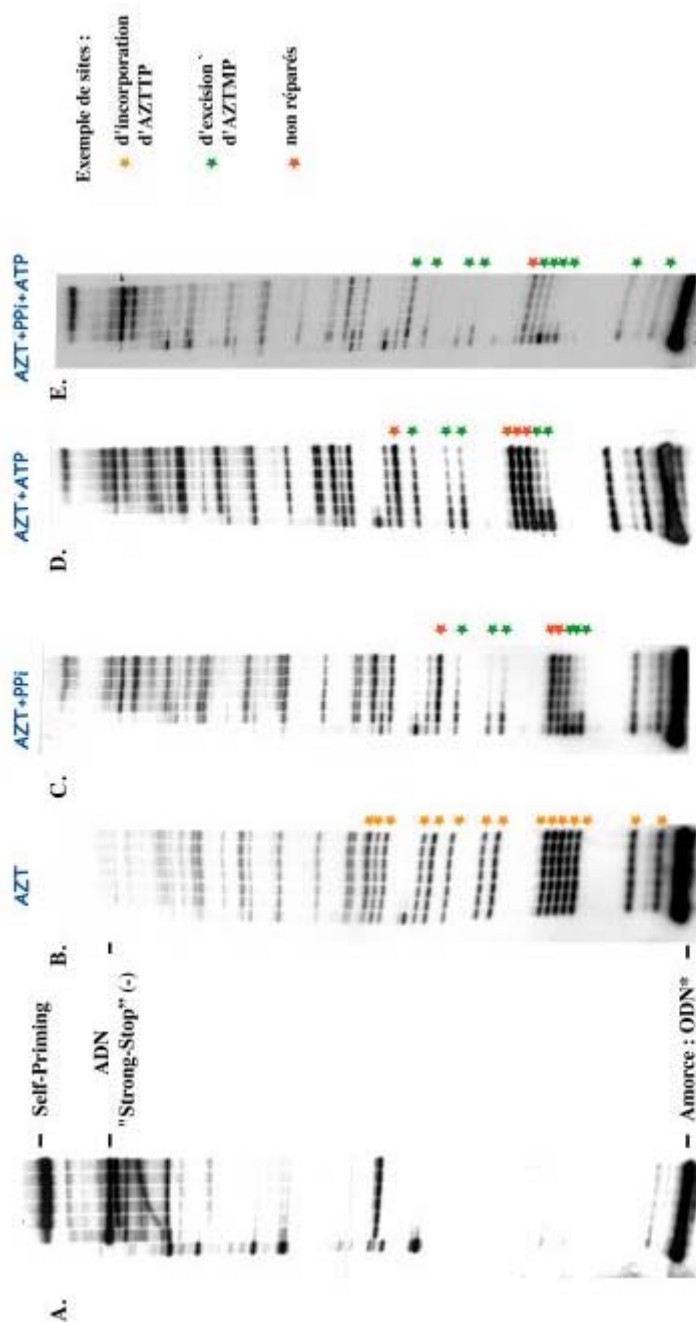


Figure 55 : Cinétiques d'incorporation d'AZTTP par la RT résistante et effets du PPI et/ou de l'ATP sur l'enlèvement du NRTI lors de la synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-).

Dix nM de complexe ODN/ARNI-311 sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP en absence (A) ou en présence d'AZTTP (3 μ M) (B, C, D et E). Le milieu contient également du PPI (150 μ M) (C et E) et /ou de l'ATP (3,5 nM) (D et E). La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT résistante. Des aliquotes sont prélevées aux temps 1, 5, 20, 40, 60, 90 et 120 min, puis déposées sur gel dénaturant de polyacrylamide 15%. Urée 8M.

toutefois donner une explication rationnelle à ce phénomène.

D. Existe-t-il une compétition entre l'ATP et le PPi pour exciser l'AZTMP incorporé ?

Des cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) ont été réalisées en présence d'AZTTP, d'ATP et de PPi. Pour la première fois, la réparation a été étudiée en présence des deux donneurs potentiels de pyrophosphate qui utilisent le même mécanisme de réparation d'une amorce terminée par de l'AZT. En effet, pour permettre l'enlèvement du nt incorporé, le phosphate γ de l'ATP et un phosphate du PPi doivent se positionner dans la même orientation, à proximité du phosphate liant les deux derniers nt de l'amorce. D'après les résultats obtenus par M. Rigourd, démontrant que les affinités des enzymes sauvage et résistante pour le PPi et l'ATP sont similaires, on peut supposer qu'il existe une compétition entre les deux donneurs de pyrophosphate pour leur fixation dans le site catalytique. Pour la RT sauvage, le taux de récupération en présence de PPi et d'ATP devrait être inférieur à celui obtenu en présence de PPi uniquement. En effet, l'ATP qui peut se fixer dans le site catalytique aussi efficacement que le PPi ne permet pas une réaction d'enlèvement de l'AZTMP incorporé : c'est un compétiteur qui « inhibe » partiellement dans ces circonstances la réparation. Une diminution du taux de récupération devrait également être observée en présence de la RT résistante, puisque l'efficacité d'enlèvement par ATP-lyse est inférieure à l'efficacité d'enlèvement par PP-lyse. Cependant, de façon surprenante, le pourcentage d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé en présence de PPi et d'ATP est nettement supérieur au taux obtenu en présence de PPi uniquement. Il est de 22,9% et de 28,9% en présence des enzymes sauvage et résistante respectivement avec un taux de récupération de 70,7% et 74,8%. Comme précédemment, l'enlèvement de l'AZTMP incorporé varie d'un site à l'autre avec cependant une efficacité supérieure. Comment expliquer ces résultats ? Il semblerait qu'il y ait, non pas une compétition entre les deux donneurs de pyrophosphates pour leur fixation dans le site actif, mais un effet coopératif activant la réparation. La RT pourrait dans ce cas être considérée comme une enzyme allostérique, possédant un site de fixation différent du site catalytique, appelé site allostérique, permettant la fixation d'un effecteur ou ligand allostérique. Nous pourrions penser que la RT possède un site allostérique permettant la fixation d'un des deux donneurs de pyrophosphate, favorisant la fixation du second dans le site catalytique. Par exemple, l'ATP pourrait jouer le rôle de ligand allostérique et augmenter l'efficacité de réparation par PP-lyse, soit en permettant une meilleure affinité de l'enzyme pour le PPi, soit en augmentant la constante de PP-lyse. La même hypothèse peut être émise

Résultats et Discussion

	Milieu Réactionnel	% ADN “Strong-Stop” (-)	% ADN “Strong-Stop” (-) du à l'ajout d'un composé	% de récupération (% ADN “Strong-Stop” (-) du à l'ajout d'un composé/%ADN “Strong-Stop” (-) initial)
RT sauvage	dNTP	32		
	dNTP+AZT	0,9		
	dNTP+AZT+PPi	13,6	12,7	40,8
	dNTP+AZT+ATP	3,1	2,2	7,1
	dNTP+AZT+ATP+PPi	22,9	22	70,7
RT AZT résistante	dNTP	37,9		
	dNTP+AZT	2,2		
	dNTP+AZT+PPi	14,3	12,1	33,9
	dNTP+AZT+ATP	11,4	9,2	25,7
	dNTP+AZT+ATP+PPi	28,9	26,7	74,8

Tableau 5 : Comparaison des taux d'ADN “Strong-Stop” (-) synthétisé en fonction des RT sauvage ou AZT résistante et du milieu réactionnel.

en considérant le PPi comme effecteur, augmentant l'efficacité d'enlèvement par ATP-lyse. Il est à noter qu'en présence de PPi et d'ATP, le taux de récupération obtenu est similaire pour

les deux enzymes. Le rôle exact des mutations de résistance *in vivo* reste à élucider.

Une autre explication permettant de comprendre ces résultats et impliquant la concentration en magnésium, sera développée dans le Chapitre III.

En conclusion, d'après nos résultats, obtenus dans des conditions proches des conditions physiologiques (150 μM de PPi , 3,5 mM d'ATP et de l'ARNv utilisé comme matrice présentant de nombreux sites d'incorporation d'AZTTP), les mutations de résistance permettent d'utiliser l'ATP comme donneur de pyrophosphate. Toutefois la RT sauvage présente une résistance innée *via* le mécanisme de PP-lyse, dont l'efficacité d'enlèvement est supérieure à celle obtenue par ATP-lyse.

Si les mutations de résistance sont sélectionnées par le virus à la suite d'un traitement antiviral avec l'AZT, elles lui apportent obligatoirement un avantage réplcatif. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour comprendre pourquoi le virus acquiert des mutations de résistance qui favorisent une réparation par ATP-lyse :

* La PP-lyse n'est pas le mécanisme préférentiel de résistance à l'AZT utilisé *in vivo*. De ce fait, aucune résistance innée à l'AZT ne serait observée et les mutations de résistance seraient sélectionnées pour conférer un avantage réplcatif. La rétrotranscription et par conséquent la réparation d'une amorce terminée par un NRTI est cytoplasmique tandis que la production de PPi est nucléaire, suite à la réplication ou à la transcription de l'ADN génomique. Nous pouvons donc penser que la concentration en PPi varie considérablement d'un compartiment cellulaire à l'autre. Ainsi la concentration en PPi ne serait pas de 150 μM dans le cytoplasme mais serait nettement moins élevée. Si tel est le cas, la PP-lyse est inefficace et le virus est obligé de trouver une alternative pour contrer l'effet négatif de l'AZTTP et pouvoir se répliquer efficacement. Ainsi, la sélection des TAM aurait un rôle clef dans la réplication virale. Elles permettraient aux virus d'échapper aux traitements antirétroviraux en développant une résistance à l'AZT par un mécanisme de réparation médié par l'ATP.

* La concentration intracellulaire en ATP qui est estimée à 3,5 mM serait plus élevée ou le pool d'ATP plus accessible.

Il existe un état d'équilibre entre le positionnement du dernier nt incorporé dans les sites N et P. Les résultats du groupe de E. Arnold (299) suggèrent qu'il existe un conflit stérique entre le phosphate α du dNTP entrant et le groupement azido de l'AZTMP, favorisant la

rétrotranslocation de l'AZTMP dans le site N quelle que soit la RT utilisée. Ce mécanisme peut expliquer la résistance innée vis-à-vis de l'AZT de la RT sauvage par PP-lyse. De plus, l'avantage des TAM sélectionnées lors d'un traitement avec l'AZT est de déplacer l'équilibre d'une amorce terminée par de l'AZT vers le site N, facilitant son excision (232). Les résultats du groupe de W. Scott (237) confortent ces données et démontrent qu'un DEC moins stable est formé en présence d'une amorce terminée par de l'AZTMP, le nt entrant et la RT résistante, par rapport à la RT sauvage.

Nous pourrions nous attendre à une meilleure efficacité de réparation d'une amorce terminée par de l'AZT par PP-lyse en présence de la RT résistante par rapport à la RT sauvage. Cependant, d'après nos résultats et ceux d'autres laboratoires (S.Hughes, B.Canard), la PP-lyse d'une amorce terminée par de l'AZT est plus efficace en présence de la RT sauvage.

Pour expliquer ces résultats, nous pouvons supposer que :

* Les mutations de résistance diminuent l'affinité de la RT résistante pour le PPi ou diminuent la vitesse catalytique d'enlèvement de l'AZTMP incorporé par PP-lyse. Cependant d'après les résultats de M. Rigourd, les K_d^{PPi} et k_{pyro} sont identiques pour les deux RT. Ces valeurs ont été obtenues pour une position particulière d'excision. Puisque l'efficacité de réparation varie considérablement d'un site d'incorporation à l'autre, nous pouvons envisager que les constantes cinétiques (K_d^{PPi} et k_{pyro}) diffèrent suivant la position de l'AZTMP et d'une enzyme à l'autre.

Chapitre III : Rôles multiples de la concentration en Mg^{2+}

I. Introduction

La RT de HIV-1 agit sous forme d'hétérodimère p66/p51. La sous-unité p66 lui confère les activités ADN polymérase ARN et ADN dépendantes ainsi qu'une activité RNase H, tandis que la sous-unité p51 possède un rôle structural.

La RT de HIV-1 est une enzyme Mg^{2+} dépendante. Elle présente une courbe d'activité en cloche avec un maximum d'activité à 6 mM de Mg^{2+} et la substitution des ions Mg^{2+} par des ions Mn^{2+} diminue fortement la polymérisation lorsqu'un poly(rA)/(dT)₁₀ est utilisé comme substrat (78). La structure cristallographique de la RT en complexe ternaire avec un duplex A/M et un dNTP entrant (169) donne des indications précises sur les liens étroits qui existent entre les deux ions Mg^{2+} , le dNTP entrant et des AA du site actif (Figure 37). Deux ions métalliques Mg^{2+} distants de 3.57 Å sont présents dans le site actif de la RT et ont un rôle fondamental dans la catalyse. Un premier Mg^{2+} est coordiné par les chaînes latérales des aspartates catalytiques 110 et 185, par le résidu 111 et par un oxygène libre de chaque phosphate du dNTP entrant. Le complexe Mg^{2+} /dNTP doit se former avant sa fixation dans le site catalytique de l'enzyme. L'autre Mg^{2+} interagit avec l'extrémité 3'OH de l'amorce, les chaînes latérales des aspartates 110, 185, 186, l'oxygène du phosphate α du dNTP entrant et probablement une molécule d'eau. Ce deuxième Mg^{2+} intervient dans l'activation de l'extrémité 3'OH de l'amorce et favorise ainsi l'attaque nucléophile de cet hydroxyle sur le phosphate α du dNTP entrant, tandis que l'autre Mg^{2+} stabilise l'état de transition pentacoordiné du phosphate α nécessaire à la formation de la liaison phosphodiester entre l'amorce et le dNTP entrant ainsi qu'à la libération du pyrophosphate.

L'activité RNase H est dépendante de la présence d'ions divalents (Mg^{2+}/Mn^{2+}). Elle est plus efficace en présence d'ions Mg^{2+} , dont la concentration peut varier entre 4 et 12 mM sans effet significatif sur l'activité RNase H (326). La structure cristallographique du domaine RNase H montre que le site catalytique possède deux ions métalliques divalents, distants de 4 Å (91). Ils sont coordonnés par quatre AA conservés (Asp443, Glu478, Asp498 et Asp549) qui constituent le site actif. La structure en solution, résolue par RMN, met en évidence la fixation de deux ions Mg^{2+} (257). Il semblerait qu'un mécanisme impliquant deux ions métalliques soit utilisé pour dégrader l'ARN par l'activité RNase H, cependant le rôle exact

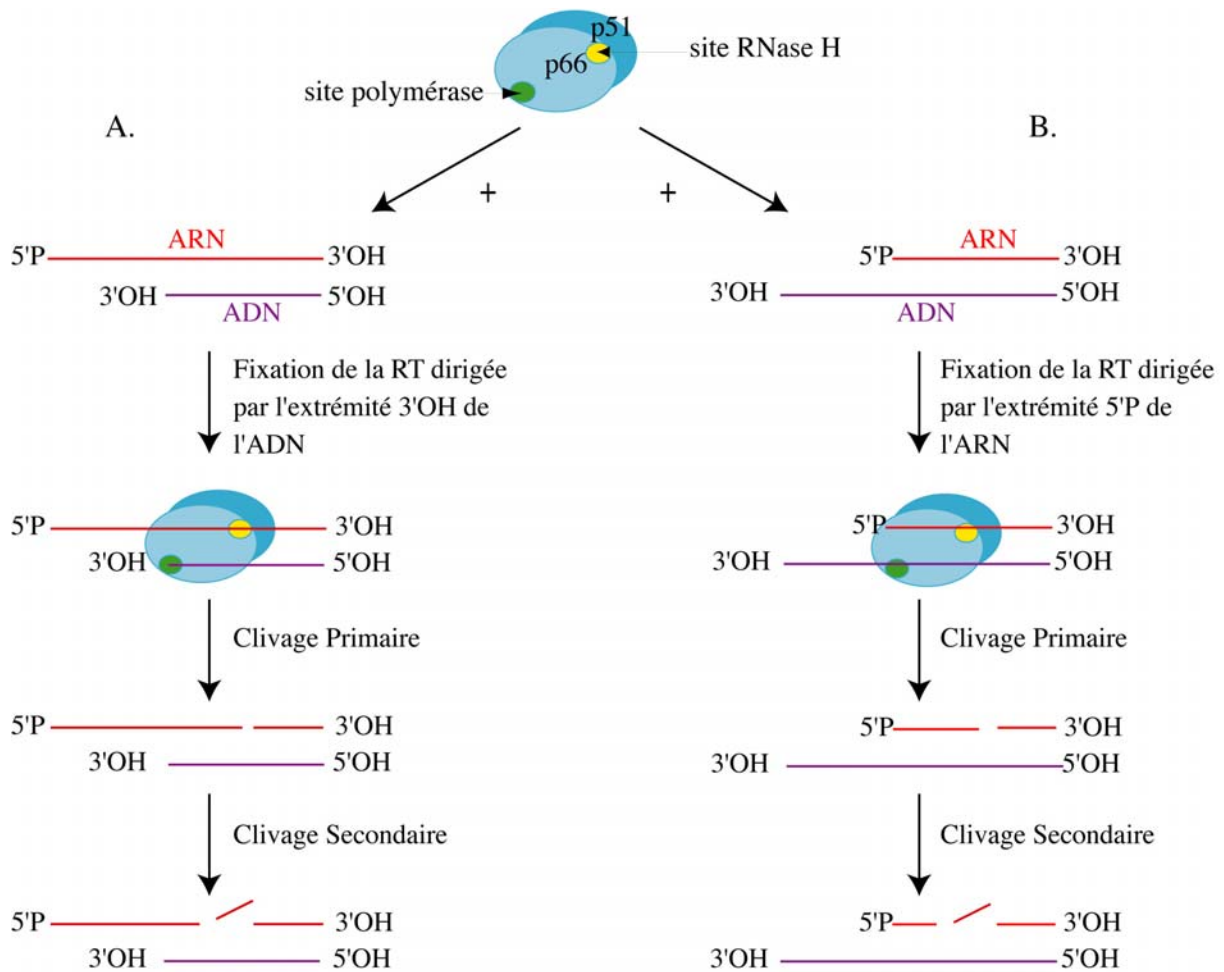


Figure 56 : Schéma illustrant les deux modes de clivage polymérase-dépendant et -indépendant par le domaine RNase H de la RT de HIV-1.

