

Université de Strasbourg  
Ecole Doctorale de la Vie et de la Santé

## THESE DE DOCTORAT

présentée en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

*Discipline* : Sciences du Vivant

*Spécialités* : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Gaëlle MERCENNE

# **ROLE DE LA PROTEINE VIF DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1) DANS LE METABOLISME D'APOBEC3G : FIXATION A L'ARNM ET INHIBITION TRADUCTIONNELLE**

Soutenue le 18 septembre 2009 devant la commission d'examen :

Dr Roland MARQUET

Dr Jean-Christophe PAILLART

Dr Pascale ROMBY

Pr Pierre BOULANGER

Dr Bruno SARGUEIL

Dr Christiane BRANLANT

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examinatrice

Je voudrais d'abord commencer par remercier tous les organismes qui m'ont permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions : Sidaction, ANRS et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Merci aux membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse : Pierre Boulanger, Christiane Branlant, Pascale Romby et Bruno Sargueil.

Je remercie Bernard Ehresmann puis Eric Westhof qui m'ont accueilli dans leur laboratoire ; et bien sur Roland Marquet pour m'avoir fait une place dans son équipe où j'ai pu m'épanouir et m'exprimer !

Merci beaucoup à tous les membres de l'UPR 9002 qui m'ont aidé et ouvert les bras quand je venais vers eux que ce soit pour un conseil ou pour emprunter du matériel.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe de Roland : Delphine, Emilie, Lucile, Céline, Catherine, Serena, Val, JC, Yazan, Simon et Roland qui m'ont accepté telle que je suis et qui ont dû s'adapter à mon sale caractère même si certains diront que je me suis améliorée depuis le DEA ;). Bon courage aux petits nouveaux qui nous ont rejoints il y a peu : Ekram et Cyrille. Je vous souhaite toute la réussite possible dans votre thèse et de profiter de chaque instant passé au labo comme je l'ai fait.

Merci plus particulièrement à Céline et Emilie avec qui j'ai partagées les déboires et les joies de la thèse au jour le jour. Merci également à Lucile avec qui je n'ai communiqué que fort tardivement, tes petits monologues me manqueront.

Merci à Serena qui m'a accompagné dès mon arrivée au labo. Ta bonne humeur, ton amitié et tes encouragements m'ont été attribués en bloc et sans contrepartie. Merci d'avoir été là quand j'avais besoin d'une amie. Je sais que cela ne s'arrêtera même si je franchis l'Atlantique ! D'autant plus avec Alex et Sophie qui sont mes jumeaux de naissance ;).

JC, JC , JC... Merci pour ton encadrement et pour ta présence continue. Même s'il y a quelque fois où j'aurais voulu t'étrangler, tu as largement contribué à faire de cette période de thèse un moment très agréable. J'allais avec plaisir tous les matins au labo car je savais que même si cela ne se passait pas comme prévu, tu serais là à essayer de me remotiver et c'était reparti pour une prep de Vif ! Merci donc pour tout ça et pour tout le reste.

Merci également aux autres équipes du département : celle de Pascale, Philippe D. et de Matteo. Les pauses café et thé, la cantine et les pots occasionnels m'ont permis de souffler entre deux manips et de sortir provisoirement la tête du guidon.

Un merci plus particulier à Guillaume qui, en plus de ces conseils sur l'expression et la purification de Vif, a participé grandement à la bonne humeur du labo. Merci aussi à Philippe Wolff : fais attention, je ne serai plus dans les parages pour te secourir ;). Je voudrais également remercier Philippe Walter et ses walterisations qui ont quelquefois animé fortement les discussions.

Je remercie Pascale pour ses discussions scientifiques et ses petits mails qui ont attiré mon attention et m'ont permis de m'intéresser à d'autres sujets que la mien. Merci pour ta passion et pour ton enthousiasme.

Merci à Matteo qui m'a accompagné à la fin de ma thèse dont au Cold Spring où je garde des souvenirs mémorables. Tu as été là lors de périodes de doute qui accompagnent la recherche de post-doc. Tu m'as aidé à me relever et tu m'as soutenu quand j'en avais besoin. Merci.

Le moment est maintenant venu d'adresser mes *vifs* remerciements à mes amis qui ont comme moi affronté l'épreuve de la thèse !

Tout d'abord, merci aux anciens qui sont partis vers de nouveaux horizons : Eric H, Michaël R et Agnès, Mickaël B, Mathieu R et Béné, Vincent, Luc, Inès, Simon, Yazan, Marc et Etienne. Merci pour les pauses et les verres que nous avons partagés.

Merci à Marie M. Tu as vu, bien qu'ancienne, tu as le droit à ta propre dédicace ! Merci pour les pauses, les restos, les sorties et bien sûr pour toutes les discussions qui vont avec. Merci d'avoir été là, d'avoir été ce que l'on appelle simplement une amie. Où que l'on soit, je suis sûre qu'on arrivera à rester en contact.

Merci à mes amis de PAUSE... Clément, Laurence et Tania que j'ai appris à réellement connaître et à apprécier. Dommage qu'on soit obligé chacun de faire notre route séparément, mais c'est la loi du thésard ! Je vous souhaite bon courage pour la suite, dans la recherche ou ailleurs. Merci également à ma petite Paolita que je regretterai du fond du cœur. Ce sera dur sans toi au quotidien.

Je remercie également toutes les copains du ski et plus particulièrement JC qui se donne à chaque fois du mal pour qu'on puisse tous se retrouver et passer un super week-end chaque

année. Merci à tous ceux qui ont participé et ont contribué à faire de ces week-end des moments de franche rigolade, je pense notamment aux soirées autour d'un fût de bière.

Même si ce n'est pas très correct, je voudrais également remercier la petite protéine Vif qui m'a servi de sujet de thèse. Sa précipitation lors de la purif ou de la dialyse, son agrégation par la suite et toutes les difficultés qui l'entourent m'ont permis d'en apprendre plus que je ne l'aurai espéré et ont fait de cette thèse un apprentissage réel du métier de chercheur.

Merci à Olivier qui a bien voulu se rapatrier jusqu'à Strasbourg pour moi et qui m'accompagne dans toutes les épreuves que ce soit celle qu'a été la thèse ou le reste. Je sais que cela n'a pas été facile pour toi de m'attendre tous les soirs, de faire les courses et la vaisselle mais tu l'as fait et ce sans rechigner (ou presque). Je ne peux malheureusement pas te dire que c'est terminé puisque je veux continuer mais j'espère qu'encore une fois, tu seras là.

Enfin, je ne peux terminer mes remerciements sans remercier les petits trucs qui m'ont aidé à survivre pendant cinq ans. Je veux bien sûr parler de Camel, Kronenbourg, Météor, le bar Happy Hours, l'Or de Maison du Café, le thé des Muses, le chocolat Nestlé et autres...

Merci encore à toutes les personnes que j'ai croisées pendant ma thèse et qui ont contribué à faire ce que je suis aujourd'hui. Merci.

---

# SOMMAIRE

## ABREVIATIONS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. LES VIRUS</b>	<b>1</b>
A. Définition et intérêts	1
B. Une grande diversité et quelques points communs	1
C. Les rétrovirus	2
1. Généralités	2
2. Classification	3
D. Les lentivirus	4
<b>II. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 OU VIH-1</b>	<b>6</b>
A. Infection et SIDA	6
1. Histoire	6
2. Origine et variabilité du VIH-1	6
3. Spectre cellulaire	8
4. Les modes de transmission	9
5. La pandémie de SIDA	9
6. Histoire naturelle de l'infection	10
7. Les traitements antirétroviraux <sup>51</sup>	11
B. Le cycle réplcatif du VIH-1	12
1. La phase pré-intégrative	12
a. Reconnaissance et entrée	13
i. L'attachement	13
ii. La liaison au récepteur et co-récepteur	13
iii. La fusion et l'entrée	13
iv. L'endocytose	13
b. Transcription inverse et décapsidation	15
i. La transcription inverse	15
ii. La décapsidation	16
c. Import et Intégration	17
i. L'import	17
ii. L'intégration	18
2. Phase post-intégrative	20
a. Transcription	20
i. La phase précoce	21
ii. La phase tardive	21

## SOMMAIRE

---

b.	Epissage et export des ARN _____	22
i.	L'épissage _____	22
ii.	L'export _____	23
c.	Traduction _____	23
d.	Assemblage _____	24
i.	Encapsidation de l'ARNg et ancrage à la membrane plasmique de Pr55 <sup>Gag</sup> _____	25
ii.	Incorporation des protéines de l'enveloppe _____	25
e.	Bourgeonnement et maturation _____	26
i.	La libération de la particule virale _____	26
ii.	La maturation de la particule virale _____	26
III.	INTERACTION HOTE / VIH-1 _____	28
A.	Protéines cellulaires impliquées dans le cycle viral _____	28
1.	Les protéines cellulaires interagissant avec le VIH-1 dans la cellule _____	28
2.	Les protéines et ARN cellulaires encapsidés dans le virion _____	29
B.	Défense cellulaire et évasion virale _____	30
1.	Défense cellulaire _____	30
a.	Réponse immunitaire _____	30
i.	Défense immunitaire innée _____	30
ii.	Réponse immunitaire adaptative _____	31
•	Présentation des antigènes viraux _____	32
•	La différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> 108 _____	32
•	La réponse humorale _____	32
•	La réponse adaptative cellulaire _____	33
b.	Défense cellulaire activée suite à la reconnaissance d'un ARN double brin _____	33
i.	Famille des PRR 23,72 _____	33
ii.	Les protéines PKR et 2'-5' oligoadénylate synthétase 72 _____	34
•	La protéine PKR _____	34
•	La protéine 2'-5'OAS _____	35
iii.	Mécanisme de l'ARN interférence ou silencing 57,148 _____	35
c.	Différentes cibles, différentes stratégies mais un but commun 2,62 _____	36
i.	Les virus contrecarrent la défense immunitaire innée. _____	36
ii.	Inhibition de la réponse adaptative _____	37
iii.	Evitement de l'apoptose _____	38
iv.	Inhibition de l'ARN interference _____	38
d.	Le VIH-1 contourne la réponse immunitaire _____	39
i.	Tat et Nef contre le système immunitaire classique _____	40
•	La protéine Tat _____	40
•	La protéine Nef _____	41
ii.	Les facteurs de restriction anti-rétroviraux _____	41
•	TRIM5 $\alpha$ , cyclophiline A et CA _____	41
	La protéine TRIM5 $\alpha$ _____	42
	La protéine de capsid 71 _____	43

## SOMMAIRE

---

 Mécanisme antiviral et évasion _____	43
• Téthérine et Vpu _____	45
 La protéine Téthérine _____	45
 La protéine Vpu <sup>161</sup> _____	46
 Mécanisme de restriction et évasion virale _____	47
• APOBEC3G et Vif _____	48
 <i>Revue : Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 Viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC3G and APOBEC3F restriction factors</i> _____	49
 La protéine APOBEC3G _____	50
 La protéine virale Vif _____	55
 Mécanisme antiviral et évasion. _____	57
• De nouveaux facteurs antirétroviraux ? _____	59
iii. Une nouvelle stratégie pour inhiber la réplication du VIH-1 ? _____	61
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE _____</b>	<b>63</b>
<b>MATERIELS ET METHODES _____</b>	<b>65</b>
I. MATERIELS _____	65
A. Plasmides _____	65
1. Les plasmides utilisés pour synthétiser les ARN d'A3G et utilisés pour les expériences de traduction _____	65
2. Les vecteurs pGL3 utilisés pour les tests luciférase _____	66
3. Les plasmides permettant l'expression de la protéine Vif _____	67
B. Cellules _____	67
C. Anticorps _____	68
II. METHODES _____	68
A. Surproduction et purification des protéines Vif WT et Vif AALA _____	68
1. Surproduction _____	68
2. Purification _____	68
3. Crible des conditions de dialyse _____	69
B. Etude de la fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G _____	71
1. Rétention sur filtres de nitrocellulose _____	71
2. Spectroscopie de fluorescence _____	71
3. Cartographie en solution et empreinte _____	72
a. Les sondes chimiques _____	72
b. Les sondes enzymatiques _____	72
c. Détection des modifications _____	73
C. Caractérisation des protéines Vif WT et AALA _____	75

## SOMMAIRE

---

1. Dichroïsme circulaire _____	75
2. Chromatographie d'exclusion de taille _____	75
3. Diffusion dynamique de la lumière _____	76
D. Etude de la traduction d'A3G en présence de Vif _____	76
1. Transcription / traduction in vitro _____	76
2. Transfections et tests luciférase _____	77
a. Expression des vecteurs pGL3 A3G dans les cellules HEK-293T _____	77
b. Tests luciférase _____	77
3. Transfections, Western blots et analyse du profil des polysomes _____	77
a. Transfections avec les vecteurs pCMV A3G _____	77
b. Western blots _____	78
c. Analyse du profil des polysomes _____	79
i. Analyse des protéines _____	79
ii. Analyse des ARN cellulaires _____	79
• Extraction des ARN cellulaires _____	79
• RT-PCR _____	80
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSIONS _____</b>	<b>81</b>
I. ETUDE DE LA FIXATION DE VIF SUR L'ARNM D'A3G _____	81
A. Introduction et objectif _____	81
B. Résultats _____	82
1. Purification des protéines Vif WT et AALA _____	82
2. Fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G et rôle du domaine de multimérisation _____	84
a. Rétention sur filtres de nitrocellulose _____	84
b. Spectroscopie de fluorescence _____	86
c. Cartographie en solution et empreinte _____	88
i. La région 5'UTR _____	88
ii. La région 3'UTR _____	90
C. Article : Vif lie l'ARNm d'A3G et inhibe sa traduction _____	92
D. Discussion _____	93
1. La protéine Vif fixe l'ARNm d'A3G _____	93
a. Le domaine de multimérisation est impliqué dans la fixation de Vif aux ARN _____	94
b. Les agrégats de Vif sont-ils fonctionnels ? _____	94
2. Les régions UTR de l'ARNm d'A3G sont très structurées _____	95
II. CARACTERISATION DES PROTEINES VIF SAUVAGE ET MUTEE DANS LE DOMAINE DE MULTIMERISATION _____	97
A. Introduction et objectif _____	97
B. Résultats _____	98

## SOMMAIRE

---

1.	Analyse de la structure secondaire des protéines Vif WT et AALA par CD _____	98
2.	Etude de l'état d'assemblage de Vif sauvage et du mutant AALA _____	99
a.	Chromatographie d'exclusion _____	99
b.	Diffusion dynamique de la lumière _____	100
C.	Discussion _____	102
1.	La protéine Vif : une protéine intrinsèquement non structurée ? _____	102
2.	La protéine Vif forme des multimères : implication du motif PPLP _____	103
III.	ETUDE DE LA TRADUCTION D'A3G EN PRESENCE DE VIF _____	105
A.	Introduction et objectif _____	105
B.	Résultats _____	106
1.	Etude de la traduction d'A3G en présence de Vif _____	106
a.	Analyse in vitro _____	106
b.	Etudes ex vivo _____	110
i.	Test luciférase _____	110
ii.	Western blot _____	112
2.	Analyse du profil de polysomes sur l'ARNm d'A3G en présence de Vif _____	114
a.	Etude des protéines _____	115
b.	Etude des ARN _____	117
i.	ARNr _____	117
ii.	ARNm d'A3G _____	118
C.	Discussion _____	120
1.	Vif inhibe la traduction d'A3G. _____	120
a.	Les régions non traduites de l'ARNm d'A3G ne sont pas suffisantes pour permettre une inhibition complète de la traduction. _____	120
b.	La région 5'UTR associée à la séquence codante d'A3G est essentielle pour l'inhibition traductionnelle _____	120
c.	Le domaine de multimérisation intervient peu ou pas dans l'inhibition traductionnelle _____	122
2.	Etude du mécanisme de régulation de la traduction d'A3G en présence de Vif _____	123
a.	Localisation des polysomes et des ribosomes 80S _____	123
b.	La protéine A3G s'associe avec les ribosomes ? _____	124
c.	La protéine Vif stimule l'assemblage de l'ARNm d'A3G en complexes de haute masse _____	124
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES _____</b>		<b>126</b>
I.	VIF : UNE PROTEINE VIRALE FLEXIBLE ET MULTIMERIQUE _____	126
A.	Vif : une protéine intrinsèquement non structurée ? _____	126
B.	Importance du motif PPLP pour la formation de multimères de la protéine Vif _____	127
II.	VIF LIE L'ARNM D'A3G ET INHIBE SA TRADUCTION _____	127

## SOMMAIRE

---

A. Identification des résidus présents sur l'ARNm d'A3G essentiels à la fixation et à l'inhibition traductionnelle par la protéine Vif _____	128
B. Etude des domaines de la protéine Vif responsables de l'inhibition de la traduction d'A3G _____	129
III. VIF STIMULE L'ASSEMBLAGE DE L'ARNM D'A3G EN COMPLEXE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE _____	129
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXES _____</b>	<b>148</b>

---

## INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

### ✧ Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les différents virus infectant l'homme .....	2
<b>Tableau 2</b> : Exemples de stratégies virales permettant de contrecarrer la défense immunitaire innée.....	36
<b>Tableau 3</b> : Exemples de mécanismes employés par les virus pour inhiber la réponse immunitaire adaptative .....	37
<b>Tableau 4</b> : Exemples de voies utilisées par les virus pour empêcher l'apoptose .....	38
<b>Tableau 5</b> : Les protéines humaines A3 sont actives contre plusieurs rétrovirus, virus et rétrotransposons .....	59
<b>Tableau 6</b> : Amorces utilisées pour amplifier différentes régions d'A3G.....	66
<b>Tableau 7</b> : Conditions de renaturation de la protéine Vif AALA.....	70

### ✧ Figures

<b>Figure 1</b> : Organisation des génomes rétroviraux.....	3
<b>Figure 2</b> : Phylogénie des rétrovirus.....	4
<b>Figure 3</b> : Arbre phylogénétique des rétrovirus humains et de primates .....	7
<b>Figure 4</b> : Planisphère de la distribution des sous-types du VIH-1 en 2008.....	8
<b>Figure 5</b> : Nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH (estimations 2007).....	10
<b>Figure 6</b> : Evolution du SIDA chez les individus ne recevant pas de traitement antiviral .....	11
<b>Figure 7</b> : Etapes précoces du cycle répliatif du VIH-1.....	12
<b>Figure 8</b> : Schéma du contact entre une cellule dendritique et un lymphocyte T CD4 <sup>+</sup> .....	14
<b>Figure 9</b> : Transcription inverse de l'ARNg du VIH-1.....	16
<b>Figure 10</b> : Translocation du PIC dans le noyau et intégration.....	17
<b>Figure 11</b> : Intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire.....	19
<b>Figure 12</b> : Etapes tardives du cycle répliatif du VIH-1.....	20
<b>Figure 13</b> : Représentation du LTR 5' sur l'ADN proviral intégré dans le génome de l'hôte.....	21
<b>Figure 14</b> : ARN messagers du VIH-1 et modèle de structure secondaire de la région 5'UTR .....	22
<b>Figure 15</b> : Export des ARNm non-, mono- et multi-épissés du VIH-1 .....	23
<b>Figure 16</b> : Bourgeonnement de la particule virale de la membrane plasmique .....	26

---

<b>Figure 17</b> : Maturation des particules virales. ....	27
<b>Figure 18</b> : Voies dans lesquelles sont impliquées les protéines cellulaires interagissant avec les protéines virales du VIH-1 .....	29
<b>Figure 19</b> : Les différents acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative .....	31
<b>Figure 20</b> : Mécanismes de la PKR et de la 2'-5'OAS.....	34
<b>Figure 21</b> : Mécanisme de l'ARN interférence médié par la reconnaissance d'un ARNdb ...	35
<b>Figure 22</b> : Organisation génétique du gène TRIM5 chez l'homme et organisation de la protéine TRIM5 $\alpha$ en domaines .....	42
<b>Figure 23</b> : Structure de la protéine de capsid mature et du core viral .....	43
<b>Figure 24</b> : Domaines de la protéine TRIM-Cyp et structure de la CypA lié au NTD de CA	44
<b>Figure 25</b> : Clichés de microscopie électronique de la surface de cellules surexprimant la tetherine et infectées par un virus WT ou un virus délété de Vpu .....	47
<b>Figure 26</b> : Organisation de la protéine A3G en domaines .....	51
<b>Figure 27</b> : Modélisation d'un dimère d'A3G .....	52
<b>Figure 28</b> : Inhibition de la rétrotransposition des rétroéléments LINE1 et SINE par les protéines humaines A3. ....	55
<b>Figure 29</b> : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine Vif et structure cristallographique de la BC box de la protéine Vif complexée avec l'ElonginB et l'ElonginC.	57
<b>Figure 30</b> : Spécificité de coupure des sondes enzymatiques et chimiques utilisées pour les études de cartographie et d'empreinte .....	73
<b>Figure 31</b> : Principes de la cartographie en solution et de la technique d'empreinte .....	74
<b>Figure 32</b> : Dichroïsme circulaire de la liaison peptidique dans une hélice $\alpha$ , un feuillet $\beta$ et une structure désordonnée.....	75
<b>Figure 33</b> : Spectre d'absorption à 280 nm des protéines purifiées sur colonne Ni-NTA et analyse des fractions éluées à pH 5 sur gel SDS-PAGE 12,5% .....	83
<b>Figure 34</b> : Courbes d'affinité des protéines Vif WT et AALA pour les différents fragments de l'ARNm d'A3G .....	85
<b>Figure 35</b> : Résultats des expériences analysées avec l'équation de MacGhee et von Hippel et représentation de Scatchard des données de fixation .....	87
<b>Figure 36</b> : Modèle de la structure secondaire de la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G.....	89
<b>Figure 37</b> : Modèle de la structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm d'A3G.....	91
<b>Figure 38</b> : Spectres de dichroïsme circulaire des protéines Vif WT et AALA .....	99
<b>Figure 39</b> : Elution par chromatographie d'exclusion des protéines Vif WT et AALA.....	100
<b>Figure 40</b> : Spectre de DLS des protéines Vif WT et AALA .....	101
<b>Figure 41</b> : Transcriptions / traductions <i>in vitro</i> d'A3G, A3G $\Delta$ UTR, A3G $\Delta$ 5'UTR, A3G $\Delta$ 3'UTR en présence d'AspRS, de Vif WT ou Vif AALA .....	107

<b>Figure 42 :</b> Comparaison du taux de protéines A3G synthétisées lorsque son ARNm est complet ou délété des deux régions UTR en présence de Vif WT ou d'AspRS et de DMSO ou de MG132 .....	108
<b>Figure 43 :</b> Comparaison du taux de protéines A3G en présence de Vif WT ou Vif AALA par rapport à A3G produites en présence de l'AspRS .....	109
<b>Figure 44 :</b> Variation du signal luciférase en fonction de la présence des protéines Vif WT ou AALA.....	111
<b>Figure 45 :</b> Variation de la luminescence des vecteurs contrôle transfectés en présence de Vif WT .....	112
<b>Figure 46 :</b> Western blot et quantification des transfections de différentes constructions permettant l'expression d'A3G en absence ou présence de Vif et en absence ou en présence d'ALLN .....	113
<b>Figure 47 :</b> Profil d'absorption type obtenu lors du prélèvement des fractions d'un gradient de sucrose continu ultracentrifugé après dépôt d'un lysat cellulaire.....	115
<b>Figure 48 :</b> Western blots des fractions issues des gradients de sucrose de cellules transfectées avec le plasmide permettant la traduction d'A3G à partir de l'ARNm complet en absence et en présence de Vif .....	116
<b>Figure 49 :</b> Western blots des fractions des gradients de sucrose correspondant aux cellules transfectées avec A3G $\Delta$ UTR en absence ou en présence de Vif .....	117
<b>Figure 50 :</b> Gel agarose type montrant la distribution des ARNr dans les gradients de sucrose .....	118
<b>Figure 51 :</b> Gels agarose des RT-PCR effectuées sur les fractions des cellules transfectées avec A3G en absence ou en présence de Vif.....	119
<b>Figure 52 :</b> Gel agarose des RT-PCR effectuées sur les cellules transfectées avec A3G $\Delta$ UTR en absence ou en présence de Vif.....	119

## ABREVIATIONS

2'-5'OAS	2'-5'-oligoadénylate synthétase
A	Adénine
A3G	APOBEC3G
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNdb	ADN double brin
AID	Activation-Induced Deaminase
ALLN	N-Acétyl-Leucine-Leucine-Norleucine-CHO
ALV	Avian Leukosis Virus
APC	Antigen Presenting Cell
ApoB	Apolipoprotéine B
APOBEC	APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme, Catalytic polypeptide
ARN	Acide RiboNucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNsb	ARN simple brin
ARNt	ARN de transfert
ARNv	ARN viral
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosine
CA	CApside
CAEV	Caprine Arthritis-Encephalitis Virus
CAML	CAlcium Modulating cyclophilin Ligand
CD	Circular Dichroïsm
CMCT	(1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoéthyl) métho-p-Toluène sulfonate) Carbodiimide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	CytoMegalovirus
cpm	coup par minute
CRF	Circulating Recombinant Form
CTD	C-Terminal Domain
CypA	Cyclophiline A
Da	Dalton

## ABREVIATIONS

---

DC	Dendritic Cell
DCP	DeCapping Protein
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grapping Non-integrin
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMS	Diméthyl Sulfate
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNase	endoDésoxyriboNucléase
dNTP	désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate
DO	Densité Optique
DOC	DésOxyCholate de sodium
DTT	DiThioTréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétate
EIAV	Equine Infectious Aneamia Virus
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FDA	Food and Drug Administration
FIV	Feline Immunodeficiency Virus
FMRP	Fragile X Mental Retardation syndrome Protein
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	gravité
G	Guanine
gag	group antigen specific
GPI	GlycoPhosphatidyl Inositol
h	heure
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C virus
HEK	Human Embryonic Kidney
HMM	High Molecular Mass
HSV	Herpès Simplex Virus
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
IAP	Intracisternal A Particle
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IN	INtégrase

## ABREVIATIONS

---

IPTG	IsoPropyl ThioGalactopyranoside
kb	kilobase
l	Litre
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
LMM	Low Molecular Mass
LTc	Lymphocyte T cytotoxique
LTh	Lymphocyte T helper
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molaire
MA	MAtrice
MG132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MHR	Major Homology Region
miARN	microARN
min	minute
MLV	Murine Leukemia Virus
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MOPS	3-(N-MOrpholino)PropaneSulfonic acid
N	Normal
NC	NucléoCapside
Nef	Negative factor
NES	Nuclear Export Signal
NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Signal
nt	nucleotide
NTD	N-Terminal Domain
ORF	Open Reading Frame
P bodies	Processing bodies
PABP	PolyA Binding Protein
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
pb	paire de bases
PBS	Primer Binding Site ou Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylene Glycol
PFV	Primate Foamy Virus
pH	potentiel Hydrogène
PIC	Pre-Integration Complex

## ABREVIATIONS

---

PKA	Protéine Kinase A
PKR	dsRNA-activated Protein Kinase R
pol	polymerase
PPT	PolyPurine Tract
Pr	Précurseur
PR	PRotéase
PRR	Pattern Recognition Receptor
qsp	quantité suffisante pour
Rev	Regulator of expression of viral proteins
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RLH	Retinoic acid-inducible gene (RIG-I)-Like RNA Helicases
RNase	endoRiboNucléase
RNP	RiboNucléoProtéique
RRE	Rev Responsive Element
RS	tRNA Synthetase
RT	Reverse Transcriptase
RTC	Reverse Transcription Complex
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SG	Stress Granules
siARN	small interfering ARN
SIDA	Syndrôme de l'ImmunoDéficiency Acquis
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SNC	Système Nerveux Central
SRP	Signal Recognition Particle
T	Thymine
TAR	Trans-Acting Responsive element
Tat	Transcriptional transactivator
TCA	acide TriChloroAcétique
TEM	Tetraspanins-Enriched Microdomain
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis-(2-Pyridilmethyl) EthyleNediamine
TRBP	TAR RNA Binding Protein
TRIM	TRIPartite Motif protein
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
U	Uracile

## ABREVIATIONS

---

UTR	UnTranslated Region
V	Volt
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein
Vif	Virion infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP	Virus-Like Particle
VMV	Visna/Maedi Virus
Vpr	Viral protein r
VPS	Vacuolar Protein Sorting
Vpu	Viral protein u
VSR	Viral Suppressor RNA silencing
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZAP	Zinc-finger Antiviral Protein
ZIN	Zinc finger protein Inhibiting NFκB
ZRE	ZAP-Responsive Element

---

# INTRODUCTION

## I. Les virus

### A. Définition et intérêts

Les virus sont des particules subcellulaires, infectieuses, des parasites obligatoires nécessitant la machinerie cellulaire d'un hôte pour se répliquer. Les virus infectent les trois règnes du vivant (eucaryotes, bactéries et archées) ; ils sont responsables de beaucoup de maladies et sont la première cause de mortalité dans le monde chez l'homme.

Cependant, les virus sont également des outils importants de la biologie moléculaire et cellulaire. En effet, les premiers travaux de biologie moléculaire et de nombreuses avancées ont été réalisés grâce à leur étude : invention de la PCR et de la mutagenèse dirigée, découverte du mécanisme de l'ARN interférence, développement de la thérapie génique à l'aide de vecteurs viraux, découverte des virus oncolytiques se multipliant spécifiquement dans les cellules tumorales et représentant une nouvelle stratégie pour lutter contre le cancer <sup>171</sup>...

### B. Une grande diversité et quelques points communs

Les virus sont présents sous toutes les latitudes de notre planète ; leur nombre est estimé à  $10^{31}$  <sup>90</sup>. Ils sont extrêmement divers dans leur morphologie, leur stratégie répliquative, leur génome ou encore dans le type d'organisme infecté. Les virus peuvent être néanmoins classés en fonction de la nature de leur acide nucléique (ADN ou ARN, simple ou double brin), de sa polarité (positive ou négative), de sa fragmentation ou non et en fonction de la présence ou non d'une enveloppe entourant la capsid virale (*tableau 1*).

Lorsqu'un virus parasite un être vivant, le cycle d'infection se décompose en deux grandes phases : une phase intracellulaire où les constituants du génome sont fabriqués et une phase extracellulaire qui permet sa dissémination vers d'autres cellules ; dans cette dernière, le virus est sous forme de particules virales ou virions. A l'exception des rétrovirus contenant deux copies homologues d'un ARNs, tous les virus sont haploïdes.

Génome		Particule virale	Famille
ADN	bicaténaire	Enveloppée	Poxviridae Herpesviridae Hepadnaviridae
		Nue	Adenoviridae Papovaviridae
	monocaténaire	Nue	Parvoviridae
ARN	monocaténaire (+)	Enveloppée	Flaviviridae Togaviridae Coronaviridae Retroviridae
		Nue	Picornaviridae Caliciviridae
	monocaténaire (-) et non segmenté	Enveloppée	Rhabdoviridae Filoviridae Paramyxoviridae
			Orthomyxoviridae (8 segments) Arenaviridae (2 segments) Bunyaviridae (3 segments)
	monocaténaire (-) et segmenté		
bicaténaire segmenté	Nue	Reoviridae (10 segments)	

Tableau 1 : Les différents virus infectant l'homme

## C. Les rétrovirus

### 1. Généralités

Les rétrovirus constituent une famille de virus très diversifiée qui infectent les vertébrés et les invertébrés. Ce sont des virus enveloppés possédant un génome à ARN monocaténaire de polarité positive, coiffé en 5', polyadénylé en 3' et présent en deux copies de 7 à 10 kb. L'ARN génomique (ARNg) est converti en ADNdb lors du cycle réplcatif par la Reverse Transcriptase (RT) virale. Après import dans le noyau, l'intégrase virale (IN) permet l'intégration du génome viral (ou provirus) dans l'ADN de la cellule hôte.

On retrouve chez tous les rétrovirus trois gènes : *gag*, *pol* et *env* codant respectivement les protéines de structure (MA, CA et NC), enzymatiques (PR, RT et IN) et d'enveloppe (gp41 et gp120). L'ADN proviral présente des séquences dupliquées à ses extrémités, les LTR (Long Terminal Repeat). Contrairement aux rétrovirus simples qui ne possèdent que les gènes *gag*, *pol* et *env*, les rétrovirus complexes possèdent, en plus, des phases de lecture ouvertes codant des protéines auxiliaires et régulatrices (*figure 1*). Les LTR et les gènes *gag* et *pol*

sont également retrouvés chez les rétrotransposons à LTR, rétroéléments endogènes et mobiles très semblables aux rétrovirus par leur cycle répliatif.

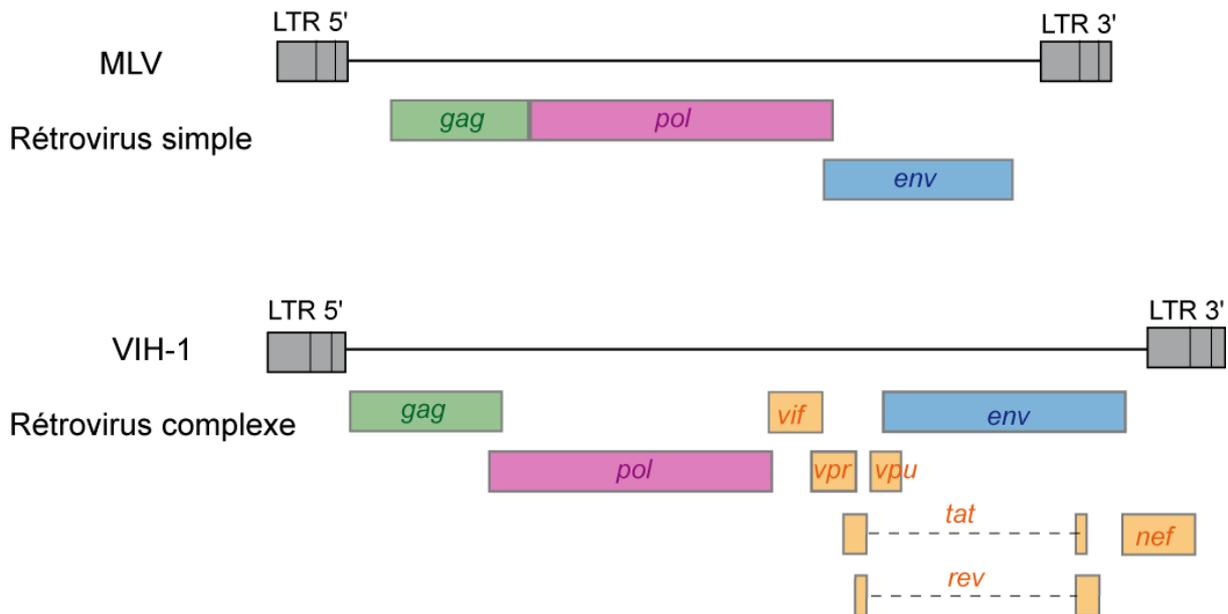


Figure 1 : Organisation des génomes rétroviraux. La position relative des différents cadres de lecture ainsi que les répétitions terminales (LTR, Long Terminal Repeats) du virus de la leucémie murine (MLV, rétrovirus simple) et du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1, rétrovirus complexe) sont représentées.

Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le diamètre est compris entre 80 et 120 nm. La bicouche phospholipidique qui entoure la particule virale provient d'une partie de la membrane plasmique de la cellule infectée emportée lors de l'étape du bourgeonnement. Elle est enrichie par les glycoprotéines virales de l'enveloppe, de surface (gp120) et transmembranaire (gp41) produites après clivage du précurseur Env par une endoprotéase cellulaire. L'enveloppe protège la capsid interne ou « core » qui renferme le génome viral complexé à la protéine de nucléocapside (NC) ainsi que les autres constituants qui permettront un nouveau cycle répliatif (ARNt amorce, RT, PR, IN...).

## 2. Classification

Le haut degré de conservation de séquence de la RT virale a permis au Comité International sur la Taxonomie des Virus d'établir un lien phylogénique et de classer les rétrovirus en 7 genres. Ces genres se divisent ensuite en deux catégories selon la présence dans le génome viral d'autres gènes régulateurs et / ou accessoires (*figure 2*).

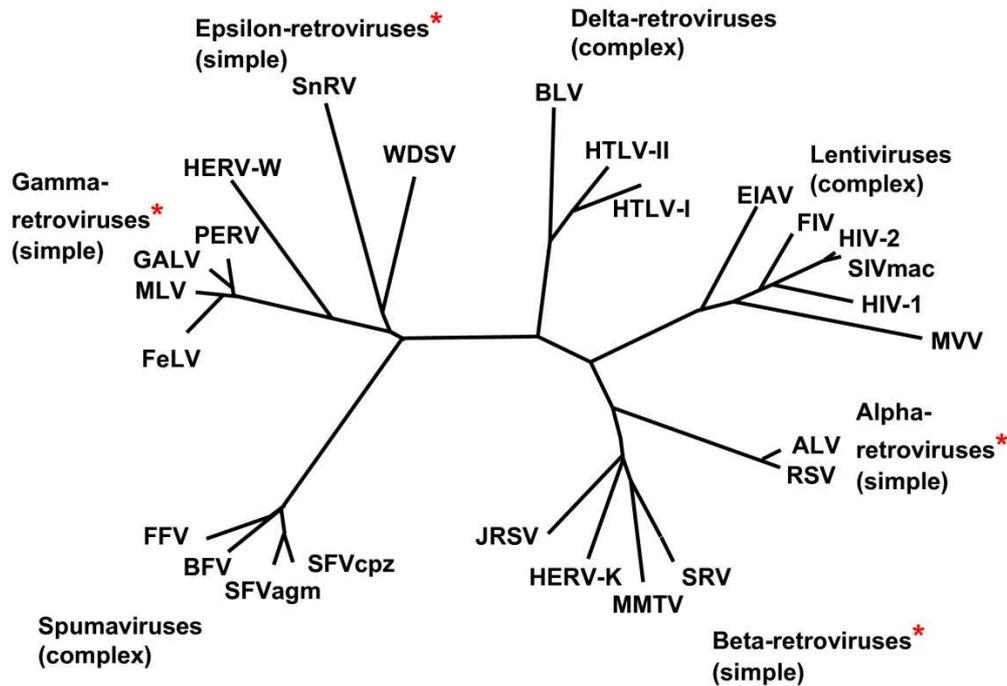


Figure 2: Phylogénie des rétrovirus. Les genres qui incluent des rétrovirus endogènes sont marqués d'un astérisque rouge. (Source <sup>226</sup>)

## D. Les lentivirus

Les lentivirus (signifiant virus lent, en latin) sont des rétrovirus complexes qui causent une infection persistante et progressive. Cinq sérogroupes sont définis en fonction de l'hôte auquel ils sont associés : primates, chevaux, chats, chèvres / moutons et bétail.

Les particules virales ont un diamètre de 80 à 100 nm et laissent apparaître un core de forme conique. Leur génome est de grande taille (supérieur à 9 kb), dimérique et représente 2 % du virion en poids. Les protéines retrouvées dans le virion sont essentiellement les protéines virales structurales et d'enveloppe (gp41 et gp120 majoritaires) et non structurales (RT, IN et PR majoritaires), elles représentent 60 % de la masse totale. Les lipides, qui constituent 35 % de la masse du virion, se situent au niveau de l'enveloppe ; ils proviennent de la membrane plasmique de la cellule hôte.

Les lentivirus peuvent être divisés en deux groupes selon leur tropisme cellulaire : les virus EIAV, CAEV et VMV qui infectent seulement la lignée monocyte / macrophage et les virus VIH, SIV et FIV capables d'infecter également les lymphocytes T porteur de l'antigène de surface CD4. Les lentivirus rendent l'hôte immunodéprimé en provoquant la mort des

cellules immunitaires infectées, ce qui favorise le développement d'infections opportunistes. Cette maladie est appelée Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée ou SIDA.

Bien que faisant partie de la classe des lentivirus, le virus EIAV fait exception. En effet, malgré une réplication et une variation antigénique rapide du rétrovirus, la plupart des animaux arrivent à contrôler l'infection en restant à un stade chronique et empêcher la progression de la maladie au stade symptomatique, c'est-à-dire au SIDA.

## II. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 ou VIH-1

### A. Infection et SIDA

#### 1. Histoire

Au début des années 1980, une infection particulière avec des manifestations pathologiques telles que des pneumonies ou des sarcomes de Kaposi (une forme très rare de cancer de la peau) est associée à un affaiblissement important du système immunitaire. Le terme SIDA fait alors son apparition pour désigner cette maladie. L'agent responsable est isolé en 1983 par les équipes des professeurs Montagnier et Gallo<sup>13,69</sup> mais ce n'est qu'en 1986 que le nom de VIH ou Virus de l'ImmunoDéficience Humaine (HIV en anglais) est adopté.

La même année, un autre virus, le VIH de type 2 (VIH-2), est identifié chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest<sup>44</sup>. Bien que différent du VIH-1, le VIH-2 en est proche avec 42 % d'homologie de séquence au niveau de leur génome.

#### 2. Origine et variabilité du VIH-1

Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier la source du VIH comme étant très probablement simienne. Alors que le VIH-1 est proche du SIV infectant une sous-espèce de chimpanzés (SIV<sub>cpz</sub>), le VIH-2 est plus semblable au SIV<sub>smm</sub> (infectant les sooty mangabeys) et au SIV<sub>mac</sub> (infectant les macaques) (*figure 3*).

Les explications pour le passage du virus de l'immunodéficience du singe à l'homme ne manquent pas. Souvent pris comme animaux de compagnie ou chassés comme gibier, les contacts par morsures ou par blessures lors du dépeçage des animaux suffisent à expliquer comment ces virus ont pu infecter l'homme.

Une des caractéristiques du VIH est une très grande variabilité ; on parle de quasi-espèce. Cette variabilité s'explique par un taux d'erreur très important de la RT ( $3 \cdot 10^{-5}$  par cycle de réplication)<sup>140</sup>, par un taux de production de nouvelles particules virales très élevé ( $10^9$ - $10^{10}$  virions par jour/par individu)<sup>169</sup> et par le processus de recombinaison.

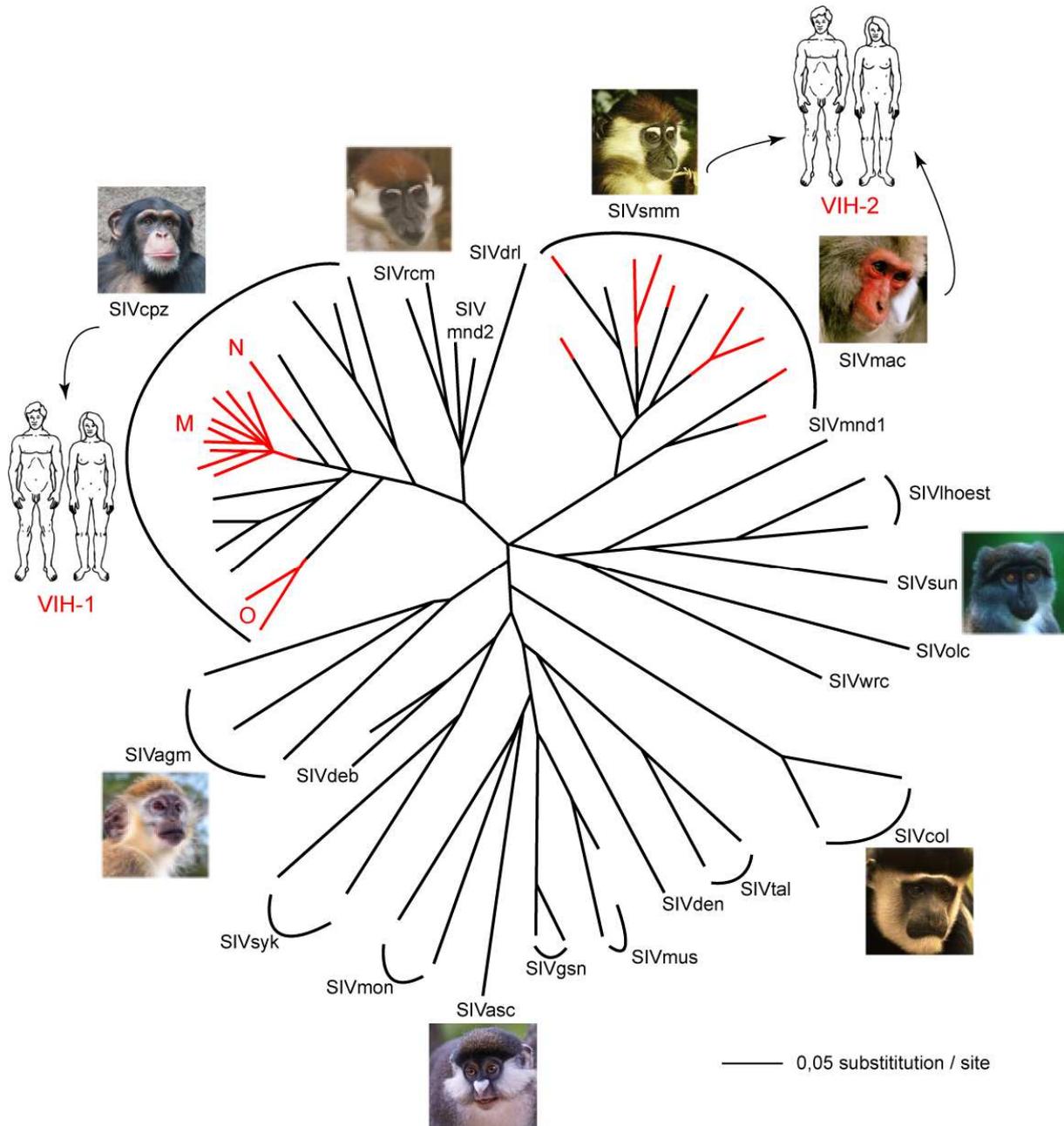


Figure 3 : Arbre phylogénétique des rétrovirus humains (VIH-1 et VIH-2) et de primates (SIV). (Adapté de <sup>98</sup>)

Les VIH-1 et -2 sont classés en plusieurs groupes puis sous-types qui diffèrent notamment par le gène de l'enveloppe. Le VIH-1 est classé en trois groupes présentant au moins 30 % de dissemblance entre eux : M (Major), O (Outlier) et N (Non-M, Non-O). Le groupe M prédomine et est le plus répandu dans le monde. Ce groupe comprend neuf sous-types avec 15-20 % de différence (A, B, C, D, F, G, H, J et K) auxquels s'ajoutent plusieurs formes recombinantes (CRF, Circulating Recombinant Form) (*figure 4*). Les groupes O et N sont rares et sont retrouvés quasi-exclusivement en Afrique Centrale. Le VIH-2 infecte

principalement les pays d'Afrique Occidentale et est composé de sept sous-types (A, B, C, D, E, F et G).

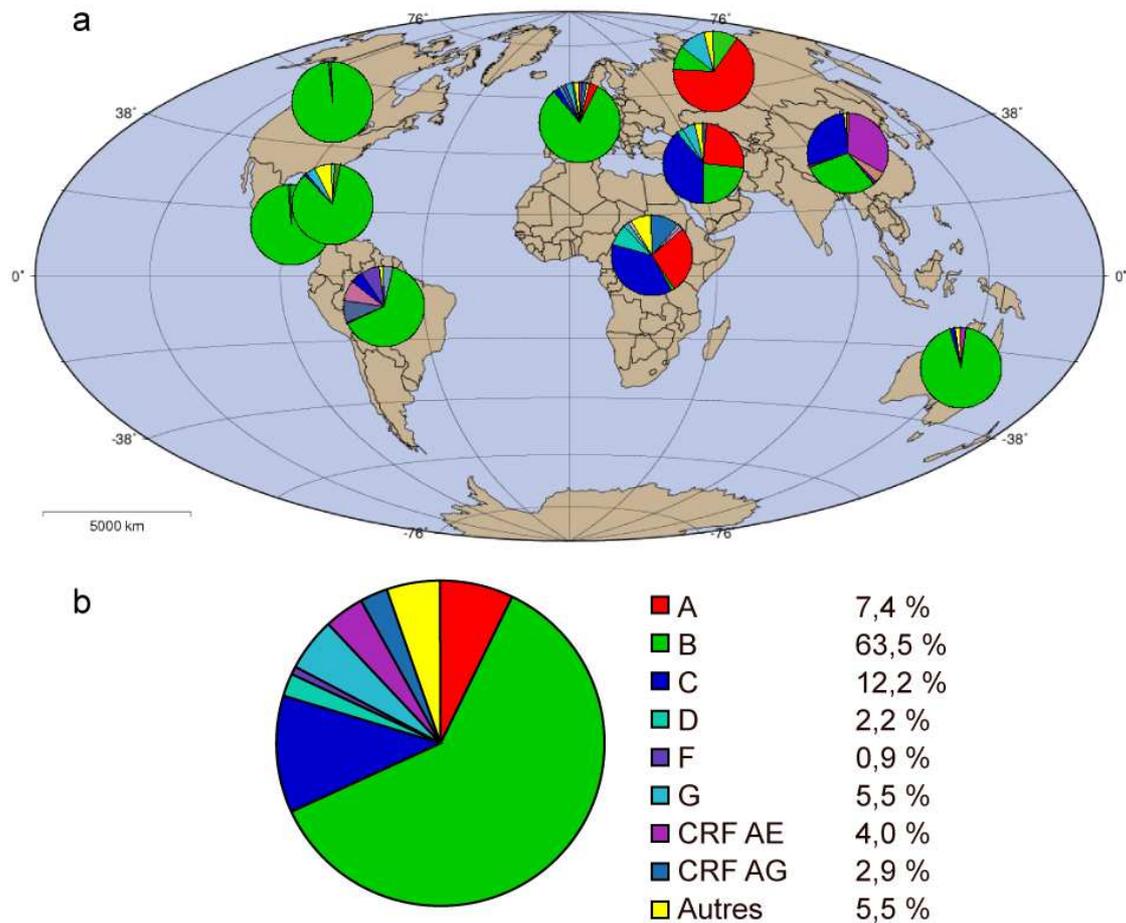


Figure 4: (a) planisphère de la distribution des sous-types du VIH-1 en 2008. (b) diagramme résumant la répartition des sous-types du VIH-1 dans le monde. (Source : laboratoire national de Los Alamos)

### 3. Spectre cellulaire

Le VIH-1 infecte en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, piliers du système immunitaire mais d'autres cellules sont atteintes : les monocytes / macrophages, les cellules dendritiques (DC, Dendritic Cell), les cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux. Les sites primaires de réplication virale comprennent l'intestin, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (la rate et les nœuds lymphatiques). Ces tissus constituent les réservoirs des monocytes et lymphocytes infectés qui seront ensuite distribués vers les autres organes où les monocytes se différencient en macrophages et les lymphocytes sont activés. La différenciation et / ou l'activation de ces cellules induit l'expression des gènes viraux et la production de virus.

L'infection du Système Nerveux Central (SNC) est très précoce<sup>52</sup> bien que l'apparition de complications neurologiques soit tardive. L'entrée dans le SNC nécessite le passage de la barrière hémato-encéphalique que les inhibiteurs antirétroviraux actuels franchissent très faiblement<sup>217</sup>. Ainsi, les cellules du SNC constituent également un réservoir pour le VIH<sup>217</sup>. Les principales cibles sont les cellules microgliales qui représentent les macrophages résidents.

#### 4. Les modes de transmission

Le VIH peut être isolé de la plupart des liquides biologiques : sang, sperme, sécrétions vaginales, lait maternel, salive, larmes, liquide céphalo-rachidien ou encore urine. Bien qu'enveloppé, le VIH est un virus fragile qui nécessite des contacts humains rapprochés pour être transmis. Les modes de contamination se font :

- Majoritairement par voie sexuelle
- Par voie veineuse lors d'échange de seringues (toxicomanie) ou par transfusions sanguines (avant dépistage des produits sanguins)
- Par voie materno-fœtale. La transmission du virus peut se faire *in utero* durant la grossesse mais surtout au moment de l'accouchement. La contamination par le lait est également possible lorsque la mère nourrit son enfant, notamment si elle est phase de primo-infection.

#### 5. La pandémie de SIDA

Depuis les premiers cas recensés d'infection par le VIH en 1981, l'épidémie est devenue mondiale. Jusqu'à ce jour, plus de 30 millions de personnes sont mortes du SIDA (environ 6000 décès par jour actuellement). Plus de 7400 personnes, dont 1000 enfants de moins de 15 ans, sont infectées par jour et le nombre de contaminations reste supérieur au nombre de décès dus au SIDA. Selon les dernières estimations de l'OMS / ONUSIDA, environ 33 millions de personnes vivent avec le VIH (*figure 5*), le nombre de nouvelles infections s'élève à 2,7 millions et plus de 2 millions de personnes sont décédées du SIDA en 2007 .

Il existe des inégalités géographiques marquantes dans la prévalence de l'infection. En effet, 67 % des personnes vivant avec le VIH habitent dans les pays de l'Afrique subsaharienne, or cette population est celle qui a le plus de difficultés à accéder aux traitements rétroviraux. On estime que seulement 3 millions de personnes sont sous traitement antirétroviral sur 11 millions qui en ont besoin.

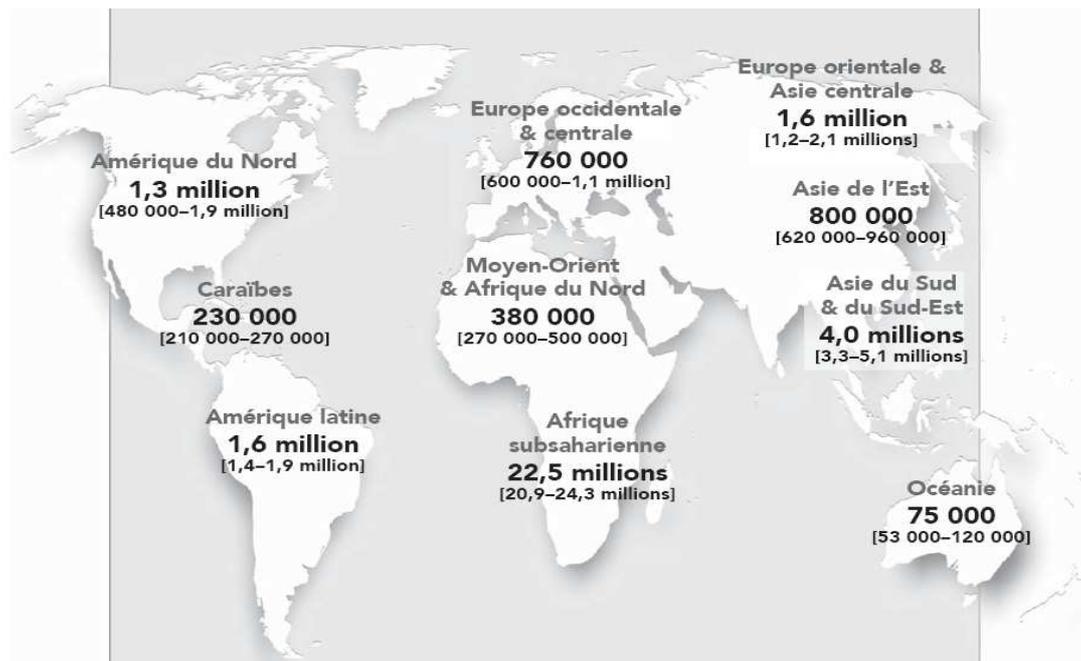


Figure 5 : Nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH (estimations 2007). (Source : OMS / ONUSIDA)

## 6. Histoire naturelle de l'infection

L'évolution du SIDA s'effectue en trois phases (*figure 6*) :

- La primo-infection. Trois à six semaines après la contamination, 50 à 70 % des personnes présentent des symptômes qui ressemblent à diverses infections virales aiguës comme la mononucléose ou la grippe (fièvre, fatigue, courbatures). Cette phase correspond à une multiplication virale intense qui conduit à une diminution très forte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et à la dissémination du virus. Une réponse immunitaire anti-VIH se développe diminuant le taux de virus plasmatique.
- La phase asymptomatique. Cette période peut se prolonger pendant plusieurs années et est caractérisée par une absence totale de symptômes. Le virus est continuellement produit et éliminé, un équilibre s'établit entre la production du virus et la défense immunitaire du patient.
- La phase symptomatique / SIDA. L'augmentation du taux de réplication virale conduit à une diminution très forte du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (décompte inférieur à 500 cellules / mm<sup>3</sup>). L'immunodépression favorise alors le développement de maladies opportunistes (pneumonies, toxoplasmose...) et l'apparition de cancers (sarcome de Kaposi, lymphomes). La maladie aboutit au décès de la personne.

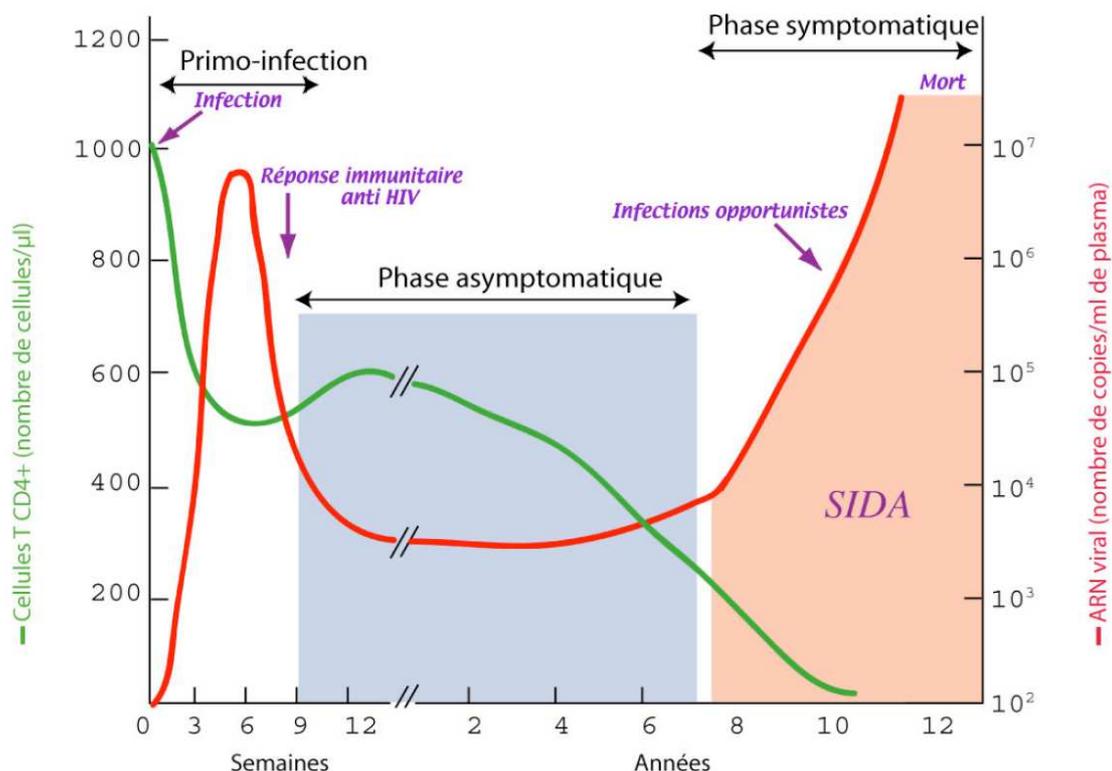


Figure 6 : Evolution du SIDA chez les individus ne recevant pas de traitement antiviral

## 7. Les traitements antirétroviraux <sup>51</sup>

Actuellement, aucun traitement ne permet de guérir du SIDA. Les inhibiteurs utilisés de nos jours permettent de ralentir la prolifération du VIH chez les patients infectés. Ils visent quatre étapes du cycle viral : l'entrée et la fusion, la transcription inverse, l'intégration ou encore la maturation de la particule virale. Ces médicaments sont toujours utilisés en combinaison de trois ou quatre afin d'éviter au maximum l'apparition de mutations de résistance.

La persistance du virus dans les cellules quiescentes ou réservoirs, ainsi que l'apparition de virus résistants obligent le développement de nouveaux inhibiteurs. Ainsi, de nouvelles molécules (en cours d'étude) ciblent des étapes non bloquées par les antirétroviraux actuels comme l'assemblage. Une autre stratégie serait de stimuler les facteurs de restriction cellulaires ou bien d'inhiber les défenses virales qui neutralisent ces protéines, comme APOBEC3G et la protéine virale Vif respectivement. En conclusion, le meilleur « traitement » contre le VIH / SIDA reste encore la prévention.

## B. Le cycle répliatif du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 peut se diviser en deux grandes phases : la phase précoce débutant par l'entrée du virus dans la cellule jusqu'à son intégration dans le génome de l'hôte et la phase tardive comprenant l'expression du provirus intégré (transcription et traduction des éléments viraux) jusqu'au bourgeonnement et à la maturation de la particule virale.

### 1. La phase pré-intégrative

La phase pré-intégrative est décomposée en plusieurs étapes : la reconnaissance et l'entrée dans la cellule hôte, la décapsidation et la transcription inverse et enfin l'import du génome viral suivi de son intégration dans celui de l'hôte (figure 7).

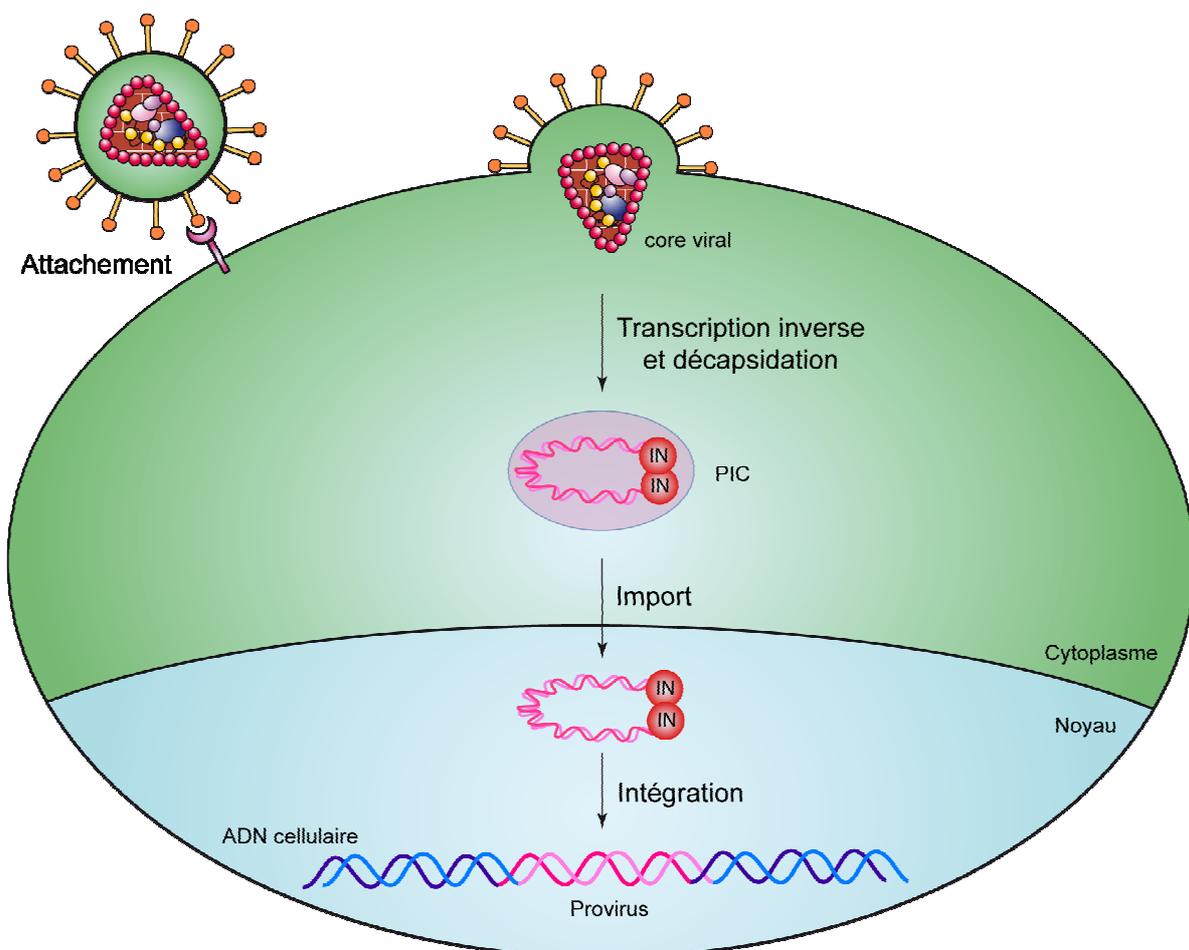


Figure 7 : Etapes précoces du cycle répliatif du VIH-1.

## a. Reconnaissance et entrée

### i. *L'attachement*

La première étape du cycle réplicatif consiste en l'attachement du virus à la surface de la cellule. Bien que le virus reconnaisse en premier le récepteur CD4, il semblerait que d'autres molécules soient nécessaires pour stabiliser cette première interaction et permettre la poursuite continuation du processus d'entrée <sup>215</sup>. Ce sont les protéoglycanes héparanes sulfates, LFA-1 et la nucléoline. Leur mécanisme précis d'intervention reste néanmoins à déterminer.

### ii. *La liaison au récepteur et co-récepteur*

Bien que le récepteur CD4 soit essentiel, il n'est pas suffisant pour permettre la fusion et l'entrée du virus. La présence de l'un des deux récepteurs aux chimiokines, CCR5 ou CXCR4, est en effet indispensable à une infection virale productive ; ils définissent également le tropisme des différentes souches du VIH-1 <sup>17</sup>. La liaison du trimère de gp120 au récepteur CD4 situé à la surface de la cellule induit un changement de conformation des protéines de l'enveloppe qui permet alors dans un second temps, d'interagir avec le co-récepteur défini <sup>81</sup>.

### iii. *La fusion et l'entrée*

L'interaction avec le co-récepteur permet la dissociation du complexe gp120 / gp41. Les deux domaines hélicaux de la protéine gp41 s'associent alors pour former une structure à six hélices <sup>33,227</sup>. Cette structure s'insère dans la membrane plasmique et permet la fusion des membranes virale et cellulaire. Le core de la particule virale est entré dans la cellule.

### iv. *L'endocytose*

Le VIH-1 entre également dans la cellule par endocytose. Très récemment, l'équipe de Melikyan a remis en cause le mécanisme d'entrée par fusion et a montré que le virus utilise de manière prépondérante la voie des endosomes cellulaires afin de pénétrer dans le cytoplasme des cellules TZM-bl (dérivées de cellules HeLa exprimant les récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4) et de la lignée lymphoïde CEM-SS <sup>147</sup>. Ce mode d'entrée impliquerait la protéine cellulaire Dynamine qui provoque la formation de vésicules d'endocytose par scission de la membrane plasmique en remodelant l'actine et favorisant la courbure de la bicouche lipidique. La voie d'entrée par les endosomes pourrait alors être directe ou indirecte. La voie directe implique l'internalisation du virion dans les particules d'endocytose immédiatement après contact avec les récepteurs cellulaires. La voie indirecte fait appel à un

premier évènement de fusion entre le virus et la membrane cellulaire mais qui ne serait pas achevé par la libération du core viral dans le cytoplasme. Dans ce processus appelé « hémifusion », le virion commencerait à fusionner avec la membrane, serait ensuite internalisé dans des particules d'endocytose et le core viral serait enfin relargué dans le cytoplasme après fusion complète entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome.

L'endocytose est depuis longtemps connue chez les DC mais ce processus est particulier car il n'implique pas les récepteurs classiques utilisés par le VIH-1. En effet, dans ce cas, la protéine gp120 du virus interagit avec une molécule d'adhésion spécifique des DC, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grapping Non-integrin). Ce contact n'induit pas de changement de conformation de gp120 et ne déclenche pas de fusion mais seulement une internalisation du virus dans des vésicules acides non-lysosomales <sup>32</sup>. Une fois mature, les DC migrent dans les nœuds lymphatiques où elles exposent les virus aux lymphocytes T. De cette manière, les particules virales peuvent être transmises directement de cellule à cellule (*figure 8*). Les DC participent ainsi à la dissémination du virus des muqueuses vers les organes lymphatiques <sup>235</sup>.

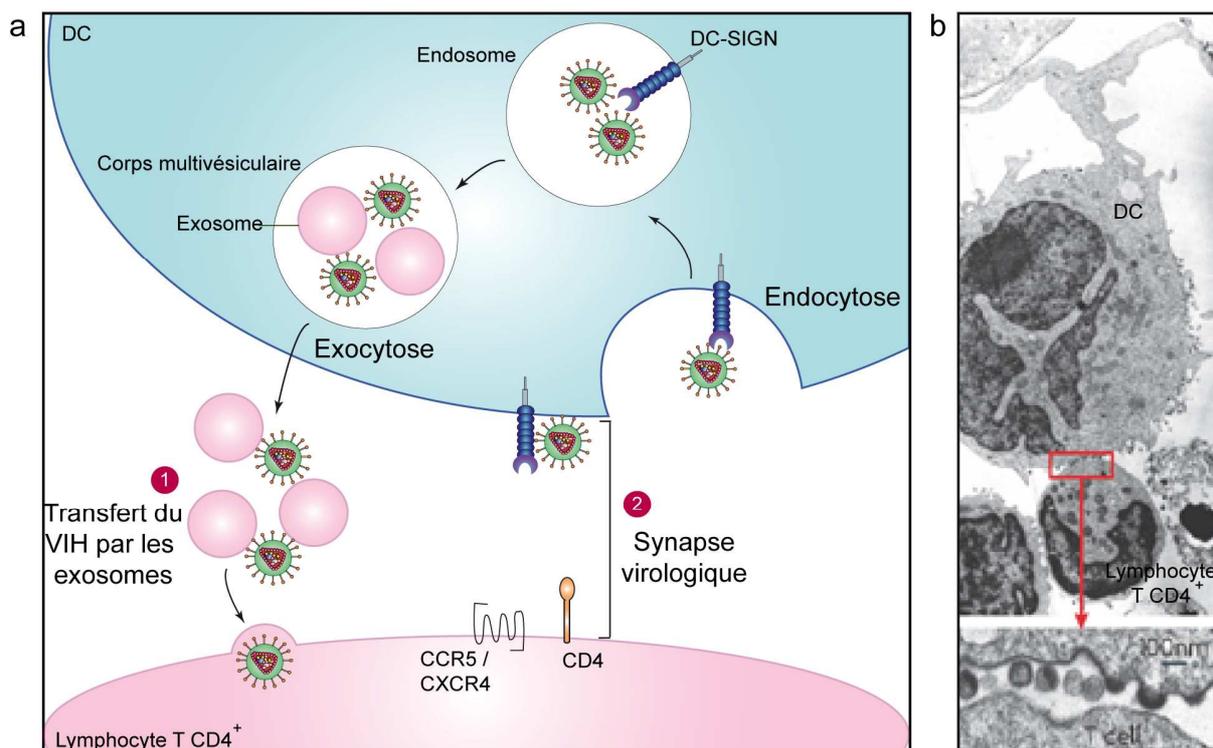


Figure 8: (a) Schéma du contact entre une cellule dendritique et un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. (1) Transmission du VIH par exocytose. (2) Transmission du VIH par contact cellule-cellule (synapse virologique). (Adapté de <sup>235</sup>).