(A) Le mode de clivage polymérase-dépendant est dirigé par l'extrémité 3' OH de l'ADN et a lieu durant la polymérisation. Le site actif polymérase est positionné à l'extrémité 3'OH rentrante du brin ADN, environ 18 nt en amont du site RNase H et détermine la position du clivage primaire de l'ARN (18 nt en aval de l'extrémité 3'OH de l'ADN). Après cette coupure, la RT se repositionne et réalise un second clivage sur l'ARN, environ 8 nt en aval de l'extrémité 3' OH de l'ADN. (B) Le mode de clivage polymérase-indépendant est dirigé par l'extrémité 5'P de l'ARN et aboutit à une coupure primaire suivie d'une coupure secondaire à respectivement 18 et 8 nt en aval de l'extrémité 5' P de l'ARN, selon le même mécanisme que celui décrit précédemment.

des ions métalliques n'a pas été élucidé. Deux modes de clivage par le domaine RNase H, polymérase -dépendant et -indépendant, ont été décrits (15) (Figure 56). Le clivage polymérase-dépendant est dirigé par l'extrémité 3'OH de l'amorce permettant un clivage à 18 nt de l'extrémité 3' de l'amorce (-18 nt). Cette première coupure induit un repositionnement de la RT qui réalise une seconde coupure environ 10 nt en aval de la première (-8 nt). Ce mode de clivage se produit au cours de la synthèse du brin d'ADN (-) et permet la dégradation de l'ARN génomique utilisé comme matrice. Le clivage polymérase-indépendant contribue à la dégradation des fragments d'ARN générés par l'activité RNase H dépendante de la polymérisation mais également à la formation et à la dégradation du PPT. Le clivage est dirigé par l'extrémité 5' de l'ARN et conduit aux mêmes types de coupures (-18 nt suivi de -8 nt).

Dans la littérature, la concentration en Mg^{2+} couramment utilisée pour étudier la RT est de 6 mM, car elle permet d'obtenir une activité optimale pour les deux fonctions enzymatiques, polymérase et RNase H, en utilisant respectivement un poly(rA)/(dT)₁₀ ou un poly(dC)/poly(rG) comme substrat. Toutefois, la concentration intracellulaire de Mg^{2+} libre est certainement inférieure à 6 mM car une partie du pool de Mg^{2+} lie l'ARN, l'ADN, les NTP et les dNTP. Ainsi, la concentration en Mg^{2+} libre, mesurée dans les muscles striés, est d'environ 0,9 mM et d'environ 0,2 mM dans le cerveau. Nous avons évalué l'effet de la concentration en Mg^{2+} libre sur la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence de différentes RT (sauvage, résistante à l'AZT, au 3TC, RNase H⁻ (E478Q)), en faisant varier la concentration en Mg^{2+} , en présence ou en absence d'agents chélateurs des ions Mg^{2+} (ATP, EDTA, EGTA). Nous avons ensuite testé l'influence du Mg^{2+} sur l'activité polymérase en étudiant l'incorporation de nt et la processivité, sur l'activité RNase H polymérase dépendante de la RT sauvage, et sur l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) par les inhibiteurs nucléosidiques.

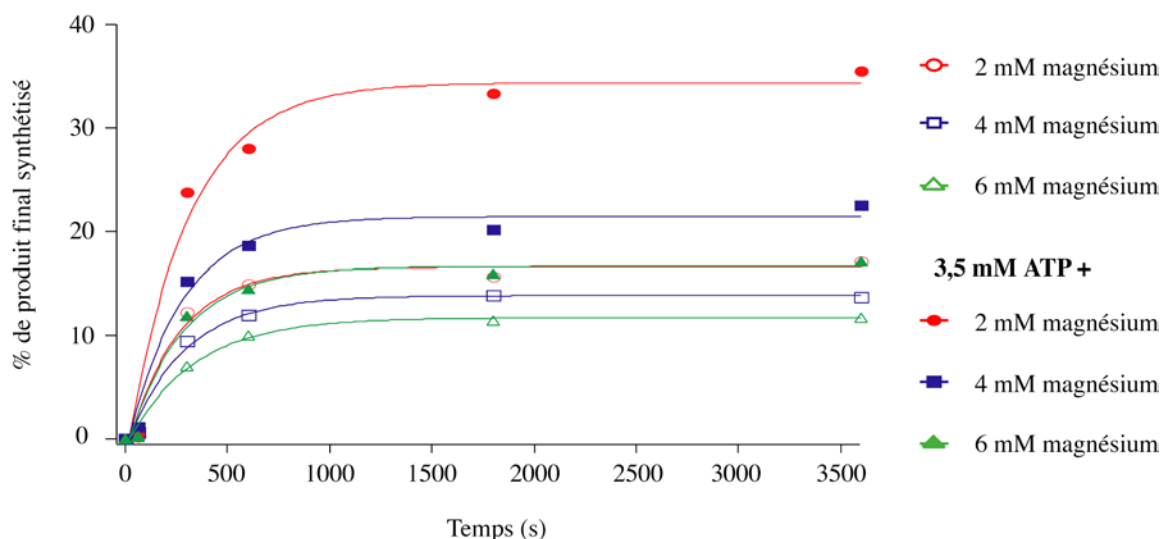


Figure 57 : Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'efficacité de la synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-).

Comparaison des cinétiques de synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-) en fonction de la concentration en magnésium en présence ou en absence d'ATP (3,5 mM). Dix nM de complexe ODN/ARNv 1-311 MAL (hybridé à plus de 95%) sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP. La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage de HIV-1. Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (2, 4 et 6 mM), en absence ou en présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%. L'ODN, utilisé comme amorce, a été marqué radioactivement pour permettre une quantification directe du taux de produit final. Les gels ont été quantifiés et le pourcentage d'ADN "Strong-Stop" (-) (ADN "Strong-Stop" (-) et produit de self-priming) est reporté en fonction du temps.

	[magnésium] (mM)	1	2	3	4	5	6
Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé (%)	-ATP	20,2	16,6	14,9	12,7	11,7	10,9
	+ATP (3,5 mM)	27	32,1	28,7	20,8	18,0	16,9
	[Mg^{2+}] libre (mM) après ajout d'ATP	0,018	0,095	0,301	0,837	1,68	2,62

Tableau 6 : Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé en fonction de la concentration en magnésium.

Dix nM de complexe ODN/ARNv 1-311 MAL sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP. La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage de HIV-1. Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (de 1 à 6 mM), en absence ou présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%. Le taux d'ADN "Strong-Stop" (-) obtenu au bout de 60 min est quantifié et comparé d'une expérience à l'autre. Le taux de Mg^{2+} libre après ajout d'ATP est calculé en tenant compte de la constante d'association de l'ATP pour le Mg^{2+} ($K_{ass}=10^{4,05} M^{-1}$).

II. Résultats et discussion

La concentration totale en magnésium est désignée sous le terme de magnésium. La concentration en Mg^{2+} libre, après chélation d'une quantité d'ions par un agent chélateur, sera désignée sous le terme de Mg^{2+} .

A. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-)

Nous avons comparé les cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en variant la concentration en magnésium (2, 4 et 6 mM), en présence de RT sauvage de HIV-1 (Figure 57). La synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) est plus efficace à faible concentration en magnésium. En effet, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé (ADN « Strong-Stop » (-) et produits de self-priming) est de 16,6 % et 10,9 % respectivement pour une concentration en magnésium de 2 mM et 6 mM.

Pour confirmer ce résultat nous avons reconduit ces expériences en présence d'agents chélateurs des ions Mg^{2+} (EDTA > ATP > EGTA) (Figure 57). L'ajout d'ATP augmente le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé d'environ 45%, 64% et 107% en présence respectivement de 6, 4 et 2 mM de magnésium. Les phosphates β et γ de l'ATP coordinent les ions Mg^{2+} avec une très forte affinité et diminuent la concentration en magnésium dans le milieu réactionnel. Plus la concentration en Mg^{2+} est faible, plus le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) est élevé. Les mêmes résultats ont été obtenus en présence d'EDTA et d'EGTA (Résultats non présentés), et en testant une gamme plus large de concentration magnésium (1 à 6 mM) en présence ou en absence d'ATP (Tableau 6). En tenant compte de la constante d'association de l'ATP pour le Mg^{2+} ($K_{ass}=10^{4,05} M^{-1}$), nous avons déterminé la concentration en Mg^{2+} disponible après chélation d'une partie des ions par l'ATP. De façon surprenante, la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) est maximale pour des concentrations en Mg^{2+} inférieure à 0,1 mM (Tableau 6). Lorsque la concentration en Mg^{2+} diminue et se situe aux alentours de 0,02 mM, la synthèse d'ADN est inhibée, comme le montre le résultat obtenu à 1 mM de magnésium en présence d'ATP. Ce résultat était prévisible puisque la RT est une enzyme Mg^{2+} dépendante. Les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant les RT résistantes à l'AZT (D67N, K70R, T215F et K219K), ou au 3TC (M184V) (Résultats non présentés), et la RT RNase H⁻ (E478Q). Quelle que soit la RT testée, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est inversement proportionnel à la concentration en Mg^{2+} et maximal pour une

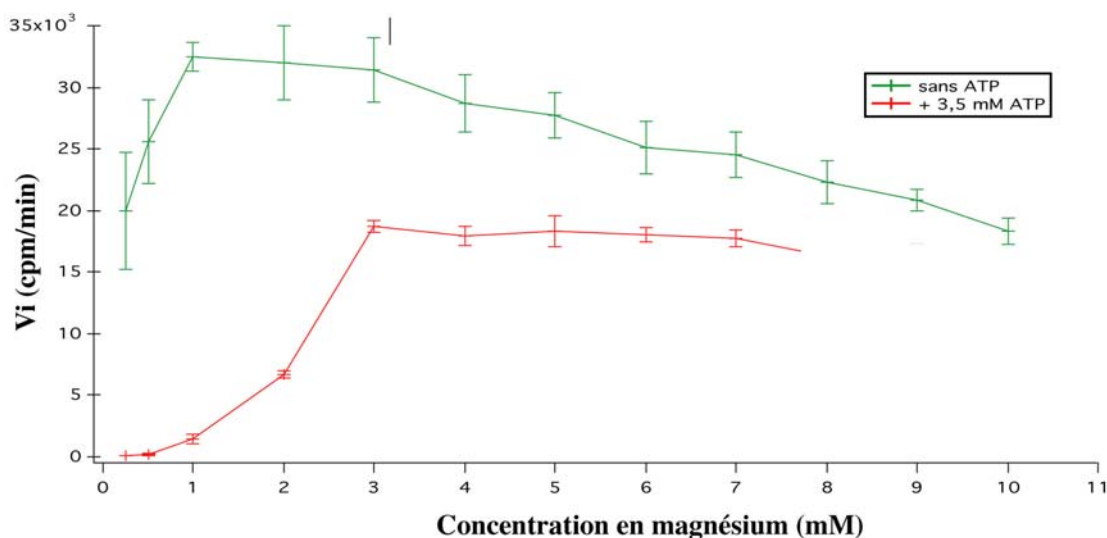


Figure 58 : Variation de la vitesse initiale d'incorporation de dTTP [^3H] dans des conditions michaeliennes en fonction de la concentration en Mg^{2+} .

Le poly(rA)/(dT)18 (500 nM) est incubé en présence de $1\mu\text{M}$ final en dTTP [^3H] (121 Ci/mmol). La réaction d'élongation de l'amorce est initiée par l'addition de 25 nM de RT sauvage. Des prélèvements du milieu réactionnel sont effectués toutes les minutes pendant 4 min et sont déposés sur une unité de filtration 96 puits, constituée d'une membrane en fibre de verre (Millipore), préalablement incubée 30 min à 4°C et contenant $100\mu\text{l}$ de TCA 5% froid dans chaque puit. Lorsque les dépôts sont effectués, la plaque est incubée 30 min à 4°C afin d'obtenir une précipitation homogène des complexes poly(rA)/(dT) n . La plaque est ensuite assemblée au système de filtration et les puits sont lavés deux fois avec $100\mu\text{l}$ de TCA 5% froid, afin d'éliminer le dTTP [^3H] non incorporé, puis rincés à l'éthanol absolu. Après séchage de la plaque, les membranes sont extraites, collectées individuellement et comptées dans 2 ml de liquide de scintillation (Ecoscint OTM). Cette expérience est répétée en modifiant la concentration en magnésium (de 0,5 à 10 mM), avec ou sans ATP (3,5 mM). Après quantification, le nombre de cpm est reporté en fonction du temps et les pentes des différentes droites représentent la vitesse initiale (V_i en cpm/min) de polymérisation dans des conditions michaeliennes. Ces V_i sont représentées en fonction de la concentration en magnésium. La courbe verte correspond aux variations de V_i sans ATP, et la courbe rouge en sa présence.

concentration très faible ($< 0,1$ mM).

De plus, la concentration en Mg^{2+} ne modifie pas la vitesse de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) mais influence uniquement la quantité de produit final synthétisé (Figure 57). En effet, nous observons une forte variation du plateau suivant les conditions testées. Cependant le temps nécessaire pour synthétiser 50% du taux d'ADN « Strong-Stop » (-) final est relativement proche (environ 200s) d'une expérience à l'autre. Ces résultats semblent indiquer que la concentration en Mg^{2+} influence d'avantage la stabilité de la structure secondaire de la matrice que l'activité polymérase de la RT. Il n'est pas à exclure que la concentration en Mg^{2+} puisse moduler l'activité RNase H de l'enzyme.

Il est à noter que la concentration en Mg^{2+} influence également la synthèse de produits de « self-priming » (Figure 59), qui correspondent à l'élongation de l'ADN « Strong-Stop » (-) par un phénomène d'auto-initiation de la RT à partir de la tige-boucle TAR, en 5' de l'ARNv. Deux produits de self-priming sont observés : des produits courts et longs. Plus la concentration en Mg^{2+} est basse, plus la synthèse de produits longs de « self-priming » est inhibée, favorisant la synthèse de produits courts.

1. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'activité polymérase

Le Mg^{2+} pourrait influencer l'activité polymérase en agissant sur la vitesse d'incorporation de nt ou sur la processivité de la RT.

a. Sur la vitesse d'incorporation de nt

Pour cette étude, nous nous sommes placés dans des conditions michaeliennes, en large excès de substrat par rapport à l'enzyme. En utilisant le poly(rA)/(dT)₁₈, le complexe A/M : RT peut être considéré comme l'enzyme [E] du formalisme michaelien, car son temps de demi-vie est très long (19 min). Le dTTP [³H] est considéré comme l'unique substrat. En reportant la vitesse initiale en fonction de la concentration en magnésium (Figure 58), nous pouvons constater que la vitesse d'incorporation de nt est maximale pour une concentration en Mg^{2+} de 1 mM et 0,3 mM respectivement en absence et en présence d'ATP. Ces résultats indiquent qu'il existe une compétition entre la RT et l'ATP pour la fixation du Mg^{2+} . De plus, une faible variation de la vitesse d'incorporation de nt est observée en augmentant la concentration en Mg^{2+} . En effet, en passant de 1 à 6 mM de magnésium, la vitesse d'incorporation de nt diminue de 25 % en absence d'ATP et quasiment pas en sa présence, tandis que le taux de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé diminue d'un facteur 2,

	[magnésium] (mM)	1	2	3	4	5	6
Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé (%)	-ATP	9,08	4,04	2,88	1,94	1,89	1,26
	+ATP (3,5 mM)	1,93	2,59	4,13	3,4	2,67	1,33
	[Mg²⁺] (mM) après ajout d'ATP	0,018	0,095	0,301	0,837	1,68	2,62

Tableau 7 : *Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé lors d'un cycle de polymérisation unique, en fonction de la concentration en Mg²⁺.*

Dix nM de complexe ODN/ARNv 1-311 MAL sont pré-incubés 1 min en présence de 25 nM de RT sauvage de HIV-1. La réaction est initiée par l'ajout de 50 µM de chaque dNTP et d'un piège en large excès (1,5 µM de poly(rA)/(dT)₁₈). Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (de 1 à 6 mM), en absence ou en présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%. Le taux d'ADN "Strong-Stop" (-) obtenu au bout de 60 min est quantifié et comparé d'une expérience à l'autre. Le taux de Mg²⁺ disponible après ajout d'ATP est calculé en tenant compte de la constante d'association de l'ATP pour le Mg²⁺ ($K_{\text{ass}}=10^{4,05} \text{ M}^{-1}$).

en absence ou en présence d'agent chélateur. Certes, le Mg^{2+} influence l'incorporation des nt, toutefois cet effet est très modeste et ne peut expliquer à lui seul les variations de taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé.

b. Sur la processivité

Deux types de polymérisation, distributive et processive, ont été caractérisés. Lorsque la polymérisation est distributive, la dissociation du complexe amorce/matrice : enzyme (correspondant au k_{off}) est plus rapide que l'incorporation d'un nt (traduit par k_{pol}). A l'inverse, lorsqu'une polymérisation est processive, l'enzyme incorpore un grand nombre de nt avant de se dissocier du complexe amorce/matrice. La processivité dépend du rapport k_{pol}/k_{off} . Plus la valeur du k_{pol} est supérieure au k_{off} , plus l'enzyme est processive.