(b) Clichés de microscopie électronique d'une cellule dendritique interagissant avec un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et détails de la synapse virologique. (Source <sup>97</sup>)

## b. Transcription inverse et décapsulation

Suite à l'étape de fusion, le core est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Depuis de nombreuses années, le processus de décapsulation est décrit comme précédant l'étape de transcription inverse. Néanmoins, les dernières études montrent que la décapsulation aurait lieu après synthèse de l'ADN proviral, au niveau des pores nucléaires<sup>5,143</sup>. Une décapsulation « tardive » empêcherait en effet une dilution dans le cytoplasme des différents partenaires impliqués dans la réplication et permettrait une meilleure efficacité du processus de transcription inverse.

### i. La transcription inverse

Lors de cette étape, l'ARNg du VIH-1 est converti en ADNdb par la RT virale. La RT est un dimère de deux sous-unités, p66 et p51, qui confèrent à l'enzyme des activités ADN polymérase ARN dépendante, ADN polymérase ADN dépendante et RNase H.

La transcription inverse est caractérisée par une série d'étapes (pour revue,<sup>83</sup> *figure 9*) :

- La RT initie la synthèse de l'ADN de polarité négative à partir de l'extrémité 3' de l'ARNt<sup>lys3</sup> hybridé au PBS (Primer Binding Site) jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNg. De façon concomitante, l'ARNg est dégradé par l'activité RNase H. Ce brin d'ADN nouvellement synthétisé comporte les séquences U5 et R ; c'est l'ADN strong-stop (-).
- Le premier transfert de brin est possible par la présence des séquences répétées R aux deux extrémités de l'ARN. L'ADN strong-stop (-) s'hybride alors à l'extrémité 3' du génome pour permettre la synthèse du brin d'ADN (-) jusqu'au PBS. L'ARN viral est dégradé simultanément à l'exception des deux séquences PPT (PolyPurine Tract).
- L'initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) se fait à partir des séquences PPT. La synthèse se poursuit jusqu'à la transcription inverse d'une partie de l'ARNt<sup>lys3</sup> encore attaché. L'activité RNase H de la RT clive l'ARNt<sup>lys3</sup> et les séquences PPT libérant ainsi le PBS.
- Le second transfert de brin est permis par l'hybridation des deux séquences PBS. La synthèse du brin d'ADN (+) s'achève au niveau d'une séquence centrale riche en AT et déplace le brin d'ADN déjà synthétisé sur approximativement 100 nucléotides. Ce recouvrement résulte en la formation d'une structure à trois brins d'ADN appelée « DNA flap » essentielle pour la suite du cycle viral.

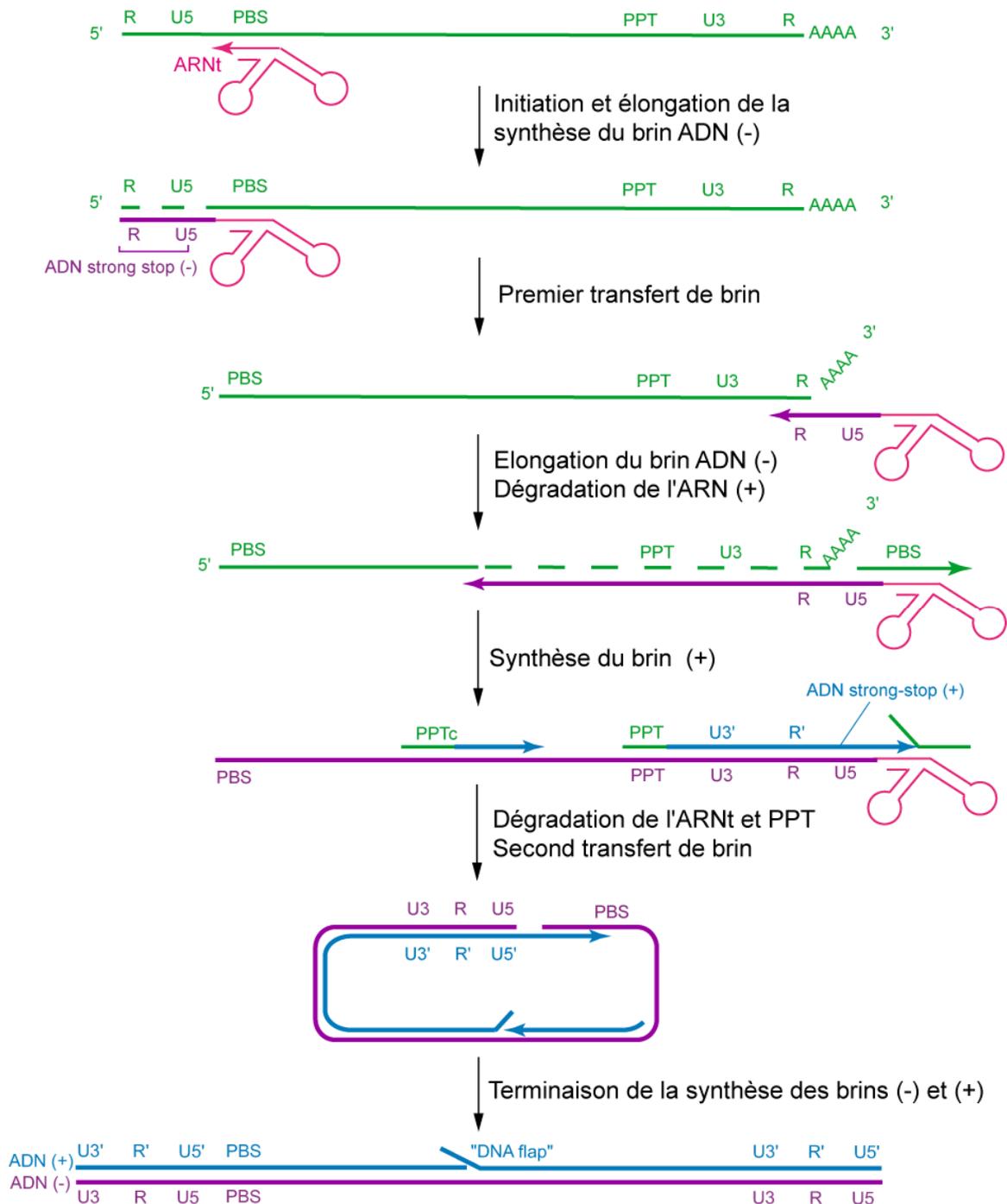


Figure 9 : Transcription inverse de l'ARNg du VIH-1.

ii. La décapsidation

Bien qu'il semble nécessaire que le core reste relativement intact pendant la transcription inverse, le core, étant plus large que le pore nucléaire, doit se dissocier pour permettre le transport du génome viral dans le noyau. La décapsidation permet la transition du complexe de transcription inverse (RTC) vers le complexe de pré-intégration (PIC) dépourvu de CA.

Cette étape aurait lieu aux abords des pores nucléaires<sup>5</sup>. La formation du « DNA flap » signalerait la fin de la transcription inverse et déclencherait la maturation du RTC en PIC<sup>246</sup>

### c. Import et Intégration

Le PIC protège l'ADN viral de la dégradation et facilite son intégration dans le génome de l'hôte (*figure 10*). Il comprend l'ADN proviral, certaines protéines virales (IN, MA, RT, NC et Vpr) et quelques protéines cellulaires (BAF, HMGs, LAP2 $\alpha$ , LEDGF / p75...) <sup>206</sup>.

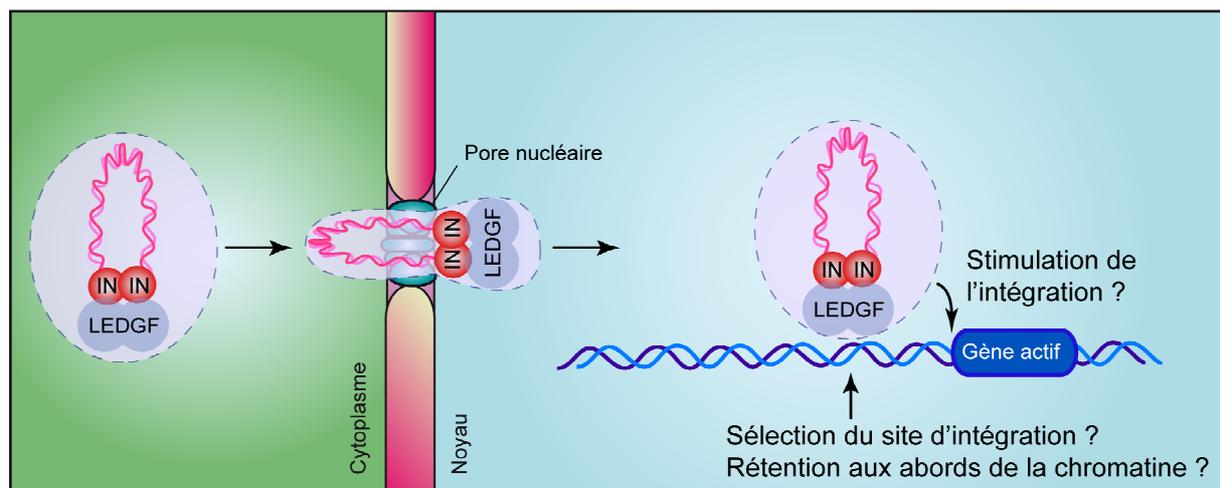


Figure 10 : Translocation du PIC dans le noyau et intégration. (Adapté de <sup>206</sup>)

### i. L'import

Contrairement aux rétrovirus oncogènes, les lentivirus ont la capacité d'infecter des cellules quiescentes (macrophages, lymphocytes T quiescents...). Seules les molécules d'un diamètre de 6 nm (correspondant à une protéine globulaire de 60 kDa) ont la capacité de traverser le pore par diffusion passive. Le diamètre du PIC est estimé à 56 nm, trop large pour rentrer par simple diffusion dans le noyau. Le VIH-1 a donc élaboré une stratégie complexe lui permettant d'importer son génome dans le but de l'intégrer à celui de l'hôte. Les protéines MA, Vpr, IN et le « DNA flap » sont essentiels à l'import du PIC directement ou indirectement, néanmoins le mécanisme précis reste incompris. La plupart des protéines du PIC possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) qui leur permet d'être importées de manière active dans le noyau. De plus, Vpr interagit avec de nombreuses nucléoporines et les protéines MA, Vpr et IN interagissent avec les membres de la famille des importines  $\alpha$ , impliquées dans le transport des protéines à NLS. Des études récentes montrent que la nucléoporine Nup98, l'importine 7 ainsi que des ARNt cellulaires participeraient également à l'import <sup>77,206</sup>.

*ii. L'intégration*

L'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN de l'hôte est l'étape finale de la phase précoce du cycle viral. Cette étape est médiée par l'intégrase virale et certaines protéines cellulaires (LEDGF / p75, hSNF5, HMGI(Y), émerine et BAF) dont les rôles exacts restent encore à déterminer <sup>77</sup>. L'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire ne se fait pas au hasard. En effet, elle se produit préférentiellement dans des zones où les gènes sont fortement transcrits par l'ARN polymérase II <sup>184</sup> et les histones post-traductionnellement modifiées (acétylation des histones H3 et H4 ainsi que la méthylation de l'histone H3) <sup>221</sup>. Les composants cellulaires du PIC (notamment LEDGF / p75) ou liés à l'ADN cellulaire (facteurs de transcription) pourraient également intervenir dans la sélection du site d'intégration et / ou dans la rétention du PIC aux abords de l'ADN chromatinien <sup>43,61</sup>.

La réaction d'intégration se déroule en trois étapes (*figure 11*) :

- L'intégrase clive un dinucléotide GT situé à l'extrémité 3' du LTR des deux brins de l'ADN proviral, libérant des extrémités 3'OH rentrantes. Cette étape est appelée « 3' processing »
- L'IN catalyse une réaction de trans-estérification consistant en une étape de clivage de l'ADN cellulaire et de ligation de l'ADN viral aux extrémités 5' phosphate générées dans l'ADN chromatinien. C'est le transfert de brin.
- Le processus se termine par l'élimination des dinucléotides CA sortants et la réparation de l'ADN en ajoutant les nucléotides manquants au niveau du site d'insertion. Cette dernière étape fait intervenir les enzymes de réparation cellulaires (DNA-PK, ATM, ATR, Ku80 et ligase IV) <sup>194</sup>.

Tous les PIC n'aboutissent pas à une infection productive. L'ADN viral non intégré représente 99 % de l'ADN viral total, ainsi, l'intégration est un processus rare <sup>41</sup>. L'ADN non intégré se présente sous trois formes : linéaire, circulaire à deux LTR (extrémités de l'ADN proviral liées de façon covalente) ou circulaire à un LTR suite à un événement de recombinaison homologue. Aucune de ces formes ne produit de virus infectieux mais elles permettent, à des taux faibles, la production des protéines précoces comme Tat, Rev et Nef <sup>117,236</sup>. Dans les macrophages, l'ADN viral non intégré peut persister jusqu'à trente jours après infection. Dans le cas d'une co-infection ou de surinfection, un provirus intégré peut compléter l'ADN non intégré et conduire à une augmentation de la diversité du VIH-1 <sup>75</sup>.

Les « cercles » à deux LTR pourraient également servir à la production de virus. En effet, une fonction supplémentaire de l'IN a été récemment proposée <sup>54</sup>. Elle pourrait cliver l'ADN circulaire à deux LTR au niveau de la jonction LTR-LTR. L'ADN redevenu linéaire pourrait

alors s'intégrer dans le génome de l'hôte. Cependant, l'existence de ce clivage reste à être démontrée *in vivo*.

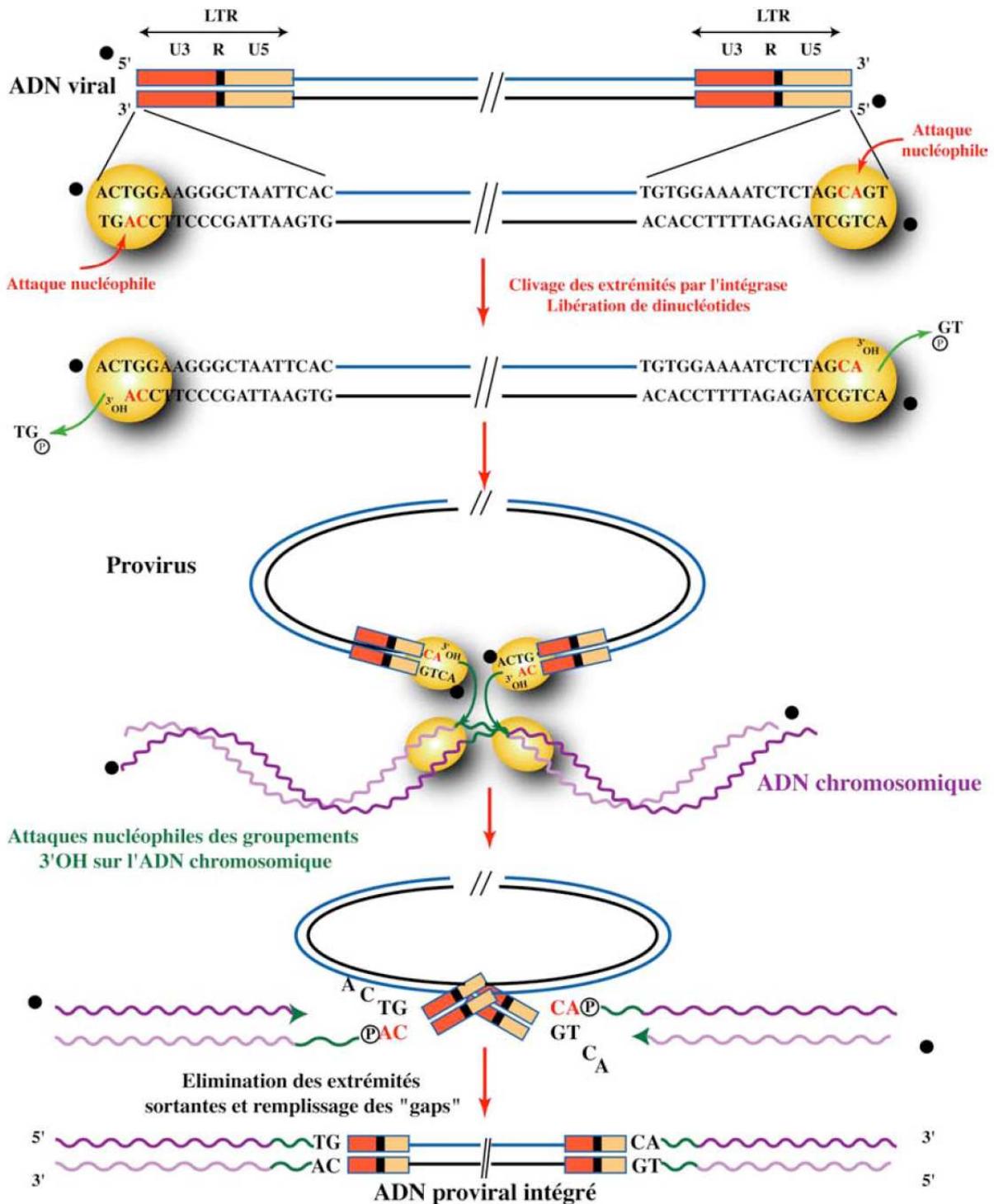


Figure 11 : Intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire.

## 2. Phase post-intégrative

Après l'intégration, le provirus sert de matrice pour la synthèse des ARN viraux qui vont permettre l'expression des protéines structurales, enzymatiques, régulatrices et accessoires. Dans un second temps, les composants protéiques et l'ARNg s'assemblent, la particule virale se forme et bourgeonne de la membrane plasmique cellulaire. Le cycle viral se termine par la maturation du virion (*figure 12*).

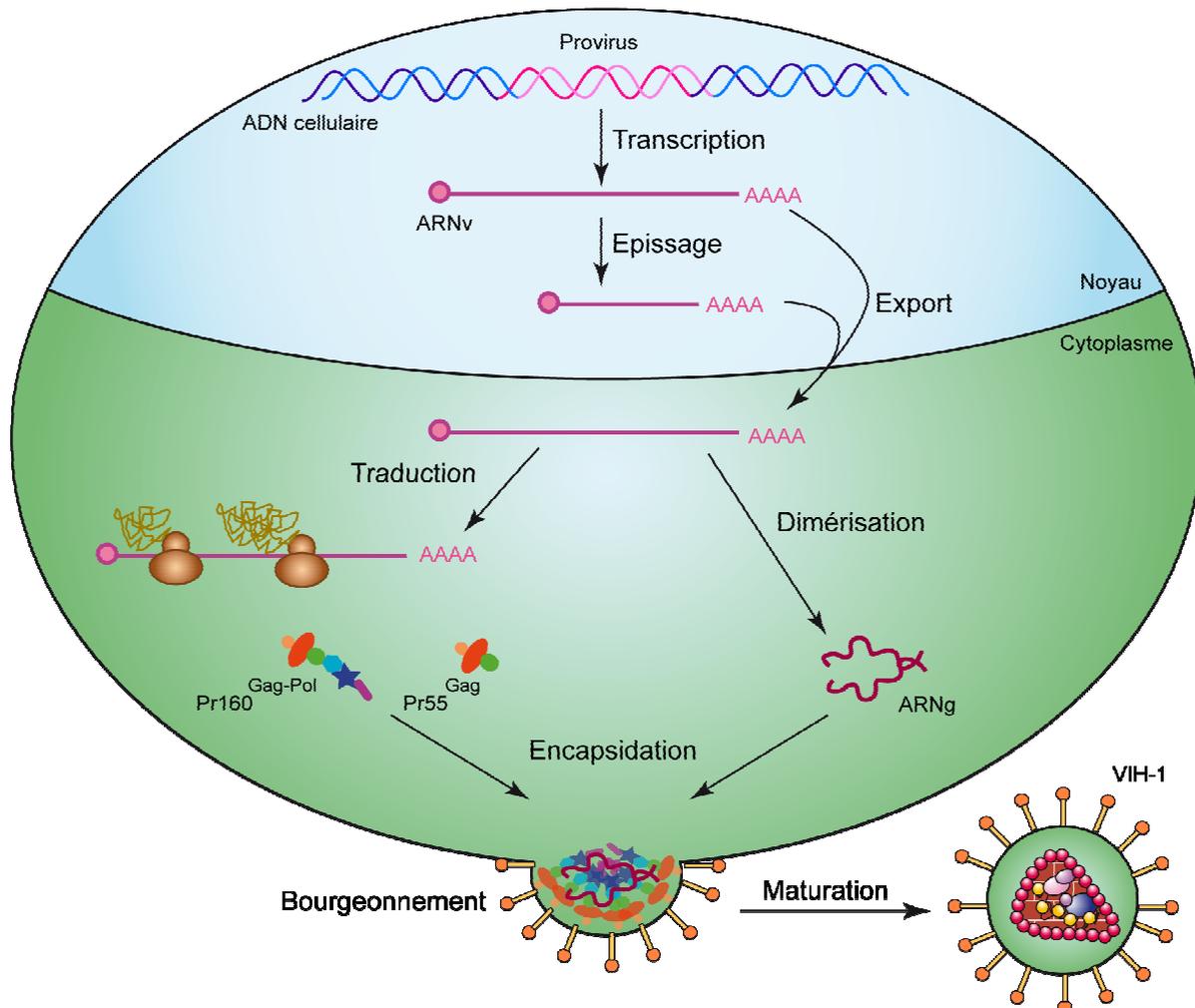


Figure 12 : Etapes tardives du cycle réplicatif du VIH-1.

### a. Transcription

La région LTR en 5' permet l'initiation de la transcription et comprend les éléments *cis* essentiels à la production d'ARN. Le LTR est composé de trois régions : U3 (Unique, 3'end), R (Repeated) et U5 (Unique, 5'end). La région U3 contient le promoteur de l'ARN polymérase II ainsi que des sites de fixation de différents facteurs de transcription cellulaires (*figure 13*).

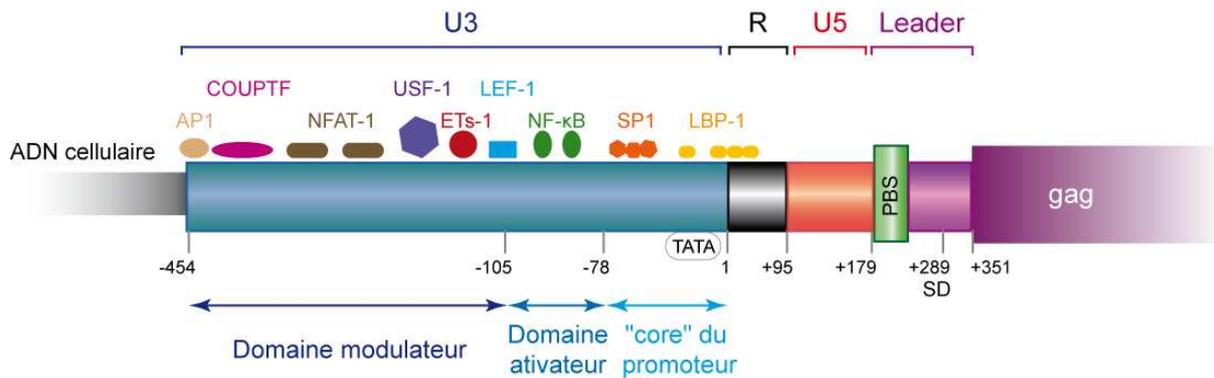


Figure 13 : Représentation du LTR 5' sur l'ADN proviral intégré dans le génome de l'hôte. Le LTR se divise en 3 régions U3, R et U5. Le départ de la transcription s'effectue au début de la région R, les sites de fixation reconnus par différents facteurs de transcription de l'ARN polymérase II sont représentés en amont. La position des sites est relative au nucléotide de départ de la transcription.

La transcription du provirus est effectuée par l'ARN polymérase II, les ARN sont donc coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. La synthèse se déroule en deux étapes : celle sous le contrôle des facteurs cellulaires et celle sous le contrôle de la protéine virale Tat.

#### *i. La phase précoce*

La faible efficacité d'élongation de l'ARN polymérase II résulte en la synthèse d'ARN courts non polyadénylés mais qui persistent à cause d'une structure en tige-boucle appelée TAR (Trans-Acting Responsive element)<sup>111</sup>. L'activation de la cellule permet la relocalisation nucléaire du facteur NF-κB qui se fixe sur le domaine activateur du LTR 5'. Il en résulte un remodelage de la chromatine conduisant à l'augmentation de l'initiation et de l'élongation de la transcription<sup>11</sup>. L'ARN viral est produit en faible quantité, puis multi-épissé, exporté et enfin traduit par la machinerie cellulaire afin de synthétiser les protéines régulatrices Tat, Nef et Rev. Les protéines Tat et Rev sont alors réimportées dans le noyau afin d'activer la transcription et permettre le transport des ARNg et mono-épissés, respectivement.

#### *ii. La phase tardive*

La protéine Tat augmente de façon très importante (plus de deux log) la transcription<sup>53,63</sup>. En effet, Tat reconnaît une tige boucle en 5' de l'ARN viral, l'élément TAR, et recrute le facteur d'élongation P-TEFb formé de la cycline T1 et de la protéine kinase Cdk9<sup>225</sup>. P-TEFb phosphoryle alors le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II qui devient plus processive, c'est la phase d'élongation de la transcription. Le complexe Tat / TAR / P-TEFb se dissocie après acétylation spécifique de Tat sur la Lys<sup>50</sup> et interaction avec le facteur PCAF (p300 / CREB binding protein-Associated Factor)<sup>150</sup>.

## b. Epissage et export des ARN

### i. L'épissage

L'utilisation alternative des cinq sites donneurs et des neuf sites accepteurs d'épissage présents sur l'ARNv conduit à la génération de plus de trente transcrits viraux <sup>174</sup> qui se divisent en 3 classes (*figure 14*) :

- L'ARN non épissé (9,2 kb) qui représente l'ARNg plus tard encapsidé et sert également de messenger pour la synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol
- Les ARN mono-épissés (~ 5 kb) qui codent les protéines Vif, Vpr et Vpu / Env
- Les ARN multi-épissés (1,7 à 2 kb) qui permettent la synthèse de Tat, Rev et Nef.

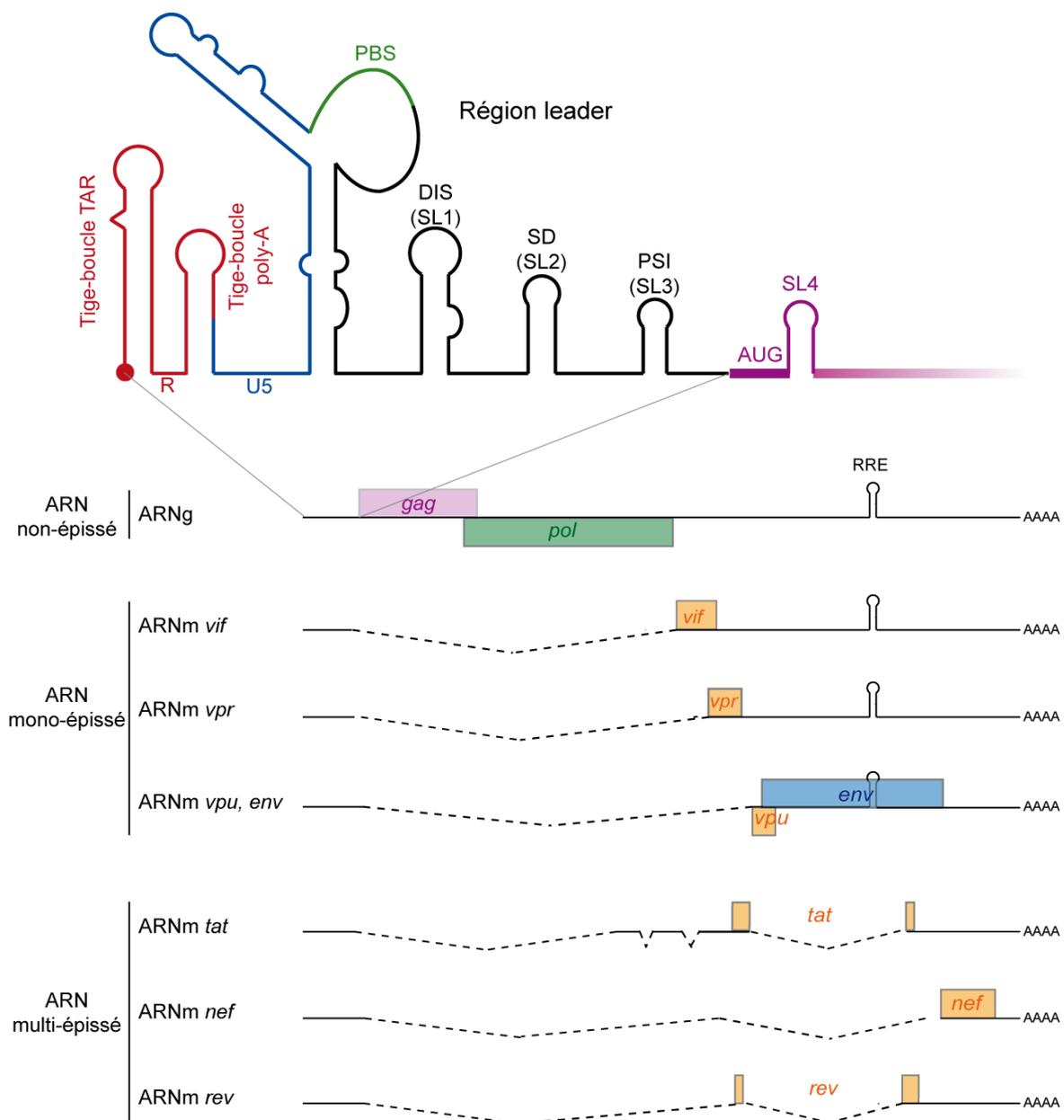
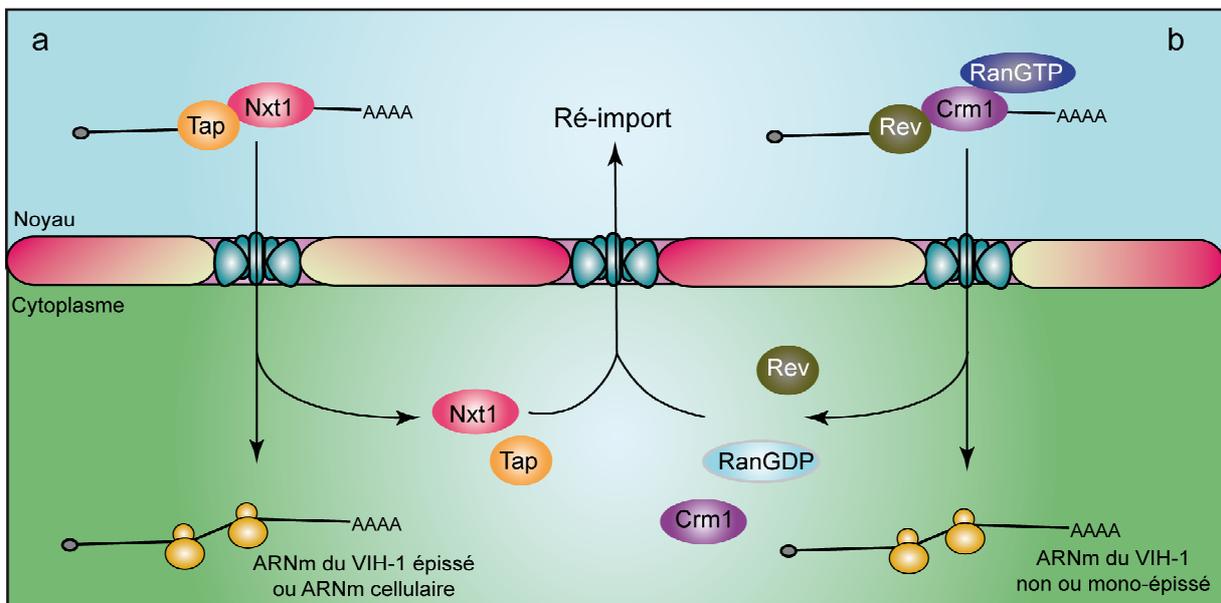


Figure 14 : ARN messagers du VIH-1 et modèle de structure secondaire de la région 5'UTR

## ii. L'export

Les ARN multi-épissés sont exportés par la voie classique utilisés par les ARNm cellulaires faisant intervenir le complexe NXT1 / TAP. Les ARN non et mono-épissés présentent des signaux de rétention nucléaire localisés dans les gènes *gag*, *pol* et *env*<sup>137,179</sup>. Afin d'être exporté, ils nécessitent l'intervention de la protéine Rev. Cette protéine possède deux séquences de localisation : une nucléaire (NLS) et une cytoplasmique (NES) qui lui permettent de faire la navette entre le cytosol et le noyau. Rev se fixe sur une tige boucle très stable présente sur les ARN non et mono-épissés, l'élément RRE (Rev Responsive Element) localisé dans le gène *env*<sup>139</sup>. La fixation coopérative des multimères de Rev sur le RRE induit une exposition du signal NES<sup>47</sup>. Grâce à ce domaine, la protéine virale interagit avec la machinerie d'export médiée par CRM1 et la GTPase Ran. L'hydrolyse du GTP permet une déstructuration du complexe ARN / Rev / CRM1 / Ran et le retour de Rev dans le noyau (figure 15).



**Figure 15 :** (a) Export des ARNm épissés du VIH-1 dépendant de NXT1 / TAP. (b) Export des ARNm non ou mono-épissés du VIH-1 dépendant de Rev, de CRM1 et du facteur Ran. (Adapté de <sup>46</sup>)

## c. Traduction

Une fois dans le cytoplasme, les ARN messagers viraux sont traduits grâce à la machinerie de l'hôte. Le VIH-1 possède deux messagers polycistroniques : l'ARN non épissé permettant la synthèse des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol et l'ARN mono-épissé Vpu / Env codant les protéines Vpu et d'enveloppe. La traduction de ces messagers se fait par des mécanismes originaux :

- La synthèse de la protéine Env est permise grâce à un évènement de « leaky scanning ». Le faible consensus de la séquence Kozak autour de l'AUG de *Vpu* autorise une poursuite du balayage du messenger par le ribosome jusqu'au prochain AUG correspondant à *Env*, initiant ainsi la traduction de Env <sup>186</sup>.
- La traduction des polyprotéines Gag-Pol implique un décalage du cadre de lecture (« frameshift ») en -1 <sup>104</sup>. La présence d'une tige-boucle et d'une séquence de glissement (UUUUUUA) à la fin de la traduction de Gag induit un recul du ribosome d'un nucléotide ; ce changement de cadre de lecture prolonge la synthèse au-delà du premier codon stop sur l'ORF de *pol*. La fréquence de ce mécanisme d'une fois sur vingt évènements de traduction <sup>104</sup> est critique pour l'assemblage et la propagation du virus <sup>112,191</sup>.

L'ARN non épissé joue également le rôle d'ARNg. La transition entre la traduction et la phase d'encapsidation est régulée par le taux de protéines Gag et Gag-Pol dans le cytoplasme <sup>3</sup>. En effet, lorsqu'il y a peu de protéines, la traduction est stimulée mais en présence d'un excès des précurseurs polyprotéiques, le domaine NC de Gag commence à lier l'ARN et à le transporter au lieu d'assemblage du virion. La liaison des protéines inhibe la fixation du ribosome et donc la traduction.

La protéine Rev est également impliquée dans la traduction des protéines virales. Sa présence augmente l'association des polysomes sur les ARN messagers contenant la séquence RRE (Gag-Pol, Vif, Vpr et Vpu / Env) <sup>6,48</sup>. Une étude récente propose que Rev ne soit pas uniquement impliquée dans la traduction des ARN contenant le RRE mais dans tous les ARN comprenant la séquence 5'UTR viral <sup>89</sup>. En effet, Rev lie la boucle A de la tige-boucle 1 (SL1) de la séquence leader située dans le LTR5' <sup>68,88</sup>. A haute concentration, Rev inhibe la traduction de manière aspécifique, probablement en recouvrant l'ARN, le rendant inaccessible à la machinerie traductionnelle. Cependant, à de plus basses concentrations, Rev stimule la traduction des ARN contenant la séquence 5'UTR du VIH-1 <sup>89</sup>. Cette stimulation est dépendante de la présence de la boucle A et indépendante du domaine RRE. Le mécanisme exact de cette régulation reste néanmoins à déterminer et à étudier *ex vivo* sur des ARN viraux intacts.