L'utilisation d'un complexe ODN/ARNv 1-311 permet de démarrer la polymérisation en phase d'élongation. La réaction d'élongation est effectuée en condition de cycle catalytique unique en présence d'un excès de poly(rA)/(dT)₁₈ qui piège la RT libre et empêche sa refixation sur un autre complexe binaire. Dans ces conditions, nous pouvons étudier l'influence de la concentration en Mg^{2+} sur la processivité de l'enzyme. En présence ou en absence d'ATP, la processivité de la RT est inversement proportionnelle à la concentration en Mg^{2+} et est maximale pour une concentration en Mg^{2+} proche de 0,3 mM. A forte concentration en Mg^{2+} , la processivité chute puisque le complexe A/M : RT se dissocie plus facilement. La diminution de processivité à très faible concentration en Mg^{2+} (en présence d'ATP) est probablement due à l'inhibition de l'activité catalytique de la RT.

Ces données indiquent que l'activité polymérase de la RT est Mg^{2+} dépendante et, de façon étonnante, maximale à très basse concentration en Mg^{2+} . L'incorporation de nt est optimale aux environs de 1 mM de Mg^{2+} tandis que la processivité est maximale aux environs de 0,3 mM de Mg^{2+} . Ces résultats sont étonnants, car la littérature indique une activité maximale de synthèse d'ADN de la RT aux alentours de 6 mM en Mg^{2+} , en présence de poly(rA)/(dT)₁₈ comme substrat (78). La nature des substrats pourrait expliquer ces différences.

2. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'activité RNase H polymérase dépendante

Pour déterminer l'origine des bandes observées sur les gels de cinétique en présence de la RT sauvage une étude cinétique de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) avec la RT RNase H⁻ a été entreprise (Figure 59). Quelques pauses sont observées avec la RT RNase H⁻ à 2 mM de

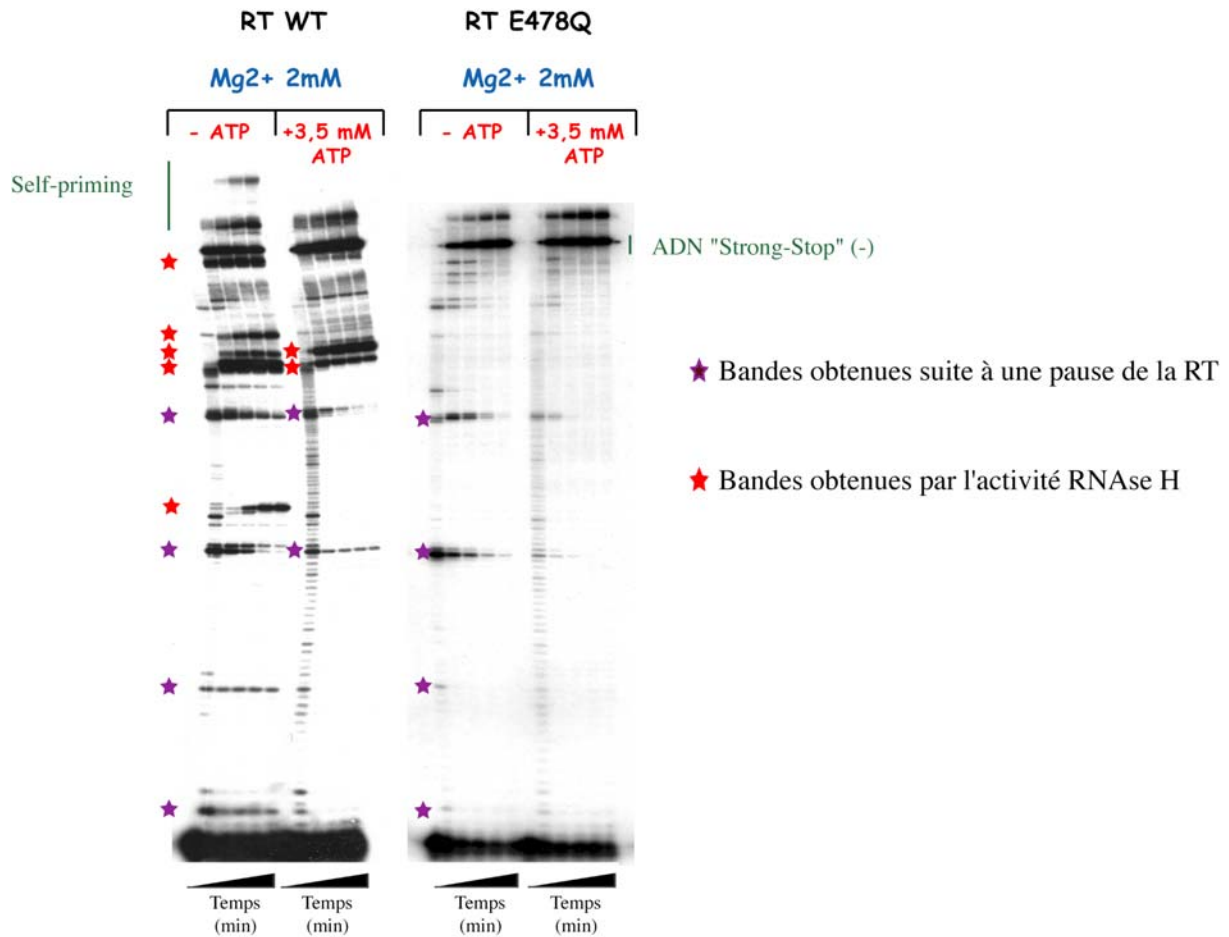


Figure 59 : Comparaison des cinétiques de synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-) en présence des RT sauvage et RNase H (E478Q).

Dix nM de complexe ODN/ARNv1-311 MAL sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP. La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage ou RNase H^r de HIV-1. Le milieu réactionnel contient 2 mM de magnésium, en absence ou en présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%.

magnésium et disparaissent en présence d'ATP. Ces pauses sont attribuées à la structure

de la matrice. En effet, une faible concentration en Mg^{2+} peut déstabiliser la structure secondaire de la matrice ARN, diminuant les pauses de l'enzyme au cours de la polymérisation. Il est important de noter qu'aucune bande n'apparaît et ne persiste au cours de la polymérisation en présence de la RT RNase H⁻. De plus, le taux de produit final synthétisé varie peu en fonction de la concentration en Mg^{2+} . En effet, il est de 46 et 49 % en présence de 2 mM de magnésium sans ou avec ATP. Ces faibles variations sont liées à l'effet de la concentration en Mg^{2+} sur la structure secondaire de la matrice.

En présence de la RT sauvage, les pauses qui apparaissent rapidement et disparaissent à faible concentration en Mg^{2+} sont attribuées à la structure de la matrice, tandis que les pauses qui apparaissent tardivement et qui persistent sont induites par l'activité RNase H de la RT. L'augmentation du taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé (Tableau 6) à 2 mM de magnésium en présence d'ATP s'explique principalement par la diminution ou disparition des coupures générées par l'activité RNase H (exception faite pour une coupure qui apparaît dans ces conditions). La disparition des pauses liées à la structure de la matrice augmente la synthèse, mais de façon moindre.

L'activité RNase H est dépendante du Mg^{2+} puisqu'elle requiert deux ions Mg^{2+} dans son site catalytique pour cliver l'ARN dans un duplex ARN/ADN. Dans nos conditions, l'activité RNase H croît avec la concentration en Mg^{2+} (Gels non présentés) et est minimale à faible concentration (<0,1 mM Mg^{2+}). Ces résultats corroborent ceux obtenus en présence de poly(dC)/poly(rG) comme substrat, concluant à une activité RNase H maximale pour une gamme de concentration en magnésium allant de 4 à 12 mM (326).

En conclusion, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est inversement proportionnel à la concentration en Mg^{2+} , et maximal pour une concentration en Mg^{2+} inférieure à 0,1 mM. Ces résultats surprenants s'expliquent principalement par une diminution de l'activité RNase H à faible concentration en Mg^{2+} , liée à une déstabilisation de la structure secondaire de la matrice ARN, et à une meilleure activité polymérase. L'effet du Mg^{2+} sur l'activité polymérase se fait au niveau de la processivité ainsi qu'au niveau de la vitesse d'incorporation de nt. Cependant l'influence du Mg^{2+} sur l'activité polymérase est moins marquée que sur l'activité RNase H.

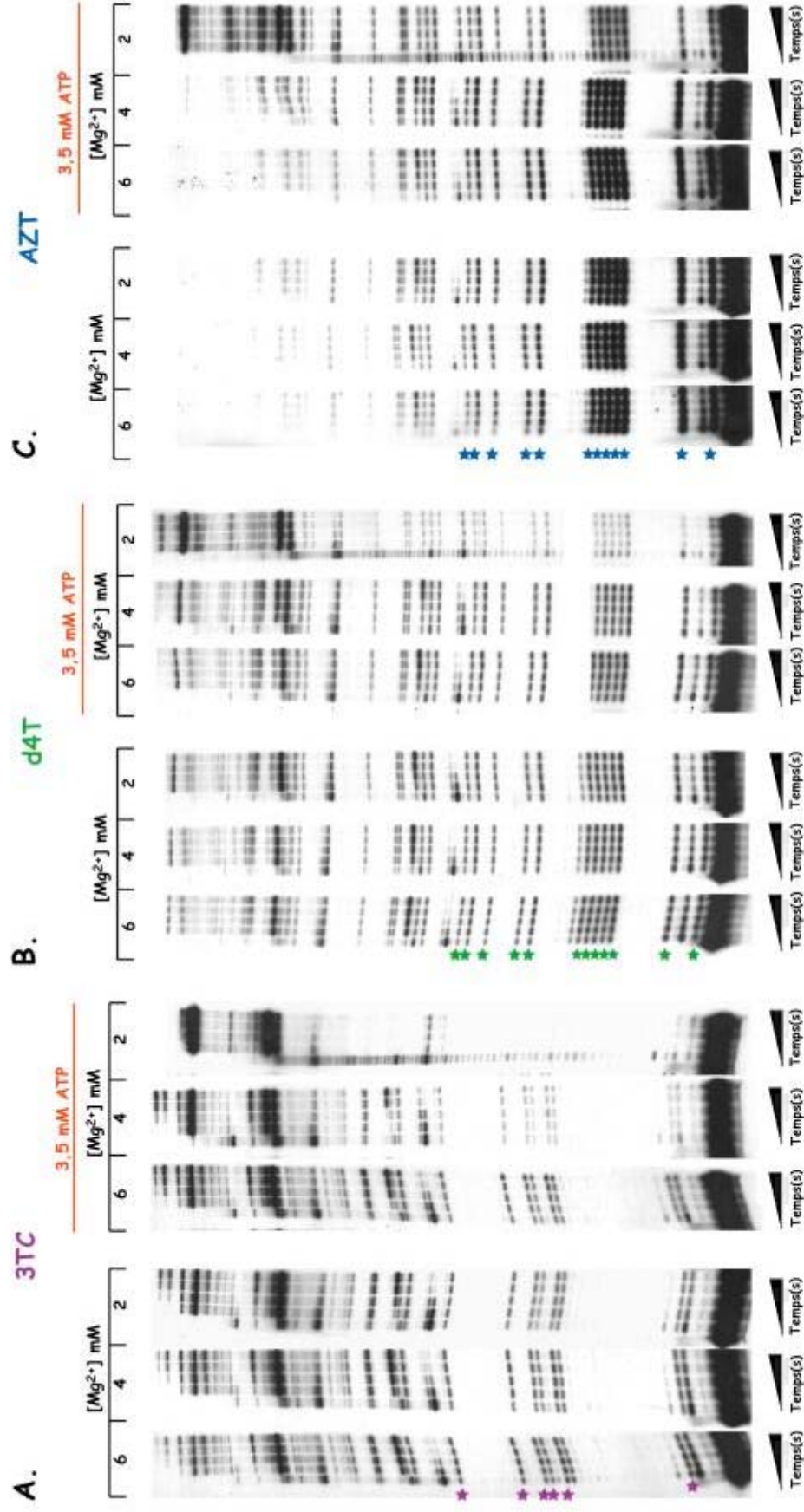


Figure 60 : Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'incorporation de NRTI lors de synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-).

Dix nM de complexe ODN/ARNv1-311 MAL, sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP et de 5 μ M de 3TC (A), de d4T (B) ou d'AZT (C). La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage de HIV-1. Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (2, 4 et 6 mM), en absence ou présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevés en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposés sur un gel de polyacrylamide 15%. Certains sites d'incorporation de NRTI sont indiqués par des étoiles.

B. Influence de la concentration en Mg^{2+} sur l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence de différents NRTI

Nous avons voulu savoir si la concentration en Mg^{2+} pouvait moduler l'efficacité d'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) par différents NRTI. Les NRTI triphosphorylés, compétiteurs des dNTP, vont se fixer dans le site actif de la polymérase. L'absence de 3'-hydroxyle sur le ribose empêche la formation de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant et conduit à un arrêt de synthèse d'ADN. Pour une concentration en magnésium de 6 mM, l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) est très efficace (Tableau 8), exception faite pour le 3TC qui s'incorpore moins bien. L'inhibition de la synthèse d'ADN par un terminateur de chaîne est dépendante de la concentration en Mg^{2+} . Plus la concentration en Mg^{2+} diminue, plus l'inhibition est inefficace. Cet effet est amplifié en présence d'agents chélateurs du Mg^{2+} comme l'ATP, qui rétablit un taux d'ADN « Strong-Stop » (-) non négligeable. Par exemple, lorsque la concentration en magnésium varie de 6 mM à 2 mM en présence d'ATP, l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) par le ddC et le ddA passe respectivement de 91% à 30,7% et de 89,2% à 15,5%. Sur les gels de cinétique de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-), l'intensité des bandes correspondant à des sites d'incorporation de NRTI diminue lorsque la concentration en Mg^{2+} baisse, mais ne varie pas en fonction du temps. L'inhibition est levée, non pas par un mécanisme d'excision, mais par un mécanisme de discrimination Mg^{2+} dépendant. A faible concentration en Mg^{2+} , la RT aurait une préférence accrue pour les dNTP naturels par rapport aux NRTI. Cependant cette discrimination serait également dépendante de la nature du NRTI utilisé. Contrairement à la discrimination drastique des ddA, ddC et 3TC à faible concentration en Mg^{2+} , le d4T et l'AZT sont incorporés à un taux non négligeable. L'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) reste élevée, au alentour de 60%. Les résultats obtenus avec l'AZT peuvent s'expliquer par son fort taux d'incorporation par rapport aux autres NRTI.

Les ions Mg^{2+} pourraient-ils avoir une meilleure affinité pour les dNTP par rapport aux NRTI ? Les modifications structurales pour l'élaboration de NRTI, comme la conformation du sucre, la présence d'un soufre, d'un groupement azido... pourraient diminuer l'affinité du Mg^{2+} pour le NRTI. Si tel est le cas, moins de complexe NRTI/ Mg^{2+} serait formé, fixé dans le site catalytique de la RT et par conséquent incorporé lors de la rétrotranscription. Cependant, la discrimination concerne également le ddA et le ddC, ou l'absence d'un hydroxyle en 3' du ribose est la seule modification par rapport aux dNTP. Puisque le Mg^{2+} se fixant aux dNTP

Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé en présence ou en absence de NRTI % d'inhibition du au terminateur de chaîne				
	6 mM Mg ²⁺	6 mM Mg ²⁺ +3,5 mM ATP	2 mM Mg ²⁺	2 mM Mg ²⁺ +3,5 mM ATP
dNTP	11,71	16,64	16,58	34,13
dNTP +ddC	1,06 91%	1,09 93,5%	2,57 84,5%	23,65 30,7%
dNTP +ddA	1,26 89,2%	3,75 77,5%	3,48 79%	28,84 15,5%
dNTP +d4T	1,75 85%	2,76 83,4%	3,16 80,9%	20,64 60,5%
dNTP +3TC	5,4 53,8%	10,1 39,3%	8,86 46,6%	26,5 22,3%
dNTP +AZT	0,05 99,6%	0,11 99,3%	0,31 98,1%	12,51 63,3%

Tableau 8 : *Influence de la concentration en Mg²⁺ sur l'inhibition de la synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-) en absence ou en présence de NRTI.*

Dix nM de complexe ODN/ARNv1-311 MAL sont incubés en présence de 50 µM de chaque dNTP et de 5 µM de différents NRTI (AZT, d4T, ddC, ddA, 3TC). La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage de HIV-1. Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (2 et 6 mM), en absence ou présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 1, 5, 10, 30 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%. Le % d'ADN "Strong-Stop" (-) en présence de NRTI est quantifié et comparé au taux obtenu en absence d'inhibiteur.

n'interagit pas avec l'hydroxyle en 3', l'hypothèse d'une modification d'affinité entre le Mg²⁺

et les NRTI est peu probable.

A faible concentration en Mg^{2+} , l'absence d'hydroxyle en 3' du nt entrant pourrait être un facteur négatif et contribuer à sa discrimination. Rappelons que dans le site catalytique, un ion Mg^{2+} interagit avec trois aspartates, l'oxygène du phosphate α du dNTP entrant et l'extrémité 3'OH de l'amorce. Ce Mg^{2+} doit être présent dans le site actif puisqu'il est requis pour activer le groupement hydroxyle de l'amorce et permettre l'attaque nucléophile du dNTP entrant. Le deuxième ion Mg^{2+} est coordonné par deux aspartates, le résidu 111 et les oxygènes présents sur le groupements phosphates du dNTP entrant. De plus, des AA présent dans le site actif stabilisent le positionnement du dNTP pour permettre une attaque nucléophile efficace. En effet, les résidus Asp113, Ala114 et Tyr115 interagissent avec l'hydroxyle en 3' du dNTP et les résidus Lys65 et Arg72 stabilisent les groupements phosphates du dNTP entrant. Nous pouvons supposer qu'à faible concentration en Mg^{2+} , les dNTP et les NRTI se fixent dans le site actif de la RT sans interaction avec un ion Mg^{2+} . La présence du groupement hydroxyle en 3' des dNTP leur permettrait de s'orienter correctement dans le site actif pour la réaction catalytique. L'absence de ce groupement conduirait à un positionnement incorrect des NRTI dans le site catalytique diminuant leur incorporation.

L'effet de la concentration en Mg^{2+} sur la discrimination est plus modéré en présence d'AZT comme terminateur de chaîne. Bien que le mécanisme de résistance à l'AZT se fasse *via* un mécanisme d'excision, nous avons voulu déterminer l'effet de la concentration en Mg^{2+} sur la discrimination et l'excision de l'analogue en présence des RT sauvage et résistante, provenant du laboratoire de M. A. Parniak, au cours de la synthèse d'ADN « Strong-Stop »(-).

Comme observé précédemment, la concentration en Mg^{2+} module la discrimination de l'AZT avec la RT sauvage. En effet, le taux de produit final synthétisé est de 3,24% et 9,46% pour des concentrations en magnésium de 6 mM et 2 mM, en présence d'ATP. Puisque la RT sauvage ne répare pas une amorce terminée par de l'AZT par ATP-lyse, l'augmentation de synthèse provient uniquement d'un mécanisme de discrimination. En effet, il existe une bonne corrélation entre la diminution de l'intensité des bandes correspondant aux sites de fixation d'AZTTP et la concentration en Mg^{2+} . Avec la RT résistante, le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est plus élevé. Il est de 6,37% et 18,87%, respectivement pour des concentrations en magnésium de 6 mM et 2 mM, en présence d'ATP. Dans ce cas, la

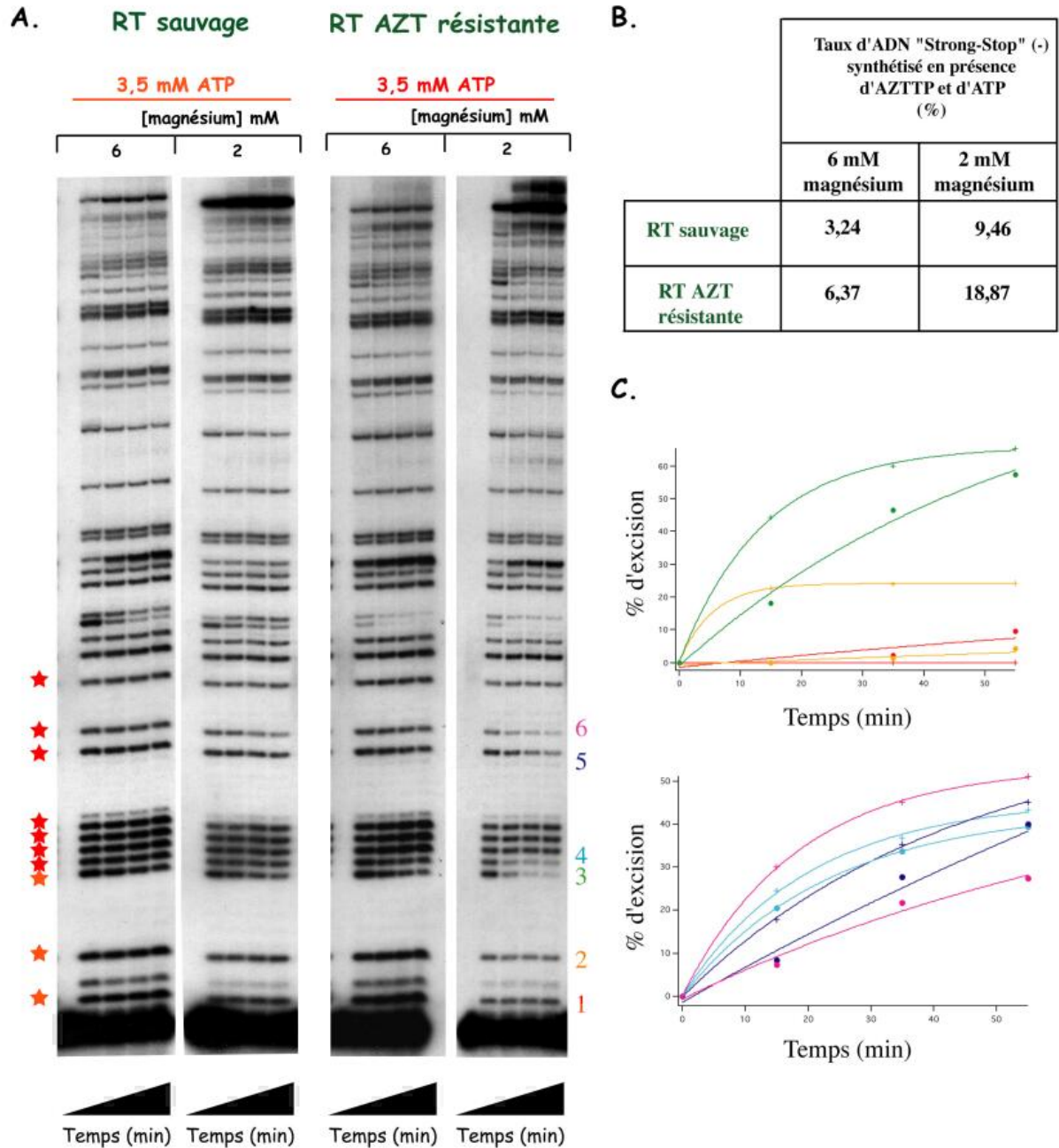


Figure 61 : Influence du Mg^{2+} sur l'inhibition de synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-) en présence d'AZTTP.

A. Dix nM de complexe ODN/ARNv1-311 MAL sont incubés en présence de 50 μ M de chaque dNTP et de 5 μ M d'AZT. La réaction est initiée par l'ajout de 25 nM de RT sauvage ou AZT résistante. Les expériences sont répétées en variant la concentration en magnésium (2 et 6 mM), en présence d'ATP (3,5 mM). Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps : 5, 20, 40 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15%. Certains sites d'incorporation d'AZTTP sont indiqués par des étoiles ; B. Taux d'ADN "Strong-Stop" (-) synthétisé en fonction de la concentration en magnésium. Ces résultats ont été obtenus après quantification des gels présentés en (A) ; C. Certains sites d'incorporation d'AZTTP en présence de la RT résistante ont été quantifiés. Le % d'excision d'AZTTP avec la RT résistante a été réporté en fonction du temps. La couleur des courbes correspond à un site particulier d'excision indiqué sur en (A). Les croix et les ronds correspondent aux courbes d'excision respectivement à 2 et 6 mM de magnésium.

concentration en Mg^{2+} influencerait la discrimination du NRTI et la réparation par ATP-lyse.

Des résultats préliminaires indiquent que l'efficacité de réparation par ATP-lyse dépend également de la concentration en Mg^{2+} . Dans un premier temps, la quantification de certaines bandes, correspondant à des sites d'incorporation d'AZT suggère une meilleure excision de l'AZTMP par ATP-lyse à faible concentration en Mg^{2+} (Figure 61C). Cependant, cet effet varie d'un site d'incorporation à l'autre. De plus, au niveau du premier site d'incorporation d'AZTTP, l'effet est inversé (Figure 62). En effet, un plus fort taux d'excision par ATP-lyse a lieu à 6 mM en magnésium (Figures 61C et 62).

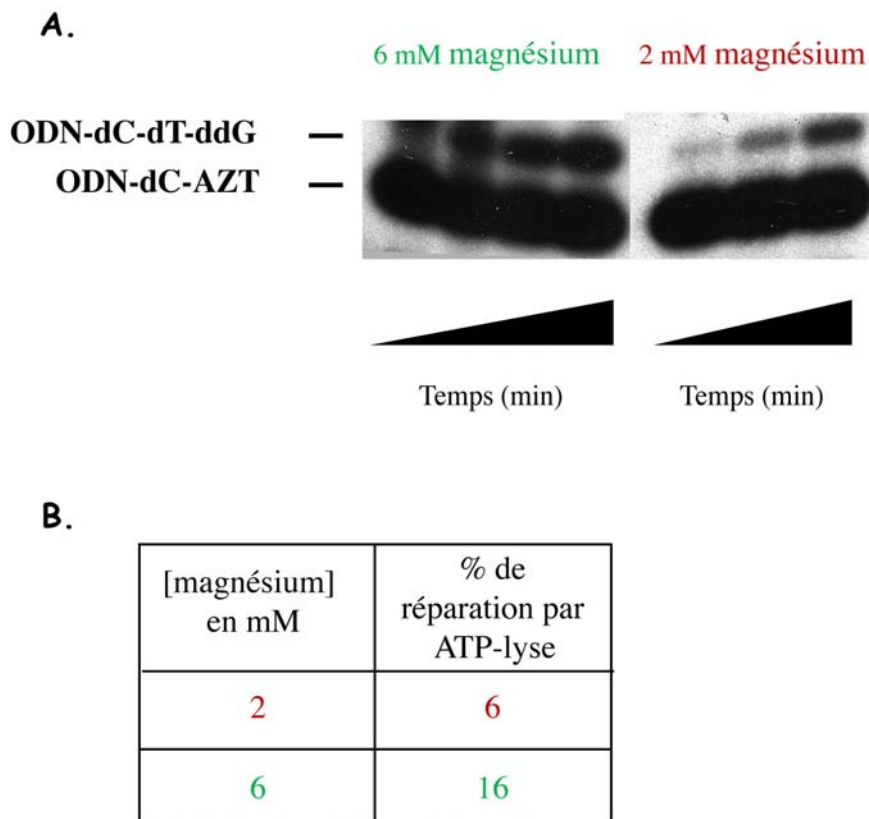


Figure 62 : Cinétiques de réparation d'un ODN-dC-AZT par ATP-lyse en fonction de la concentration en Mg^{2+} .

A. Afin de synthétiser une amorce terminée par un AZT, 10 nM de complexe ODN/ARNv 1-311 sont incubés en présence de 25 nM de RT, 50 μ M de dCTP et 5 μ M d'AZTTP, pendant 5 min à 37°C. La réaction de réparation est initiée par l'addition de 3,5 mM d'ATP, 50 μ M de dTTP et de ddGTP, afin d'arrêter la réaction en +3. Des aliquotes sont prélevées aux temps 5, 20 et 60 min et déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15% ; B. Taux de réparation d'une amorce terminée par de l'AZT par ATP-lyse en fonction de la concentration en magnésium.

Cette étude dévoile les rôles multiples de la concentration en Mg^{2+} .

* L'activité polymérase de la RT de HIV-1 est inversement proportionnelle à la

concentration en Mg^{2+} . La concentration en Mg^{2+} peut influencer l'incorporation de nt et la processivité de l'enzyme. La déstabilisation du complexe A/M : RT à forte concentration en Mg^{2+} conduit à une diminution de la processivité de la RT.

* L'activité RNase H croît avec la concentration en Mg^{2+} . Cet effet est observé en comparant le profil des bandes obtenues lors des cinétiques de synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) en présence des RT sauvage et RNase H.

* La structure secondaire de la matrice ARN est déstabilisée à faible concentration en Mg^{2+} , diminuant les pauses de l'enzyme au cours de la polymérisation.

* De façon surprenante, la concentration en Mg^{2+} augmente la résistance innée de la RT sauvage aux NRTI. En effet, plus la concentration en Mg^{2+} est faible, moins l'inhibition de la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-) est marquée. A basse concentration en Mg^{2+} , la présence de l'hydroxyle en 3' du dNTP entrant pourrait jouer un rôle crucial pour permettre un positionnement correct du dNTP dans le site actif de la RT et son incorporation. L'absence de ce groupement conduirait à un mauvais placement du NRTI qui empêcherait son incorporation dans l'ADN en cours de synthèse.

* La concentration en Mg^{2+} influencerait également la réparation d'une amorce terminée par de l'AZTMP par ATP-lyse. Cependant, l'effet observé ne suit pas une règle prédéfinie et dépend du site d'incorporation de l'AZT.

La concentration en Mg^{2+} couramment utilisée dans la littérature pour étudier les activités polymérase et RNase H de la RT de HIV-1 est de 6 mM. Cependant il semblerait que la concentration intracellulaire de Mg^{2+} libre soit certainement inférieure à 6 mM puisqu'une partie du pool de Mg^{2+} lie l'ARN, l'ADN, les NTP et les dNTP. Puisque la concentration en Mg^{2+} influence les activités catalytiques de la RT et la structure de la matrice, il serait préférable de tester l'activité de l'enzyme, l'implication de certaines mutations, l'incorporation d'inhibiteur... à différentes concentrations de Mg^{2+} .

Ce travail permet de comprendre les résultats inattendus de récupération obtenus lors de l'étude sur les mécanismes d'excision de l'AZTMP (Chapitre II). Le fort taux de récupération observé en présence de PPi et d'ATP avec la RT sauvage (70,7%) serait dû, non pas à un effet coopératif, mais à un effet cumulatif de la chélation du Mg^{2+} par l'ATP, (entraînant une augmentation de l'activité polymérase, une diminution de l'activité RNase H et une discrimination de l'AZTTP), et d'une excision efficace par PP-lyse. Avec la RT résistante, la

récupération est du même ordre de grandeur (70,8%), suggérant que la PP-lyse est le mécanisme prédominant de réparation d'une amorce terminée par de l'AZTMP. Le rôle des mutations de résistance ne peut s'expliquer qu'en supposant que la PP-lyse n'existe pas ou à un taux très faible *in vivo*.

Conclusions et perspectives

I. Versatilité du complexe d'initiation

Dans le modèle de structure secondaire du domaine PBS de l'isolat MAL, qui dérive du sous-type A, un ensemble complexe de réarrangements intra et intermoléculaire en dehors de l'interaction canonique entre les 18 nt 3'-terminaux de l'ARNt₃^{Lys} et le PBS de l'ARNv s'opère. Le complexe binaire A/M est organisé autour d'un cœur très structuré formé d'une jonction tétrahélicoidale (Figure 24). L'utilisation d'une amorce naturelle, possédant des modifications post-transcriptionnelles est nécessaire pour stabiliser l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}. Cette interaction joue un rôle essentiel tant d'un point de vue structurale que fonctionnel. En effet, elle intervient dans le processus de rétrotranscription en favorisant une transition efficace du complexe d'initiation vers le complexe d'élongation. Dans un premier temps, nous avons identifié les éléments structuraux du complexe d'initiation de l'isolat MAL de HIV-1 important pour l'initiation de la rétrotranscription. Nous avons montré que la perturbation des interactions intermoléculaires du complexe d'initiation, qui ne sont pas reconnues directement par la RT, affecte plus fortement la rétrotranscription que la délétion ou la déstabilisation d'une interaction intramoléculaire reconnue directement par la RT. En effet, la déstabilisation des hélices intermoléculaires (hélices 6C, 5D et 3E) diminue dramatiquement l'affinité de la RT pour le complexe A/M mais aussi la synthèse d'ADN « Strong-Stop » (-). Ces hélices semblent jouer un rôle fondamental en évitant des heurts stériques entre l'ARNv et la RT mais également en permettant une orientation correcte des différents éléments structuraux reconnus par la RT. De plus, la longueur de la jonction en amont du PBS et deux hélices intramoléculaires (hélices 1 et 2) jouent un rôle crucial pour la fixation de la RT au complexe A/M et pour l'extension de l'ARNt₃^{Lys}. Ces résultats montrent le rôle essentiel de la structure tridimensionnelle globale dans le processus d'initiation.

Nous avons ensuite entrepris une étude structurale et fonctionnelle comparative de deux isolats, MAL et Hxb2/NL4-3, dont les domaines PBS appartiennent respectivement aux sous types A et B. Les deux isolats présentent une forte homologie de séquence. Toutefois, ils diffèrent par de nombreuses mutations ponctuelles autour du PBS et une insertion de 23 nucléotides en 3' de celui-ci dans l'isolat MAL. Cette étude a tout d'abord permis d'écarter l'interaction intermoléculaire entre l'ARNt₃^{Lys} et l'ARNv de sous type B, appelée PAS/Anti-PAS, proposée par le groupe de B. Berkhout. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'une telle interaction ait lieu de façon transitoire, sans pour autant avoir un rôle fonctionnel dans l'efficacité d'initiation de la rétrotranscription.