#### d. Assemblage

Le précurseur Gag est l'effecteur central dans l'assemblage de la particule virale en dirigeant l'encapsidation des principaux composants du virion *via* des interactions protéine / protéine, protéine / ARN ou encore protéine / lipide <sup>71</sup>. Pr55<sup>Gag</sup> code les protéines MA, CA, NC, p6 et les peptides intermédiaires p1 et p2. Gag peut s'auto-assembler pour former des pseudo-particules virales (VLP) en absence des autres constituants du virus <sup>76</sup>. Dans la particule

virale, le domaine MA du précurseur Gag forme la « coquille » interne du virus se trouvant immédiatement sous la bicouche lipidique où sont enchassées les protéines de l'enveloppe. La partie CA renferme l'ARNg interagissant avec le domaine NC de Gag et avec les protéines enzymatiques de Gag-Pol.

*i. Encapsidation de l'ARNg et ancrage à la membrane plasmique de Pr55<sup>Gag</sup>*

Deux copies de l'ARNg viral sont incorporées dans la particule virale. L'encapsidation spécifique de l'ARNg est médiée par des interactions entre le domaine NC de Pr55<sup>Gag</sup> et le signal d'encapsidation Psi situé dans la région leader de l'ARNg<sup>50,130</sup>. L'interaction NC / ARNg favorise la multimérisation de Gag<sup>42,151</sup> et la formation des complexes Gag / Gag-Pol<sup>122</sup>. L'association de la polyprotéine Gag en trimères induit l'exclusion du groupement myristyl situé en N-terminal. A la membrane plasmique, ce groupement s'insère dans la bicouche lipidique<sup>84</sup>; l'interaction d'une région basique de MA avec le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) permet de stabiliser cette liaison<sup>163</sup>. L'assemblage s'effectue au niveau de microdomaines de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques<sup>158,164</sup>, qui sont enrichis en cholestérol, sphingolipides et protéines membranaires. L'ancrage de Gag à la membrane plasmique induit une courbure de la membrane qui favorisera ensuite le bourgeonnement.

*ii. Incorporation des protéines de l'enveloppe*

La protéine Env est synthétisée sous forme d'un précurseur gp160. La polyprotéine transite dans le réticulum endoplasmique où le domaine gp120 est fortement glycosylé puis dans l'appareil de Golgi où, après assemblage en trimères, gp160 est clivée en gp120 et gp41. gp41 conduit le complexe gp41 / gp120, associé de manière non covalente, à la membrane; gp120 s'ancore à la membrane extracellulaire alors que gp41 reste transmembranaire avec une petite partie cytoplasmique. Une protéine cellulaire, TIP47 (Tail-Interacting protein of 47 kDa), sert alors d'adaptateur entre les protéines de l'enveloppe et le précurseur Gag. A la membrane plasmique, TIP47 interagit avec la queue cytoplasmique de gp41 puis avec le domaine MA du précurseur Gag<sup>132</sup> afin de médier l'incorporation des protéines d'enveloppe dans les particules virales.

Une autre voie d'assemblage semble exister en particulier dans les macrophages<sup>86,157</sup>. En effet, les particules produites par les macrophages présentent dans leur enveloppe des marqueurs des corps multi-vésiculaires et ne possèdent pas les caractéristiques des radeaux lipidiques. Le VIH-1 utiliserait la voie classique de transport et de sortie des exosomes. Les vésicules serviraient de lieu d'assemblage du virus et seraient transportées à la membrane plasmique puis excrétées.

## e. Bourgeonnement et maturation

### i. La libération de la particule virale

Le bourgeonnement implique une courbure de la membrane plasmique qui va conduire à la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire. Le virus détourne la voie que la cellule utilise pour l'expulsion des exosomes, le système VPS (Vacuolar Protein Sorting). Ce système est composé des complexes ESCRT-I, -II et -III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le domaine p6 de Pr55<sup>Gag</sup> contient deux séquences essentielles pour le bourgeonnement : le motif PTAP en N-terminal et la séquence LYPLTSLRSL en C-terminal. Une protéine du complexe ESCRT-I, Tsg101, initie l'étape de bourgeonnement en interagissant avec le motif PTAP de Gag<sup>101</sup>. La liaison avec les autres complexes ESCRT serait assurée par le contact entre Tsg101 et la protéine cellulaire Alix<sup>202,220</sup> (figure 16). Cependant, bien que le motif PTAP soit essentiel pour l'étape du bourgeonnement, il semblerait que la délétion du domaine de liaison à Alix n'altère pas de façon significative la libération de la particule virale<sup>1</sup>.

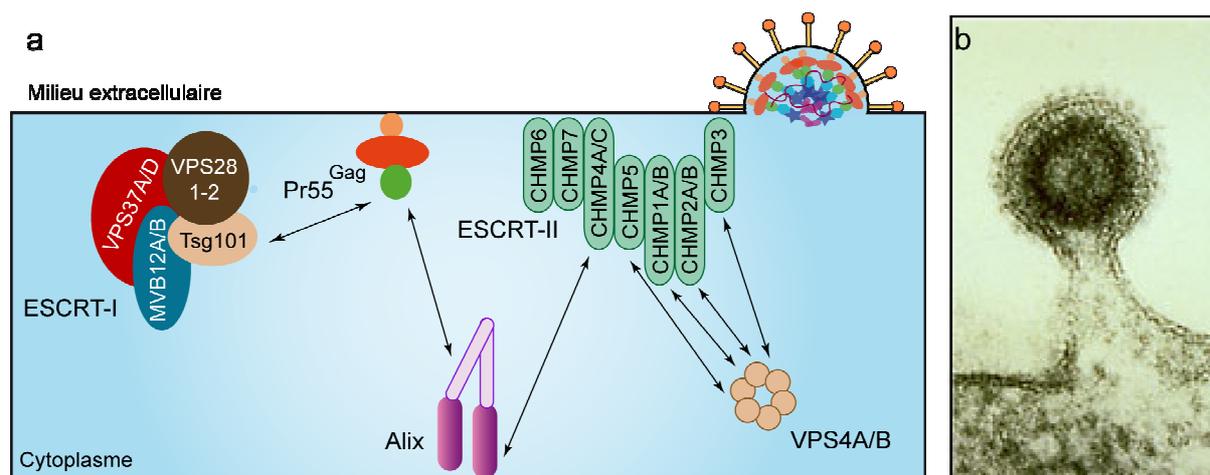


Figure 16: (a) Bourgeonnement de la particule virale de la membrane plasmique. (Adapté de<sup>66</sup>). (b) Cliché de microscopie électronique d'un virion bourgeonnant d'une cellule.

### ii. La maturation de la particule virale

En microscopie électronique, la particule virale immature présente, sous la bicouche lipidique, une surface sphérique dense aux électrons (figure 17b). Durant ou immédiatement après le bourgeonnement, la protéase virale, PR, clive les précurseurs Gag et Gag-Pol libérant les protéines nécessaires à un réarrangement de la particule virale et à son infectivité. Le clivage initial conduit à la libération de PR suite au rapprochement de deux Pr160<sup>Gag-Pol</sup>. La protéolyse des précurseurs Gag et Gag-Pol s'effectue ensuite de manière séquentielle<sup>213,231</sup> et permet la libération des protéines MA, CA, NC, RT et IN (figure 17a).

Dans un premier temps, PR clive Pr55<sup>Gag</sup> au niveau des jonctions p2 et NC libérant les protéines MA / CA / p2 et NC / p1 / p6. Des clivages intermédiaires entre p1 / p6 et CA / MA sont suivis par des coupures entre CA / p2 et NC / p1. Cette dernière étape déclenche une condensation de la NC autour de l'ARNg et la formation du core par la protéine de capsid (figure 17c). La particule virale est infectieuse et peut commencer un nouveau cycle répliatif.

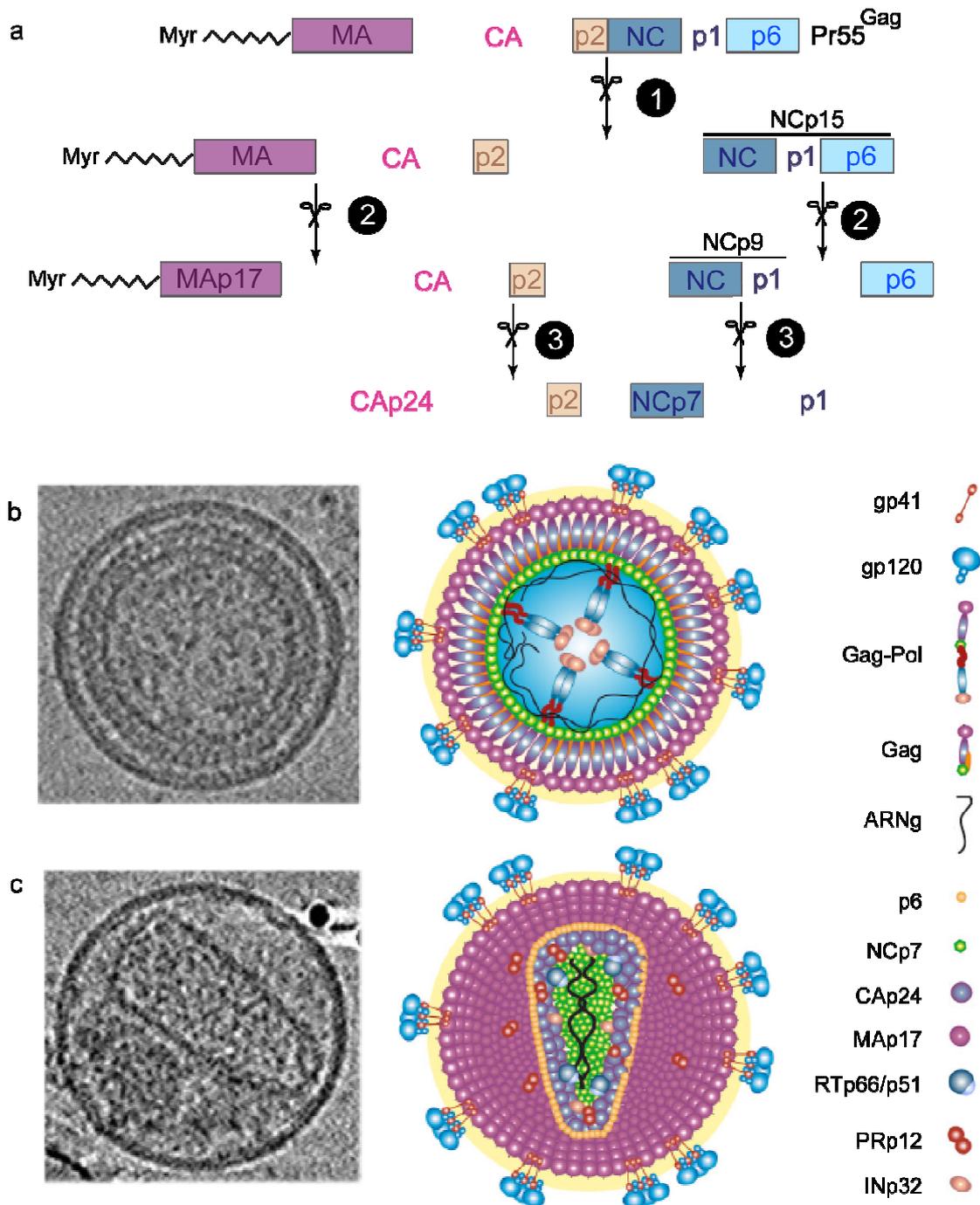


Figure 17 : Maturation des particules virales. (a) Clivage séquentiel du précurseur Pr55<sup>Gag</sup> par la protéase virale. Schéma et coupe transversale de particule virale immature (b) et mature (c) obtenus par cryo-tomographie électronique. (Source <sup>71</sup>)

### III. Interaction hôte / VIH-1

#### A. Protéines cellulaires impliquées dans le cycle viral

Etant donné la taille restreinte de leur génome, les rétrovirus ont besoin de protéines et d'ARN cellulaires afin d'effectuer leur cycle répliatif. Ces protéines sont impliquées dans toutes les étapes du cycle viral et certaines sont encapsidées dans la particule.

##### 1. Les protéines cellulaires interagissant avec le VIH-1 dans la cellule

Afin d'identifier les partenaires cellulaires du VIH-1, plusieurs cribles ont été réalisés sur des cellules transfectées avec des siARN spécifiques de gènes cellulaires puis infectées avec le virus<sup>24,124,248</sup>. Dans chaque étude, plus de 220 gènes ont été révélés comme étant importants dans la réplication virale soit en la favorisant soit en l'inhibant. Cependant, parmi tous les gènes identifiés, moins d'une dizaine sont communs à toutes les analyses. Cette discordance peut s'expliquer par les différences expérimentales et d'analyse de chacun des trois cribles : type cellulaire, virus utilisé, temps d'action des siARN... De plus, certains gènes connus comme partenaires dans la réplication virale n'ont pas été identifiés ; c'est le cas de LEDGF / p75 (partenaire de l'intégrase) mais aussi d'APOBEC3G (facteur de restriction contrôlé par Vif).

Parallèlement à ces cribles, une banque de données référençant toutes les interactions hôte/virus a été créée (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/RefSeg/HIVInteractions/>). Cette banque compile les informations de plus de 3200 articles décrivant des liaisons putatives entre 1448 protéines cellulaires humaines et les composants du VIH-1. Plus de la moitié (58 %) des interactions décrites ont été confirmées par au moins deux articles. La majorité des contacts sont indirects (68 %) et 37 % des protéines cellulaires identifiées interagissent avec plus d'une protéine virale<sup>65,173</sup>. Tous les compartiments ainsi que toutes les voies de signalisation métaboliques et cellulaires sont impliquées dans la réplication du VIH (*figure 18*).

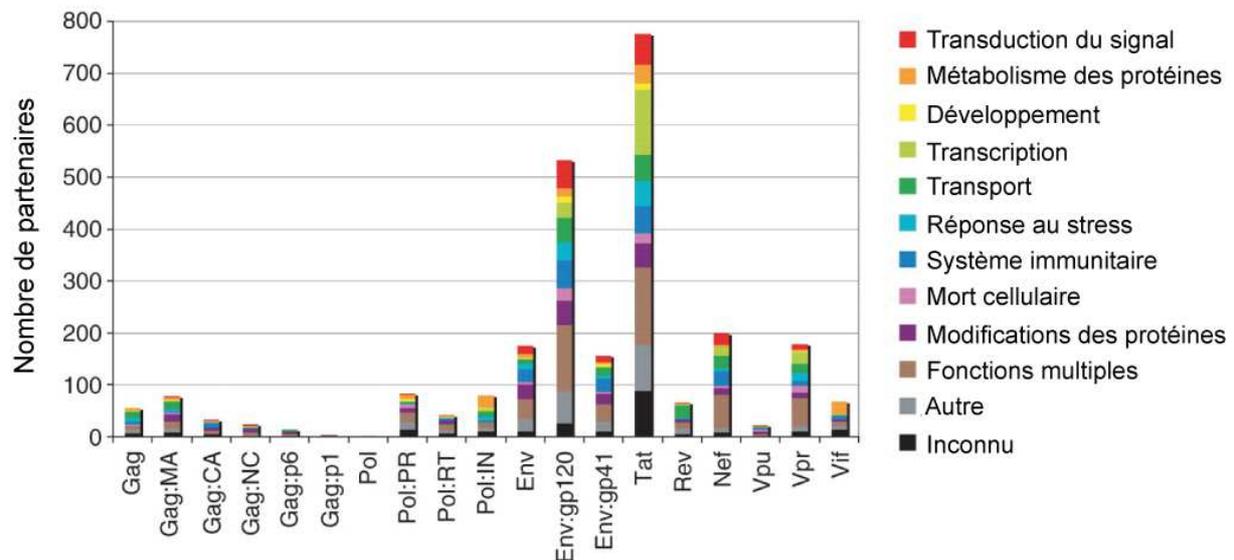


Figure 18 : Voies dans lesquelles sont impliquées les protéines cellulaires interagissant avec les protéines virales du VIH-1. (Source <sup>65</sup>)

## 2. Les protéines et ARN cellulaires encapsidés dans le virion

En plus des protéines virales, certains composants cellulaires sont incorporés dans le virion lors de l'étape d'assemblage puis de bourgeonnement. Ces protéines et ARN sont présents à la surface ou à l'intérieur de la particule virale. On en retrouve trois sortes lorsque le contenu du virus est analysé <sup>165</sup> :

- Ceux encapsidés à cause de leur proximité du site d'assemblage et incorporés de manière aspécifique. Leur présence peut fournir des informations importantes sur l'environnement et le lieu de l'assemblage. Ainsi, l'identification de plusieurs tétraspanines (CD9, CD53, CD81...) retrouvées à la surface de la particule virale permet de situer le bourgeonnement au niveau de domaines de la membrane plasmique riche en tétraspanines (TEM, Tetraspanins-Enriched Microdomains)
- Les facteurs encapsidés de manière spécifique par interactions avec l'ARN ou des protéines virales. Ce sont les partenaires essentiels dont le virus aura besoin soit pour l'étape d'infection ou pour les étapes suivantes telles que la décapsidation. Ces facteurs sont très nombreux et leur analyse permet de mieux comprendre les différentes phases du cycle répliatif viral. Parmi eux, l'ARN<sup>Lys3</sup>, l'actine, l'ubiquitine, les protéines de la famille ESCRT (Tsg101, Alix, VPS28) sont retrouvées dans le virion.
- Ceux « emmenés » après l'étape d'assemblage, typiquement les protéines de surface cellulaires.

Bien que les protéines de toutes les voies cellulaires puissent être encapsidées, les protéines impliquées dans le trafic (des vésicules notamment) et les voies de signalisation sont majoritaires.

## B. Défense cellulaire et évasion virale

Les organismes pluri-cellulaires ont développé des systèmes de défense parfois très évolués afin de contrer les diverses invasions par les pathogènes tels que les bactéries ou les virus. Cependant, afin de survivre, les virus ont appris à leurrer et à contrecarrer la réponse immunitaire cellulaire.

Seuls les événements relatifs à la défense cellulaire suivant une infection virale et les stratégies d'évasion du virus seront détaillés ici.

### 1. Défense cellulaire

#### a. Réponse immunitaire

La réponse immunitaire se divise en deux phases : une première étape qui fait intervenir une réponse non spécifique, la réponse innée et une deuxième étape qui va cibler spécifiquement le pathogène, la défense adaptative.

##### *i. Défense immunitaire innée*

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle permet de limiter la propagation du virus dans les premières heures de l'infection en attendant la mise en place de l'immunité adaptative. Cette défense est non spécifique du virus, immédiate et intervient localement. La réponse innée est médiée par des cellules (monocytes / macrophages, cellules « Natural Killer », NK et DC) mais également par des molécules telles que le complément, l'interféron ou encore les cytokines (*figure 19*).

En présence d'une cellule infectée par un virus ou d'un virus lui-même, la voie alternative du complément est activée. Le fragment C3 initie cette cascade en se fixant à la surface de la cellule contaminée ou de la particule virale<sup>92</sup>. Les cellules ou virions ainsi recouverts sont plus facilement reconnus et phagocytés par les macrophages. Ils exposent alors à leur surface des fragments de peptides viraux (antigènes), ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC, Antigen Presenting Cell). Les macrophages synthétisent également des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) et le TNF $\alpha$  qui permettront le recrutement d'autres effecteurs de la réponse immunitaire au niveau du site de l'infection<sup>152</sup>. Les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  (IFN $\alpha$  et IFN  $\beta$ ) sont également synthétisés par les cellules infectées,

les DC et macrophages. Ces cytokines permettent la surexpression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et la résistance à l'infection des cellules non infectées. Les cellules NK sont activées par l'interleukine 12 et l'IFN $\alpha$ . Une fois stimulées, elles induisent la lyse des cellules qui ne présentent pas ou peu de molécules du CMH-I à leur surface. Elles tiennent aussi un rôle très important dans le développement de la réponse adaptative notamment en synthétisant l'interféron  $\gamma$ .

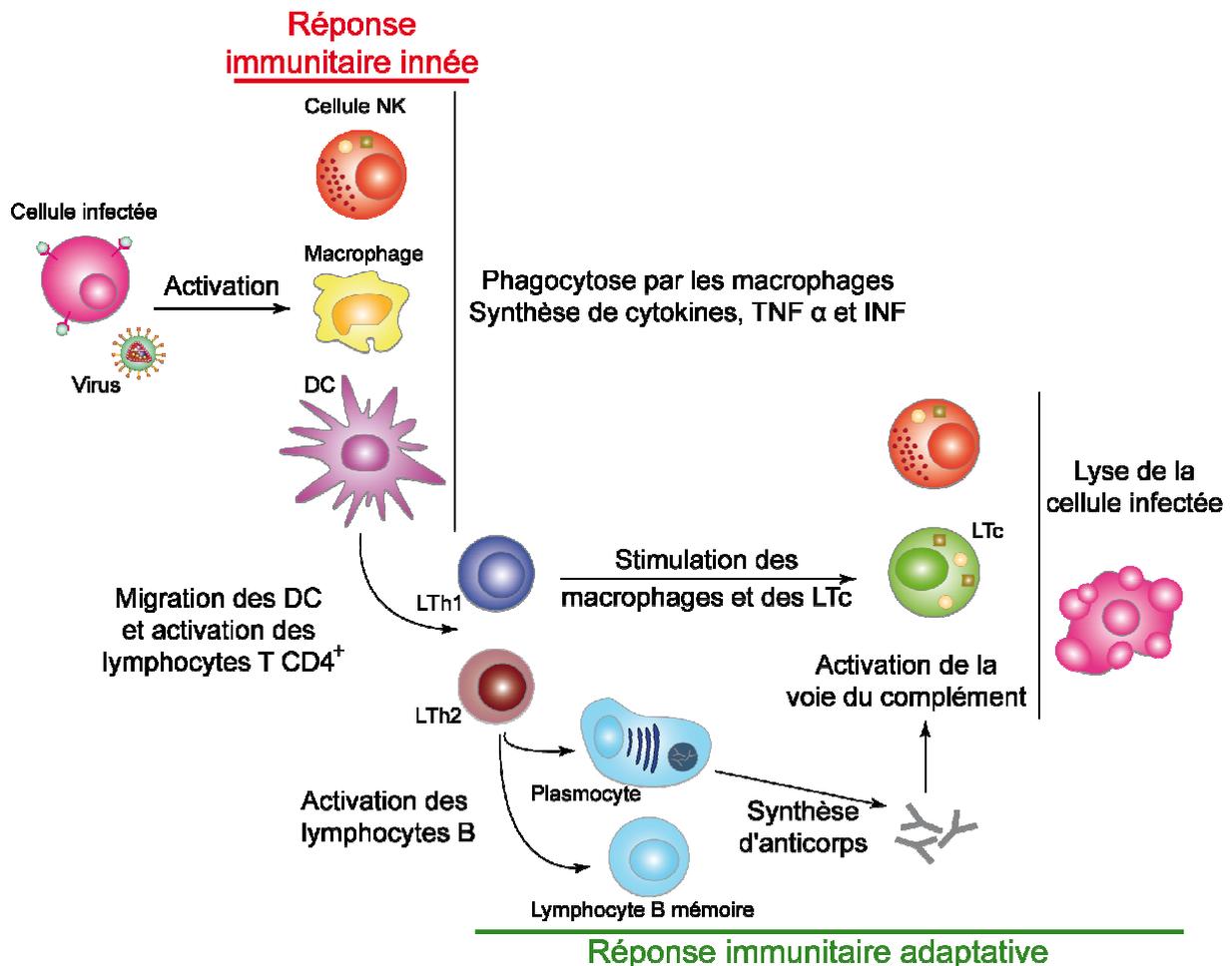


Figure 19 : Les différents acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative

### ii. Réponse immunitaire adaptative

Le système de défense immunitaire existe chez les invertébrés et les vertébrés mais les vertébrés sont les seuls capables de réponse adaptative. Contrairement à la défense innée, cette réponse est spécifique du pathogène et induit un processus de mémoire qui persiste et qui pourra être réactivé dans le cas d'un contact futur avec un pathogène identique. La réponse adaptative est soit humorale (basée sur la production d'anticorps produits par les lymphocytes B) soit cellulaire (basée sur l'action des lymphocytes T) <sup>105</sup> (figure 19).

- Présentation des antigènes viraux

La réponse immunitaire adaptative est basée sur la reconnaissance du pathogène et donc sur la présentation des antigènes à la surface des cellules. Les antigènes viraux peuvent être endogènes ou exogènes selon que le virus est intra ou extracellulaire, respectivement. Dans les deux cas, les protéines virales sont fragmentées en peptides de 8-20 acides aminés et associés à des molécules du CMH-I pour les antigènes endogènes ou de CMH-II pour les antigènes exogènes. Les complexes CMH / antigène sont alors exposés à la surface de la cellule. Les DC immatures exposant un tel complexe migrent vers les tissus lymphoïdes et « se présentent » aux cellules T CD4<sup>+</sup> naïves qui deviennent actives<sup>108</sup>.

- La différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>108</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en Th1 (T helper 1) qui synthétisent l'IL-2 et l'IFN $\gamma$  (impliqués dans la réponse cellulaire) soit en cellules Th2 (T helper 2) qui produisent essentiellement les IL-4, -5 et -6 (impliqués dans la réponse humorale). La production d'IFN $\gamma$ , lors de la réponse innée par les cellules NK, oriente la différenciation des lymphocytes T vers les LTh1 et inhibe la formation des LTh2. La modification de la surface des lymphocytes T suite à leur activation leur permet de migrer jusqu'au site de l'infection. Ce processus est engagé quatre à cinq jours après l'invasion virale.

La reconnaissance du complexe CMH / antigène à la surface d'un macrophage par un LTh1 provoque la synthèse d'IFN $\gamma$  et induit la stimulation du macrophage. Le macrophage activé présente une activité antivirale renforcée (production de radicaux oxygénés), surexprime les molécules du CMH-II et produit les cytokines IFN $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que l'IL-12 qui orientent la différenciation des cellules T naïves vers les LTh1. Les LTh1 synthétisent également les TNF $\alpha$  et  $\beta$  qui permettent le recrutement de nouveaux phagocytes au site de l'infection.

Dans les tissus lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (LTc) naïfs reconnaissent le complexe CMH-I / antigène à la surface des APC et deviennent actifs.

- La réponse humorale

L'activation des lymphocytes B est initiée après contact entre une cellule B présentatrice du complexe CMH-II / antigène avec un LTh1. Cette interaction déclenche la libération d'IL-4 par les LTh2. Les lymphocytes B vont proliférer et se différencier en plasmocytes, producteur d'anticorps, ou en lymphocytes B mémoires.

Les anticorps capables de neutraliser les virus (anticorps neutralisants) permettent de bloquer la fixation du virus à la cellule et donc l'entrée. Néanmoins, lorsque le virus est déjà à l'intérieur de la cellule et se réplique, il devient moins accessible à la réponse humorale et

échappe à la neutralisation. Les anticorps neutralisants peuvent toutefois immobiliser les virus qui sont libérés à la surface de la cellule infectée. Le complexe anticorps / virus ou anticorps / cellule infectée va induire la cascade du complément (voie classique) qui conduit à la lyse du virus ou de la cellule <sup>30</sup>.

- La réponse adaptative cellulaire

La réponse à médiation cellulaire est conçue pour reconnaître et détruire les cellules infectées avant que la réplication et la libération de nouveaux virus ne soient accomplies. Les LTc ou les cellules NK interagissent avec une cellule infectée présentatrice d'antigènes et induisent la libération de perforines et de granzymes, molécules qui vont initier l'apoptose. L'apoptose peut également être déclenchée par la fixation du récepteur Fas à son ligand FasL se trouvant à la surface de la cellule infectée.

- b. Défense cellulaire activée suite à la reconnaissance d'un ARN double brin

En plus de la réponse immunitaire classique, la cellule a développé un mécanisme de défense spécialisé dans la reconnaissance et l'inhibition de l'ARNdb, caractéristique d'une invasion virale.

- i. *Famille des PRR* <sup>23,72</sup>

Dans la cellule, il existe une famille de récepteurs, les PRR (Pattern Recognition Receptor) qui sont sensibles à certaines caractéristiques des pathogènes (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern). Les PRR regroupent deux classes de récepteurs : les TLR (Toll-Like Receptor) et les RLH (Retinoic acid-inducible gene (RIG-I)-like RNA helicases). Après reconnaissance du pathogène, ces récepteurs déclenchent une cascade de réactions qui conduisent à la synthèse d'IFN $\alpha$  et  $\beta$  et de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12...).

Les virus possèdent un génome ARN ou ADN protégé par une capsid et parfois sont recouverts d'une enveloppe. Tous ces éléments constituent les PAMP que reconnaissent les PRR. L'ARNdb ou un appariement local double brin d'ARN généré au cours du cycle viral constitue un élément clef de la réaction gouvernée par les PRR. Le lieu où s'effectue la reconnaissance PAMP / PRR engage l'une des deux classes de récepteurs : les TLR à la surface de la cellule (reconnaissance de particules virales ; implication de TLR-2 et -4) et également dans les endosomes (TLR-3, -7, -8 et -9) et les récepteurs RLH dans le cytoplasme.

ii. Les protéines PKR et 2'-5' oligoadénylate synthétase <sup>72</sup>

Suite à la synthèse d'IFN, deux voies sont initiées : la voie gouvernée par la protéine PKR (dsRNA-activated Protein Kinase R) et la voie mise en place par la 2'-5' oligoadénylate synthétase (2'-5'OAS) (figure 20). Ces deux mécanismes permettent à la cellule de préparer la venue d'une potentielle infection. Cette condition cellulaire est appelée veille antivirale.

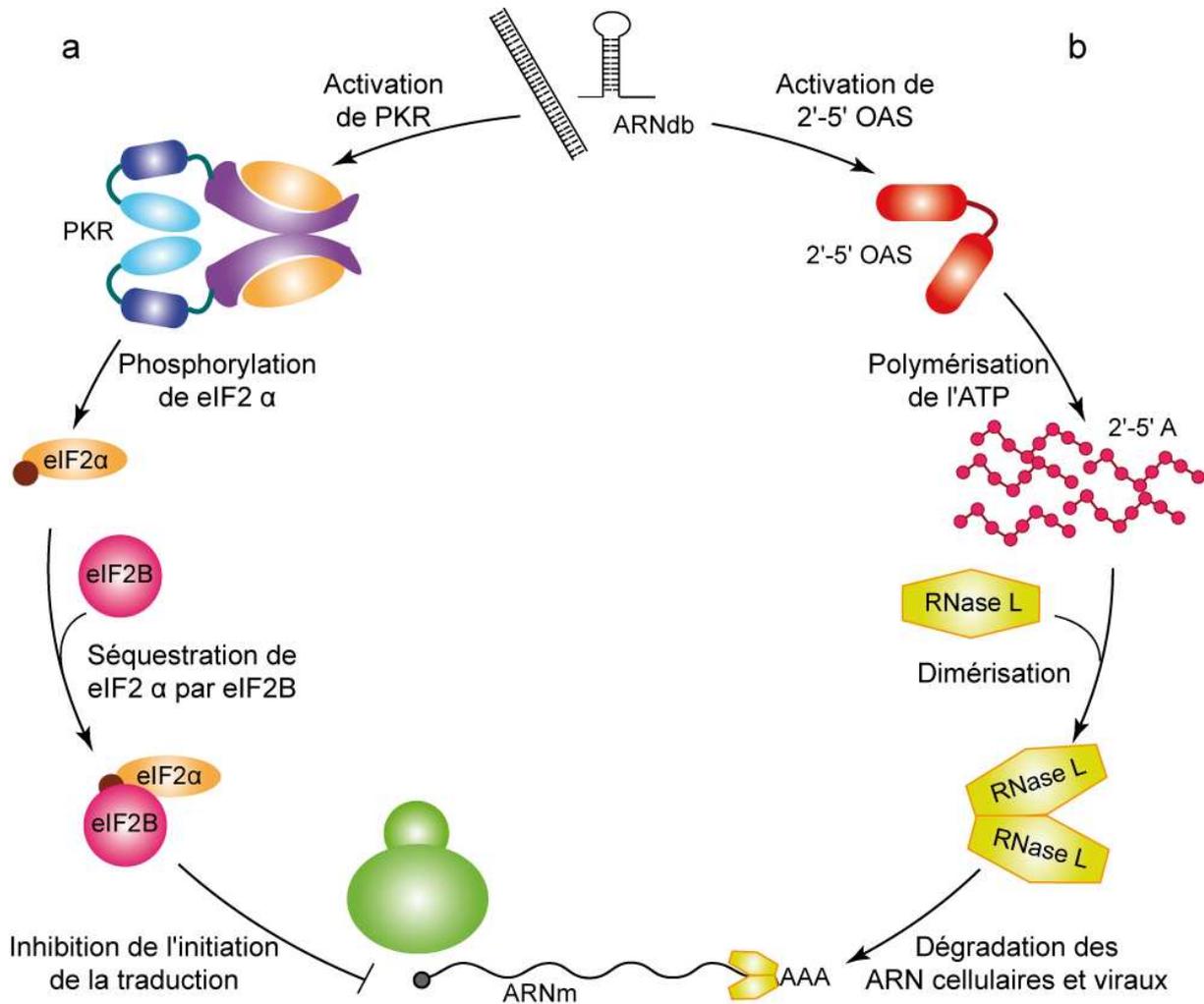


Figure 20 : Mécanismes de la PKR (a) et de la 2'-5'OAS (b). (Adapté de <sup>72</sup>)

- La protéine PKR

PKR est une protéine de 68 kDa qui phosphoryle ses cibles sur les résidus sérine ou thréonine. La fixation d'un ARNdb par PKR induit son homodimérisation ainsi que son autophosphorylation (figure 20a). PKR phosphoryle alors de nombreuses protéines dont le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  qui conduit à un arrêt total de la traduction. PKR phosphoryle également I $\kappa$ B ce qui induit la libération du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui active alors la synthèse de cytokines et d'IFN. L'étape finale de ce mécanisme conduit à l'apoptose de la cellule infectée.

- La protéine 2'-5'OAS

La 2'-5'OAS induite dans un premier temps par l'IFN est, dans un second temps, activée par un ARNdb (*figure 20b*). Cette enzyme polymérise alors l'ATP en oligoadénylates liés par une liaison 2'-5' (2'-5'A). La fixation de 2'-5'A sur la RNase L conduit à la dimérisation de la nucléase qui devient à son tour active. En conséquence, la RNase L dégrade les ARN cellulaires et viraux ce qui conduit à un arrêt de la traduction et à terme à l'induction de l'apoptose.

iii. *Mécanisme de l'ARN interférence ou silencing*<sup>57,148</sup>

Lorsqu'un virus pénètre dans la cellule et commence son cycle répliatif, des intermédiaires ARN double brin ou des appariements locaux double brin d'ARN sont souvent observés. Ces structures sont reconnues par l'enzyme Dicer qui fragmente l'ARN en petites molécules de 21-30 nucléotides de long, les siARN. La reconnaissance d'un des brins du siARN par une protéine Argonaute est suffisante pour créer le core d'un complexe spécifique, le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) responsable du mécanisme d'interférence. Dans ce complexe, le siRNA sert de guide pour la reconnaissance des séquences complémentaires au niveau d'un ARN cible qui sera clivé puis dégradé (*figure 21*).