De plus, ces recherches ont montré la versatilité du système HIV-1, puisque les

interactions intermoléculaires entre l'ARNv et l'ARNt₃^{Lys} diffèrent suivant les isolats. Pour confirmer ces résultats, nous avons entrepris la première étude structurale *in situ* de l'ARN génomique des deux isolats au sein des cellules infectées et des particules virales. Contrairement à la situation observée avec l'isolat MAL, l'interaction entre le PBS de l'ARNv de l'isolat Hxb2/NL4-3 et les 18 nucléotides 3'-terminaux de l'ARNt₃^{Lys} est suffisante pour initier la rétrotranscription, en absence de tout remaniement conformationnel. En particulier, l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}, cruciale dans le cas de l'isolat MAL, n'est pas requise pour une initiation efficace de la rétrotranscription. Ces différences s'expliquent par les différentes structures adoptées par les ARN viraux avant l'hybridation à l'ARNt₃^{Lys}. Nous avons montré qu'au sein du complexe d'initiation de l'isolat MAL, plusieurs éléments structuraux jouent un rôle important et sont directement reconnus par la RT. Aucun de ces éléments structuraux n'est présent dans l'ARNv de l'isolat MAL avant hybridation de l'amorce. Cependant, ces éléments préexistent dans l'ARNv de l'isolat Hxb2/NL4-3 avant la fixation de l'ARNt₃^{Lys}. Nous supposons que l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv de l'isolat MAL et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} est indispensable pour contrer les effets négatifs de l'ARNv et conduire à un réarrangement structural permettant de former tous les éléments structuraux reconnus par la RT et initier efficacement la rétrotranscription. Comme ces éléments préexistent dans l'ARNv de l'isolat Hxb2/NL4-3 avant l'hybridation de l'amorce, l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} n'est pas requise et aucun réarrangement conformationnel n'a lieu au sein de l'ARNv. Une analyse de séquences révèle qu'environ 15% des isolats de HIV-1, essentiellement des isolats d'Afrique et d'Asie, possèdent une insertion en 3' du PBS et une structure similaire à celle obtenue pour l'ARNv de l'isolat MAL. Ces isolats ont vraisemblablement recours aux changements conformationnels médiés par l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} pour initier correctement la rétrotranscription.

Un autre élément en faveur de l'absence d'interaction entre la boucle des A de l'ARNv de l'isolat Hxb2/NL4-3 et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} est qu'en présence d'une amorce synthétique (l'ARNt₃^{Lys} transcrit *in vitro*, ORN₃^{Lys}), ou un mutant de la boucle des A (ARN Lys-AC ou Lys-AC-GAC) l'initiation de la rétrotranscription est peu affectée. De plus, l'absence d'interaction entre la boucle des A et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} n'affecte pas la transition du complexe d'initiation vers le complexe d'élongation.

Ces résultats semblent contradictoires avec ceux obtenus lors de notre étude sur les virus Hxb2 mutants, obtenus par C. Morrow, capables de se répliquer en utilisant une amorce non

naturelle, l'ARNt^{His}. Ce groupe a montré que l'isolat Hxb2 peut utiliser cette amorce seulement si le PBS et la séquence impliquée dans l'interaction avec l'anticodon sont mutés simultanément pour être complémentaires de cet ARNt. La mutation du PBS seul conduit à une réversion qui restaure la complémentarité avec l'ARNt₃^{Lys}. Notre étude fonctionnelle réalisée à partir de chacun de ces mutants a permis de corréler le maintien de l'ARNt^{His} en culture cellulaire à l'initiation de la rétrotranscription. De plus, il existe une bonne corrélation entre l'initiation de la rétrotranscription et la stabilité de l'interaction intermoléculaire entre la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{His} et la région complémentaire de l'ARNv. Cette interaction est renforcée par l'apparition de mutations additionnelles stabilisant le virus en culture cellulaire. Ces études menées sur l'isolat Hxb2 confirment donc l'importance de l'interaction entre l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}. Cependant, ces mutants ne reflètent pas le comportement du virus sauvage. En effet, l'utilisation d'une amorce synthétique ne permettant aucune interaction intermoléculaire d'avoir lieu en dehors du PBS (ORN^{His}) initie efficacement la rétrotranscription, suggérant que l'interaction canonique de 18 nt entre le PBS et l'extrémité 3' de l'ARNt^{His} est suffisante. Le système utilisant un ARNt non conventionnel apporte une information biaisée. En effet, dans ce cas précis, la structure adoptée par l'ARNt^{His} après son hybridation à l'ARNv devient un facteur négatif, contré par l'apparition d'une interaction stable entre l'anticodon de l'amorce non conventionnelle et l'ARNv.

Pour compléter cette étude, nous avons construit deux clones moléculaires infectieux des isolats MAL et NL4-3 mutés dans la boucle des A. Ces deux constructions permettront de tester l'importance de l'interaction intermoléculaire entre la boucle des A de l'ARNv et l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} *in vivo*. Pour cela nous suivrons et comparerons la répllication des virus MAL et Hxb2 sauvage ou muté dans la boucle des A dans des cellules de lignées lymphoïdes. Il serait également intéressant de suivre l'étape de rétrotranscription dans les cellules infectées et dans les particules virales, des différents clones moléculaires infectieux.

Il serait intéressant de construire un modèle tridimensionnel du complexe ARNv Hxb2/ARNt₃^{Lys} par modélisation graphique afin de déterminer comment se positionnent les différents éléments structuraux du complexe binaire Hxb2 et de vérifier si la RT se fixe tout aussi bien sur ce complexe que sur le complexe binaire de l'isolat MAL. De plus, un programme de cristallogénèse est en cours dans notre laboratoire afin de comprendre la structure fine des complexes d'initiation de la rétrotranscription.

II. Rôles de l'ATP-lyse dans le mécanisme de réparation d'une amorce terminée par de l'AZT

Il a été montré que la résistance à l'AZT s'effectue non pas par un mécanisme de discrimination mais *via* une étape d'enlèvement de l'AZTMP impliquant la réaction inverse de la polymérisation : la pyrophosphorolyse.

La pyrophosphorolyse médiée par le PPi est une réaction très lente (160 fois) par rapport à la polymérisation (286). De plus, la constante de fixation du PPi est 500 fois plus élevée que celle de dTTP. De ce fait, dans des conditions normales, la pyrophosphorolyse doit être une réaction négligeable *in vivo*. Toutefois, cette réaction peut avoir lieu lorsqu'une amorce est terminée par de l'AZTMP, bloquant la polymérisation. La RT sauvage présente ainsi une résistance innée à l'AZT qui diminue l'effet inhibiteur de l'AZT. L'acquisition de mutations de résistance n'améliore pas la réparation par PP-lyse (K_d et k_{pyro} du PPi sont similaires pour les deux RT), mais permet un enlèvement efficace de l'AZTMP en présence d'ATP (237), (238), (285) (Tableau 5). Le mécanisme de résistance semble reposer sur l'utilisation préférentielle de l'ATP comme donneur de pyrophosphate. Puisque les RT sauvage et résistance fixent l'ATP avec la même affinité, les mutations de résistance doivent repositionner l'ATP dans le site actif ou replacer correctement le complexe P/T à l'intérieur du site catalytique de la RT. Ce repositionnement peut faciliter l'attaque de la liaison phosphate entre les deux derniers nucléotides de l'amorce par l'ATP.

Le rôle de la PP-lyse *in vivo* reste à définir puisqu'aux concentrations intracellulaires en PPi (150 μ M) et ATP (3,5 mM) la RT sauvage présente une résistance innée par PP-lyse, dont la vitesse d'enlèvement est trois fois supérieure à celle obtenue par ATP-lyse en présence de la RT résistante. Comme les mutations de résistance sont sélectionnées pour conférer un avantage répliatif aux virus, il est logique de penser que la PP-lyse n'est pas le mécanisme préférentiel de résistance à l'AZT *in vivo*. Nous pouvons supposer que la concentration en PPi varie considérablement d'un compartiment cellulaire à l'autre. Elle pourrait être élevée dans le noyau puisque le PPi est produit au cours des étapes de transcription ou répliation et faible dans le cytoplasme. De ce fait aucune résistance innée à l'AZT ne serait observée et les mutations de résistance auraient une importance capitale pour la survie du virus.

III. Rôles multiples de la concentration en Mg^{2+}

Pour étudier les activités polymérase, RNase H et les mécanismes de résistance de la RT de HIV-1 une concentration en magnésium de 6 mM, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques, est généralement utilisée. Cependant, puisqu'une partie du pool de magnésium lie l'ARN, l'ADN, les NTP et les dNTP, la concentration intracellulaire de magnésium libre doit certainement être inférieure à 6 mM. Ainsi, la concentration en magnésium libre mesurée dans les muscles striés est d'environ 0,9 mM et d'environ 0,2 mM dans le cerveau.

En étudiant l'influence de la concentration en magnésium sur la synthèse d'ADN «Strong-Stop» (-), nous avons noté une corrélation entre la quantité d'ions magnésium libre et le taux de produit final formé. Plus la concentration en magnésium libre est faible, plus le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est élevé. La concentration en magnésium libre influencerait fortement l'activité RNase H de la RT de HIV-1, son activité polymérase, en agissant sur l'incorporation de nt et la processivité de l'enzyme, et la stabilité de la matrice ARN.

A la suite d'un traitement antirétroviral comprenant des NRTI, des virus résistants apparaissent. Cette résistance est associée à l'apparition de mutations dans la RT de HIV-1. Deux mécanismes différents de résistance aux NRTI ont été proposés. Les mutations de résistance conduisent soit à une discrimination de l'analogue de nucléotide par une diminution de l'affinité de la RT pour le NRTI ou en diminuant sa vitesse de catalyse, soit à une excision de l'analogue incorporé par PP-lyse ou ATP-lyse. De façon surprenante, la concentration en magnésium libre augmente la résistance innée de la RT sauvage à différents NRTI. En effet, plus la concentration en magnésium libre est faible, plus le taux d'ADN « Strong-Stop » (-) synthétisé est élevé en présence de NRTI. Cette augmentation de synthèse est corrélée à une diminution du taux de NRTI incorporé au cours de la rétrotranscription par un mécanisme de discrimination magnésium dépendant. A faible concentration en magnésium, la RT aurait une préférence accrue pour les dNTP naturels par rapport aux NRTI. A basse concentration en magnésium, la présence de l'hydroxyle en 3' du dNTP entrant pourrait jouer un rôle crucial pour permettre un positionnement correct du dNTP dans le site actif de la RT et son incorporation. L'absence de ce groupement conduirait à un mauvais placement du NRTI qui empêcherait son incorporation dans l'ADN en cours de synthèse. De plus des résultats

préliminaires indiquent que la concentration en magnésium pourrait également influencer la réparation d'une amorce terminée par de l'AZTMP par ATP-lyse. En conclusion, la concentration en magnésium pourrait augmenter la résistance innée de la RT de HIV-1 aux NRTI en influençant les deux mécanismes de résistance : la discrimination et l'excision.

Dans un premier temps, nous vérifierons de façon plus précise l'influence de la concentration en magnésium libre sur la réparation par ATP-lyse et PP-lyse d'une amorce terminée par de l'AZTMP. Pour cela, nous utiliserons différentes amorces pour tester si l'efficacité d'excision d'AZTMP dépend également de la séquence.

Nous suivrons également l'effet de la concentration en Mg^{2+} sur la synthèse d'ADN "Strong-Stop" (-) en présence d'AZT et des deux donneurs de pyrophosphate. Cette étude sera réalisée avec les RT sauvage et AZT résistante pour vérifier si les mutations de résistance confèrent un avantage à faible concentration en magnésium.

Nous déterminerons l'influence de la concentration en magnésium sur l'activité RNase H en utilisant un système simplifié permettant d'étudier le mode de clivage polymérase dépendant. Le substrat sera un complexe ADN/ARN où la matrice ARN sera marquée radioactivement permettant de suivre sa dégradation au cours du temps.

Des études ont montré que la NC pouvait inhiber la formation de produits de self-priming et favoriser l'hybridation de l'ADN néosynthétisé à une matrice ARN. Puisque la concentration en magnésium régule la quantité de produits de self-priming, nous voudrions tester son influence sur le premier saut de brin, en présence et en absence de NC.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Accola, M. A., A. Ohagen, and H. G. Gottlinger.** 2000. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag). *J Virol* **74**:6198-202.
2. **Agostini, I., J. M. Navarro, F. Rey, M. Bouhamdan, B. Spire, R. Vigne, and J. Sire.** 1996. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol* **261**:599-606.
3. **Agresta, B. E., and C. A. Carter.** 1997. Cyclophilin A-induced alterations of human immunodeficiency virus type 1 CA protein in vitro. *J Virol* **71**:6921-7.
4. **Aiken, C.** 1997. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* **71**:5871-7.
5. **Aiken, C., J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, and D. Trono.** 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**:853-64.
6. **Aiken, C., and D. Trono.** 1995. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol* **69**:5048-56.
7. **Aiyar, A., D. Cobrinik, Z. Ge, H. J. Kung, and J. Leis.** 1992. Interaction between retroviral U5 RNA and the T psi C loop of the tRNA(Trp) primer is required for efficient initiation of reverse transcription. *J Virol* **66**:2464-72.
8. **Aiyar, A., Z. Ge, and J. Leis.** 1994. A specific orientation of RNA secondary structures is required for initiation of reverse transcription. *J Virol* **68**:611-8.
9. **Akari, H., M. Fujita, S. Kao, M. A. Khan, M. Shehu-Xhilaga, A. Adachi, and K. Strebel.** 2004. High level expression of human immunodeficiency virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/nucleocapsid processing site. *J Biol Chem* **279**:12355-62.
10. **Allain, B., M. Lapadat-Tapolsky, C. Berlioz, and 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.
11. **Aloia, R. C., H. Tian, and F. C. Jensen.** 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5181-5.
12. **Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu, and M. F. Summers.** 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.
13. **Amarasinghe, G. K., J. Zhou, M. Miskimon, K. J. Chancellor, J. A. McDonald, A. G. Matthews, R. R. Miller, M. D. Rouse, and 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.
14. **Ao, Z., X. Yao, and E. A. Cohen.** 2004. Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *J Virol* **78**:3170-7.

15. **Archer, R. H., M. Wisniewski, R. A. Bambara, and L. M. Demeter.** 2001. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry* **40**:4087-95.
16. **Arion, D., N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow, and M. A. Parniak.** 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37**:15908-17.
17. **Arts, E. J., M. Ghosh, P. S. Jacques, B. Ehresmann, and S. F. Le Grice.** 1996. Restoration of tRNA³Lys-primed(-)-strand DNA synthesis to an HIV-1 reverse transcriptase mutant with extended tRNAs. Implications for retroviral replication. *J Biol Chem* **271**:9054-61.
18. **Arts, E. J., and S. F. Le Grice.** 1998. Interaction of retroviral reverse transcriptase with template-primer duplexes during replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58**:339-93.
19. **Arts, E. J., X. Li, Z. Gu, L. Kleiman, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg.** 1994. Comparison of deoxyoligonucleotide and tRNA(Lys-3) as primers in an endogenous human immunodeficiency virus-1 in vitro reverse transcription/template-switching reaction. *J Biol Chem* **269**:14672-80.
20. **Arts, E. J., S. R. Stetor, X. Li, J. W. Rausch, K. J. Howard, B. Ehresmann, T. W. North, B. M. Wohrl, R. S. Goody, M. A. Wainberg, and S. F. Grice.** 1996. Initiation of (-) strand DNA synthesis from tRNA(3Lys) on lentiviral RNAs: implications of specific HIV-1 RNA-tRNA(3Lys) interactions inhibiting primer utilization by retroviral reverse transcriptases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10063-8.
21. **Auxilien, S., G. Keith, S. F. Le Grice, and J. L. Darlix.** 1999. Role of post-transcriptional modifications of primer tRNA^{Lys,3} in the fidelity and efficacy of plus strand DNA transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **274**:4412-20.
22. **Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-11.
23. **Balzarini, J., R. Pauwels, M. Baba, P. Herdewijn, E. de Clercq, S. Broder, and D. G. Johns.** 1988. The in vitro and in vivo anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and 2',3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cell species. *Biochem Pharmacol* **37**:897-903.
24. **Bampi, C., S. Jacquenet, D. Lener, D. Decimo, and J. L. Darlix.** 2004. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Curr HIV Res* **2**:79-92.
25. **Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. T. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. F. LeGrice, and J. L. Darlix.** 1989. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *Embo J* **8**:3279-85.
26. **Barboric, M., R. M. Nissen, S. Kanazawa, N. Jabrane-Ferrat, and B. M. Peterlin.** 2001. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **8**:327-37.
27. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautuet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
28. **Baudin, F., R. Marquet, C. Isel, J. L. Darlix, B. Ehresmann, and 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.
29. **Beerens, N., and B. Berkhout.** 2000. In vitro studies on tRNA annealing and reverse transcription with mutant HIV-1 RNA templates. *J Biol Chem* **275**:15474-81.
30. **Beerens, N., and B. Berkhout.** 2002. Switching the in vitro tRNA usage of HIV-1 by

- simultaneous adaptation of the PBS and PAS. *Rna* **8**:357-69.
31. **Beerens, N., and 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.
 32. **Beerens, N., F. Groot, and B. Berkhout.** 2001. Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J Biol Chem* **276**:31247-56.
 33. **Beerens, N., F. Groot, and B. Berkhout.** 2000. Stabilization of the U5-leader stem in the HIV-1 RNA genome affects initiation and elongation of reverse transcription. *Nucleic Acids Res* **28**:4130-7.
 34. **Beerens, N., B. Klaver, and B. Berkhout.** 2000. A structured RNA motif is involved in correct placement of the tRNA(3)(Lys) primer onto the human immunodeficiency virus genome. *J Virol* **74**:2227-38.
 35. **Berkhout, B.** 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**:1-34.
 36. **Berkhout, B., and I. Schoneveld.** 1993. Secondary structure of the HIV-2 leader RNA comprising the tRNA-primer binding site. *Nucleic Acids Res* **21**:1171-8.
 37. **Berkhout, B., N. L. Vastenhouw, B. I. Klasens, and H. Huthoff.** 2001. Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription. *Rna* **7**:1097-114.
 38. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.
 39. **Berkowitz, R. D., J. Luban, and S. P. Goff.** 1993. Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J Virol* **67**:7190-200.
 40. **Bernhard, W.** 1958. Electron of tumor cells and tumor viruses. *Cancer Research* **18**:491-509.
 41. **Bibollet-Ruche, F., E. Bailes, F. Gao, X. Pourrut, K. L. Barlow, J. P. Clewley, J. M. Mwenda, D. K. Langat, G. K. Chege, H. M. McClure, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 2004. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a cercopithecus monkey virus clade. *J Virol* **78**:7748-62.
 42. **Bidou, L., G. Stahl, B. Grima, H. Liu, M. Cassan, and J. P. Rousset.** 1997. In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal. *Rna* **3**:1153-8.
 43. **Borsetti, A., A. Ohagen, and H. G. Gottlinger.** 1998. The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J Virol* **72**:9313-7.
 44. **Bosco, D. A., E. Z. Eisenmesser, S. Pochapsky, W. I. Sundquist, and D. Kern.** 2002. Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5247-52.
 45. **Boucher, C. A., N. Cammack, P. Schipper, R. Schuurman, P. Rouse, M. A. Wainberg, and J. M. Cameron.** 1993. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2231-4.
 46. **Boulme, F., F. Freund, S. Gryaznov, P. E. Nielsen, L. Tarrago-Litvak, and S. Litvak.** 2000. Study of HIV-2 primer-template initiation complex using antisense oligonucleotides. *Eur J Biochem* **267**:2803-11.
 47. **Boulme, F., F. Freund, and S. Litvak.** 1998. Initiation of in vitro reverse transcription from tRNA(Lys3) on HIV-1 or HIV-2 RNAs by both type 1 and 2 reverse transcriptases. *FEBS Lett* **430**:165-70.
 48. **Bour, S., and K. Strebel.** 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of

- viral particle release. *Microbes Infect* **5**:1029-39.
49. **Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, R. A. Fouchier, Y. Jenkins, B. E. Meyer, L. I. Wu, M. Emerman, and M. H. Malim.** 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* **7**:1025-35.
 50. **Bowerman, B., P. O. Brown, J. M. Bishop, and H. E. Varmus.** 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* **3**:469-78.
 51. **Boyer, P. L., A. L. Ferris, P. Clark, J. Whitmer, P. Frank, C. Tantillo, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 1994. Mutational analysis of the fingers and palm subdomains of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Mol Biol* **243**:472-83.
 52. **Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 2001. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**:4832-42.
 53. **Braaten, D., E. K. Franke, and J. Luban.** 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**:3551-60.
 54. **Brule, F., G. Bec, G. Keith, S. F. Le Grice, B. P. Roques, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and 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.
 55. **Brule, F., R. Marquet, L. Rong, M. A. Wainberg, B. P. Roques, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 2002. Structural and functional properties of the HIV-1 RNA-tRNA(Lys)3 primer complex annealed by the nucleocapsid protein: comparison with the heat- annealed complex. *Rna* **8**:8-15.
 56. **Bryant, M., and L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:523-7.
 57. **Bukrinsky, M. I., and O. K. Haffar.** 1999. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci* **4**:D772-81.
 58. **Bukrinsky, M. I., and O. K. Haffar.** 1998. HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr. *Mol Med* **4**:138-43.
 59. **Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-9.
 60. **Burnett, B. P., and C. S. McHenry.** 1997. Posttranscriptional modification of retroviral primers is required for late stages of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7210-5.
 61. **Cai, M., R. Zheng, M. Caffrey, R. Craigie, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn.** 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* **4**:567-77.
 62. **Camaur, D., and D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* **70**:6106-11.
 63. **Campbell, S., and A. Rein.** 1999. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**:2270-9.
 64. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* **22**:217-27.
 65. **Canard, B., S. R. Sarfati, and C. C. Richardson.** 1998. Enhanced binding of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase to the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'- monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem* **273**:14596-604.
 66. **Carroll, S. S., J. Geib, D. B. Olsen, M. Stahlhut, J. A. Shafer, and L. C. Kuo.** 1994. Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by

- azidothymidine triphosphate. *Biochemistry* **33**:2113-20.
67. **Cen, S., Y. Huang, A. Khorchid, J. L. Darlix, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1999. The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA³Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* **73**:4485-8.
 68. **Cen, S., H. Javanbakht, S. Kim, K. Shiba, R. Craven, A. Rein, K. Ewalt, P. Schimmel, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2002. Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J Virol* **76**:13111-5.
 69. **Cen, S., A. Khorchid, J. Gabor, L. Rong, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2000. Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**:10796-800.
 70. **Cen, S., A. Khorchid, H. Javanbakht, J. Gabor, T. Stello, K. Shiba, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2001. Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:5043-8.
 71. **Chalker, D. L., and S. B. Sandmeyer.** 1992. Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev* **6**:117-28.
 72. **Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**:2814-20.
 73. **Charneau, P., G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, and F. Clavel.** 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* **241**:651-62.
 74. **Chen, H., and A. Engelman.** 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15270-4.
 75. **Chen, J. C., J. Krucinski, L. J. Miercke, J. S. Finer-Moore, A. H. Tang, A. D. Leavitt, and R. M. Stroud.** 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8233-8.
 76. **Chen, R., E. Le Rouzic, J. A. Kearney, L. M. Mansky, and S. Benichou.** 2004. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* **279**:28419-25.
 77. **Chen, Y., M. Balakrishnan, B. P. Roques, and R. A. Bambara.** 2003. Steps of the acceptor invasion mechanism for HIV-1 minus strand strong stop transfer. *J Biol Chem* **278**:38368-75.
 78. **Cheng, Y. C., G. E. Dutschman, K. F. Bastow, M. G. Sarngadharan, and R. Y. Ting.** 1987. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. *J Biol Chem* **262**:2187-9.
 79. **Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano.** 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**:183-8.
 80. **Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**:954-60.
 81. **Clever, J. L., D. A. Eckstein, and 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.
 82. **Cobrinik, D., A. Aiyar, Z. Ge, M. Katzman, H. Huang, and J. Leis.** 1991. Overlapping retrovirus U5 sequence elements are required for efficient integration and

- initiation of reverse transcription. *J Virol* **65**:3864-72.
83. **Cobrinik, D., L. Soskey, and J. Leis.** 1988. A retroviral RNA secondary structure required for efficient initiation of reverse transcription. *J Virol* **62**:3622-30.
 84. **Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore.** 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397-401.
 85. **Conticello, S. G., R. S. Harris, and M. S. Neuberger.** 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* **13**:2009-13.
 86. **Cooley, L. A., and S. R. Lewin.** 2003. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J Clin Virol* **26**:121-32.
 87. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *Embo J* **15**:5783-8.
 88. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
 89. **Darlix, J. L., M. Lapadat-Tapolsky, H. de Rocquigny, and B. P. Roques.** 1995. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* **254**:523-37.
 90. **Darlix, J. L., A. Vincent, C. Gabus, H. de Rocquigny, and 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.
 91. **Davies, J. F., 2nd, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, and D. A. Matthews.** 1991. Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**:88-95.
 92. **Davis, W. R., S. Gabbara, D. Hupe, and 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.
 93. **De Clercq, E.** 1993. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. *Med Res Rev* **13**:229-58.
 94. **De Clercq, E.** 1999. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco* **54**:26-45.
 95. **De Clercq, E.** 1998. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res* **38**:153-79.
 96. **De Harven, E.** 1974. Remarks on the ultrastructure of type A, B and C virus particules. *Adv Virus Res* **19**:221-264.
 97. **Debouck, C., J. G. Gorniak, J. E. Strickler, T. D. Meek, B. W. Metcalf, and M. Rosenberg.** 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8903-6.
 98. **Demirov, D. G., A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2002. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:955-60.
 99. **Dettenhofer, M., S. Cen, B. A. Carlson, L. Kleiman, and X. F. Yu.** 2000. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* **74**:8938-45.
 100. **Dietrich, L., L. S. Ehrlich, T. J. LaGrassa, D. Ebbets-Reed, and C. Carter.** 2001. Structural consequences of cyclophilin A binding on maturational refolding in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol* **75**:4721-33.
 101. **Ding, J., K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1998. Structure and functional implications

- of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **284**:1095-111.
102. **Ding, J., S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1997. Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* **44**:125-38.
103. **Divita, G., B. Muller, U. Immendorfer, M. Gautel, K. Rittinger, T. Restle, and R. S. Goody.** 1993. Kinetics of interaction of HIV reverse transcriptase with primer/template. *Biochemistry* **32**:7966-71.
104. **Divita, G., T. Restle, and R. S. Goody.** 1993. Characterization of the dimerization process of HIV-1 reverse transcriptase heterodimer using intrinsic protein fluorescence. *FEBS Lett* **324**:153-8.
105. **Dorfman, T., J. Luban, S. P. Goff, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger.** 1993. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **67**:6159-69.
106. **Doublet, S., S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, and T. Ellenberger.** 1998. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* **391**:251-8.
107. **Drummond, J. E., P. Mounts, R. J. Gorelick, J. R. Casas-Finet, W. J. Bosche, L. E. Henderson, D. J. Waters, and L. O. Arthur.** 1997. Wild-type and mutant HIV type 1 nucleocapsid proteins increase the proportion of long cDNA transcripts by viral reverse transcriptase. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:533-43.
108. **Dupuy, L. C., N. J. Kelly, T. E. Elgavish, S. C. Harvey, and C. D. Morrow.** 2003. Probing the importance of tRNA anticodon: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA genome complementarity with an HIV-1 that selects tRNA(Glu) for replication. *J Virol* **77**:8756-64.
109. **Eisenberg, E. J., G. X. He, and W. A. Lee.** 2001. Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **20**:1091-8.
110. **Ellerman, V., and O. Bang.** 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* **46**:595-609.
111. **Engelman, A., K. Mizuuchi, and R. Craigie.** 1991. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**:1211-21.
112. **Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and 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.
113. **Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**:303-8.
114. **Farjot, G., A. Sergeant, and I. Mikaelian.** 1999. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* **274**:17309-17.
115. **Farnet, C. M., and 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.
116. **Fassati, A., and S. P. Goff.** 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:3626-35.
117. **Fassati, A., and S. P. Goff.** 1999. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **73**:8919-25.
118. **Fosse, P., M. Mougel, G. Keith, E. Westhof, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1998. Modified nucleotides of tRNA^{Pro} restrict interactions in the binary primer/template complex of M-MuLV. *J Mol Biol* **275**:731-46.

-
119. **Fournier, C., J. C. Cortay, C. Carbonnelle, C. Ehresmann, R. Marquet, and P. Boulanger.** 2002. The HIV-1 Nef Protein Enhances the Affinity of Reverse Transcriptase for RNA In Vitro. *Virus Genes* **25**:255-269.
120. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**:1-25.
121. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**:341-51.
122. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* **270**:23883-6.
123. **Freund, F., F. Boulme, S. Litvak, and L. Tarrago-Litvak.** 2001. Initiation of HIV-2 reverse transcription: a secondary structure model of the RNA-tRNA(Lys3) duplex. *Nucleic Acids Res* **29**:2757-65.
124. **Friant, S., T. Heyman, A. S. Bystrom, M. Wilhelm, and F. X. Wilhelm.** 1998. Interactions between Ty1 retrotransposon RNA and the T and D regions of the tRNA(iMet) primer are required for initiation of reverse transcription in vivo. *Mol Cell Biol* **18**:799-806.
125. **Friant, S., T. Heyman, O. Poch, M. Wilhelm, and F. X. Wilhelm.** 1997. Sequence comparison of the Ty1 and Ty2 elements of the yeast genome supports the structural model of the tRNA^{iMet}-Ty1 RNA reverse transcription initiation complex. *Yeast* **13**:639-45.
126. **Friant, S., T. Heyman, F. X. Wilhelm, and M. Wilhelm.** 1996. Role of RNA primers in initiation of minus-strand and plus-strand DNA synthesis of the yeast retrotransposon Ty1. *Biochimie* **78**:674-80.
127. **Friant, S., T. Heyman, M. L. Wilhelm, and F. X. Wilhelm.** 1996. Extended interactions between the primer tRNA^{iMet} and genomic RNA of the yeast Ty1 retrotransposon. *Nucleic Acids Res* **24**:441-9.
128. **Fu, W., R. J. Gorelick, and A. Rein.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**:5013-8.
129. **Furman, P. A., J. A. Fyfe, M. H. St Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. N. Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, and et al.** 1986. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:8333-7.
130. **Gabor, J., S. Cen, H. Javanbakht, M. Niu, and L. Kleiman.** 2002. Effect of altering the tRNA(Lys)(3) concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J Virol* **76**:9096-102.
131. **Gabus, C., D. Ficheux, M. Rau, G. Keith, S. Sandmeyer, and J. L. Darlix.** 1998. The yeast Ty3 retrotransposon contains a 5'-3' bipartite primer-binding site and encodes nucleocapsid protein NCp9 functionally homologous to HIV-1 NCp7. *Embo J* **17**:4873-80.
132. **Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono.** 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9825-30.
133. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-3.
134. **Gamble, T. R., S. Yoo, F. F. Vajdos, U. K. von Schwedler, D. K. Worthylake, H. Wang, J. P. McCutcheon, W. I. Sundquist, and C. P. Hill.** 1997. Structure of the

- carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**:849-53.
135. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-41.
136. **Gao, H. Q., P. L. Boyer, S. G. Sarafianos, E. Arnold, and S. H. Hughes.** 2000. The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* **300**:403-18.
137. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
138. **Gaynor, R.** 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* **6**:347-63.
139. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97.
140. **Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M. A. Koch.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.
141. **Gelderblom, H. R., M. Ozel, and G. Pauli.** 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol* **106**:1-13.
142. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-12.
143. **Gitti, R. K., B. M. Lee, J. Walker, M. F. Summers, S. Yoo, and W. I. Sundquist.** 1996. Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **273**:231-5.
144. **Goh, W. C., M. E. Rogel, C. M. Kinsey, S. F. Michael, P. N. Fultz, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and M. Emerman.** 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* **4**:65-71.
145. **Goncalves, J., Y. Korin, J. Zack, and D. Gabuzda.** 1996. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* **70**:8701-9.
146. **Gorelick, R. J., L. E. Henderson, J. P. Hanser, and A. Rein.** 1988. Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger- like" protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8420-4.
147. **Gotte, M., D. Arion, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg.** 2000. The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol* **74**:3579-85.
148. **Gotte, M., X. Li, and M. A. Wainberg.** 1999. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure- function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**:199-210.
149. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-31.
150. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15 Suppl 5**:S13-20.
151. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1991. Effect of

- mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3195-9.
152. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.
153. **Guo, F., S. Cen, M. Niu, H. Javanbakht, and L. Kleiman.** 2003. Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNA(Lys) incorporation, tRNA(3)(Lys) annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:9817-22.
154. **Guo, J., T. Wu, B. F. Kane, D. G. Johnson, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, and 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.
155. **Haffar, O. K., S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, and M. Bukrinsky.** 2000. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* **299**:359-68.
156. **Harrich, D., C. W. Hooker, and E. Parry.** 2000. The human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J Virol* **74**:5639-46.
157. **Harrich, D., C. Ulich, L. F. Garcia-Martinez, and R. B. Gaynor.** 1997. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *Embo J* **16**:1224-35.
158. **Harrich, D., C. Ulich, and 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.
159. **Harris, R. S., S. K. Petersen-Mahrt, and M. S. Neuberger.** 2002. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* **10**:1247-53.
160. **Hermann, T., T. Meier, M. Gotte, and H. Heumann.** 1994. The 'helix clamp' in HIV-1 reverse transcriptase: a new nucleic acid binding motif common in nucleic acid polymerases. *Nucleic Acids Res* **22**:4625-33.
161. **Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence, and D. Gabuzda.** 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **201**:349-55.
162. **Holm, K., K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* **77**:4805-17.
163. **Hooker, C. W., and D. Harrich.** 2003. The first strand transfer reaction of HIV-1 reverse transcription is more efficient in infected cells than in cell-free natural endogenous reverse transcription reactions. *J Clin Virol* **26**:229-38.
164. **Hooker, C. W., W. B. Lott, and D. Harrich.** 2001. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *J Virol* **75**:3095-104.
165. **Hostomska, Z., D. A. Matthews, J. F. Davies, 2nd, B. R. Nides, and Z. Hostomsky.** 1991. Proteolytic release and crystallization of the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **266**:14697-702.
166. **Hsieh, J. C., S. Zinnen, and P. Modrich.** 1993. Kinetic mechanism of the DNA-dependent DNA polymerase activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem* **268**:24607-13.
167. **Hsiou, Y., J. Ding, K. Das, A. D. Clark, Jr., P. L. Boyer, P. Lewi, P. A. Janssen, J. P. Kleim, M. Rosner, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2001. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol* **309**:437-45.
168. **Hu, W. S., and H. M. Temin.** 1990. Retroviral recombination and reverse transcription.