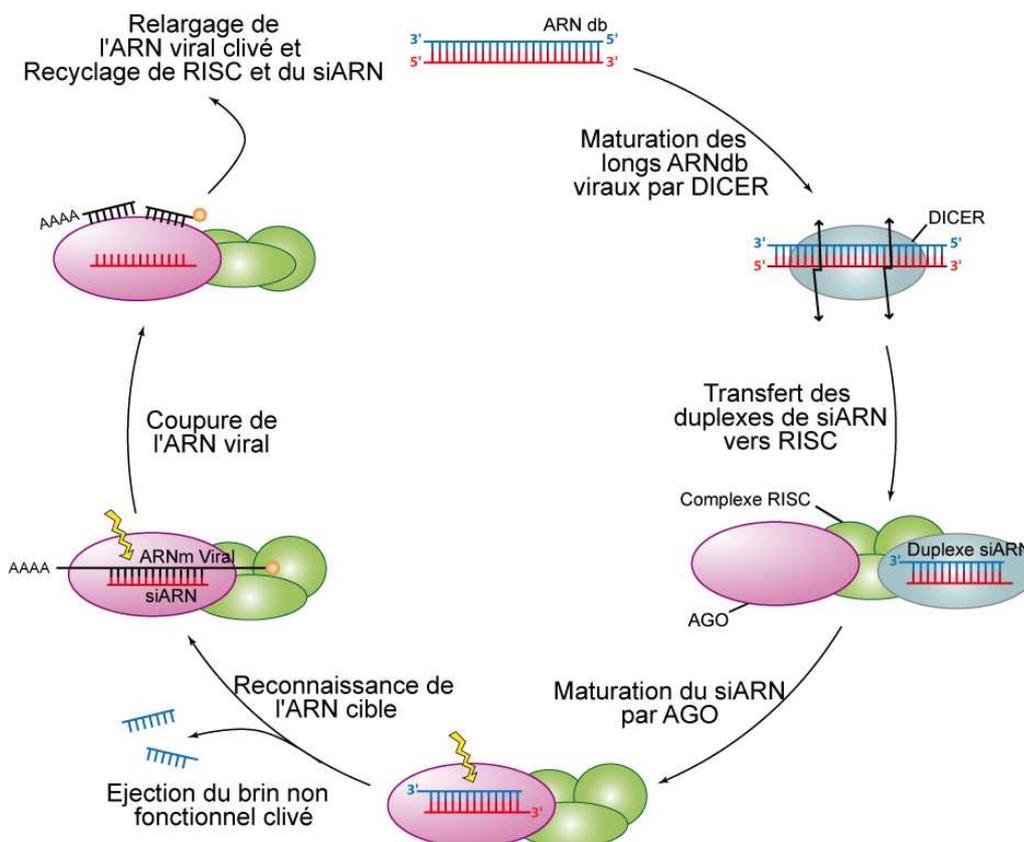


Figure 21 : Mécanisme de l'ARN interférence médié par la reconnaissance d'un ARNdb provenant de virus. (Source : Clément Chevalier, modifiée avec sa permission)

c. Différentes cibles, différentes stratégies mais un but commun <sup>2,62</sup>

## i. Les virus contrecarrent la défense immunitaire innée.

La réponse innée est non-spécifique du pathogène et est gouvernée par les cytokines telles que l'IFN et les IL. Les cytokines sont sécrétées par les cellules infectées et les APC (DC et macrophages) afin d'initier, activer et coordonner les acteurs de la réponse immunitaire. Le contrôle de la réponse innée permet aux virus d'échapper non seulement à la première barrière de défense de la cellule mais également d'empêcher l'activation d'une réponse spécifique à l'invasion : la réponse immunitaire adaptative. Les stratégies et les techniques développées par les virus pour contenir la défense innée sont très variées, quelques-unes sont énoncées ci-dessous (*tableau 2*) :

Différentes stratégies	Différentes techniques	Exemples de virus qui ont adopté cette stratégie
Non-activation de la voie alternative du complément	Camouflage de la particule virale (incorporation de protéines cellulaires ou glycosylation des protéines virales au niveau de l'enveloppe)	VIH CMV Virus de la vaccine HTLV
	Induction de l'expression d'inhibiteurs cellulaires de la voie du complément (DAF et MCP)	CMV
Interférence dans la transduction du signal suite à la fixation de l'IFN sur son récepteur.	Mécanisme exact inconnu	Adénovirus EBV HBV
Neutralisation des cytokines	Production d'homologues de récepteurs aux cytokines	Poxvirus
Détournement de la voie des cytokines	Synthèse de virokines (cytokines produites par les virus) qui permet d'attirer les cellules cibles du virus	EBV
Contournement de la veille antivirale et de la voie médiée par les PRR	Masque de l'ARNdb viral	EBV Virus de la vaccine
	Inhibition de l'activation de PKR (synthèse d'un ARNdb qui bloque PKR, dégradation de PKR ou activation de la protéine cellulaire inhibitrice de PKR, la TRBP)	EBV VIH Adénovirus
	Synthèse d'un analogue au 2'-5' oligoadénylate qui bloque l'activation de la RNase L	HSV
	Inhibition de la transduction du signal après fixation du PAMP sur le récepteur PRR (RLH ou TLR)	HCV Virus de la vaccine Virus de la grippe

Tableau 2: Exemples de stratégies virales permettant de contrecarrent la défense immunitaire innée.

ii. *Inhibition de la réponse adaptative*

Contrairement à la réponse innée, le système immunitaire adaptatif permet la mise en place d'une réponse spécifique à chaque pathogène. L'initiation de la défense adaptative repose sur la présentation des antigènes viraux par les molécules du CMH. L'inhibition de cette reconnaissance par les lymphocytes T est au cœur des stratégies virales et peut être régulée à plusieurs niveaux (*tableau 3*) :

Différentes stratégies	Différentes techniques	Exemples de virus qui ont adopté cette stratégie
Interférence avec l'expression des antigènes présentés par les molécules du CMH-I	Diminution de l'expression des molécules du CMH-I (inhibition de la transcription, dégradation)	VIH Adénovirus CMV
	Inhibition de l'exposition du CMH-I à la surface de la cellule (internalisation, rétention...)	Adénovirus VIH CMV
	Empêchement de la liaison CMH-I / antigène	CMV HSV
Inhibition de la voie classique du complément	Séquestration des protéines du complément	Herpèsvirus CMV
	Synthèse d'analogues de récepteurs aux anticorps (liaison de l'anticorps sur le virus ou cellule / récepteur viral)	HSV CMV
Infection virale latente	Non-production de protéines virales (pas de synthèse d'antigènes)	VIH EBV Herpèsvirus Alphavirus
Immunodépression	Infection des cellules immunitaires	Lentivirus Virus de la rougeole
Plus de correspondance entre antigène et virus	Evolution rapide, réassortiment génétique	(Virus à ARN) Virus de la grippe VIH

Tableau 3 : Exemples de mécanismes employés par les virus pour inhiber la réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes mémoires permettent de reconnaître les pathogènes lors d'une surinfection et de mettre en place beaucoup plus rapidement une réponse immunitaire adaptée. La capacité des virus à évoluer rapidement inhibe l'action des lymphocytes mémoires : les antigènes reconnus lors du premier contact ne sont plus les mêmes et par conséquent, toute la réponse adaptative doit être réamorcée. Ainsi, pour les virus hautement mutagènes,

l'élaboration de vaccins est impossible, le principe d'immunisation faisant appel aux lymphocytes mémoires.

### iii. Evitement de l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est déclenchée par contact entre une cellule infectée et une cellule NK ou un LTc. Cet évènement se produit lors de la réponse immunitaire adaptative mais également lors de la défense innée. L'apoptose permet au système immunitaire d'éliminer les cellules infectées sans déclencher d'inflammation. Cette voie est contrôlée par les caspases et la balance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques. La destruction des cellules infectées permet, dans certains cas, d'accélérer la propagation des virus ayant achevé leur cycle viral (surtout les virus à ARN). Cependant, pour les virus qui se répliquent lentement, l'apoptose réduit considérablement le taux de particules virales produites. C'est pourquoi de nombreux virus inhibent ou retardent l'apoptose (*tableau 4*).

Différentes stratégies	Différentes techniques	Exemples de virus qui ont adopté cette stratégie
Résistance aux cellules NK	Synthèse d'analogues des molécules du CMH-I	CMV
	Déplétion partielle des récepteurs CMH-I	VIH
Inhibition de la voie des caspases	Séquestration des caspases	Poxvirus
	Synthèse d'homologues au récepteur du TNF	Poxvirus
	Réduction des récepteurs Fas à la surface de la cellule	Adénovirus
Synthèse des molécules anti-apoptotiques	Production d'homologues à Bcl-2	Herpèsvirus Adénovirus
	Augmentation de la synthèse de Bcl-2	EBV VIH
Contrôle du facteur pro-apoptotique p53	Séquestration de p53	Adénovirus Herpèsvirus Papillomavirus HBV
	Dégradation de p53	Papillomavirus

Tableau 4 : Exemples de voies utilisées par les virus pour empêcher l'apoptose

### iv. Inhibition de l'ARN interference

Le mécanisme d'ARN interférence peut être considéré comme faisant partie de la défense immunitaire innée. Cette voie dépend de petits ARN de 21-30 nucléotides, les siARN (*figure 21*).

Beaucoup de virus codent une ou plusieurs protéines suppresseur du silencing (VSR, Viral Suppressor of RNA silencing). Ces VSR ciblent différentes étapes et acteurs de la voie de l'ARN interférence<sup>57,216</sup> :

- Masque de l'ARNdb et inhibition du clivage. L'association de l'ARNv avec une capsid ou des protéines de transport réduit son accessibilité aux RNases. La réplication virale dans des vésicules ou des organelles permet également d'échapper à la machinerie de l'ARN interférence.
- Stimulation de l'expression de facteurs cellulaires inhibiteurs du silencing. Le mécanisme exact d'action de ces régulateurs reste inconnu.
- Synthèse d'une protéine qui lie les siARN. Ces protéines sont souvent retrouvées chez les virus mais ne présentent aucune similarité dans la séquence en acides aminés et le repliement tridimensionnel ni entre elles ni avec les protéines cellulaires ayant un domaine de liaison à l'ARNdb. Elles ne sont pas spécifiques d'une séquence mais plutôt d'une structure. En effet, alors que la protéine P19 du virus de la mosaïque du Cymbidium s'homodimérise afin de lier les ARNdb de 21 pb, la protéine B2 du virus « Flock-House » reconnaît plutôt un duplexe ARN de conformation A indépendant de sa longueur. Ces protéines permettent de séquestrer les siARN qui ne peuvent plus alors être associés avec le complexe RISC.
- Modifications post-transcriptionnelles des siARN. Certains facteurs viraux peuvent inhiber la méthylation des siARN requise pour les stabiliser ; en son absence, ils sont dégradés. Ainsi, la protéine HcPro des potyvirus bloque l'activité de la méthyltransférase HEN1 responsable de la méthylation des siARN ; les siARN deviennent oligo-uridinilés puis sont dégradés.
- Inhibition de la formation ou de l'activité du complexe RISC. En séquestrant certaines protéines essentielles pour la formation du complexe RISC ou en inhibant son activité, le mécanisme d'ARN interférence est interrompu. La protéine 2b du virus de la mosaïque du concombre agit de cette manière en interagissant avec les siARN chargés par AGO1 ce qui inhibe l'activité de clivage du complexe RISC

#### d. Le VIH-1 contourne la réponse immunitaire

La première défense du VIH contre le système immunitaire consiste en sa capacité à évoluer très rapidement, par le camouflage de la particule virale en incorporant dans son enveloppe des protéines cellulaires et par la glycosylation de gp120. Le VIH inhibe également la réponse immunitaire adaptative avant son activation. En effet, une fois le VIH entré par endocytose dans les DC, ces cellules migrent vers les tissus lymphoïdes afin d'activer les lymphocytes T. Le VIH infecte alors les lymphocytes naïfs avant leur différenciation<sup>235</sup>.

Etant un virus complexe, le VIH code en plus des protéines structurales, enzymatiques et d'enveloppe, les protéines régulatrices (Tat et Rev) et auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu et Nef). Initialement, ces protéines étaient supposées comme non-indispensables à l'infection, mais il a été démontré depuis qu'elles sont importantes pour une infection productive *in vivo*. Certaines protéines virales sont impliquées dans des mécanismes de défense contre le système immunitaire classique alors que d'autres ont pour fonction de contrecarrer des facteurs anti-rétroviraux <sup>138</sup>.

L'apoptose est très régulée par le VIH tout au long de son cycle répliatif. Plusieurs protéines virales (Tat, Nef, Vpr, Vpu, PR et Env) sont impliquées dans la mise en place d'un équilibre entre la survie et la mort cellulaire en régulant soit des facteurs pro-apoptiques soit des facteurs anti-apoptiques. Cette régulation est très complexe (pour revue <sup>85,188</sup>) et ne sera pas discutée ici.

*i. Tat et Nef contre le système immunitaire classique*

- La protéine Tat

Tat est une petite protéine de 14 kDa dont la fonction principale est d'activer la transcription des gènes viraux en recrutant le facteur cellulaire PTEF-b. Elle est également impliquée dans les mécanismes d'évasion du système immunitaire mis en place par le VIH.

A faible taux, l'élément TAR des ARN viraux active la protéine PKR qui s'auto-phosphoryle et peut alors cibler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  qui sera dégradé. La protéine Tat agit comme un compétiteur avec eIF2 $\alpha$  et prévient sa phosphorylation. Tat phosphorylée présente une meilleure affinité pour l'élément TAR et stimule plus fortement la transcription des ARN viraux. A haute concentration, TAR inhibe également la voie médiée par PKR en séquestrant la kinase. Des études récentes ont également montré que Tat pouvait inhiber l'activation de PKR en prévenant sa phosphorylation <sup>22</sup>.

Tat interfère également avec le mécanisme du silencing. En sa présence, le complexe RISC ne peut s'associer. Tat intervient en effet en aval du processus du clivage de l'ARNdb probablement en séquestrant les mi / siARN produits par Dicer <sup>175</sup>. L'élément TAR participe aussi à cette régulation en liant la protéine cellulaire TRBP (TAR RNA Binding Protein). Cette protéine fait partie du complexe RISC <sup>36</sup> et sa fixation sur TAR prévient sa formation <sup>14</sup>. L'association TAR / TRBP ou TAR / Tat masque également la structure double brin et prévient l'activation des défenses faisant appel à la présence d'un ARNdb.

- La protéine Nef

La protéine Nef (Negative factor) est une protéine de 27 kDa, myristylée à son extrémité N-terminale et essentielle à la pathogénie du VIH *in vivo*. Nef est multifonctionnelle, elle inhibe la réponse immunitaire innée et adaptative et augmente l'infectivité du virus de plusieurs façons. En complément de l'action de la protéine Vpu, Nef diminue l'expression des récepteurs CD4<sup>73</sup>. Le manque de ces récepteurs au niveau des endosomes permet aux protéines de l'enveloppe virale, auparavant séquestrées par les molécules CD4, d'être délivrées jusqu'au lieu d'assemblage du virion. De plus, l'absence de CD4 au niveau de la membrane renforce l'infectivité en favorisant les processus d'assemblage et de bourgeonnement.

Nef permet également l'internalisation spécifique de certains allotypes des molécules du CMH-I<sup>185</sup>, normalement retrouvés en surface de la cellule. En régulant spécifiquement la présence de certains récepteurs du CMH-I, Nef perturbe le processus de présentation d'antigènes viraux aux lymphocytes Th1 tout en préservant la cellule infectée de l'apoptose. En effet, une cellule qui ne possède pas ou peu de récepteurs du CMH-I est reconnue par les cellules NK qui induisent son élimination. Dans les macrophages, Nef induit également la production de chimiokines qui recrutent de nouveaux lymphocytes au lieu de l'infection<sup>208</sup>. Cet aspect facilite la dissémination du virus.

- ii. Les facteurs de restriction anti-rétroviraux*

D'après les récents résultats, il devient évident que la cellule a développé, en plus de son système immunitaire classique, d'autres voies faisant appel à des facteurs spécifiques de l'infection par les rétrovirus : les facteurs de restriction anti-rétroviraux. Théoriquement, ces protéines peuvent intervenir à toutes les étapes du cycle viral : de l'attachement à la cellule hôte jusqu'à la libération et la maturation des particules virales. En plus de contrer la voie classique, le VIH contourne ces défenses cellulaires spécifiques des rétrovirus par des mécanismes variés. L'étude des facteurs de restriction ainsi que les stratégies mises en œuvre afin de les contrecarrer peut fournir de nouvelles cibles aux médicaments antiviraux qui inhiberaient les protéines virales impliquées ou au contraire stimuleraient l'expression des protéines cellulaires.

- TRIM5 $\alpha$ , cyclophiline A et CA

La protéine TRIM5 $\alpha$  (TRIMpartite Motif protein 5 $\alpha$ ) a récemment été identifiée comme un facteur de restriction important dans les cellules de mammifères en bloquant l'infection par les rétrovirus d'une manière espèce dépendante. Le gène TRIM5 a été identifié suite à un criblage d'une banque d'ADNc afin de déterminer le facteur responsable de la restriction de

l'infection par le VIH-1 chez le singe rhésus <sup>204</sup>. Les protéines Ref1 (chez l'humain) et Lev1 (chez le singe) ont été identifiées comme des variants de TRIM5 $\alpha$  <sup>94,115</sup>.



### La protéine TRIM5 $\alpha$

La protéine TRIM5 $\alpha$  fait partie d'une superfamille de protéines qui compte plus de 70 membres chez l'homme. Cette famille se caractérise par la présence d'un domaine en trois parties qui lui a donné son nom, ce motif est appelé RBCC parce qu'il contient un domaine RING, un domaine B-Box 2 et un domaine Coil-Coiled (*figure 22*). Le domaine RING est un domaine de liaison au zinc impliqué dans des interactions protéine-protéine et retrouvé dans des protéines ayant une activité E3 ubiquitine ligase. Le motif B-Box est également un domaine de liaison au zinc médiant putativement les interactions protéine-protéine. Le domaine coiled-coil est responsable de la multimérisation de la protéine.

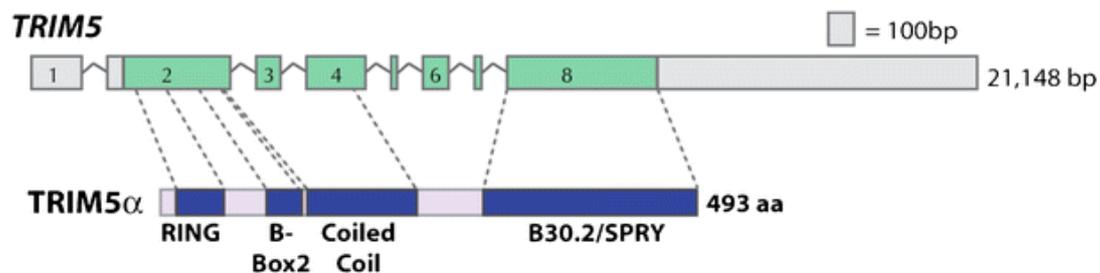


Figure 221 : Organisation génétique du gène TRIM5 chez l'homme et organisation de la protéine TRIM5 $\alpha$  en domaines. (Source <sup>107</sup>)

La fonction de la plupart des protéines TRIM reste à être déterminée bien que plusieurs membres soient impliqués dans la défense immunitaire innée. La majorité des gènes TRIM codent un domaine additionnel en C-terminal, le domaine B30.2 ou SPRY, responsable de la spécificité de TRIM pour ses cibles virales <sup>177</sup>. Le gène TRIM5 code plusieurs isoformes grâce à un mécanisme d'épissage alternatif permettant le raccourcissement du domaine SPRY. La plus longue de ces isoformes est la protéine TRIM5 $\alpha$  avec 493 acides aminés. Cette protéine s'associe sous forme de trimère dans le cytoplasme et est exprimée dans la plupart des tissus <sup>181</sup>. La structure de cette protéine est encore inconnue mais par analogie avec des protéines comportant les mêmes domaines que TRIM5 $\alpha$ , des hypothèses sont émises. Le core du domaine SPRY se replierait en feuillets  $\beta$  antiparallèles entourés par des boucles de longueur variable selon les espèces ; ce domaine présenterait deux faces de liaison aux substrats.

 **La protéine de capside**<sup>71</sup>

La protéine de capside du VIH-1 constituée de 231 acides aminés représente le constituant élémentaire du core viral. Cette protéine est synthétisée sous forme de précurseurs, Gag et Gag-Pol, qui seront clivés lors de la maturation par la PR virale. CA est composée de deux domaines : le NTD (résidus 1-145) connecté par une région linker au CTD (résidus 151-231) (figure 23). Le NTD est structuré en sept hélices  $\alpha$  (1-7), la boucle reliant l'hélice 4 à 5 renferme le site de liaison à la cyclophiline A (CypA). Le CTD est composé d'une hélice  $3_{10}$  courte suivie d'une boucle et d'un motif à quatre hélices  $\alpha$  (8-11). Il renferme un domaine très conservé chez la plupart des rétrovirus et des rétrotransposons, MHR (Major Homology Region), impliqué dans l'assemblage de Gag. Après le clivage de Gag, 4000 à 5000 molécules de CA s'assemblent afin de construire le core viral mature. L'assemblage des protéines de capside forme un cône de fullerène fermé par cinq pentamères à l'extrémité la plus étroite et par sept pentamères à l'autre extrémité (figure 23). Les protéines CA matures du corps du core viral forment un réseau d'hexamères constitué d'un anneau de six NTD connectés aux multimères voisins par des interactions CTD-CTD.

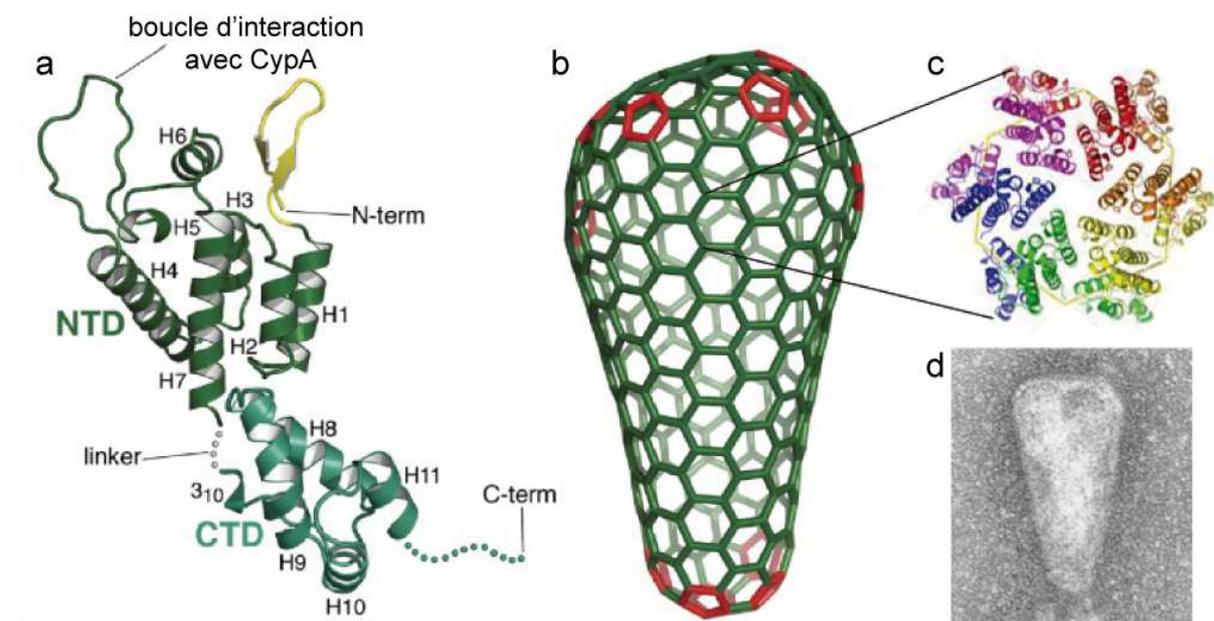


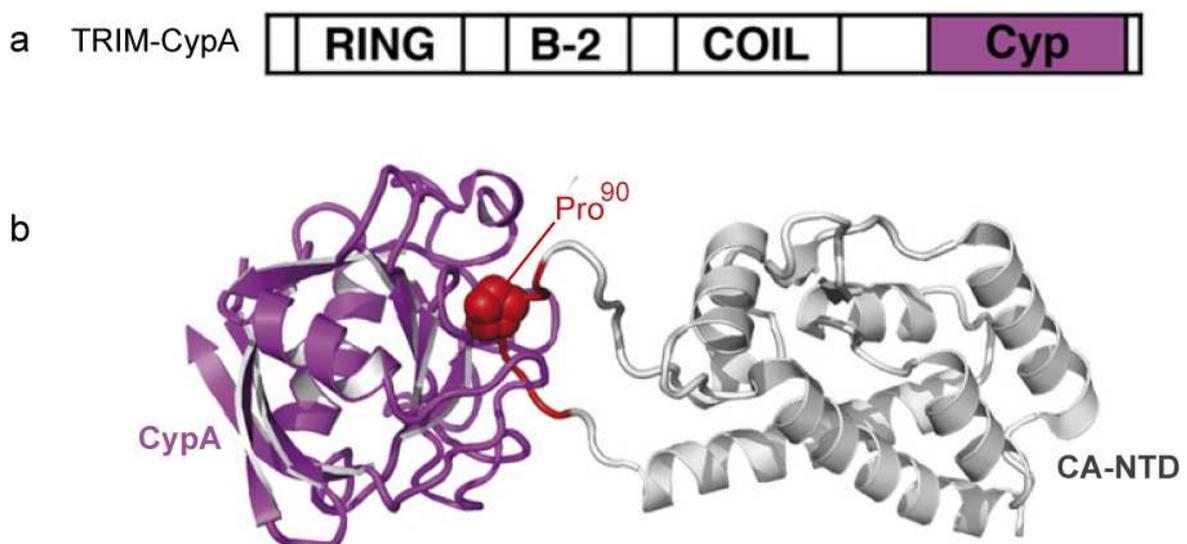
Figure 23: (a) Structure de la protéine virale de capside mature. (b) Modèle du core en structure de fullerène avec les hexamères (en vert) et les pentamères (en rouge) de capside. (c) Structure d'un hexamère de capside. (Source <sup>71</sup>) (d) Cliché de microscopie électronique de core purifié.

 **Mécanisme antiviral et évation**

Lorsque le core du VIH-1 pénètre dans le cytoplasme de cellules simiennes, la protéine de capside qui le forme est reconnue rapidement par TRIM5 $\alpha$ . Le complexe virus / TRIM5 $\alpha$

conduit à un blocage du cycle au niveau des étapes post-entrée avant le processus d'intégration. Ce mécanisme de restriction reste flou mais implique probablement une décapsidation précoce <sup>107</sup>.

La découverte de deux protéines de fusion entre TRIM5 $\alpha$  et CypA chez les singes renforce l'idée que CypA intervient dans le mécanisme de restriction <sup>160,182</sup>. Dans le cas de ces deux fusions, cette protéine remplace le domaine SPRY de TRIM5 $\alpha$  (*figure 24*). CypA est une enzyme ubiquitaire cytoplasmique qui catalyse l'isomérisation *cis* / *trans* de la liaison peptidique au niveau d'un résidu proline. Cette protéine est encapsidée dans la particule virale après interaction avec le précurseur Gag au niveau du domaine de capsid. La présence de CypA dans la cellule nouvellement infectée jouerait un rôle plus important que la protéine préalablement encapsidée. La fixation de CypA sur la capsid formant le core conduit à l'isomérisation de la liaison Gly<sup>89</sup>-Pro<sup>90</sup> au niveau de la surface externe de la capsid (*figure 24*) et ce changement est essentielle à l'infectivité <sup>211</sup>.



**Figure 24:** (a) Domaines de la protéine TRIM-Cyp. (b) Structure de la CypA lié au domaine N-terminal de la capsid. La boucle d'interaction entre CA et CypA est indiquée en rouge. (Source <sup>71</sup>)

Le rôle de la CypA dans la réplication virale est ambigu. En effet, dans les cellules simiennes, CypA fait le lien entre TRIM5 $\alpha$  et CA et conduit à la restriction de la réplication du VIH-1. L'inhibition spécifique par ajout de siARN ou d'inhibiteur de CypA (comme la cyclosporine) permet une restauration de l'infectivité virale <sup>19</sup>. Néanmoins, dans les cellules humaines, sa présence permet au virus d'effectuer un cycle viral normal et de produire des particules virales infectieuses. En résumé, CypA agit en facteur positif pour la réplication du

VIH-1 dans les cellules humaines et en facteur négatif pour la réplication du VIH-1 dans les cellules simiennes<sup>212</sup>.

La protéine TRIM5 $\alpha$  humaine lie avec une faible affinité la protéine de capsid du VIH-1<sup>205</sup>. De faibles changements dans le domaine SPRY de TRIM5 $\alpha$  chez l'homme affecte sa capacité d'interaction. Ainsi, la mutation du résidu 332 confère à TRIM5 $\alpha$  une meilleure efficacité de liaison à CA et permet de restreindre l'inhibition par le VIH-1<sup>131</sup>. Une possibilité pour expliquer ces différents résultats est que le complexe CA / CypA permet d'améliorer l'affinité de TRIM5 $\alpha$  pour sa cible<sup>211</sup>. Dans le cas d'une infection chez l'homme, TRIM5 $\alpha$  pourrait donc reconnaître la capsid mais serait incapable de médier la restriction du VIH-1. L'isomérisation de CA par CypA pourrait expliquer l'arrêt du mécanisme de restriction mené par TRIM5 $\alpha$ . Une autre hypothèse dit qu'au contraire, l'isomérisation de la capsid serait un prérequis à la reconnaissance de CA par TRIM5 $\alpha$ <sup>211</sup>. Dans ce cas, TRIM5 $\alpha$  ciblerait uniquement les protéines de capsid en conformation *cis* et les bloquerait dans cette conformation, processus qui favoriserait une décapsidation précoce.

De nombreuses expériences restent à accomplir afin d'élucider le rôle précis de la CypA dans le mécanisme de résistance chez l'homme et le devenir du virus après la reconnaissance par TRIM5 $\alpha$  (dégradation, décapsidation prématurée ?).

- Téthérine et Vpu

L'infection de cellules HeLa par un virus VIH-1 pseudotypé avec VSV-G requiert la présence de la protéine virale Vpu. La nécessité de Vpu est cellulaire-dépendante ; l'infection de cellules simiennes (Cos par exemple) par le VIH-1 pouvant se faire en son absence. Le défaut de production de particules virales à partir d'hétérocaryons entre une cellule HeLa et une cellule Cos infectés avec un virus pseudotypé a permis de démontrer l'existence d'un facteur de restriction spécifiquement retrouvé dans les cellules HeLa et absent des cellules Cos. L'ajout en *trans* de Vpu restituant la production de virions permet de conclure que Vpu est responsable du contournement de ce facteur de restriction<sup>219</sup>. Des études récentes ont permis son identification<sup>156</sup>.



### **La protéine Téthérine**

Auparavant nommée BST-2, HMI 1.24 ou encore CD317, la protéine téthérine a été identifiée comme étant responsable de la restriction du VIH-1 en absence de la protéine Vpu<sup>156</sup>. Chez l'homme, la téthérine est une protéine de 180 acides aminés qui effectue la navette entre la membrane plasmique et les membranes cellulaires internes (réseau trans-Golgien et endosomes). Cette protéine présente peu d'homologies de séquence avec les différents

orthologues mais la fonction reste conservée entre les espèces <sup>78</sup>. Elle est ubiquitaire et semble jouer un rôle en régulant le développement des cellules B <sup>103</sup>. Son taux d'expression varie selon le type cellulaire <sup>103</sup> et est contrôlé par la présence d'IFN $\alpha$  <sup>155</sup>, lui-même stimulé lors d'une infection virale. A la membrane cytoplasmique, cette protéine est majoritairement extracellulaire et est composée de trois domaines : un domaine transmembranaire en N-terminal avec une petite queue cytoplasmique, un motif central coiled-coil et un domaine C-terminal couplé avec un lipide (GPI) permettant l'ancrage de la protéine à la membrane <sup>127</sup>. Le domaine central coiled-coil est probablement impliqué dans des interactions protéine-protéine et l'homodimérisation. La téthérine est localisée au niveau des radeaux lipidiques par la présence du résidu GPI, siège de l'assemblage de la particule virale.



### **La protéine Vpu <sup>161</sup>**

La protéine Vpu n'est pas retrouvée dans tous les génomes des lentivirus : elle est absente chez le VIH-2 et les quelques virus simiens proches phylogénétiquement. Vpu est une petite phosphoprotéine de 16 kDa exprimée tardivement dans le cycle viral à partir d'un ARN bicistronique. Cette protéine est localisée à la membrane plasmique, dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et également dans les endosomes. Vpu forme des oligomères à la membrane plasmique mais n'est pas encapsidée dans la particule virale. Elle est composée de trois hélices  $\alpha$  réparties en deux domaines majeurs : le NTD hydrophobe qui permet l'ancrage à la membrane (résidus 1-27) et le CTD cytoplasmique (acides aminés 27-81) formé de deux hélices  $\alpha$  (résidus 35-50 et 58-70) reliées par une boucle flexible renfermant deux résidus serine conservés phosphorylables.

Ces deux domaines sont indépendamment requis pour les deux fonctions principales de Vpu. Le premier rôle identifié de Vpu est d'induire la dégradation des récepteurs CD4 dans le réticulum endoplasmique. Après formation du complexe Vpu / CD4, la protéine virale induit le recrutement d'une E3 ubiquitine ligase ( $\beta$ TrCP) dans ce compartiment cellulaire. Les résidus sérine phosphorylés ainsi que le CTD de Vpu sont essentiels pour l'interaction avec  $\beta$ TrCP. Le récepteur CD4 ubiquitiné est relargué du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme où il est dégradé par la voie du protéasome. La seconde fonction de Vpu essentielle à la production de virions infectieux est portée par le NTD. En effet, dans les cellules humaines (HeLa, monocytes / macrophages, cellules T naïves), Vpu contourne un facteur de restriction, la téthérine.



### Mécanisme de restriction et évasion virale

En absence de Vpu, la téthérine induit un blocage dans la libération des virus caractérisé par une accumulation de particules virales matures à la surface de la cellule <sup>156</sup> (figure 25).