- Science **250**:1227-33.
169. **Huang, H., R. Chopra, G. L. Verdine, and S. C. Harrison.** 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**:1669-75.
170. **Huang, H., S. C. Harrison, and G. L. Verdine.** 2000. Trapping of a catalytic HIV reverse transcriptase*template:primer complex through a disulfide bond. *Chem Biol* **7**:355-64.
171. **Huang, Y., A. Khorchid, J. Gabor, J. Wang, X. Li, J. L. Darlix, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1998. The role of nucleocapsid and U5 stem/A-rich loop sequences in tRNA(3Lys) genomic placement and initiation of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:3907-15.
172. **Huang, Y., J. Mak, Q. Cao, Z. Li, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1994. Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:7676-83.
173. **Huang, Y., J. Wang, A. Shalom, Z. Li, A. Khorchid, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 1997. Primer tRNA^{3Lys} on the viral genome exists in unextended and two-base extended forms within mature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**:726-8.
174. **Huvent, I., S. S. Hong, C. Fournier, B. Gay, J. Tournier, C. Carriere, M. Courcoul, R. Vigne, B. Spire, and P. Boulanger.** 1998. Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins. *J Gen Virol* **79 (Pt 5)**:1069-81.
175. **Isel, C., C. Ehresmann, G. Keith, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1995. Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol* **247**:236-50.
176. **Isel, C., C. Ehresmann, G. Keith, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1997. Two step synthesis of (-) strong-stop DNA by avian and murine reverse transcriptases in vitro. *Nucleic Acids Res* **25**:545-52.
177. **Isel, C., G. Keith, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1998. Mutational analysis of the tRNA^{3Lys}/HIV-1 RNA (primer/template) complex. *Nucleic Acids Res* **26**:1198-204.
178. **Isel, C., J. M. Lanchy, S. F. Le Grice, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and 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.
179. **Isel, C., R. Marquet, G. Keith, C. Ehresmann, and 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.
180. **Isel, C., E. Westhof, C. Massire, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1999. Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Embo J* **18**:1038-48.
181. **Iwatani, Y., A. E. Rosen, J. Guo, K. Musier-Forsyth, and J. G. Levin.** 2003. Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription in vitro. Requirement for RNA sequences downstream of the primer binding site abrogated by nucleocapsid protein-dependent primer-template interactions. *J Biol Chem* **278**:14185-95.
182. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
183. **Jacobo-Molina, A., J. Ding, R. G. Nanni, A. D. Clark, Jr., X. Lu, C. Tantillo, R. L. Williams, G. Kamer, A. L. Ferris, P. Clark, and et al.** 1993. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 90:6320-4.
184. **Javanbakht, H., S. Cen, K. Musier-Forsyth, and L. Kleiman.** 2002. Correlation between tRNA^{Lys3} aminoacylation and its incorporation into HIV-1. *J Biol Chem* **277**:17389-96.
185. **Jenkins, Y., M. McEntee, K. Weis, and W. C. Greene.** 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* **143**:875-85.
186. **Jiang, M., J. Mak, A. Ladha, E. Cohen, M. Klein, B. Rovinski, and L. Kleiman.** 1993. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:3246-53.
187. **Johnson, K. A.** 1993. Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu Rev Biochem* **62**:685-713.
188. **Johnson, M. A., and A. Fridland.** 1989. Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol Pharmacol* **36**:291-5.
189. **Johnson, M. S., M. A. McClure, D. F. Feng, J. Gray, and R. F. Doolittle.** 1986. Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7648-52.
190. **Jonckheere, H., J. Anne, and E. De Clercq.** 2000. The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med Res Rev* **20**:129-54.
191. **Jung, A., R. Maier, J. P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**:144.
192. **Kameoka, M., M. Morgan, M. Binette, R. S. Russell, L. Rong, X. Guo, A. Mouland, L. Kleiman, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2002. The Tat Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Can Promote Placement of tRNA Primer onto Viral RNA and Suppress Later DNA Polymerization in HIV-1 Reverse Transcription. *J Virol* **76**:3637-45.
193. **Kang, S. M., Z. Zhang, and C. D. Morrow.** 1999. Identification of a human immunodeficiency virus type 1 that stably uses tRNA^{Lys1,2} rather than tRNA^{Lys3} for initiation of reverse transcription. *Virology* **257**:95-105.
194. **Kang, S. M., Z. Zhang, and C. D. Morrow.** 1997. Identification of a sequence within U5 required for human immunodeficiency virus type 1 to stably maintain a primer binding site complementary to tRNA(Met). *J Virol* **71**:207-17.
195. **Karacostas, V., E. J. Wolffe, K. Nagashima, M. A. Gonda, and B. Moss.** 1993. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* **193**:661-71.
196. **Karn, J.** 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**:235-54.
197. **Kati, W. M., K. A. Johnson, L. F. Jerva, and K. S. Anderson.** 1992. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* **267**:25988-97.
198. **Kelly, N. J., M. T. Palmer, and C. D. Morrow.** 2003. Selection of retroviral reverse transcription primer is coordinated with tRNA biogenesis. *J Virol* **77**:8695-701.
199. **Khan, M. A., C. Aberham, S. Kao, H. Akari, R. Gorelick, S. Bour, and K. Strebel.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* **75**:7252-65.
200. **Khan, M. A., H. Akari, S. Kao, C. Aberham, D. Davis, A. Buckler-White, and K. Strebel.** 2002. Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease may be correlated with Vif function. *J Virol* **76**:9112-23.
201. **Khorchid, A., R. Halwani, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2002. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* **76**:4131-7.
202. **Khorchid, A., H. Javanbakht, S. Wise, R. Halwani, M. A. Parniak, M. A. Wainberg,**

- and L. Kleiman.** 2000. Sequences within Pr160gag-pol affecting the selective packaging of primer tRNA(Lys3) into HIV-1. *J Mol Biol* **299**:17-26.
203. **Kiernan, R. E., A. Ono, G. Englund, and E. O. Freed.** 1998. Role of matrix in an early postentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. *J Virol* **72**:4116-26.
204. **Kleiman, L.** 2002. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* **53**:107-14.
205. **Kleiman, L., R. Halwani, and H. Javanbakht.** 2004. The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res* **2**:163-75.
206. **Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, and T. A. Steitz.** 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**:1783-90.
207. **Kondo, E., F. Mammano, E. A. Cohen, and H. G. Gottlinger.** 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol* **69**:2759-64.
208. **Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken.** 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **73**:8824-30.
209. **Krebs, R., U. Immendorfer, S. H. Thrall, B. M. Wohrl, and R. S. Goody.** 1997. Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-TC. *Biochemistry* **36**:10292-300.
210. **Kruhoffer, M., C. Urbanke, and F. Grosse.** 1993. Two step binding of HIV-1 reverse transcriptase to nucleic acid substrates. *Nucleic Acids Res* **21**:3943-9.
211. **Lama, J., and D. Trono.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 matrix protein interacts with cellular protein HO3. *J Virol* **72**:1671-6.
212. **Lanchy, J. M., C. Ehresmann, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. Binding and kinetic properties of HIV-1 reverse transcriptase markedly differ during initiation and elongation of reverse transcription. *Embo J* **15**:7178-87.
213. **Lanchy, J. M., G. Keith, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1998. Contacts between reverse transcriptase and the primer strand govern the transition from initiation to elongation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **273**:24425-32.
214. **Lapadat-Tapolsky, M., C. Pernelle, C. Borie, and J. L. Darlix.** 1995. Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic Acids Res* **23**:2434-41.
215. **Lavigne, M., and H. Buc.** 1999. Compression of the DNA minor groove is responsible for termination of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* **285**:977-95.
216. **Lavigne, M., P. Roux, H. Buc, and F. Schaeffer.** 1997. DNA curvature controls termination of plus strand DNA synthesis at the centre of HIV-1 genome. *J Mol Biol* **266**:507-24.
217. **Le Grice, S. F., T. Naas, B. Wohlgensinger, and O. Schatz.** 1991. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *Embo J* **10**:3905-11.
218. **Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance.** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**:1112.
219. **Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine, and 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.
220. **Li, X., Y. Quan, E. J. Arts, Z. Li, B. D. Preston, H. de Rocquigny, B. P. Roques, J. L. Darlix, L. Kleiman, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg.** 1996. Human immunodeficiency virus Type 1 nucleocapsid protein (NCp7) directs specific initiation of minus-strand DNA synthesis primed by human tRNA(Lys3) in vitro:

- studies of viral RNA molecules mutated in regions that flank the primer binding site. *J Virol* **70**:4996-5004.
221. **Liang, C., X. Li, L. Rong, P. Inouye, Y. Quan, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 1997. The importance of the A-rich loop in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and infectivity. *J Virol* **71**:5750-7.
222. **Liang, C., L. Rong, M. Gotte, X. Li, Y. Quan, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 1998. Mechanistic studies of early pausing events during initiation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **273**:21309-15.
223. **Luban, J.** 1996. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**:1157-9.
224. **Luciw, P. A.** 1996. Human immunodeficiency viruses and their replication, p. 845-916. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fundamental Virology*, Third Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia.
225. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and 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.
226. **Mak, J., M. Jiang, M. A. Wainberg, M. L. Hammarskjold, D. Rekosh, and L. Kleiman.** 1994. Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **68**:2065-72.
227. **Mak, J., and L. Kleiman.** 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* **71**:8087-95.
228. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
229. **Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
230. **Mansky, L. M., S. Preveral, L. Selig, R. Benarous, and S. Benichou.** 2000. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 *In vivo* mutation rate. *J Virol* **74**:7039-47.
231. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**:5087-94.
232. **Marchand, B., and M. Gotte.** 2003. Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J Biol Chem* **278**:35362-72.
233. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-403.
234. **Marquet, R., C. Isel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* **77**:113-24.
235. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**:1313-9.
236. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**:4794-804.
237. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. M. Mian, A. G. So, and W. A. Scott.** 1999. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell* **4**:35-43.
238. **Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. G. So, and W. A. Scott.** 1998. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13471-6.
239. **Meyer, P. R., A. J. Smith, S. E. Matsuura, and W. A. Scott.** 2004. Effects of primer-

- template sequence on ATP-dependent removal of chain-terminating nucleotide analogues by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*.
240. **Miller, J. T., B. Ehresmann, U. Hubscher, and S. F. Le Grice.** 2001. A novel interaction of tRNA(Lys,3) with the feline immunodeficiency virus RNA genome governs initiation of minus strand DNA synthesis. *J Biol Chem* **276**:27721-30.
241. **Miller, M., M. Jaskolski, J. K. Rao, J. Leis, and A. Wlodawer.** 1989. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* **337**:576-9.
242. **Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**:5382-90.
243. **Momany, C., L. C. Kovari, A. J. Prongay, W. Keller, R. K. Gitti, B. M. Lee, A. E. Gorbalenya, L. Tong, J. McClure, L. S. Ehrlich, M. F. Summers, C. Carter, and M. G. Rossmann.** 1996. Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nat Struct Biol* **3**:763-70.
244. **Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2000. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* **74**:5441-51.
245. **Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-51.
246. **Negroni, M., and H. Buc.** 2001. Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet* **35**:275-302.
247. **Neville, M., F. Stutz, L. Lee, L. I. Davis, and M. Rosbash.** 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**:767-75.
248. **Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-72.
249. **O'Reilly, M. M., M. T. McNally, and K. L. Beemon.** 1995. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**:373-85.
250. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**:11055-66.
251. **Ohi, Y., and J. L. Clever.** 2000. Sequences in the 5' and 3' R elements of human immunodeficiency virus type 1 critical for efficient reverse transcription. *J Virol* **74**:8324-34.
252. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-30.
253. **Ott, D. E.** 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev Med Virol* **12**:359-74.
254. **Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1998. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **72**:2962-8.
255. **Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-72.
256. **Panganiban, A. T., and D. Fiore.** 1988. Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. *Science* **241**:1064-9.
257. **Pari, K., G. A. Mueller, E. F. DeRose, T. W. Kirby, and R. E. London.** 2003. Solution structure of the RNase H domain of the HIV-1 reverse transcriptase in the presence of magnesium. *Biochemistry* **42**:639-50.

-
258. **Pata, J. D., W. G. Stirtan, S. W. Goldstein, and T. A. Steitz.** 2004. Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to an inhibitor active against mutant reverse transcriptases resistant to other nonnucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10548-53.
259. **Patel, P. H., A. Jacobo-Molina, J. Ding, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., R. Raag, R. G. Nanni, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1995. Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:5351-63.
260. **Paxton, W., R. I. Connor, and 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.
261. **Payne, L. N.** 1992. Biology of avian retroviruses, p. 299-404. *In* J. A. Levy (ed.), *The retroviridae*. Plenum Press, New York.
262. **Peliska, J. A., and S. J. Benkovic.** 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **258**:1112-8.
263. **Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon.** 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**:663-8.
264. **Piller, S. C., L. Caly, and D. A. Jans.** 2003. Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets* **4**:409-29.
265. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and 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 U S A* **77**:7415-9.
266. **Powell, D. M., M. C. Amaral, J. Y. Wu, T. Maniatis, and W. C. Greene.** 1997. HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:973-8.
267. **Powell, M. D., and J. G. Levin.** 1996. Sequence and structural determinants required for priming of plus- strand DNA synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 polypurine tract. *J Virol* **70**:5288-96.
268. **Prats, A. C., V. Housset, G. de Billy, F. Cornille, H. Prats, B. Roques, and J. L. Darlix.** 1991. Viral RNA annealing activities of the nucleocapsid protein of Moloney murine leukemia virus are zinc independent. *Nucleic Acids Res* **19**:3533-41.
269. **Prats, A. C., C. Roy, P. A. Wang, M. Erard, V. Housset, C. Gabus, C. Paoletti, and J. L. Darlix.** 1990. cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol* **64**:774-83.
270. **Prats, A. C., L. Sarih, C. Gabus, S. Litvak, G. Keith, and 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.
271. **Preston, B. D., B. J. Poiesz, and L. A. Loeb.** 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1168-71.
272. **Provitera, P., A. Goff, A. Harenberg, F. Bouamr, C. Carter, and S. Scarlata.** 2001. Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* **40**:5565-72.
273. **Purcell, D. F., and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**:6365-78.
274. **Ray, A. S., E. Murakami, A. Basavapathruni, J. A. Vaccaro, D. Ulrich, C. K. Chu, R. F. Schinazi, and K. S. Anderson.** 2003. Probing the molecular mechanisms of AZT drug resistance mediated by HIV-1 reverse transcriptase using a transient kinetic analysis. *Biochemistry* **42**:8831-41.
275. **Ray, A. S., Z. Yang, J. Shi, A. Hobbs, R. F. Schinazi, C. K. Chu, and K. S. Anderson.** 2002. Insights into the molecular mechanism of inhibition and drug resistance for

- HIV-1 RT with carbovir triphosphate. *Biochemistry* **41**:5150-62.
276. **Reicin, A. S., G. Kalpana, S. Paik, S. Marmon, and S. Goff.** 1995. Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *J Virol* **69**:5904-7.
277. **Rein, A., L. E. Henderson, and J. G. Levin.** 1998. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**:297-301.
278. **Ren, J., L. E. Bird, P. P. Chamberlain, G. B. Stewart-Jones, D. I. Stuart, and D. K. Stammers.** 2002. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14410-5.
279. **Ren, J., R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Darby, Y. Jones, D. Stuart, and et al.** 1995. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol* **2**:293-302.
280. **Ren, J., R. M. Esnouf, A. L. Hopkins, E. Y. Jones, I. Kirby, J. Keeling, C. K. Ross, B. A. Larder, D. I. Stuart, and D. K. Stammers.** 1998. 3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9518-23.
281. **Renda, M. J., J. D. Rosenblatt, E. Klimatcheva, L. M. Demeter, R. A. Bambara, and V. Planelles.** 2001. Mutation of the methylated tRNA(Lys)(3) residue A58 disrupts reverse transcription and inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:9671-8.
282. **Rhim, H., J. Park, and C. D. Morrow.** 1991. Deletions in the tRNA(Lys) primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. *J Virol* **65**:4555-64.
283. **Ricchetti, M., and H. Buc.** 1990. Reverse transcriptases and genomic variability: the accuracy of DNA replication is enzyme specific and sequence dependent. *Embo J* **9**:1583-93.
284. **Rigourd, M., G. Bec, P. Benas, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2003. Effects of tRNA 3 Lys aminoacylation on the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Biochimie* **85**:521-5.
285. **Rigourd, M., C. Ehresmann, M. A. Parniak, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2002. Primer unblocking and rescue of DNA synthesis by AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase: Comparison between initiation and elongation of reverse transcription and between (-) and (+) strand DNA synthesis. *J Biol Chem* **18**:18.
286. **Rigourd, M., J. M. Lanchy, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2000. Inhibition of the initiation of HIV-1 reverse transcription by 3'-azido-3'-deoxythymidine. Comparison with elongation. *J Biol Chem* **275**:26944-51.
287. **Rittinger, K., G. Divita, and R. S. Goody.** 1995. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8046-9.
288. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-3.
289. **Roberts, J. D., B. D. Preston, L. A. Johnston, A. Soni, L. A. Loeb, and T. A. Kunkel.** 1989. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Mol Cell Biol* **9**:469-76.
290. **Rodgers, D. W., S. J. Gamblin, B. A. Harris, S. Ray, J. S. Culp, B. Hellmig, D. J. Woolf, C. Debouck, and S. C. Harrison.** 1995. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1222-6.
291. **Rong, L., C. Liang, M. Hsu, X. Guo, B. P. Roques, and M. A. Wainberg.** 2001. HIV-1 nucleocapsid protein and the secondary structure of the binary complex formed

- between tRNA(Lys.3) and viral RNA template play different roles during initiation of (-) strand DNA reverse transcription. *J Biol Chem* **276**:47725-32.
292. **Rong, L., C. Liang, M. Hsu, L. Kleiman, P. Petitjean, H. de Rocquigny, B. P. Roques, and M. A. Wainberg.** 1998. Roles of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in annealing and initiation versus elongation in reverse transcription of viral negative-strand strong-stop DNA. *J Virol* **72**:9353-8.
293. **Roques, B. P., N. Morellet, H. de Rocquigny, H. Demene, W. Schueler, and N. Jullian.** 1997. Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* **79**:673-80.
294. **Roshal, M., B. Kim, Y. Zhu, P. Nghiem, and V. Planelles.** 2003. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem* **278**:25879-86.
295. **Rous, P.** 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med* **13**:397-411.
296. **Russell, R. S., A. Roldan, M. Detorio, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* **77**:12986-95.
297. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
298. **Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Gally.** 2002. Cyclophilin a plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation. *J Virol* **76**:4671-7.
299. **Sarafianos, S. G., A. D. Clark, Jr., K. Das, S. Tuske, J. J. Birktoft, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2002. Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *Embo J* **21**:6614-24.
300. **Sarafianos, S. G., A. D. Clark, Jr., S. Tuske, C. J. Squire, K. Das, D. Sheng, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, H. Kroth, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2003. Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA. *J Biol Chem* **278**:16280-8.
301. **Sarafianos, S. G., K. Das, A. D. Clark, Jr., J. Ding, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1999. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10027-32.
302. **Sarafianos, S. G., K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2001. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *Embo J* **20**:1449-61.
303. **Sarafianos, S. G., V. N. Pandey, N. Kaushik, and M. J. Modak.** 1995. Glutamine 151 participates in the substrate dNTP binding function of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**:7207-16.
304. **Scarlata, S., and C. Carter.** 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* **1614**:62-72.
305. **Schiavoni, I., S. Trapp, A. C. Santarcangelo, V. Piacentini, K. Pugliese, A. Baur, and M. Federico.** 2004. HIV-1 Nef enhances both membrane expression and virion incorporation of Env products: a model for the Nef dependent Increase of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem*.
306. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
307. **Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in

- the infected cell. *J Virol* **69**:4053-9.
308. **Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**:338-42.
309. **Schwartz, S., B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**:2519-29.
310. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* **64**:5448-56.
311. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* **12**:207-19.
312. **Selig, L., J. C. Pages, V. Tanchou, S. Preveral, C. Berlioz-Torrent, L. X. Liu, L. Erdtmann, J. Darlix, R. Benarous, and S. Benichou.** 1999. Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol* **73**:592-600.
313. **Selmi, B., J. Deval, K. Alvarez, J. Boretto, S. Sarfati, C. Guerreiro, and B. Canard.** 2003. The Y181C substitution in 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant human immunodeficiency virus, type 1, reverse transcriptase suppresses the ATP-mediated repair of the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem* **278**:40464-72.
314. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-7.
315. **Sherman, M. P., and W. C. Greene.** 2002. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* **4**:67-73.
316. **Siekevitz, M., S. F. Josephs, M. Dukovich, N. Pepper, F. Wong-Staal, and W. C. Greene.** 1987. Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science* **238**:1575-8.
317. **Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and 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.
318. **Sluis-Cremer, N., D. Arion, N. Kaushik, H. Lim, and M. A. Parniak.** 2000. Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J* **348 Pt 1**:77-82.
319. **Sluis-Cremer, N., D. Arion, and M. A. Parniak.** 2000. Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Cell Mol Life Sci* **57**:1408-22.
320. **Smith, C. M., O. Leon, J. S. Smith, and M. J. Roth.** 1998. Sequence requirements for removal of tRNA by an isolated human immunodeficiency virus type 1 RNase H domain. *J Virol* **72**:6805-12.
321. **Smith, J. S., and M. J. Roth.** 1992. Specificity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H in removal of the minus-strand primer, tRNA(Lys3). *J Biol Chem* **267**:15071-9.
322. **Sova, P., and D. J. Volsky.** 1993. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:6322-6.
323. **Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson, and K. A. Johnson.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**:988-993.
324. **Srinivas, R. V., and A. Fridland.** 1998. Antiviral activities of 9-R-2-

- phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1484-7.
325. **Stark, L. A., and R. T. Hay.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* **72**:3037-44.
326. **Starnes, M. C., and Y. C. Cheng.** 1989. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. *J Biol Chem* **264**:7073-7.
327. **Strack, B., A. Calistri, M. A. Accola, G. Palu, and H. G. Gottlinger.** 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13063-8.
328. **Strack, B., A. Calistri, and H. G. Gottlinger.** 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol* **76**:5472-9.
329. **Strebel, K.** 2003. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* **17 Suppl 4**:S25-34.
330. **Takahashi, H., M. Matsuda, A. Kojima, T. Sata, T. Andoh, T. Kurata, K. Nagashima, and W. W. Hall.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: enhancement of activity by interaction with cellular topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5694-8.
331. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. Hall, and T. Kurata.** 2002. Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. *Biochem Biophys Res Commun* **297**:593-9.
332. **Takahashi, H., M. Tatsumi, M. Matsuda, K. Nagashima, T. Kurata, and W. W. Hall.** 1997. The role of topoisomerase I in HIV-1 replication. *Leukemia* **11 Suppl 3**:113-5.
333. **Tang, C., E. Loeliger, P. Luncsford, I. Kinde, D. Beckett, and M. F. Summers.** 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:517-22.
334. **Tasara, T., G. Maga, M. O. Hottiger, and U. Hubscher.** 2001. HIV-1 reverse transcriptase and integrase enzymes physically interact and inhibit each other. *FEBS Lett* **507**:39-44.
335. **Taura, T., H. Krebber, and P. A. Silver.** 1998. A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7427-32.
336. **Temin, H. M., and S. Mizutani.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-3.
337. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-5.
338. **Tisdale, M., S. D. Kemp, N. R. Parry, and B. A. Larder.** 1993. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5653-6.
339. **Tsurutani, N., M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, and T. Masuda.** 2000. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J Virol* **74**:4795-806.
340. **Turner, B. G., and M. F. Summers.** 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**:1-32.
341. **Turville, S. G., J. Arthos, K. M. Donald, G. Lynch, H. Naif, G. Clark, D. Hart, and**

- A. L. Cunningham.** 2001. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* **98**:2482-8.
342. **Tuske, S., S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., J. Ding, L. K. Naeger, K. L. White, M. D. Miller, C. S. Gibbs, P. L. Boyer, P. Clark, G. Wang, B. L. Gaffney, R. A. Jones, D. M. Jerina, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 2004. Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol* **11**:469-74.
343. **Ulich, C., A. Dunne, E. Parry, C. W. Hooker, R. B. Gaynor, and D. Harrich.** 1999. Functional domains of Tat required for efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* **73**:2499-508.
344. **van Wamel, J. L., and B. Berkhout.** 1998. The first strand transfer during HIV-1 reverse transcription can occur either intramolecularly or intermolecularly. *Virology* **244**:245-51.
345. **VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and 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.
346. **Wainberg, M. A., M. D. Miller, Y. Quan, H. Salomon, A. S. Mulato, P. D. Lamy, N. A. Margot, K. E. Anton, and J. M. Cherrington.** 1999. In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA. *Antivir Ther* **4**:87-94.
347. **Wakefield, J. K., S. M. Kang, and C. D. Morrow.** 1996. Construction of a type 1 human immunodeficiency virus that maintains a primer binding site complementary to tRNA(His). *J Virol* **70**:966-75.
348. **Wakefield, J. K., A. G. Wolf, and C. D. Morrow.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 can use different tRNAs as primers for reverse transcription but selectively maintains a primer binding site complementary to tRNA(3Lys). *J Virol* **69**:6021-9.
349. **Wang, J., S. J. Smerdon, J. Jager, L. A. Kohlstaedt, P. A. Rice, J. M. Friedman, and T. A. Steitz.** 1994. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7242-6.
350. **Wang, J. Y., H. Ling, W. Yang, and R. Craigie.** 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *Embo J* **20**:7333-43.
351. **Wang, L., S. Mukherjee, F. Jia, O. Narayan, and L. J. Zhao.** 1995. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem* **270**:25564-9.
352. **Wiegand, H. L., B. P. Doehle, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* **23**:2451-8.
353. **Wieggers, K., G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg, and H. G. Krausslich.** 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* **72**:2846-54.
354. **Wilhelm, M., M. Boutabout, T. Heyman, and F. X. Wilhelm.** 1999. Reverse transcription of the yeast Ty1 retrotransposon: the mode of first strand transfer is either intermolecular or intramolecular. *J Mol Biol* **288**:505-10.
355. **Wilhelm, M., F. X. Wilhelm, G. Keith, B. Agoutin, and T. Heyman.** 1994. Yeast Ty1 retrotransposon: the minus-strand primer binding site and a cis-acting domain of the Ty1 RNA are both important for packaging of primer tRNA inside virus-like particles. *Nucleic Acids Res* **22**:4560-5.
356. **Wilk, T., B. Gowen, and S. D. Fuller.** 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol* **73**:1931-40.

-
357. **Williams, M. C., I. Rouzina, J. R. Wenner, R. J. Gorelick, K. Musier-Forsyth, and 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.
358. **Witte, V., B. Laffert, O. Rosorius, P. Lischka, K. Blume, G. Galler, A. Stilper, D. Willbold, P. D'Aloja, M. Sixt, J. Kolanus, M. Ott, W. Kolanus, G. Schuler, and A. S. Baur.** 2004. HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane. *Mol Cell* **13**:179-90.
359. **Witvrouw, M., C. Pannecouque, K. Van Laethem, J. Desmyter, E. De Clercq, and A. M. Vandamme.** 1999. Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV- 2 and SIV. *Aids* **13**:1477-83.
360. **Wu, T., J. Guo, J. Bess, L. E. Henderson, and 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.
361. **Wu, W., L. E. Henderson, T. D. Copeland, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, A. Rein, and J. G. Levin.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *J Virol* **70**:7132-42.
362. **Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hehl, G. V. Kalpana, V. Prasad, and J. C. Kappes.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol* **73**:2126-35.
363. **Wu, Y., and J. W. Marsh.** 2003. Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* **77**:10376-82.
364. **Wu, Y., and J. W. Marsh.** 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**:1503-6.
365. **Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken.** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **74**:9381-7.
366. **Yu, Q., and C. D. Morrow.** 2001. Identification of critical elements in the tRNA acceptor stem and T(Psi)C loop necessary for human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **75**:4902-6.
367. **Yuan, X., X. Yu, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol* **67**:6387-94.
368. **Yusupova, G., J. M. Lanchy, M. Yusupov, G. Keith, S. F. Le Grice, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. Primer selection by HIV-1 reverse transcriptase on RNA-tRNA(3Lys) and DNA-tRNA(3Lys) hybrids. *J Mol Biol* **261**:315-21.
369. **Zemmel, R. W., A. C. Kelley, J. Karn, and P. J. Butler.** 1996. Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J Mol Biol* **258**:763-77.
370. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
371. **Zhang, H., R. J. Pomerantz, G. Dornadula, and Y. Sun.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol* **74**:8252-61.
372. **Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.

373. **Zhang, H., Y. Zhang, T. Spicer, D. Henrard, and B. J. Poiesz.** 1995. Nascent human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription occurs within an enveloped particle. *J Virol* **69**:3675-82.
374. **Zhang, Z., S. M. Kang, A. LeBlanc, S. L. Hajduk, and C. D. Morrow.** 1996. Nucleotide sequences within the U5 region of the viral RNA genome are the major determinants for an human immunodeficiency virus type 1 to maintain a primer binding site complementary to tRNA(His). *Virology* **226**:306-17.
375. **Zhang, Z., S. M. Kang, Y. Li, and C. D. Morrow.** 1998. Genetic analysis of the U5-PBS of a novel HIV-1 reveals multiple interactions between the tRNA and RNA genome required for initiation of reverse transcription. *Rna* **4**:394-406.
376. **Zheng, Y. H., D. Irwin, T. Kurosu, K. Tokunaga, T. Sata, and B. M. Peterlin.** 2004. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **78**:6073-6.
377. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**:2556-69.
378. **Zhu, K., C. Dobard, and S. A. Chow.** 2004. Requirement for Integrase during Reverse Transcription of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and the Effect of Cysteine Mutations of Integrase on Its Interactions with Reverse Transcriptase. *J Virol* **78**:5045-55.

La rétrotranscription de HIV-1 : étude du complexe d'initiation et des mécanismes de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques.

La rétrotranscription est une étape centrale du cycle répliatif de HIV-1 et permet la synthèse de l'ADN proviral bicaténaire à partir de l'ARN génomique. Elle requiert la présence de trois partenaires : l'ARN viral (ARN_v) qui sert de matrice, l'ARN_{t₃^{Lys}} cellulaire qui sert d'amorce, et la rétrotranscriptase virale (RT). Les 18 nucléotides 3'-terminaux de l'ARN_{t₃^{Lys}} sont strictement complémentaires d'une séquence appelée PBS (Primer Binding Site) où débute la rétrotranscription. Notre laboratoire a démontré qu'outre cette interaction, des remaniements conformationnels intra- et intermoléculaires ont lieu lors de la formation du complexe ARN_{t₃^{Lys}}/ARN_v de l'isolat MAL de HIV-1, dont la région PBS dérive du sous type A. Des études de cartographie en solution et d'empreinte de la RT ont permis d'élaborer un modèle tridimensionnel du complexe ARN_{t₃^{Lys}}/ARN_v : RT. Il suggère que la RT interagit avec l'hélice intermoléculaire du PBS, les trois premiers nucléotides de la matrice en simple brin en amont du PBS, ainsi que les trois hélices intramoléculaires formées par l'ARN_v.

Nous avons dans un premier temps identifié les éléments structuraux du complexe d'initiation de l'isolat MAL de HIV-1 cruciaux pour l'initiation de la rétrotranscription. Nos résultats montrent le rôle essentiel de la structure tridimensionnelle globale dans le processus d'initiation. Puis, nous avons entrepris une étude structurale (*in vitro* et *in situ*) et fonctionnelle comparative de deux isolats, MAL et Hxb2/NL4-3, dont les domaines PBS appartiennent respectivement aux sous-types A et B. Cette étude a montré la versatilité du système HIV-1. Contrairement à la situation observée avec l'isolat MAL, l'interaction entre le PBS de l'ARN_v de l'isolat Hxb2/NL4-3 et les 18 nucléotides 3'-terminaux de l'ARN_{t₃^{Lys}} est suffisante pour initier la reverse transcription, en absence de tout remaniement conformationnel. En particulier, l'interaction entre la séquence riche en A de l'ARN_v et l'anticodon de l'ARN_{t₃^{Lys}}, cruciale dans le cas de l'isolat MAL, n'est pas requise pour une initiation efficace de la rétrotranscription. Ces différences s'expliquent par les différentes structures adoptées par les ARN viraux avant l'hybridation à l'ARN_{t₃^{Lys}}, pouvant avoir un effet négatif.

Nous avons mené une étude structurale et fonctionnelle de virus mutants, obtenus par C. Morrow, capables de se répliquer en utilisant une amorce non naturelle, l'ARN_{t^{His}}. Dans ce cas précis, la structure adoptée par l'ARN_t après son hybridation à l'ARN_v devient un facteur négatif, contré par l'apparition d'une interaction stable entre l'anticodon de l'ARN_t et

l'ARNv. Il existe une bonne corrélation entre la stabilité de cette interaction intermoléculaire et l'initiation de la rétrotranscription. Cette interaction est renforcée par l'apparition de mutations additionnelles stabilisant le virus en culture cellulaire.

Lors du traitement par l'AZT, de nombreuses mutations de résistance apparaissent. Les paramètres cinétiques des mécanismes d'enlèvement par ATP-lyse et pyrophosphorolyse en présence des RT sauvage et résistante ont été déterminés au laboratoire. Bien que les mutations de résistance permettent une réparation par ATP-lyse, la RT sauvage présente une résistance innée *via* le mécanisme de pyrophosphorolyse, dont l'efficacité d'enlèvement est supérieure à celle obtenue par ATP-lyse en présence de l'enzyme résistante.

Nous avons étudié l'influence de la concentration en Mg^{2+} libre sur les activités catalytiques de la RT de HIV-1. La concentration en Mg^{2+} libre influence les activités RNase H et polymérase, en agissant sur l'incorporation de nt et la processivité de l'enzyme, ainsi que la stabilité de la matrice ARN. De plus, l'inhibition de la synthèse d'ADN par un terminateur de chaîne est dépendante de la concentration en Mg^{2+} . L'inhibition est levée, non pas par un mécanisme d'excision des NRTI incorporés, mais par un mécanisme de discrimination Mg^{2+} dépendant.

Mots clés : rétrovirus – HIV – rétrotranscription – ARNt amorce - structure – initiation – résistance – inhibiteur - Mg^{2+}