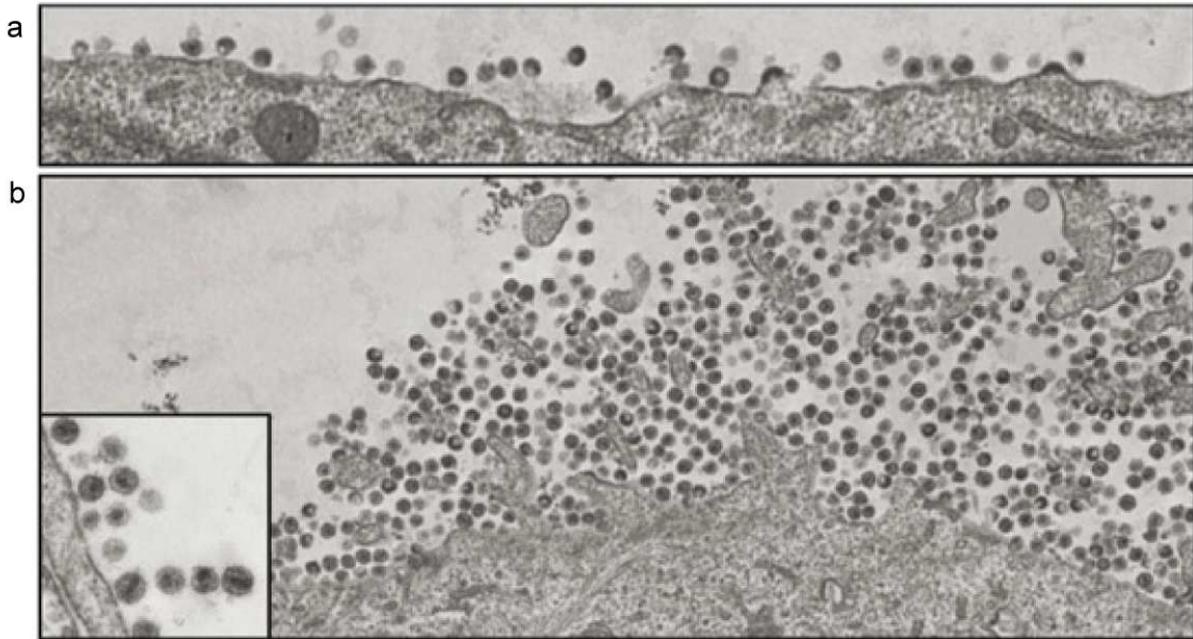


Figure 25 : Clichés de microscopie électronique de la surface de cellules surexprimant la téthérine et infectées par un virus WT (a) ou un virus délété de Vpu (b). (Source <sup>156</sup>)

Les mécanismes exacts de restriction et d'évasion virale restent à éclaircir. Néanmoins, les éléments déterminés permettent d'échafauder plusieurs hypothèses. La téthérine permettrait la construction d'un pont entre la cellule et le virion ou entre virions en ancrant le motif GPI d'un monomère de téthérine dans une des membranes du complexe et le motif lipidique du second monomère dans la membrane partenaire <sup>156</sup>. L'association de la téthérine avec le virus induit le recrutement de la machinerie cellulaire de l'endocytose qui conduit à l'internalisation du virion dans des endosomes tardifs puis à sa dégradation <sup>154</sup>. Vpu diminue l'expression de la téthérine en déclenchant son clivage par la voie de l'ubiquitine / protéasome <sup>78</sup>. La déplétion de la téthérine dans la cellule et au niveau de la membrane plasmique permet aux particules virales d'achever leur cycle répliatif.

Cependant, la stratégie employée par Vpu afin de réduire l'expression de la téthérine reste floue. En effet, bien qu'il ait été montré que Vpu interagisse avec la téthérine *via* son domaine transmembranaire dans les compartiments intracellulaires <sup>156</sup>, de nombreuses questions demeurent. Vpu inhibe-t-elle la localisation membranaire de la téthérine en interagissant avec elle dans les endosomes ou induit-elle un transport rétrograde de la téthérine de la membrane plasmique vers les endosomes ? Une fois dans les endosomes,

comment Vpu recrute les membres de la voie de l'ubiquitine / protéasome ? Le mécanisme est-il identique à celui employé pour la dégradation du récepteur CD4 ? De plus, une étude récente montre que la téthérine ne serait pas l'unique facteur que Vpu contrerait afin d'induire le bourgeonnement du virion <sup>218</sup>. Un autre niveau de complexité s'ajoute en effet par la présence d'une protéine impliquée dans le recyclage d'un récepteur de l'hormone EGF (Epidermal Growth Factor) à la membrane plasmique, la protéine CAML (CAlcium Modulating cyclophilin Ligand). L'expression de cette protéine dans une cellule permissive à l'infection par un virus  $\Delta$ Vpu transforme le phénotype de la cellule en un état restrictif et la déplétion de CAML dans une cellule restrictive permet de produire des particules virales infectieuses en absence de Vpu. De plus, les protéines Vpu et CAML colocalisent dans les compartiments périnucléaires <sup>218</sup>. Des études supplémentaires devront être menées afin de répondre à plusieurs interrogations sur le devenir de CAML en présence de la protéine Vpu, si CAML est effectivement un autre facteur de restriction et enfin si la téthérine et CAML font parties d'un mécanisme de défense commun et par conséquent de définir les interactions entre ces deux protéines.

- APOBEC3G et Vif

Le VIH-1 délété du gène *Vif* peut se répliquer uniquement dans les cellules permissives : certaines lignées de cellules T (Jurkat et SupT1) et les lignées non hématopoïétiques (HeLa, 293T, COS). Des expériences d'hétérocaryons entre une cellule permissive et une cellule non-permissive (cellules naturelles de l'infection du VIH-1 : lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, monocytes / macrophages) ont montré l'existence d'un facteur de restriction présent uniquement dans les cellules non-permissives <sup>136,193</sup>. Le mode d'action de ce facteur est particulier car il n'agit pas au premier cycle de l'infection mais au second. En effet, la production de particules virales infectieuses ne dépend pas de la cellule dans laquelle le virus se réplique mais de la cellule source d'où sont issus les virions. L'identification de ce facteur a été effectuée par l'analyse soustractive de banques d'ADNc provenant des cellules CEM (non permissives) et de cellules CEM-SS (permissives). Cette protéine d'abord nommée CEM15 puis APOBEC3G (APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme, Catalytic polypeptide, A3G) a permis de mieux comprendre le phénotype des virions  $\Delta$ Vif produits à partir de cellules non-permissives <sup>189</sup>. Depuis, de nombreuses études tentent d'élucider quels sont les mécanismes gouvernés par la protéine virale Vif afin d'annihiler l'action d'A3G.



**Revue : Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 Viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC3G and APOBEC3F restriction factors**

Cette revue discute des rôles des protéines Vif et A3G dans la réplication du VIH-1. Elle s'articule en plusieurs parties et décrit :

1. Les propriétés générales de la protéine Vif : son expression et la régulation de son expression ainsi que sa localisation dans la cellule
2. Les défauts structuraux et fonctionnels des particules virales produites en absence de Vif
3. Les fonctions de Vif dans l'assemblage : son interaction avec l'ARNg, son encapsidation dans la particule virale et sa fonction comme possible régulateur du cycle de réplication
4. Le rôle des protéines A3G et A3F comme facteurs de restriction : leur mécanisme désaminase-dépendant et -indépendant
5. La stratégie virale conduite par Vif afin de contrecarrer l'action des protéines A3G et A3F.

Signalement bibliographique ajouté par :

**L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Tumultuous Relationship between the Human Immunodeficiency Virus Type 1  
Viral Infectivity Factor (Vif) and the Human APOBEC-3G and APOBEC-3F  
Restriction Factors**

Simon HENRIET, Gaëlle MERCENNE, Serena BERNACCHI, Jean-Christophe  
PAILLART, and Roland MARQUET

***Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, Volume 73, Numéro 2,  
Pages 211-232***

*Copyright © 2009 American Society for Microbiology*

**Revue : p. 49-.... (I - XXI)**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00040-08>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Bien que de nombreux aspects aient été exposés dans cette revue, il m'a semblé important de revenir sur certains points afin de les développer davantage. Ainsi, dans un premier temps, je détaillerai un peu plus la protéine A3G : son expression, sa structure, sa localisation et enfin sa fonction dans la cellule. Dans un second temps, je m'attarderai sur la protéine Vif et plus précisément, je décrirai son organisation et l'importance de son domaine de multimérisation dans la production de particules virales infectieuses.



### **La protéine APOBEC3G**

La protéine A3G est une cytidine désaminase faisant partie de la sous-famille des protéines APOBEC3 qui compte sept membres. Bien que beaucoup d'éléments aient été rassemblés sur l'activité d'A3G, peu de choses sont connues sur sa régulation transcriptionnelle. Le gène codant A3G est localisé sur le chromosome 22 et le promoteur possède des sites de fixation aux facteurs de transcription Sp1 et Sp3<sup>149</sup>. L'identification de ces facteurs de transcription stimulant la synthèse d'A3G n'exclut pas l'existence d'autres protéines régulant la production d'ARNm A3G. Cet ARN possède plusieurs isoformes ayant toutes en communs huit exons<sup>106</sup> mais différent par leur partie 5'UTR plus ou moins longue<sup>149</sup>. La diversité de taille des ARN pourrait faire intervenir des mécanismes de régulation différents. Cependant, une isoforme de l'ARNm est retrouvée majoritairement, elle contient 297 nucléotides en 5'UTR, une séquence codante de 1152 résidus et une région 3'UTR de 321 nucléotides.

La protéine A3G est exprimée dans les cellules hématopoïétiques (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, monocytes / macrophages, les DC), le poumon, le foie, la rate, les ovaires, les testicules et également dans certaines lignées de cellules cancéreuses<sup>106</sup>. A3G est une protéine de 384 acides aminés (taille prédite de 46 kDa) phosphorylable sur le résidu thréonine 32 par la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation d'A3G diminue l'affinité de Vif pour A3G ainsi que l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome<sup>192</sup>. A3G se structure en deux domaines : le NTD responsable de la liaison à l'ARN et impliqué dans l'incorporation dans le virion et le CTD porteur de l'activité catalytique (*figure 26*). Bien que seul le CTD soit fonctionnel<sup>153</sup>, les deux domaines possèdent la signature d'un motif cytidine désaminase de type doigt de zinc composé des résidus His-X-Glu-X<sub>27-28</sub>-Pro-Cys-X<sub>2</sub>-Cys<sup>93</sup>. La structure cristallographique (résidus 197-380<sup>99</sup>) et les études RMN (résidus 198-384<sup>35</sup> et résidus 193-384<sup>67</sup>) du CTD d'A3G ont permis d'établir le repliement du domaine catalytique en cinq feuillets  $\beta$  entourés par six hélices  $\alpha$ . L'atome de zinc est enfermé entre les résidus H<sup>257</sup>, C<sup>288</sup>, C<sup>291</sup> et une molécule d'eau. La présence du zinc est essentielle pour l'activation de la molécule d'eau afin de produire un résidu hydroxyle nucléophile qui induit la désamination<sup>31</sup>.

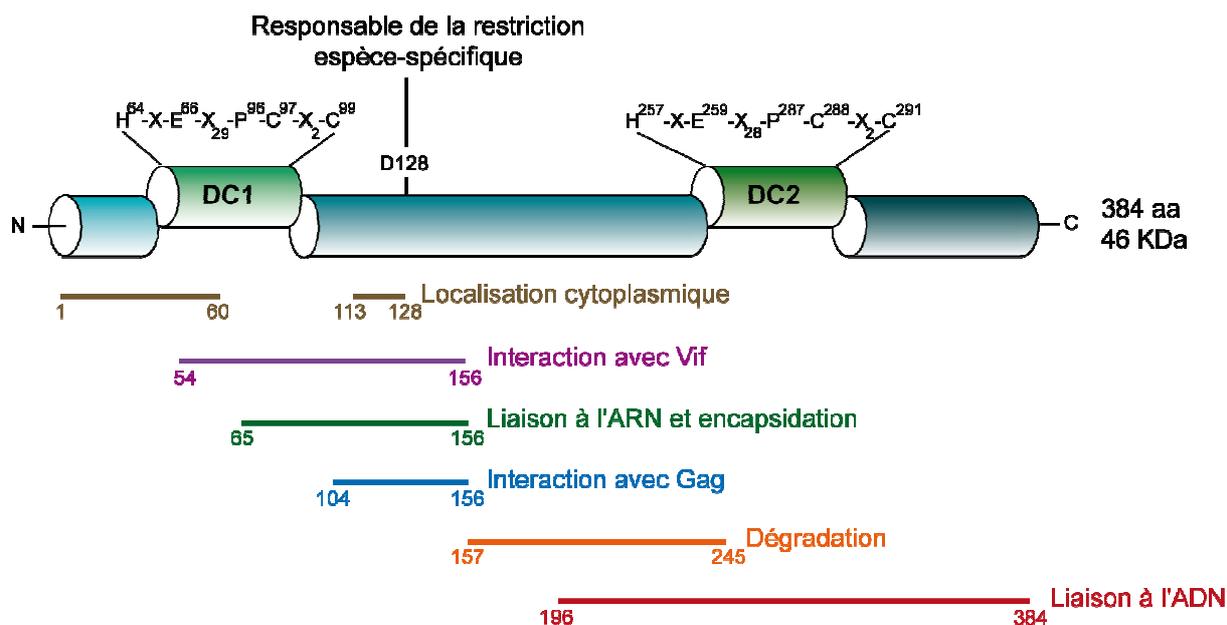


Figure 26 : Organisation de la protéine A3G en domaines. DC : domaine catalytique

La forte homologie entre les domaines N- et C-terminaux ainsi que la résolution de la structure en tétramères d'APOBEC2<sup>172</sup> ont permis de modéliser la structure complète d'A3G. Contrairement à A3G, APOBEC2 ne possède qu'un domaine catalytique. Plusieurs études montrent qu'A3G est capable de s'associer pour former des homodimères<sup>16,34,102,224,230</sup>. Bien que certains résultats soient contradictoires, plusieurs indices argumentent vers une dimérisation d'A3G *via* son NTD (*figure 27a*) et que cette association soit dépendante de l'ARN : (1) toutes les structures du CTD résolues montrent que ce domaine est monomérique, (2) les mutations dans le NTD induisant une perte d'oligomérisation entraînent également une diminution de la capacité à lier l'ARN et (3) les dimères d'A3G sont dissociés après un traitement à la RNase. La présence de résidus basiques (R<sup>14</sup>, R<sup>24</sup>, R<sup>29</sup>, R<sup>30</sup>, K<sup>63</sup>, K<sup>99</sup>, R<sup>102</sup>, R<sup>122</sup>, R<sup>136</sup>, K<sup>141</sup> et R<sup>142</sup>) et de résidus aromatiques (<sup>124</sup>YYFW<sup>127</sup>) à l'interface construite par les deux NTD d'un dimère d'A3G induit la formation d'une surface de charge positive caractéristique de la fixation des acides nucléiques<sup>102</sup> (*figure 27b*). De plus, des mutations des résidus basiques à l'intérieur de la poche induit une perte d'oligomérisation, un défaut de liaison à l'ARN, un défaut d'encapsidation ainsi qu'une disparition de l'activité antivirale<sup>102</sup>. A3G peut également former des hétérodimères *in vitro* et dans les cellules avec A3F et A3DE<sup>49,230</sup> ; la fonction de ces hétérodimères reste encore à élucider.

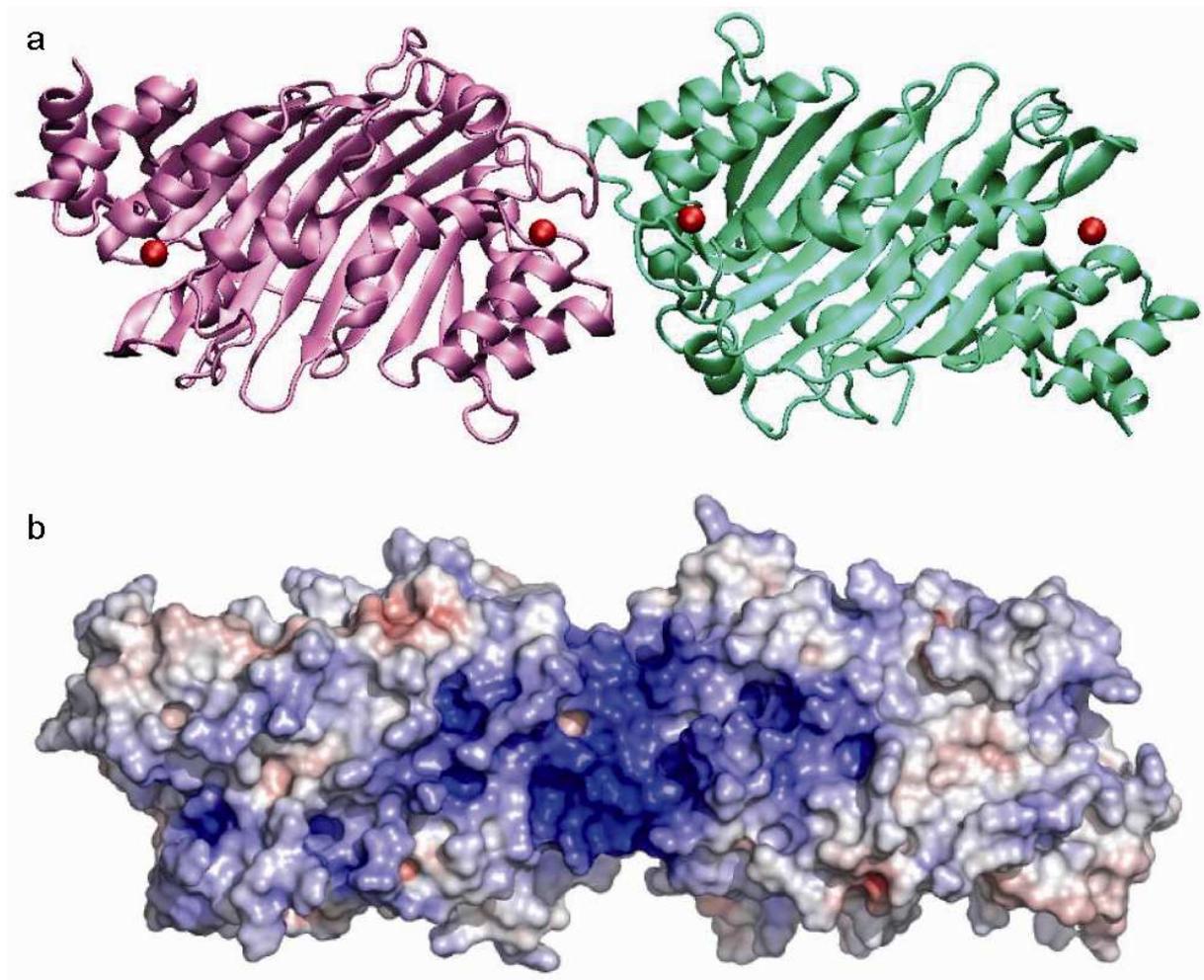


Figure 27 : (a) Modélisation d'un dimère d'A3G relié par le NTD. L'atome de zinc est représenté par une sphère rouge (b) Distribution des charges à la surface du dimère modélisé. En bleu, les charges positives et en rouge, les charges négatives. (Source <sup>102</sup>)

La protéine A3G est cytoplasmique et ne parait pas faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. La présence d'un motif putatif de rétention cytoplasmique (résidus 113-128) et des premiers 60 acides aminés du NTD sont nécessaires à la localisation d'A3G <sup>15,199</sup>. Dans les cellules T activées et H9, A3G est présent dans des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) de haut poids moléculaire (HMM, High Molecular Mass) (5-15 MDa) où l'activité désaminase est inhibée. Ces complexes HMM peuvent être convertis en une forme catalytique active correspondant à des complexes de bas poids moléculaires (LMM, Low Molecular Mass) (46-100 kDa) suite à un traitement à la RNase A, suggérant que l'ARN joue un rôle prépondérant dans l'assemblage des complexes HMM <sup>39</sup>. La découverte de l'existence d'A3G sous ces deux formes a permis d'établir une corrélation entre la configuration intracellulaire d'A3G et l'état de permissivité des cellules à l'infection par le VIH-1. En effet, les lymphocytes T circulants qui sont réfractaires à l'infection présentent A3G sous forme LMM <sup>39</sup> alors que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> résidents dans le tissu lymphoïde

qui sont permissifs<sup>59</sup> possèdent A3G sous forme HMM<sup>126</sup>. Les complexes LMM fonctionnent comme un facteur de restriction au niveau des étapes post-entrée, le mécanisme est désaminase-indépendant et implique un retard dans l'accumulation des produits tardifs de la transcription inverse<sup>39</sup>. La restriction contrôlée par A3G LMM est indépendante de la présence ou de l'absence de Vif car Vif est incorporée très faiblement dans les virions (7-20 Vif / particule virale)<sup>26</sup> et la synthèse de nouvelles protéines intervient après la mise en place de la restriction. Les monocytes, avant leur différenciation en macrophages, présentent également A3G sous forme de complexes LMM<sup>39</sup> et sont hautement restrictifs<sup>196</sup>. La différenciation et l'activation des cellules immunitaires dépendent de leur environnement et de la présence de cytokines ; l'expression d'A3G est également stimulée<sup>201</sup>. Les cytokines induisent un changement de l'assemblage d'A3G : les complexes LMM sont convertis sous forme HMM et les nouvelles protéines produites s'associent directement en complexe HMM<sup>39,126,201</sup>. Cette différence d'association est accompagnée par une augmentation de la susceptibilité cellulaire au VIH-1<sup>39,201</sup>. De manière surprenante, les DC immatures possèdent peu d'A3G et A3G est présent sous forme HMM. Leur maturation stimule la production d'A3G et leur association en complexe LMM<sup>170,201</sup> ; les DC matures sont moins permissifs à l'infection que les DC immatures.

Des expériences de TAP-Tag et de spectrométrie de masse ont permis l'identification des composants protéiques et ARN des complexes HMM<sup>40,70,125</sup>. Parmi plus d'une centaine identifiée, de nombreuses protéines lient l'ARN et ont divers rôles dans la fonction et le métabolisme de l'ARN (dégradation, rétention / répression, traduction). Les protéines et ARN partenaires d'A3G sont caractéristiques de deux granules cellulaires : les « processing bodies » (P bodies) et les granules de stress (SG, Stress Granules).

Les P bodies et les SG sont des granules d'ARN impliquées dans la dégradation et / ou le stockage des ARNm retrouvés dans le cytoplasme de la cellule. Ces deux ensembles sont composés d'ARNm « dormants » issus de la traduction et de protéines communes comme eIF4E, FAST (Fast-Activated Serine / Thréonine kinase), ainsi que certains éléments de l'ARN interférence (Argonaute et miARN). Bien que proches, les P bodies et les SG se distinguent néanmoins par quatre points : (1) les SG se forment uniquement lors de stress, (2) l'association des SG est dépendante de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , (3) seuls les SG contiennent le complexe de pré-initiation de la traduction, le 48S (eIF3, eIF4A, eIF4G, PABP et la petite sous-unité ribosomique (40S)) et (4) les P bodies renferment spécifiquement les composants des complexes de dégradation comme les enzymes de « décoiffage », DCP (DeCapping Protein) 1a et 2. Les SG et les P bodies se distinguent également par leur taille et leur capacité de mouvement. Les SG sont de taille variable et ont la capacité de se diviser et de fusionner, cependant, ils sont fixes dans le cytoplasme. Au contraire, les P bodies ont

des formes et des tailles constantes mais se déplacent dans le cytosol et rentrent parfois en contact avec les SG où des échanges de certains composants peuvent être effectués <sup>116</sup>.

Des expériences de microscopie confocale ont permis de confirmer la localisation d'A3G dans les P bodies et les SG <sup>70,125,229</sup>. Les complexes HMM d'A3G sont dynamiques et transitent rapidement des polysomes aux P bodies ou aux SG <sup>125</sup>. En présence d'A3G, la protéine Vif a été également identifiée dans ces deux « compartiments » <sup>229</sup> et il a été proposé que Vif favoriserait la formation des complexes HMM d'A3G <sup>79</sup>. La plupart des interactions entre A3G et les protéines retrouvées dans les complexes HMM sont indirectes. Un traitement à la RNase les dissociant, les protéines du complexe sont donc rattachées à A3G par un intermédiaire commun ARN. Les ARN retrouvés spécifiquement en contact avec A3G sont : son propre transcrit, l'ARNg du VIH-1 et les ARN des rétroéléments Alu et Y (Y1-5) <sup>40,125</sup>.

Il existe deux types de rétroéléments : les rétrotransposons à LTR (IAP et MusD chez la souris, Ty1 chez la levure) et ceux sans LTR (LINE, Long Interspersed Nuclear Element dont L1 est le plus représentatif et SINE, Short Interspersed Nuclear Element avec Alu majoritairement) qui seront détaillés ici. Le génome humain contient entre 80 et 100 rétroéléments L1 actifs qui codent les enzymes nécessaires à sa propre transposition et environ 10 % de l'ADN humain sont des éléments Alu. Pour se répliquer et se « disperser », Alu se sert de la transcriptase inverse / endonucléase produite par L1. La réplication de L1 et d'Alu commence par un intermédiaire ARN dans le cytoplasme, se poursuit par l'étape de transcription inverse dans le noyau et finit par l'intégration du nouvel ADN à un nouvel emplacement dans le génome. Contrairement à A3A, A3B, A3C et A3F, A3G n'inhibe pas la rétrotransposition de L1 mais empêche la réplication L1-dépendante d'Alu <sup>38</sup> (*figure 28*). En effet, Alu fait partie des complexes HMM et A3G prévient sa transposition en le séquestrant dans le cytoplasme. Bien que les phénomènes de transposition se produisent dans les cellules somatiques, ils restent rares et sont plus fréquemment observés dans les cellules germinales au moment de l'embryogénèse où le génome n'est pas encore méthylé <sup>114</sup>. Le taux d'expression élevé des protéines A3 dans les cellules germinales permet donc de limiter la transposition et de protéger le génome contre des insertions de rétrotransposons délétères.

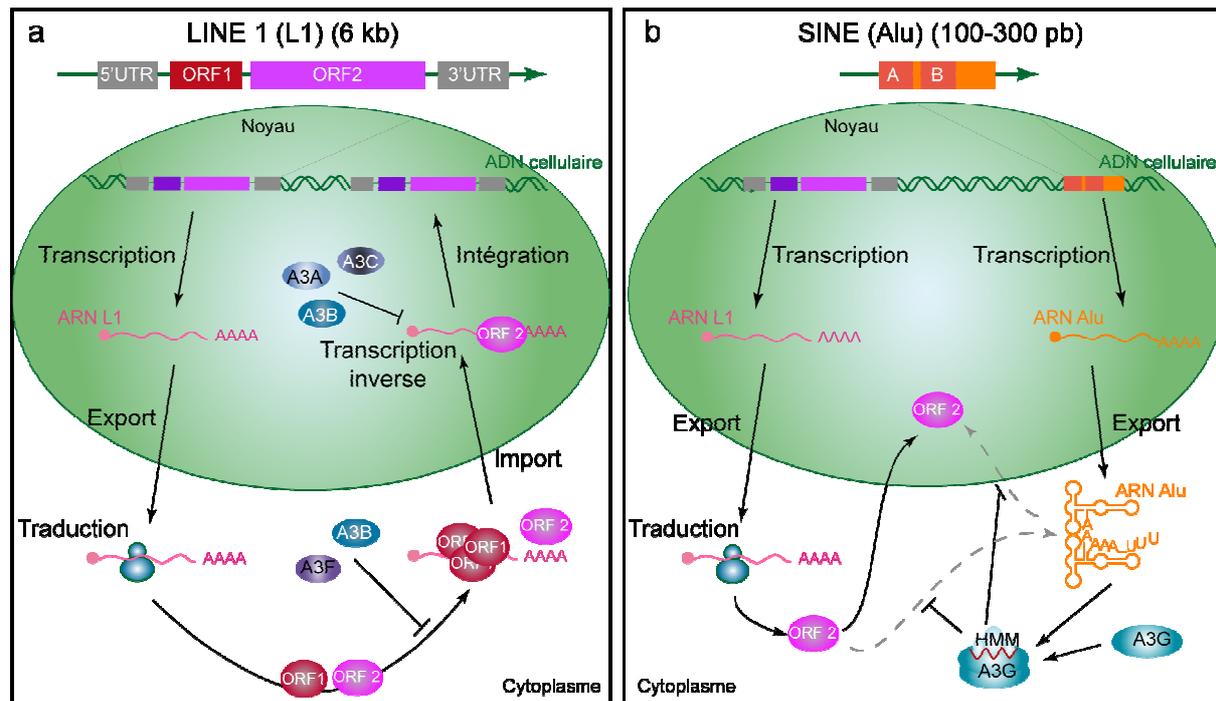


Figure 28 : Inhibition de la rétrotransposition des rétroéléments LINE1 (a) et SINE (Alu) (b) par les protéines humaines A3. Les protéines A3A / B / C inhibent également la rétrotransposition de SINE mais indirectement en bloquant celui de LINE1. (Adapté de <sup>38</sup>)



### La protéine virale Vif

Vif est une petite protéine virale de 192 acides aminés (23 kDa) hautement basique (pI = 10,7) et exprimée à partir d'un ARN viral mono-épissé. La tendance de Vif à s'agréger facilement rend difficile toutes les études *in vitro* et par conséquent l'obtention de cristaux permettant la visualisation de la structure tridimensionnelle. Néanmoins, des expériences de mutagenèse dirigée, de dichroïsme circulaire, de spectrométrie de masse ou encore de modélisation donnent quelques indices sur les domaines importants et le repliement de Vif. La fixation du zinc au niveau du doigt de zinc (résidus 108-139) induit une rapide agrégation de Vif <sup>168</sup> et sa chélation inhibe le recrutement de la Culline 5 et par conséquent la dégradation d'A3G <sup>237</sup>. Le domaine de multimérisation a été ciblé entre les résidus 151-164 <sup>240</sup>, cependant il semble que le motif <sup>161</sup>PPLP<sup>164</sup> riche en proline soit suffisant <sup>239</sup> : sa délétion réduisant de 80 % les interactions Vif-Vif. Toutefois, des expériences de co-immunoprécipitation entre une protéine Vif sauvage et une protéine mutée dans le motif de multimérisation (<sup>161</sup>AALA<sup>164</sup>) montrent que Vif WT / Vif AALA peuvent encore interagir <sup>198</sup>. Néanmoins, cette expérience ne montre pas que le domaine PPLP n'est pas requis pour l'oligomérisation, des études de co-immunoprécipitation entre deux protéines mutées AALA n'ayant pas été menées. L'oligomérisation de Vif est importante pour la production de virions infectieux <sup>58,146,239</sup>. En effet, l'association d'un peptide antagoniste (QRRRGQGGSP<sup>L</sup>PSRV)

du domaine de multimérisation augmente la quantité d'A3G incorporée dans le virion et par conséquent induit une diminution de l'infectivité des particules virales<sup>146</sup>. Le lien entre le défaut d'oligomérisation de Vif et le recrutement d'A3G dans le virion a été élucidé par des études de mutagenèse du motif PPLP<sup>58</sup>. La protéine Vif ne pouvant plus multimériser perd effectivement la capacité d'interagir avec A3G mais conserve la faculté de recruter les ElonginC et Culline 5 : A3G n'est donc plus dégradée et est encapsidée dans le virion où le mécanisme de restriction peut commencer.

La protéine Vif fait partie des RTC dans les cellules infectées et est essentielle pour une transcription inverse efficace *in vitro* et *in vivo*<sup>27,28,55,247</sup>. Récemment, il a été mis en évidence que Vif interagit avec la RT de manière ARN-indépendante *via* les résidus 161-168, plus particulièrement avec la séquence<sup>161</sup>PPLP<sup>164</sup> et que les résidus 169-192 sont également nécessaires à la stimulation de l'activité de transcription inverse<sup>113</sup>.

Des études de spectrométrie de masse sur la protéine entière ont permis de montrer que le NTD est compact alors que le CTD est intrinsèquement non structuré<sup>7</sup>. Cette dernière conclusion est également retrouvée par des expériences de dichroïsme circulaire sur le CTD (résidus 141-192) de Vif<sup>176</sup>. Ces deux équipes proposent que ce domaine se structurerait en présence de ses partenaires. En effet, l'ajout de micelles DPC (lipides phosphatidylcholine) à une solution de protéines Vif afin de mimer l'environnement de la membrane plasmique induit une diminution de la partie non structurée de 60 % à 38 % et une augmentation de la proportion de repliements en feuillets  $\beta$  de 13 % à 38 %<sup>176</sup>. Néanmoins, aucun changement dans la conformation de Vif n'est observé après mise en contact avec un peptide dérivé du domaine de liaison à Vif de l'ElonginC<sup>176</sup>. Le domaine de liaison de la protéine Vif à l'ElonginC ou « BC box » (résidus 139-176) a été cristallisé avec ses deux partenaires : l'ElonginB et C<sup>198</sup> (*figure 29b*). Dans cette structure cristallographique, seuls les résidus 140-155 de Vif sont visibles ; leur repliement en hélice  $\alpha$  suivie d'une boucle induit une surface hydrophobe nécessaire à la liaison de l'ElonginC. Malgré le peu d'homologie de la protéine Vif avec d'autres protéines cellulaires et virales, deux modélisations de la structure de Vif ont été construites<sup>10,135</sup>. L'intégration des résultats obtenus d'après des expériences de mutagenèse dirigée dans l'élaboration du modèle tridimensionnel de Lv *et al.* permet de se rapprocher de la réalité. Ce modèle a été construit en prenant comme bases deux protéines différentes : le domaine N-terminal de NarL pour le NTD et la partie SOCS-box de la protéine VHL (Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein) pour le CTD (*figure 29a*). Ces modèles sont à utiliser avec précaution à cause de la difficulté de modéliser les larges boucles de Vif, d'orienter le NTD par rapport au CTD et également parce qu'aucune de ces études ne tient compte de la présence du doigt de zinc<sup>12</sup>.

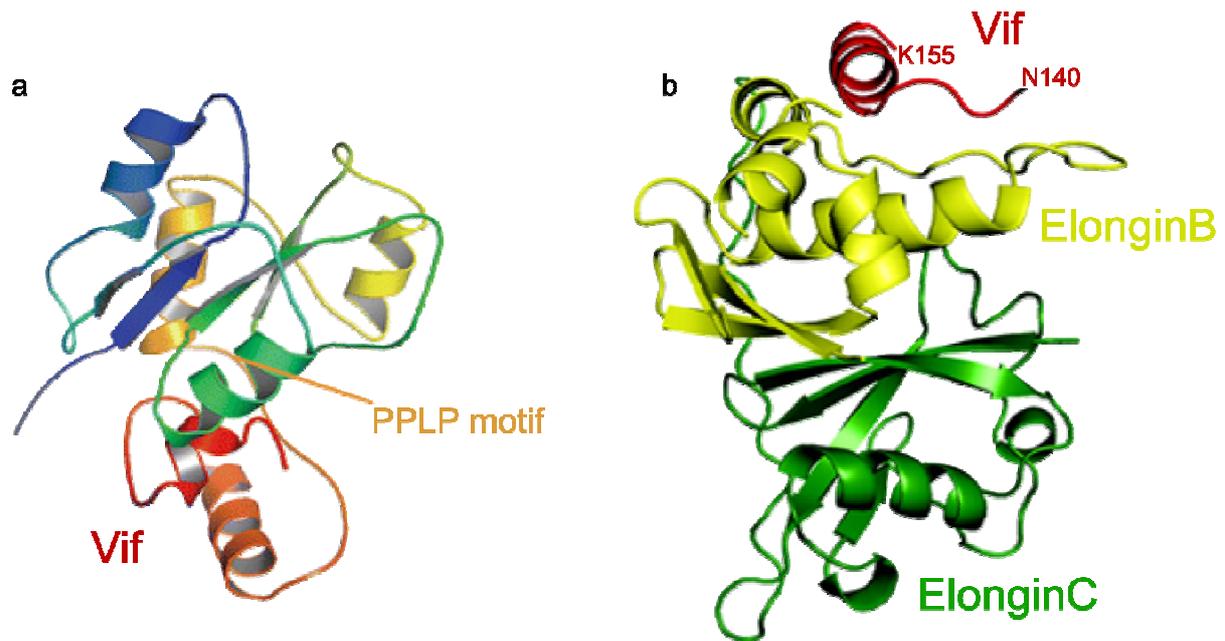


Figure 29 : (a) Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine Vif. (Source <sup>135</sup>). (b) Structure cristallographique de la BC box de la protéine Vif complexée avec l'ElonginB et l'ElonginC. (Source <sup>198</sup>)



### **Mécanisme antiviral et évacion.**

Dans la plupart des cas, A3G agit comme un facteur de restriction au niveau du deuxième cycle d'infection et doit être encapsidée dans la particule virale ( $7 \pm 4$  molécules d'A3G en absence de Vif <sup>238</sup>). Bien que certains résultats soient contradictoires, le consensus général veut que l'incorporation d'A3G dans le virion soit ARN- et Gag-dépendants. Cependant, des incertitudes demeurent sur une interaction directe entre Gag et A3G ou indirecte *via* un ARN. Soros *et al.* proposent qu'à faible concentration d'A3G, Gag lierait A3G d'une manière ARN-dépendante et qu'à haute concentration, l'interaction entre Gag et A3G serait directe <sup>197</sup>. En effet, des mutants dans le NTD d'A3G montrent une bonne corrélation entre la capacité à dimériser et à lier l'ARN avec la possibilité d'interagir avec Gag <sup>82,102</sup>. Le domaine de Gag impliqué dans la reconnaissance d'A3G se situe au niveau de la NC et plus précisément au niveau du premier doigt de zinc et du motif basique <sup>25</sup>. Il apparaît qu'A3G est recrutée dans le virion sous forme LMM mais plusieurs études s'opposent sur la provenance de ces complexes : A3G LMM pourrait provenir de protéines A3G nouvellement synthétisées <sup>25, 197</sup>, d'une conversion d'un complexe HMM ou des deux <sup>80</sup>. Enfin, une dernière incertitude demeure sur l'identité de l'ARN qui sert de lien entre Gag et A3G : l'ARN 7SL, composant de la SRP (Signal Recognition Particle), l'ARNv <sup>203</sup>...

Les arguments en faveur de l'implication de l'ARN 7SL proviennent de l'étude de mutants d'A3G capables de lier les ARN cellulaires et viraux mais incapables d'intégrer avec l'ARN 7SL, ces mutants présentent un défaut d'encapsidation dans les particules virales<sup>222</sup>. Wang *et al.* montrent également une corrélation entre l'inhibition de l'incorporation de l'ARN 7SL et la diminution de l'encapsidation d'A3G<sup>222,223</sup>. Cependant, ce résultat est en contradiction avec des expériences sur des virions bourgeonnant d'une cellule dépourvue de l'ARN 7SL qui ne présentent pas de diminution de la quantité d'A3G<sup>9</sup>. Enfin, alors que deux études montrent que la partie du domaine NC du précurseur Gag requis pour l'encapsidation de l'ARN 7SL est identique à celle nécessaire pour l'incorporation d'A3G<sup>9,210</sup>, l'équipe de King révèle que l'ARN 7SL est recruté dans la particule virale de manière NC / Gag indépendante<sup>162</sup>.

L'autre hypothèse d'incorporation d'A3G porte sur une interaction avec l'ARNg et avec Gag. Khan *et al.* ont en effet montré que l'encapsidation d'A3G dans un virus helper  $\Delta$ Vif (n'incorporant pas d'ARNg) est diminuée<sup>119,120</sup> et que celle-ci est rétablie par apport en *trans* de l'ARNg<sup>120</sup>. De plus, l'ARN viral délété de la tige-boucle SL1 est encapsidé mais ne permet pas l'incorporation d'A3G dans le virion<sup>119</sup>. Enfin, la même équipe a également montré qu'A3G encapsidée en absence d'ARNg ne s'associe pas avec le core et que cette association est restaurée par son ajout<sup>119,120</sup>. Pour résumer cette hypothèse, A3G lierait l'ARNg d'une manière Gag-dépendante au niveau de la tige-boucle SL1 et cette association permettrait l'incorporation d'A3G dans le core viral. La protéine A3G s'associe spécifiquement avec l'ARNg dans les P bodies et les SG<sup>125</sup>. Néanmoins, la colocalisation de Gag avec A3G n'est pas visible dans ces deux granules mais uniquement à la membrane plasmique<sup>25</sup>, suggérant que Gag recrute la protéine A3G nouvellement synthétisée dans le cytoplasme.

D'autres groupes proposent également que l'interaction entre Gag et A3G soit renforcée par un ARN non spécifique. L'ARNg favoriserait l'encapsidation d'A3G mais ne serait pas essentiel et pourrait être remplacé par des ARN cellulaires<sup>133,207</sup>. L'identité de l'ARN complexé avec A3G et Gag importerait peu<sup>21,245</sup>, la présence d'un ARNs permettrait uniquement la stabilisation de l'interaction entre A3G et Gag et l'encapsidation d'A3G dans la particule virale.

Très récemment, il a été montré qu'A3G pouvait être incorporée dans les exosomes<sup>121</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> H9 exprimant A3G l'incorporent en effet dans des vésicules qui sont relarguées dans un second temps dans le milieu extracellulaire. Dans les exosomes, A3G est catalytiquement active, suggérant l'encapsidation sous forme de complexe LMM. Arrivés à la membrane cellulaire voisine, les exosomes sont internalisés libérant A3G dans le

cytoplasme où elle agirait comme un facteur de restriction post-entrée, d'une manière identique au cas des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants, monocytes et DC matures. Néanmoins, *in vivo*, en présence d'un virus sauvage, il semble que les exosomes n'inhibent pas la réplication du VIH-1. Cet évènement pourrait s'expliquer parce qu'une faible proportion des exosomes contiendrait A3G : les lymphocytes, principales cellules exprimant A3G, sont également les cibles du VIH-1 qui, une fois entré, déplete partiellement la cellule des protéines A3G et par conséquent des exosomes.

Les mécanismes de restriction désaminase-dépendant et -indépendant d'A3G ainsi que la régulation de son activité par Vif sont exposés dans la revue.

Le VIH n'est pas le seul virus cible d'A3G. Effectivement, la protéine humaine A3G est active contre d'autres rétrovirus comme le SIV, le MLV, le MMTV et le EIAV. La surexpression d'A3G bloque également la réplication de HBV, un hépadnavirus dont le cycle implique la transcription inverse d'un intermédiaire génomique ARN. Les autres protéines de la famille A3 médient également la restriction de certains rétrovirus et rétrotransposons<sup>38</sup> (*tableau 5*) :

	Rétrovirus					Autres Virus		Rétrotransposons à LTR			Rétrotransposons sans LTR	
	VIH-1 ΔVif	SIVΔ Vif	HTLV-1	MLV	PFV ΔBet	HBV	AAV	IAP	MusD	Ty1	LINE-1	Alu
A3A	-	-		-			+	+	+		+	+
A3B	+/-	+	+/-	+/-		+	-	+	+		+	+
A3C	+/-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+	+	+
A3DE	+/-	+		-							-	
A3F	+	+	+/-	-	+	+	-	+	+	+	+/-	
A3G	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
A3H	-	-		-							-	

Tableau 5 : Les protéines humaines A3 sont actives contre plusieurs rétrovirus, virus et rétrotransposons. +, inhibé ; -, non inhibé ; +/-, modérément inhibé ; case grisée, non déterminé. (Source<sup>38</sup>)

- De nouveaux facteurs antirétroviraux ?

Actuellement, de nouveaux facteurs de restriction continuent à être découverts, leur mode d'intervention ainsi que la stratégie avec laquelle le VIH parvient à les contourner sont le

sujet de nombreuses études. Très récemment, l'étude des cellules CEM.NKR (une lignée dérivée des cellules CEM) a révélé que ces cellules n'autorisent pas la production de particules virales infectieuses. Les virus peuvent pourtant pénétrer la cellule, effectuer leur cycle mais sont incapables de produire de nouveaux virus pathogènes<sup>91</sup>. Ces cellules exprimeraient un facteur de restriction qui agirait au niveau des étapes post-entrée lors du second cycle d'infection. Ce facteur nécessiterait en effet d'être encapsidé dans la particule virale pour, lors d'une nouvelle infection, inhiber la réplication virale<sup>249</sup>. Cette protéine ainsi que son mode d'action exact restent encore à être identifiés.

Le VIH-2 ainsi que les virus simiens proches permettent l'expression de la protéine Vpr comme le VIH-1 mais codent en plus la protéine Vpx, très similaire à Vpr et issue d'une duplication de gènes<sup>64</sup>. Des études sur les macrophages et les DC ont révélé que Vpx était nécessaire pour une infection productive par le VIH-2. L'infection par un virus  $\Delta$ Vpx d'hétérocaryons entre un macrophage et une cellule 293T a permis de démontrer la présence d'un facteur de restriction spécifiquement exprimé dans ces cellules immunitaires<sup>187</sup>. De plus, l'ajout en *trans* de la protéine Vpx rétablissant la production de particules infectieuses permet de conclure que Vpx contrecarre ce facteur de restriction<sup>187</sup>. Néanmoins, l'identification du facteur de restriction, son mode d'action ainsi que le mécanisme dont Vpx se sert afin de contourner ce facteur restent à déterminer.

La protéine ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein) est un facteur cellulaire qui inhibe la réplication de nombreux virus (MLV, Ebola, Alphavirus...) en empêchant l'accumulation d'ARN viraux dans le cytoplasme. Afin d'être dégradés, les ARNm doivent comporter une séquence spécifique pour recruter ZAP, le ZRE (ZAP-Responsive Element). Une fois reconnu, l'ARNm est dégradé par la voie classique utilisée pour l'élimination des ARN cellulaires : la queue polyA est d'abord retirée et le complexe de l'exosome recruté afin de poursuivre la dégradation<sup>250</sup>. Le VIH ne semble pas être inhibé par cette défense cellulaire. La raison de cette résistance potentielle reste inconnue mais peut être expliquée par deux hypothèses : (1) les ARN viraux du VIH ne possèdent pas de séquence ZRE et sont donc résistants « naturellement » à ZAP ou (2) le VIH a mis en place une défense pour contrecarrer ce facteur de restriction. De plus amples études sur ce facteur antiviral et son implication dans le cycle du VIH doivent être réalisées afin de répondre à ces questions.

Très récemment, il a été montré que la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation syndrome Protein) pourrait être un nouveau facteur de restriction contre le VIH-1<sup>166</sup>. FMRP est associée à une maladie génétique, le syndrome X-Fragile qui affecte 1 homme sur 4000 et 1 femme sur 7000. FMRP est un des composants des granules dans les neurones et est impliquée dans l'export et la traduction localisée des ARN. Cette protéine cible les ARN contenant une structure en G-quartet ou des séquences riches en U. Une extinction de l'expression de FMRP par l'emploi de siARN conduit à une augmentation de l'infectivité tandis qu'une surexpression de FMRP réduit la production de particules virales infectieuses. De plus, FMRP interagit avec Gag et est encapsidée dans le virion. Pan *et al.* proposent que FMRP pourrait s'associer avec l'ARNg et ainsi moduler l'export et la traduction. Il serait intéressant de connaître la réelle participation de FMRP dans le cycle réplcatif ainsi que d'élucider si effectivement FMRP lie l'ARNg du VIH.

*iii. Une nouvelle stratégie pour inhiber la réplication du VIH-1 ?*

Aujourd'hui, l'agence américaine de contrôle des denrées alimentaires et des médicaments (FDA, Food and Drug Administration) a approuvé 26 molécules inhibitrices de la réplication du VIH-1. Cependant, l'émergence de mutations de résistance au sein du virus ainsi que les sérieux effets secondaires dus aux traitements (hyperglycémie, hyperlipidémie...) appellent le besoin de créer de nouveaux inhibiteurs. Ces nouveaux inhibiteurs pourraient bloquer des acteurs de la réplication virale non encore ciblés comme les protéines virales accessoires et régulatrices<sup>8,178</sup>. La découverte des facteurs de restriction encourage également à poursuivre dans cette voie. En effet, de nouvelles stratégies se basent sur l'existence de tels mécanismes afin d'imaginer des inhibiteurs capables de rétablir cette défense immunitaire innée soit en renforçant l'action de ces facteurs de restriction ou encore en diminuant les effets des protéines virales impliquées dans le mécanisme de contournement.

Je vais seulement détailler les voies possibles dans lesquelles les inhibiteurs contre la protéine Vif du VIH-1 pourraient intervenir<sup>29,178</sup>. Majoritairement, les inhibiteurs testés agissent en empêchant Vif de contrecarrer le facteur de restriction A3G. Ceci peut se faire de plusieurs manières :

- En augmentant le taux de synthèse d'A3G, en inhibant sa dégradation ou en favorisant son encapsidation dans la particule virale
- En ciblant Vif directement en jouant sur sa production, en augmentant son taux de protéolyse ou encore en altérant sa localisation dans la cellule

Comme mentionné précédemment, la multimérisation de Vif est essentielle à l'infectivité des particules virales. Ainsi, des expériences de « phage display » ont permis d'identifier des

peptides inhibiteurs de la multimérisation de Vif et de la réplication virale en culture cellulaire qui ne semblent pas être toxiques pour la cellule <sup>239</sup>. Ces peptides ont pour caractéristique de tous posséder le motif PXP, présent également dans le domaine d'oligomérisation de Vif. Yang *et al.* proposent que ces peptides miment la structure hydrophobe du motif <sup>161</sup>PPLP<sup>164</sup> de Vif et qu'ils se lient à cet endroit afin d'inhiber l'assemblage de Vif.

La protéine Vif possède un doigt de zinc essentiel au recrutement de la Culline 5 et donc de dégradation d'A3G. L'inhibition par de petites molécules chélatrices de zinc a donc été testée. L'emploi de TPEN (chélateur de zinc et cellule-perméable) induit une augmentation de la stabilité de la protéine A3G et du taux d'incorporation dans le virion qui résulte en une forte diminution de l'infectivité du VIH-1 <sup>237</sup>. De manière surprenante, les concentrations de TPEN utilisées (IC<sub>50</sub> = 1,79 µM) ne sont pas toxiques pour la cellule.

Les inhibiteurs pourraient également cibler d'autres partenaires cellulaires de Vif comme la kinase Hck, ZIN (Zinc finger protein Inhibiting NFκB), Sp140... Enfin, ils pourraient intervenir en modulant les fonctions de Vif au niveau de l'assemblage et de la maturation de la particule virale en interférant avec l'ARNg, la NC ou encore avec PR.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Peu de temps après la découverte du facteur de restriction A3G, de nombreux laboratoires ont tenté d'élucider la manière dont A3G inhibe l'infectivité virale et quels sont les mécanismes mis en jeu par la protéine Vif du VIH-1 pour contrecarrer cette défense. Les premières publications relatives à ce dernier point étaient en faveur d'une inhibition d'A3G au niveau traductionnel<sup>110,141,200</sup>. Néanmoins, la découverte de la voie de dégradation d'A3G par Vif par l'intermédiaire du protéasome<sup>142,190,243</sup> ainsi que l'identification des ubiquitine ligases, ElonginB / C et Culline 5, comme partenaires de Vif nécessaires à la dégradation<sup>123,134,243,244</sup>, ont orienté une grande majorité des études sur cette voie.

L'équipe de Greene a été la première à démontrer la présence de deux mécanismes simultanés pour réguler l'expression de la protéine A3G par Vif : l'inhibition de la traduction et la dégradation<sup>200</sup>. En effet, en bloquant spécifiquement le protéasome par ajout d'inhibiteur (époxyomycine), Stopak *et al.* ont montré que la diminution du taux de la protéine A3G persistait. Le taux d'ARNm d'A3G étant constant en présence de Vif<sup>110,200</sup> suggère que la diminution de la quantité de protéines A3G observée correspond à une inhibition de sa traduction. Cette inhibition d'A3G en présence de Vif a également été confirmée par des expériences de « pulse chase »<sup>110,141,200</sup>.

Dans le but de comprendre les mécanismes de régulation traductionnelle de la protéine A3G en présence de la protéine Vif du VIH-1, mon travail de thèse s'est divisé en trois parties. Toutes les études menées ont été effectuées avec deux protéines Vif : la protéine sauvage (Vif WT) et celle mutée dans le domaine de multimérisation « PPLP » (Vif AALA). Ce domaine est essentiel à la production de particules virales infectieuses<sup>58,146,239</sup>. Nous avons ainsi étudié l'importance de ce motif dans l'inhibition traductionnelle d'A3G.

– De nombreux mécanismes de régulation de l'expression au niveau traductionnel font intervenir la reconnaissance d'un ARNm par une protéine qui interagit généralement avec les régions UTR de son ARNm cible. La protéine Vif possède un domaine de liaison à l'ARN et cette propriété de fixation à l'ARN est essentielle pour l'infectivité virale<sup>118,247</sup>. Dans les cellules infectées, Vif interagit avec l'ARNg du VIH-1<sup>55,247</sup>. Récemment, des travaux dans notre laboratoire ont montré que Vif lie précisément l'ARNg au niveau de sa région 5'-terminale<sup>18,95</sup>. Nous nous sommes par conséquent intéressés à la fixation de Vif à l'ARNm d'A3G. Cette étude a été menée sur plusieurs constructions de l'ARNm d'A3G afin d'identifier les sites de haute affinité. L'utilisation de la Vif AALA doit nous permettre de comprendre le rôle du domaine de multimérisation dans la fixation de Vif aux ARN.

- Comme déjà mentionné, la capacité de Vif à multimériser est essentielle pour l'obtention de virions infectieux<sup>58,146,239</sup>. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur l'état exact d'oligomérisation des protéines Vif WT et AALA. Nous avons donc mené des études à caractère biophysique afin d'analyser les propriétés de multimérisation de ces deux protéines et ainsi confirmer l'importance du motif PPLP dans l'oligomérisation de Vif.
- Enfin, après avoir étudié la fixation de Vif à l'ARNm d'A3G, nous nous sommes attachés à analyser les conséquences éventuelles de cette interaction sur la traduction d'A3G. L'utilisation des deux protéines Vif WT et AALA devrait nous permettre de définir le rôle de la multimérisation dans l'inhibition traductionnelle. Les exemples de régulation de la traduction faisant généralement intervenir les régions non traduites des ARNm, nous avons analysé l'importance des régions UTR de l'ARNm d'A3G par une combinaison d'approches *in vitro* et *ex vivo*, le but ultime étant d'appréhender le plus précisément possible les processus impliqués dans cette régulation traductionnelle.

## MATERIELS ET METHODES

Les techniques biochimiques couramment utilisées telles que les minipréparations de plasmides, l'extraction phénol / chloroforme, la précipitation éthanolique ou encore les digestions ne seront pas détaillées ici. Dans cette partie, je ne développerai que les techniques qui m'ont permis d'appréhender mon travail de thèse.

### I. Matériels

#### A. Plasmides

##### 1. Les plasmides utilisés pour synthétiser les ARN d'A3G et utilisés pour les expériences de traduction

La séquence d'A3G a été obtenue après extraction des ARNm de cellules H9 par utilisation du kit « PolyAtract mRNA Isolation Systems » (Promega) puis RT-PCR (Superscript – Invitrogen) avec des amorces permettant l'amplification de l'isoforme majeure de l'ARNm d'A3G<sup>149</sup> (*tableau 6*). Le fragment PCR est digéré par les enzymes de restriction EcoRI et XbaI et ligué dans le vecteur pCMV6-XL5 (Clontech) préalablement digéré avec les mêmes enzymes.

A partir de ce vecteur, les fragments correspondant à la région 5'UTR, 3'UTR ou à la séquence codante de l'ARNm délété de la partie 5' et / ou 3'UTR sont amplifiés par PCR et clonés dans le pCR TOPO 2.1 (Invitrogen) pour les réactions de transcription *in vitro* ou dans le pCMV6-XL5 pour les études de traduction (*tableau 6*). Les plasmides résultant pCMV A3G, pCMV A3G ΔUTR, pCMV A3G Δ5'UTR et pCMV A3G Δ3'UTR contiennent les nucléotides 1-1771, 298-1452, 298-1771 et 1-1432 de la séquence d'A3G respectivement. Toutes les positions ont pour référence le site de départ de la transcription de l'isoforme majeure correspondant à l'ARNm d'A3G dans la lignée lymphoïde A3.01<sup>149</sup>. Les plasmides obtenus sont d'abord vérifiés par restriction après minipréparation plasmidique puis par séquençage.

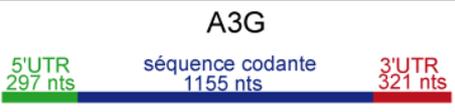
 <p>A3G</p>	pS 1-21	EcoRI-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 1750-1771	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
 <p>A3G ΔUTR</p>	pS 298-321	EcoRI-GGATGAAGCCTCACTTCAGAAACAC
	pAS 1432-1452	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
 <p>A3G Δ5'UTR</p>	pS 298-321	EcoRI-GGATGAAGCCTCACTTCAGAAACAC
	pAS 1750-1771	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
 <p>A3G Δ3'UTR</p>	pS 1-21	EcoRI-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 1432-1452	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
 <p>A3G 5'UTR</p>	pST7 1-21	EcoRI-T7-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 277-297	StuI-TGGCCGGCTAGTCCCGAC
 <p>A3G 3'UTR</p>	pST7 1454-1478	EcoRI-T7-GGATGGGCCTCAGTCTCTAAGGAAG
	pAS 1750-1771	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG

Tableau 6 : Amorces utilisées pour amplifier différentes régions d'A3G. Les fragments résultant sont clonés soit dans le vecteur pCR TOPO 2.1 soit dans pCMV5-XL6.

## 2. Les vecteurs pGL3 utilisés pour les tests luciférase

Les plasmides utilisés pour les tests luciférase ont été construits à partir du vecteur contrôle pGL3 (Promega).

– La région 5'UTR de l'ARNm d'A3G est clonée en amont de la séquence codante du gène rapporteur de la Firefly luciférase. Cette région est amplifiée par PCR en utilisant les amorces pS-NcoI **CCA TGG CCT TGG CCG GCT AGT CCC GAC** et pAS-Ecl136II **GAG CTC TTT CCC TTT GCA ATT GCC TTG GG**. Les fragments PCR purifiés sur gel agarose et extraits du gel par utilisation du kit « NucleoSpin Extract II » (Macherey-Nagel) sont clonés dans le vecteur pCR-TOPO2.1 (Invitrogen). Dans un second temps, le plasmide contrôle pGL3 est digéré par HindIII puis incubé avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I (Fermentas) pendant 20 min à 25°C dans 50 mM Tris-H Cl (pH 8,0 à 25°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 1 mM DTT en présence de 33 μM de chacun des dNTP. Les vecteurs pGL3 traités à la Klenow et pCR-TOPO2.1 A3G 5'UTR sont doublement digérés par Ecl136II et NcoI puis ligués en présence d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) pendant 16 h à 16°C. Le plasmide obtenu, pGL3-A3G 5'UTR est d'abord vérifié par restriction après minipréparation plasmidique puis par séquençage.

– La région 3'UTR d'A3G est fusionnée en aval de la séquence codante de la Firefly luciférase. Comme précédemment, le fragment 3'UTR d'A3G est amplifié par PCR avec les

amorces pS-XbaI **TCT AGA** GGA TGG GCC TCA GTC TCT AAG G et pAS-FseI **GGC CGG CCA** CAG AAA GAT TTA GTA TTT C. L'ADN obtenu est ensuite cloné dans le pCR-TOPO2.1. Le vecteur résultant et le vecteur pGL3 ou pGL3-A3G 5'UTR sont digérés par les enzymes de restriction FseI et XbaI puis ligués dans les mêmes conditions que précédemment. Les plasmides obtenus, pGL3-A3G 3'UTR et pGL3-A3G 5'&3'UTR, sont vérifiés par restriction puis par séquençage.

Les vecteurs utilisés comme contrôle dans les tests luciférase nous ont été fournis par le docteur Susan K. Fried (Faculté de médecine, Baltimore, MD, USA) <sup>129</sup>. Ces vecteurs contiennent la séquence 5'UTR ou la partie 3'UTR de l'ARNm de la leptine en amont ou en aval respectivement du gène codant la Firefly luciférase contenu dans le vecteur pGL3.

### 3. Les plasmides permettant l'expression de la protéine Vif

Le vecteur pD10 Vif permet la surproduction de la protéine Vif dans un système bactérien. Ce plasmide nous a été fourni par le Dr Dana Gabuzda (DFCI, Boston, MA, USA) <sup>242</sup> et le plasmide contient la séquence de la protéine Vif de l'isolat HXB2 fusionnée avec une tête poly-histidine en N-terminal.

Le plasmide permettant l'expression de Vif utilisé dans les expériences de traduction *in vitro* et *ex vivo* nous a été fourni par le Dr Klaus Strebel (NIH, Bethesda, MD, USA) <sup>159</sup>. Ce plasmide, pcDNA hVif, contient la séquence du gène Vif de l'isolat NL4.3 dont les codons dans sa partie 5'UTR ont été optimisés afin de permettre une meilleure expression de la protéine.

La protéine mutée dans le domaine de multimérisation, Vif AALA, est exprimée grâce aux vecteurs pD10-Vif AALA (utilisé pour la surexpression bactérienne) et pcDNA hVif AALA (utilisé dans les études de traduction). La mutation des résidus proline du motif <sup>161</sup>PPLP<sup>164</sup> en alanine a été effectuée par mutagenèse dirigée en utilisant le kit « Quick Change Mutagenesis » (Stratagène). Les plasmides ont ensuite été validés par séquençage.

## B. Cellules

La lignée cellulaire HEK-293T dérive de cellules embryonnaires rénales humaines. Ces cellules sont utilisées pour l'analyse de l'expression des vecteurs pGL3 et pCMV en présence de pcDNA hVif. Les cellules HEK-293T sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur (45 min à 54°C), de 100 U de pénicilline et 100 µg / ml de streptomycine à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.

## C. Anticorps

Les anticorps anti-ApoC17 (K. Strebel, NIH, Bethesda, MD, USA) et anti-Vif (M. Malim, King's College of London, Angleterre) reconnaissant 17 résidus localisés en C-terminal de la protéine A3G humaine ou la région N-terminale de Vif, respectivement, ont été obtenus *via* le programme « AIDS Research and Reference Reagent » du NIH (Bethesda, MD, USA).

L'anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de l'isoforme  $\beta$  de l'actine provient de l'entreprise Sigma. L'anticorps anti-L11 permettant l'identification spécifique de la protéine endogène ribosomique L11 a été obtenu chez Invitrogen.

## II. Méthodes

### A. Surproduction et purification des protéines Vif WT et Vif AALA

#### 1. Surproduction

Des bactéries *Escherichia coli* BL21 DE3 sont transformées avec le plasmide pD10-Vif WT ou pD10-Vif AALA. Une colonie contenant un des clones d'expression est repiquée puis mise en culture à 37°C. L'expression de Vif est induite par ajout de 0,5 mM d'IPTG dans la solution de culture lorsque l'absorbance de la suspension bactérienne à 600 nm atteint 0,4-0,6. Après 6 h à 22°C (Vif WT) ou à 16°C (Vif AALA), les bactéries sont centrifugées, puis le culot est conservé à -80°C.

#### 2. Purification

Les bactéries sont lysées dans 6 M Chlorure de Guanidium, 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8 pendant une nuit à température ambiante sous agitation en présence d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Complete, Roche). La solution de lyse est ultracentrifugée à 27000xg pendant 30 min dans le but d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une colonne de purification Ni<sup>2+</sup>-NTA (Invitrogen) préalablement équilibrée dans le tampon utilisé pour la lyse. La colonne est d'abord lavée afin d'éliminer les protéines fixées de manière aspécifique et l'élution de la protéine s'effectue en diminuant le pH (de 8 à 4,5). Les fractions contenant la protéine Vif sont rassemblées. La pureté de la protéine est analysée sur gel SDS-PAGE 12,5 %. La concentration est déterminée par la loi

de Beer-Lambert en mesurant l'absorbance à 280 nm et en intégrant dans l'équation le coefficient d'extinction molaire de la protéine Vif ( $\epsilon = 43050 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 3. Crible des conditions de dialyse

En sortie de colonne, les protéines Vif sont diluées à 0,2 mg / ml puis dialysées progressivement. Le tampon de renaturation et de conservation pour la Vif WT est composé de 50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 % glycérol, pH 6,5. Dans ces conditions, la protéine Vif AALA précipite. Un crible a donc été effectué pour trouver les conditions de renaturation optimales pour la protéine Vif mutée (*tableau 7*).

Brièvement, à la sortie de la colonne, la protéine Vif AALA se trouve dans un tampon composé de chlorure de guanidium. Afin de tester rapidement la renaturation de la protéine dans chacune des conditions, Vif AALA est diluée au 50<sup>e</sup> dans le tampon désiré puis incubée 16 h à 4°C. Un cinquième du volume est prélevé et conservé pour analyse ; le reste du volume est ultracentrifugé pendant 30 min à 100000xg à 4°C. Le surnageant est alors récupéré puis le culot est resuspendu dans un volume identique à celui du surnageant. Une partie aliquote de chacune de ces fractions représentant la fraction totale, insoluble et soluble est analysée sur gel SDS-PAGE 12,5% coloré au bleu de coomassie.

Les protéines WT et AALA sont ensuite concentrées en recouvrant la membrane de dialyse de PEG 35000 puis ultracentrifugées à 100000xg pendant 30 min à 4°C afin d'éliminer les agrégats. Les protéines sont enfin aliquotées et conservées à 4°C.

MATERIELS ET METHODES

	Tampon (50 mM)	Detergent <sup>A</sup>	Reducteur <sup>B</sup>	Sel <sup>C</sup>	PEG 3350 (0,06 %)	GdnHCl (550 mM) <sup>F</sup>	Cation <sup>D</sup>	Sucrose (440 mM)	Arginine (550 mM)
1	MES 5,5		BMC	0			0		
2	MES 6,5	DDM	BMC	1	1		0	1	1
3	BORATE 9,5	DDM	GSH:GSSG	1			1	1	
4	MES 6,5	T80	BMC	1		1	1		1
5	TRIS 8,2	NDSB	DTT	1	1		1		
6	TRIS 8,2	T80	BMC	1	1		0	1	1
7	MES 5,5	DDM	DTT	0			1	1	1
8	MES 5,5	T80	DTT	0	1	1	0		1
9	MES 5,5	NDSB	TCEP	1			0		1
10	TRIS 8,2	T80	TCEP	0		1	1		
11	MES 6,5	NDSB	GSH:GSSG	0	1		1		1
12	MES 5,5	DDM	GSH:GSSG	1	1	1	0		
13	TRIS 8,2	DDM	TCEP	0	1		0	1	
14	MES 6,5	NDSB	DTT	1		1	0	1	
15	BORATE 9,5	NDSB	TCEP	1	1	1	1	1	1
16	BORATE 9,5	T80	DTT	0			1	1	1
17	TRIS 8,2		DTT	1		1	0	1	
18	TRIS 8,2	DDM	BMC	1		1	1		1
19	TRIS 8,2		GSH:GSSG	0	1		1		1
20	BORATE 9,5		BMC	0	1	1	1	1	
21	TRIS 8,2	NDSB	GSH:GSSG	0		1	0	1	1
22	MES 6,5		DTT	1	1		1		
23	MES 5,5	T80	GSH:GSSG	1			1	1	
24	MES 6,5	DDM	TCEP	0		1	1		
25	MES 5,5	NDSB	BMC	0	1	1	1	1	
26	MES 6,5		GSH:GSSG	0		1	0	1	1
27	BORATE 9,5		TCEP	1			0		1
28	BORATE 9,5	T80	GSH:GSSG	1	1	1	0		
29	BORATE 9,5	NDSB	BMC	0			0		
30	MES 6,5	T80	TCEP	0	1		0	1	
31	MES 5,5	0	TCEP	1	1	1	1	1	1
32	BORATE 9,5	DDM	DTT	0	1	1	0		1

Tableau 7 : Conditions de renaturation de la protéine Vif AALA. (Source <sup>234</sup>).

A, DDM (n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside), 0,3 mM ; Tween 80, 0,5 mM ; NDSB (Non-Detergent SulfoBetaine), 1 M.

B, BMC (Bis-Mercaptoacetamide Cyclohexane), TCEP (Tris (2-CarboxyEthylPhosphine)), DTT, 5 mM ; GSH (forme réduite du glutathione) : GSSG (forme oxydée du glutathione), 1 mM GSH:0.1 mM GSSG.

C, 0=10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl ; 1=264 mM NaCl, 11 mM KCl.

D, 0=1,1 mM EDTA ; 1=2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>.

Les cases grisées indiquent une absence de produit.

## B. Etude de la fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G

### 1. Rétention sur filtres de nitrocellulose

Un microgramme et demi d'ARNt total d'*E.coli* et 20000 cpm d'ARN d'A3G (marqués radioactivement de manière interne lors de la transcription *in vitro*) contenus dans 5 µl d'eau sont chauffés 2 min à 90°C puis refroidis 2 min dans la glace. Les ARN sont ensuite renaturés par incubation 15 min à 37°C dans le tampon de liaison 1x (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 2,5 MgCl<sub>2</sub>) additionné de 1,4 mM β-Mercaptoéthanol et 5 U RNAsine, H<sub>2</sub>O qsp 10 µl. En parallèle, les protéines Vif WT ou AALA sont également renaturées pendant 15 min à 37°C dans le tampon de liaison 1x supplémenté de 0,02 % BSA et 1,4 mM β-Mercaptoéthanol, H<sub>2</sub>O qsp 48,8 µL. Les ARN sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel contenant la protéine puis incubés 30 min à 37°C puis 30 min à 4°C en présence de 0,01 % triton X-100, H<sub>2</sub>O qsp 60 µl. Après lavages d'une plaque 96 puits composée de filtres de nitrocellulose 0,45 µm (Multiscreen 96-well plate, Millipore) avec le tampon de liaison 1x, les complexes ARN / protéines sont chargés puis filtrés sous vide. Afin d'éliminer la fixation aspécifique des ARN non complexés, les filtres sont lavés trois fois avec le tampon de liaison. Après séchage de la plaque, la radioactivité restant sur les filtres est analysée par scintillation par comptage de la radioactivité (Chameleon (Hidex)).

Les données sont analysées par le logiciel Origin7 en appliquant l'équation de Hill

$$y = \frac{x + n}{K_d^n + x^n} \text{ où } y \text{ correspond au pourcentage de l'ARN retenu sur les filtres, } x \text{ à la quantité}$$

de protéine, n au coefficient de Hill et K<sub>d</sub> à la constante de dissociation.

### 2. Spectroscopie de fluorescence

Les expériences de spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire sont menées à l'aide du fluorimètre Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon) dans des cuves en quartz à 20°C. Les échantillons sont excités à 295 nm et le spectre d'émission est recueilli pour les longueurs d'onde entre 310 et 450 nm. Les titrations sont effectuées en ajoutant des concentrations croissantes d'ARN (entre 1 et 600 µM) à une concentration fixe de Vif (100 nM) dans 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. L'intensité de fluorescence (I) est mesurée à chaque ajout d'ARN. La variation d'intensité de fluorescence est convertie en paramètre d'extinction Q<sub>obs</sub> par la relation Q<sub>obs</sub> = (I<sub>0</sub>-I) / I<sub>0</sub> où I<sub>0</sub> correspond au maximum du spectre d'émission de la protéine en absence d'ARN.

Les courbes d'affinité obtenues sont ensuite analysées par le logiciel Mathematica (Wolfram Research) en utilisant le modèle de McGhee et Von Hippel <sup>144</sup> dont l'équation est :

$$\frac{v}{L_f} = K_{obs} \cdot (1 - nv) \cdot \frac{[(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R]^{n-1}}{[2(\omega - 1)(1 - nv)]^{n-1}} \cdot \frac{[1 - (n + 1)v + R]^2}{[2(1 - nv)]^2}$$

où  $R = \{[1 - (n + 1)v]^2 + 4\omega v(1 - nv)\}^{1/2}$ .

Dans notre étude, nous utilisons une correction qui tient compte de la taille de l'acide nucléique en question (N) <sup>214</sup> en multipliant l'équation ci-dessus par le facteur :  $\frac{N - n + 1}{N}$

### 3. Cartographie en solution et empreinte

Les expériences de modifications ont été effectuées sur l'ARNm complet d'A3G ou sur des fragments plus courts correspondant aux régions 5' ou 3'UTR par utilisation de sondes chimiques et enzymatiques.

#### a. Les sondes chimiques

Le DMS (Fluka) et la CMCT (Merck) sont des sondes chimiques qui permettent de tester spécifiquement les positions Watson-Crick des bases (*figure 30*). 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. Après renaturation en présence de 2 µg d'ARNt total d'*E. coli*, l'ARN est modifié dans 50 mM cacodylate de sodium pH 7,5, 300 mM KCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub> à 37°C pendant 4 et 8 min en présence de DMS dilué au vingtième dans de l'éthanol 100 %.

La CMCT est spécifique de la position N1 des guanines et N3 des uraciles non appariées. Les modifications de l'ARN sont effectuées dans 100 mM borate de sodium pH 8,0, 300 mM KCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub> à 25°C pendant 15, 30 ou 45 min en présence de 210 µg de CMCT.

#### b. Les sondes enzymatiques

Contrairement à la RNase V1 (Ambion) qui clive de manière aspécifique les ARN comportant des structures double brin, les RNases T1 et A (Ambion) sont spécifiques des régions simple brin (*figure 30*). La RNase A coupe la liaison phosphodiester entre le ribose en 5' du nucléotide et le groupement phosphate en 3' d'une pyrimidine non appariée. La RNase T1 clive la liaison phosphodiester en 3' d'une guanine dans un brin ARN simple brin. Deux µM

d'ARN sont renaturés pendant 15 min en présence de 2 µg d'ARNt d'*E. coli* dans le tampon fourni par Ambion.

Pour les études d'empreinte de Vif, seules les sondes enzymatiques sont utilisées. Brièvement, des quantités croissantes de Vif (0, 0,5, 1, 2 et 3 µg) sont incubées avec les ARN pendant 30 min à 37°C puis 30 min à 4°C afin de former des complexes. Les RNases A, T1 et V1 sont ensuite ajoutées au mélange réactionnel qui est ensuite de nouveau incubé 15 min à température ambiante.

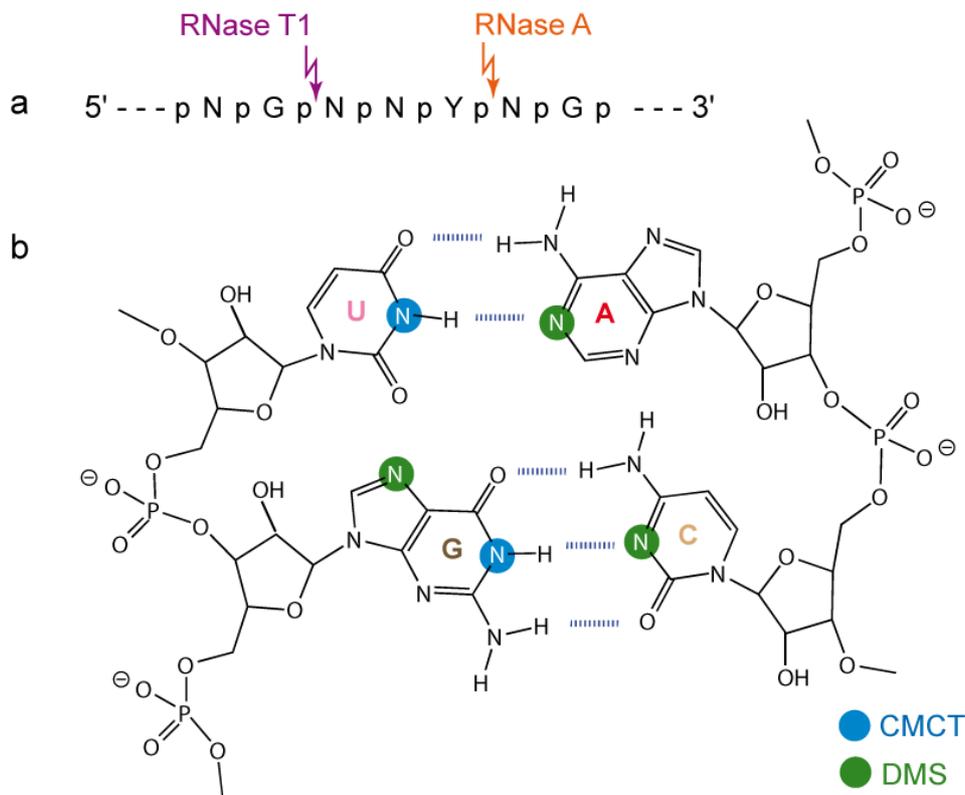


Figure 30 : Spécificité de coupure des sondes enzymatiques (a) et chimiques (b) utilisées pour les études de cartographie et d'empreinte. En (a), N renvoie à n'importe quel nucléotide et Y à une pyrimidine (C ou U).

### c. Détection des modifications

Les réactions sont stoppées par extraction au phénol / chloroforme (uniquement pour les réactions réalisées avec les sondes enzymatiques) puis par précipitation à l'éthanol. Les modifications / protections sont détectées par extension avec la RT d'AMV (MP, Bio-Medicals) d'une amorce marquée radioactivement en 5' spécifiquement hybridée en aval de la région à analyser. Les ADNc produits sont alors déposés sur un gel de polyacrylamide 8 % dénaturant et analysés par autoradiographie (figure 31).

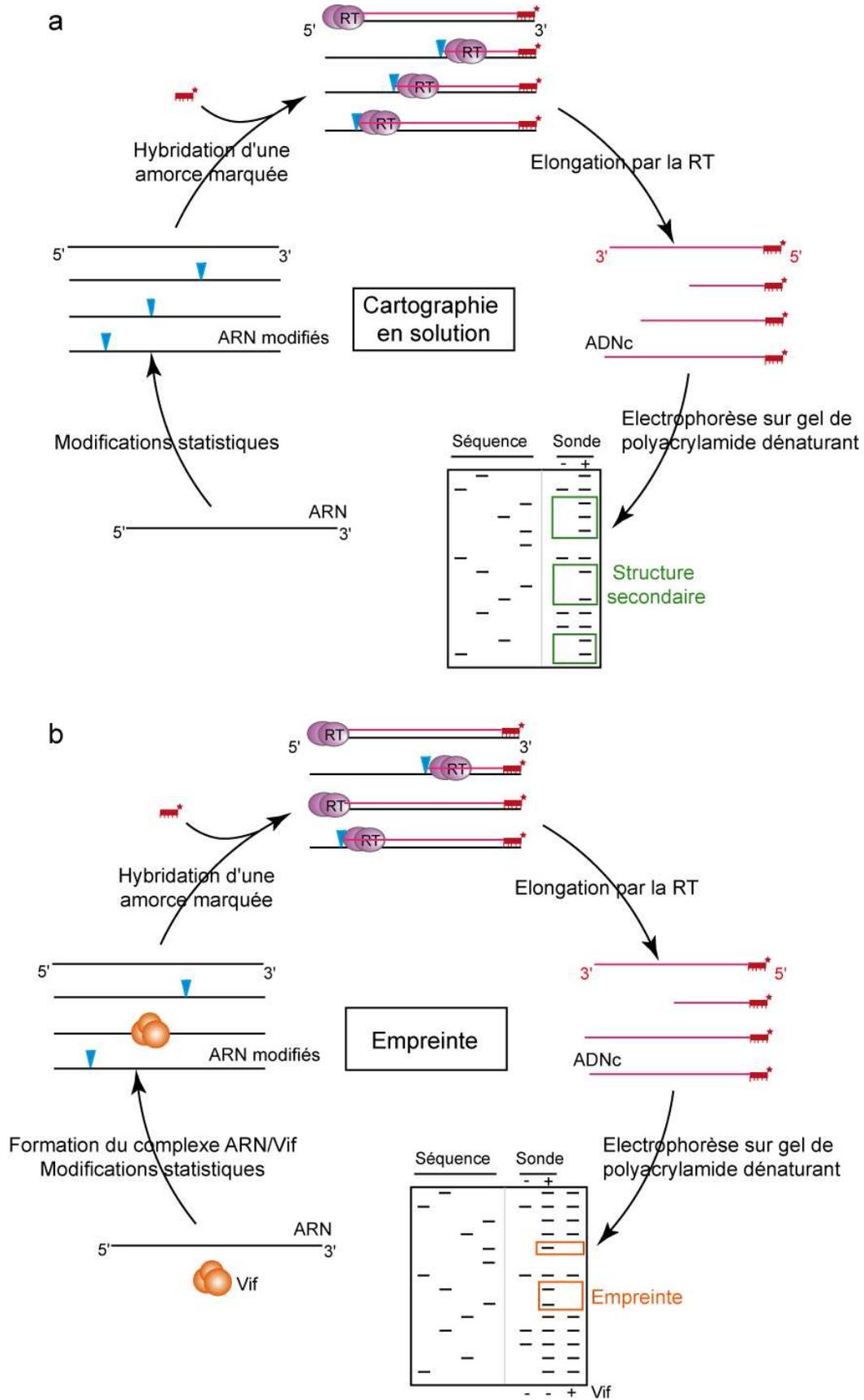


Figure 31 : Principes de la cartographie en solution (a) et de la technique d’empreinte (b). L’étoile rouge représente l’extrémité 5’ de l’amorce marquée radioactivement et les flèches bleues, les modifications ou coupures sur l’ARN.

## C. Caractérisation des protéines Vif WT et AALA

### 1. Dichroïsme circulaire

Les protéines Vif WT et AALA sont préparées de manière anaérobie dans 10 mM fluorure de potassium et 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4 à une concentration finale de 10  $\mu\text{M}$  puis placées dans des cuves en quartz de chemin optique 2 mm. Les spectres de dichroïsme circulaire sont enregistrés à 20°C grâce au dichrographe Jasco J-810 (Jasco, Easton, MD). La proportion de chaque élément de structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , boucles et régions désordonnées) des protéines est estimée par le logiciel Jasco Spectra Manager (Easton, MD) (figure 32).

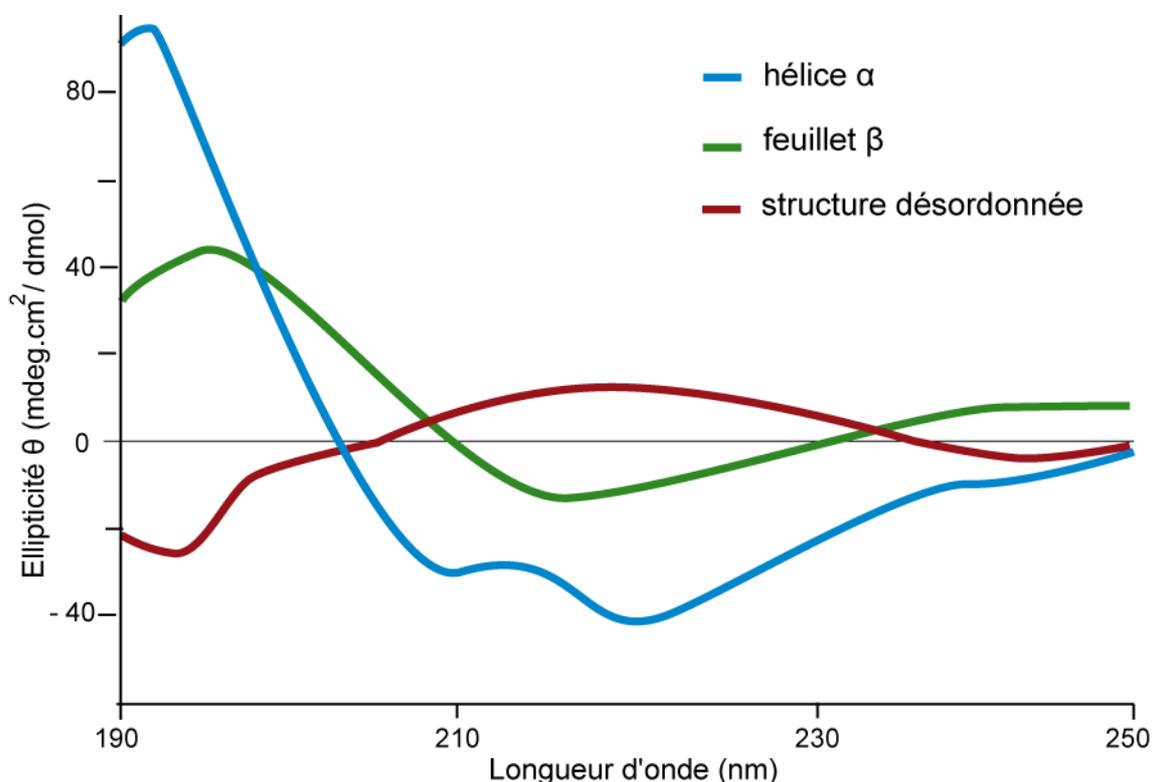


Figure 32 : Dichroïsme circulaire de la liaison peptidique dans une hélice  $\alpha$  (en bleu), un feuillet  $\beta$  (en vert) et une structure désordonnée (en rouge).

### 2. Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion a été menée sur une colonne Superdex 75 10 / 300 (Pharmacia) branchée à l'appareil AKTA purifier FPLC (GE Healthcare Biosciences). La colonne est tout d'abord équilibrée dans 50 mM NaCl, 50 mM MOPS, 10 % glycérol et 2 mM DTT pour l'étude de la protéine Vif WT et 150 mM NaCl, 50 mM MOPS, 10 % glycérol, 2 mM

DTT dans le cas de la protéine Vif AALA. Dans un premier temps, un standard de protéines de poids moléculaires connus (Bio-Rad) est chargé sur la colonne dans les différentes conditions de tampons pour obtenir une courbe d'étalonnage. Trois cents µg des protéines Vif WT et Vif AALA sont, dans un second temps, injectées sur la colonne après ultracentrifugation pendant 1 h à 100000xg à 4°C afin d'éliminer les agrégats. L'éluion des protéines est suivie par lecture de l'absorbance à 280 nm et analysée par le logiciel Unicorn version 4.11 (GE Healthcare Biosciences).

### 3. Diffusion dynamique de la lumière

Les coefficients de diffusion sont mesurés avec l'appareil Zetasizer Nano S (Malvern, UK). Après ultracentrifugation à 100000xg pendant 30 min à 4°C afin d'éliminer les agrégats, la protéine est disposée dans une cuvette trUView (Biorad) maintenue à 20°C puis irradiée par un faisceau laser ( $\lambda = 780$  nm). Une fonction d'autocorrélation exponentielle décroissante est calculée à partir du signal de diffusion de translation  $D_T$  des particules. En assimilant les protéines à des sphères dures, le coefficient de diffusion est relié au rayon hydrodynamique,  $R_h$ , de la particule *via* l'équation de Stokes-Einstein :  $R_h = k.T / 6\eta.\pi.D_T$  où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $\eta$  la viscosité et  $T$  la température. Les données expérimentales sont ensuite analysées par le logiciel DTS (Malvern, UK).

Toutes les données sont corrigées en tenant compte de la viscosité du solvant et de l'indice de réfraction. La taille ainsi que la masse des protéines Vif sont déterminées pour des concentrations entre 3 et 7 µM.

## D. Etude de la traduction d'A3G en présence de Vif

### 1. Transcription / traduction *in vitro*

Les plasmides permettant l'expression des protéines Vif WT (pcDNA hVif), AALA (pcDNA hVif AALA) et AspRS (contrôle) sont transcrits puis traduits pendant 90 min à 30°C par utilisation du kit « TNT coupled reticulocyte lysate system » selon la procédure décrite par Promega. Les protéines Vif WT, AALA et AspRS ainsi synthétisées sont ajoutées dans la glace à un nouveau mélange réactionnel contenant soit le vecteur pCMV A3G, pCMV A3G ΔUTR, pCMV A3G Δ5'UTR ou pCMV A3G Δ3'UTR. La réaction est incubée pendant 15, 30, 45 ou 60 min à 30°C et arrêtée par addition du tampon de charge pour les gels SDS-PAGE (tampon Laemmli). Les protéines sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE 12,5 % et analysées par autoradiographie.

## 2. Transfections et tests luciférase

### a. Expression des vecteurs pGL3 A3G dans les cellules HEK-293T

Seize heures avant la transfection, les cellules HEK-293T sont réparties dans des plaques 6 puits afin d'obtenir une confluence de 60-70 %. Les cellules sont ensuite transfectées transitoirement avec différents rapports des plasmides pGL3 A3G et pcDNA hVif par utilisation du FuGene-HD (Roche). Le vecteur phRL-TK (Promega) qui permet l'expression de la Renilla luciférase, essentielle à la normalisation des expériences, est ajouté au mélange réactionnel. L'ADN est incubé en présence de FuGene HD (Rapport ADN / FuGene = 2 µg / 3 µl) dans 100 µl d'Opti-MEM (Invitrogen) pendant 30 min à température ambiante. Les complexes ADN / FuGene sont ensuite ajoutés aux cellules qui sont remises en culture à 37°C. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont récoltées dans du PBS 1x (Phosphate Buffered Saline : 140 mM NaCl, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), lavées et lysées dans 100 µl de tampon de lyse fourni par le kit de détection de la Renilla et de la Firefly luciférase (Promega).

### b. Tests luciférase

Vingt µl d'échantillon dilué au 1/10<sup>e</sup> sont déposés en double sur une plaque opaque 96 puits (Berthold). Les activités de la Renilla et de la Firefly luciférase sont mesurées par ajout des substrats spécifiques de chaque enzyme fournis par le kit de détection de la Renilla et de la Firefly luciférase (Promega) et grâce au luminomètre GloMax 96 (Promega). Le signal de la Firefly luciférase est normalisé contre l'activité de la Renilla luciférase afin de tenir compte de l'efficacité de la transfection.

## 3. Transfections, Western blots et analyse du profil des polysomes

### a. Transfections avec les vecteurs pCMV A3G

Pour les expériences de western blot et d'analyse du profil des polysomes, des transfections avec les vecteurs pCMV A3G et pcDNA hVif sont effectuées. Le protocole est identique à celui utilisé pour les transfections avec le pGL3. Néanmoins, dans ce cas, 8 h avant la lyse des cellules transfectées, le milieu est changé par du milieu DMEM contenant 0,1 % DMSO ou 25 µM ALLN (resuspendu dans du DMSO telle que la concentration finale à utiliser soit de 0,1 %). L'ALLN est un peptide aldéhyde qui inhibe l'activité chymotrypsique du protéasome empêchant ainsi la dégradation des protéines modifiées par l'ubiquitine. Les cellules sont

récoltées dans du PBS 1x, lavées et lysées par ajout de 100 µl de RIPA 1x (50 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl, 1 % désoxycholate de sodium, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS) en présence d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Complete, Roche) pendant 20 min dans la glace. Après 1 h de centrifugation à 13000xg à 4°C, le surnageant contenant les protéines à analyser est récupéré.

Dans le cas de l'analyse des polysomes, le milieu des cellules est retiré 30 min avant la lyse et remplacé par du DMEM contenant 0,1 mg / ml de cycloheximide. Les cellules sont ensuite récoltées et lysées comme précédemment en complétant la solution de lyse avec 0,1 mg / ml de cycloheximide et 2U / µl de RNAsine (Promega).

#### b. Western blots

Après quantification des protéines par la technique de Bradford, 30 µg de protéines totales sont déposés sur un gel gradient de 4-12 % NuPAGE (Invitrogen). La migration électrophorétique s'effectue dans du tampon MOPS à 200 V pendant environ 1 h à température ambiante. Les protéines du gel sont alors transférées sur une membrane de nylon (Hybond P, Amersham) de la façon suivante :

- La membrane de nylon est tout d'abord activée dans du méthanol pendant 10 s, rincée 5 min dans l'eau puis équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM bicine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA et 10 % méthanol) pendant 15 min.
- Le gel est ensuite déposé sur la membrane de nylon et l'ensemble est placé entre deux feuilles de papier Whatman imprégnées du tampon de transfert.
- Le transfert des protéines sur la membrane est ensuite réalisé en condition liquide dans l'appareil XCell II Blot Module (Invitrogen) pendant 1 h à 30 V.

Après transfert, la membrane est découpée en deux au-dessus du marqueur de poids moléculaire de 25 kDa afin de détecter chaque partie par des anticorps différents. Les sites de fixation non spécifiques de la membrane sont bloqués pendant 1 h sous agitation à température ambiante dans du TNT 1x (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % triton X-100) complété de lait (4 %). Un anticorps primaire spécifique de la protéine à détecter (A3G ou Vif) (dilué au 1 / 10000<sup>e</sup>) est additionné à la solution de blocage et l'incubation se poursuit à 4°C pendant une nuit. Après deux lavages dans la solution TNT 1x, la membrane est incubée de nouveau dans du TNT 1x supplémenté d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase spécifique de l'espèce de production de l'anticorps primaire (souris ou lapin). Après 1 h à 4°C, la membrane est lavée deux fois dans la solution de TNT 1x pendant 5 min et une fois dans la solution TN 1x (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) pendant 5 min. Les protéines sont ensuite révélées par chémoluminescence après incubation de la

membrane dans un milieu ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (Pierce Western Blotting Substrate) pendant 1 min.

Après révélation, la partie haute des membranes est lavée deux fois au TNT 1x pendant 5 min à température ambiante puis les anticorps sont décrochés par un traitement de la membrane à 50°C pendant 30 min dans 100 mM  $\beta$ -Mercaptoéthanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8 à 50°C). La membrane est ensuite lavée deux fois dans du TNT 1x et prête à être sondée avec un autre anticorps primaire, l'anticorps anti- $\beta$ -actine dans notre cas.

c. Analyse du profil des polysomes

Après centrifugation des lysats et quantification de protéines (*cf paragraphe D.3.a*), le surnageant est déposé sur un gradient de sucrose continu 7-47 % dans 10 mM Tris-HCl pH 7,4 à 25°C, 250 mM KCl et 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Les gradients sont ultracentrifugés à 86000xg pendant 3 h à 4°C. Des fractions de 440  $\mu$ l sont prélevées et l'absorbance de chacune des fractions est mesurée à 280 nm. Le volume est ensuite séparé en deux parties égales qui seront indépendamment analysés pour leur contenu en ARN et en protéines.

i. Analyse des protéines

Les fractions recueillies du gradient n'étant pas assez concentrées pour une analyse par western blot, les échantillons sont précipités au TCA-DOC. Brièvement, 220  $\mu$ l de protéines sont incubées avec 0,0015 % désoxycholate de sodium (DOC), H<sub>2</sub>O qsp 1 ml puis agitées à température ambiante pendant 5 min. L'ajout de 0,5 % de TCA (acide TriChloroAcétique) induit la précipitation des protéines qui sont centrifugées à 13000xg pendant 10 min. Le surnageant est retiré avec précaution, le culot séché au speedvac (Savant, ThermoScientific) 3 min et resuspendu dans 30  $\mu$ l NaOH 0,1 N. Les protéines sont ensuite analysées par western blot comme précédemment et détectées avec les anticorps anti-A3G, -Vif, -L11 et –  $\beta$  actine.

ii. Analyse des ARN cellulaires

• Extraction des ARN cellulaires

Les fractions recueillies sont dans un premier temps digérées à la DNase I (Roche) pendant 1 h à 37°C afin d'éliminer l'ADN cellulaire et plasmidique. Dans un second temps, les ARN sont extraits par traitement au Tri-Reagent et précipités à l'éthanol.

- RT-PCR

Une partie des ARN cellulaires est renaturée en présence de 100 pmol oligodT par chauffage pendant 5 min à 90°C et refroidis 5 min dans la glace. Les ARN cellulaires sont rétrotranscrits en ADNc par incubation avec 5 U de la RT d'AMV (MP Biomedicals) pendant 2 h à 45°C en présence de 20 U RNasine, 50 mM Tris- HCl pH 8,3 à 25°C, 75 mM AcK, 8 mM AcMg, 10 mM DTT, 20 mM de chaque dNTP. Les ADNc produits sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques de chaque construction à analyser. Les fragments amplifiés sont déposés sur gel agarose 0,8 %.

L'autre partie des ARN non rétro-transcrits est déposée sur gel agarose 0,8 % afin de visualiser les ARNr.

## RESULTATS & DISCUSSIONS

### I. Etude de la fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G

#### A. Introduction et objectif

Les protéines cellulaires et virales sont impliquées dans diverses voies qui ont toutes comme point commun la régulation de l'activité de la cellule et / ou de la production de la particule virale. Les protéines liant l'ARN font partie intégrante de ce mécanisme. En effet, leur liaison à l'ARN peut avoir diverses conséquences selon le type d'ARN considéré : régulation de la traduction dans le cas d'un ARNm, équilibre entre expression et encapsidation pour l'ARNg des rétrovirus, transport nucléo-cytoplasmique...

La protéine Vif du VIH-1 possède un domaine de liaison aux ARN localisé en N-terminal<sup>118,247</sup> qui lui confère, malgré sa haute basicité, une spécificité de fixation aux ARN. En effet, alors que Vif interagit avec des homopolymères d'adénines ou de guanines en présence d'une forte concentration saline (0,5 M NaCl), Vif ne présente aucune affinité pour des homopolymères de cytidines ou d'uraciles<sup>247</sup>. De plus, Vif n'interagit pas avec l'ARNm de la  $\beta$ -globine, l'ARNr 5S ou encore avec les ARNt d'*E.coli*<sup>95,247</sup>. Dans notre laboratoire, Simon Henriet a également montré que Vif fixe plusieurs fragments dérivés de la région 5' de l'ARNg du VIH-1<sup>95</sup>.

Des substitutions des résidus W<sup>11</sup>, Y<sup>30</sup> et Y<sup>40</sup> en alanine réduisent très fortement la fixation de Vif à des homopolymères de guanines et à un ARN correspondant aux nucléotides 5104-5287 de l'ARNg du VIH-1. Par ailleurs, les virus porteurs de ces mutations ne sont pas infectieux dans les cellules restrictives<sup>247</sup>, suggérant que la capacité de Vif à fixer l'ARN est cruciale. De plus, Vif est encapsidée dans la particule virale *via* des interactions avec l'ARNg et le précurseur Gag<sup>118</sup> et régule le processus de transcription inverse en modulant l'activité de la NC et en diminuant les pauses de la RT (activité ARN chaperone)<sup>96</sup>.

Vif est une protéine multimérique<sup>240</sup>. Cette capacité d'assemblage est essentielle pour la production de virions infectieux<sup>58,146,239</sup>. En effet, l'association de peptides mimant le domaine de multimérisation d'une part réduit la multimérisation de la protéine Vif et d'autre part diminue fortement l'infectivité des particules virales<sup>239</sup>. La première explication a été apportée par Miller *et al.* qui, par ajout d'un peptide antagoniste du domaine de multimérisation de Vif, ont montré que la quantité d'A3G incorporée dans le virion

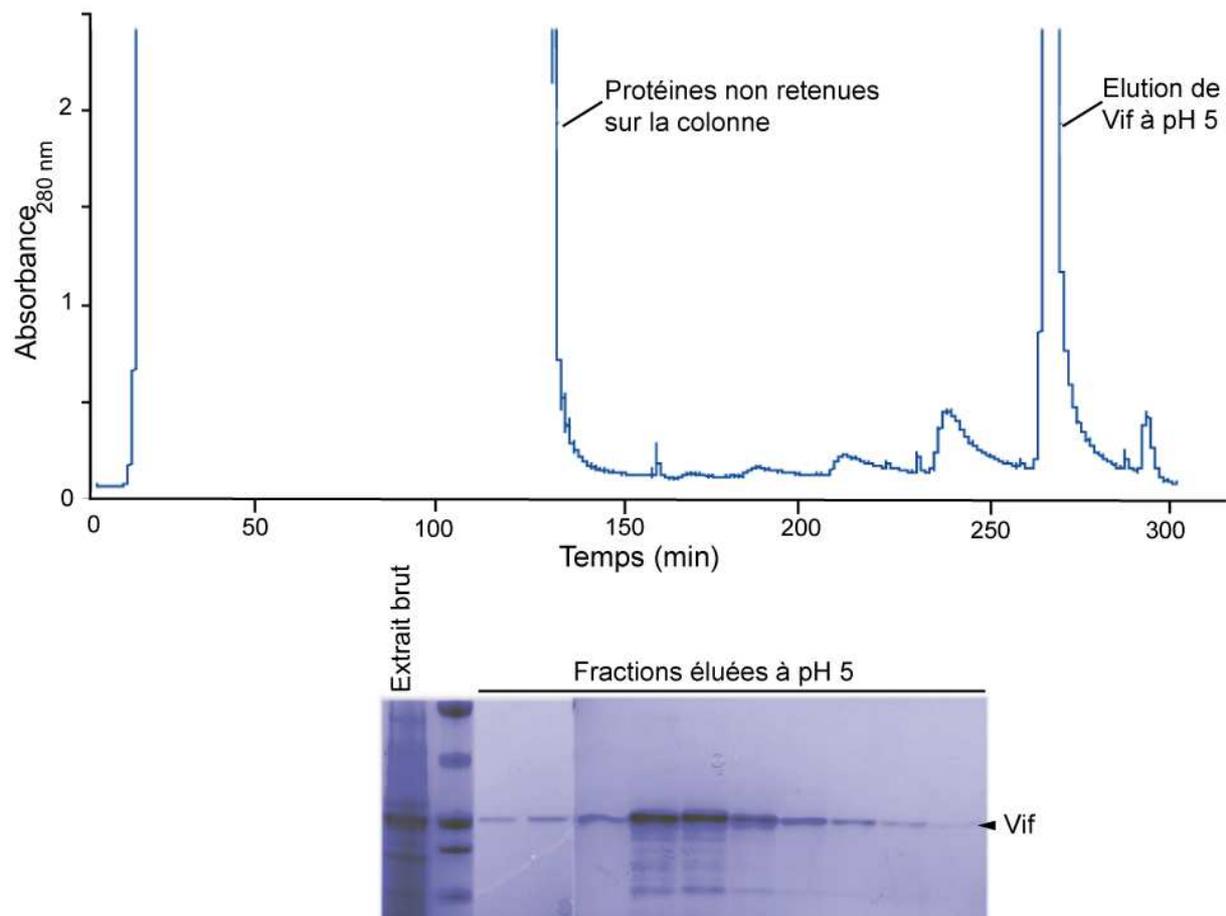
augmentait, induisant une diminution de l'infectivité des particules virales <sup>146</sup>. Une étude récente a analysé la cause de cette augmentation d'A3G encapsidée et a montré que Vif ne pouvant plus multimériser a perdu sa capacité à interagir avec A3G mais a conservé sa faculté de recruter l'ElonginC et la Culline 5 <sup>58</sup> : A3G n'est donc plus dégradée et est encapsidée dans le virion où le mécanisme de restriction peut commencer.

Nous nous sommes intéressés à la fixation de Vif à l'ARNm d'A3G en étudiant plusieurs constructions de l'ARNm d'A3G correspondant à diverses régions de l'ARNm dans le but d'identifier celles pour lesquelles Vif présente la meilleure affinité. Nous avons également analysé l'implication du domaine de multimérisation (<sup>161</sup>PPLP<sup>164</sup>) de Vif dans la fixation à l'ARNm d'A3G. Ainsi, l'étude de l'interaction de Vif avec l'ARN a été menée avec deux protéines : la protéine sauvage et une protéine mutante dans le domaine de multimérisation, Vif AALA.

## B. Résultats

### 1. Purification des protéines Vif WT et AALA

Les protéines Vif WT et AALA ont été surproduites dans les bactéries BL21 DE3 puis purifiées en conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA. Des changements de souche bactérienne, de température de culture et d'induction, de concentration d'IPTG ainsi que différentes constructions de Vif ont été testées dans le but de rendre les protéines solubles et de les purifier en conditions natives. Cependant, aucune de ces conditions n'a permis de changer l'état d'agrégation de Vif dans les bactéries. Ces tests nous auront néanmoins permis d'optimiser les conditions de surexpression de la protéine Vif WT et de trouver celles de la protéine Vif AALA (*figure 33*).



**Figure 33:** (a) Spectre d'absorption à 280 nm des protéines purifiées sur colonne Ni-NTA. (b) Analyse des fractions éluées à pH 5 sur gel SDS-PAGE 12,5% et coloré au bleu de coomassie.

A la fin de la purification, la pureté de Vif est analysée sur gel SDS-PAGE (*figure 33b*), les fractions sont ensuite rassemblées puis dialysées très lentement afin de retirer progressivement l'agent dénaturant et permettre aux protéines de se replier. Plusieurs conditions de renaturation pour Vif AALA ont été testées (*tableau 7, page 70*). Le point commun des tampons permettant de retrouver la protéine dans la phase soluble est leur teneur en arginine (550 mM). L'arginine n'a pas d'effet direct sur le repliement de la protéine, mais elle permet d'augmenter sa solubilité en diminuant l'agrégation<sup>4</sup>. Après avoir vérifié que la protéine Vif AALA ne précipite pas dans la solution utilisée pour Vif WT supplémentée de 550 mM arginine, la dialyse a été effectuée dans ce tampon.

Une fois la dialyse terminée, la protéine est concentrée. Afin de limiter la formation d'agrégats lors de cette étape, plusieurs techniques de concentration (notamment par Microcon, Millipore) ont été testées. Parmi elles, la mise en contact de la membrane de dialyse avec du PEG 35000 solide a été retenue. Plusieurs températures ainsi que différentes concentrations de glycérol ont également été testées pour conserver la protéine. Finalement, les protéines Vif sont conservées à 4°C dans 50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10

% glycérol pH 6,5 pour la protéine sauvage et dans le même tampon supplémenté de 550 mM arginine pour la protéine mutée.

## 2. Fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G et rôle du domaine de multimérisation

### a. Réention sur filtres de nitrocellulose

Cette technique nous permet d'étudier la fixation de Vif sur différentes régions de l'ARNm d'A3G. Les ARN d'A3G marqués radioactivement sont incubés avec des concentrations croissantes de la protéine Vif WT ou AALA. Le mélange réactionnel comportant l'ARN et la protéine Vif non liés ainsi que les complexes ARN / Vif formés est ensuite disposé sur des filtres de nitrocellulose puis filtrés. La filtration permet de retenir uniquement les complexes ARN / Vif qui seront ensuite analysés par scintillation. Cette technique nous permet d'obtenir une courbe d'affinité qui est ensuite analysée en appliquant le formalisme de Hill. Cette équation permet d'extraire la constante de dissociation,  $K_d$ , qui correspond à la concentration de la protéine Vif pour laquelle 50 % des ARN sont retenus sur les filtres et le paramètre de coopérativité (coefficient de Hill,  $n$ ). Ainsi,  $n > 1$  correspond à une fixation coopérative alors que  $n = 1$  indique une liaison non coopérative.

Nous avons étudié la fixation des protéines Vif WT (*figure 34a*) et AALA (*figure 34b*) à l'ARNm d'A3G ou à des fragments correspondant à l'ARNm délété de la région 5'UTR, 3'UTR ou des deux (dans ce cas, l'ARN représente uniquement la séquence codante) ainsi qu'à un ARN correspondant uniquement à la partie 5'UTR ou à la séquence 3'UTR d'A3G (*tableau 6, page 66*).

Les protéines Vif WT et AALA fixent tous les fragments correspondant à différentes parties de l'ARNm d'A3G. La forme sigmoïde des courbes d'affinité suggère que la liaison aux ARN est coopérative. De plus, la valeur du facteur de coopérativité ( $n$ ) montre que la coopérativité de cette fixation est moyenne et varie peu selon l'ARN étudié.

La protéine Vif WT lie les régions UTR de l'ARNm d'A3G avec différentes affinités (*figure 34a*). En effet, alors que Vif WT fixe avec une affinité moyenne la région 5'UTR ( $K_d = 115 \pm 4$  nM), cette protéine présente la meilleure affinité pour l'ARN A3G 3'UTR ( $K_d = 57 \pm 2$  nM). La délétion de cette région dans l'ARNm d'A3G (A3G  $\Delta$ UTR et A3G  $\Delta$ 3'UTR) conduit à une augmentation de la constante de dissociation ( $K_d \sim 150$  nM). Malgré la présence de la région 3'UTR, Vif WT fixe avec une affinité moyenne les ARNm d'A3G complet ou délété uniquement de la région 5'UTR ( $K_d \sim 115$  nM). Ce résultat suggère que les valeurs

déterminées ne correspondent pas à la constante de dissociation pour le site de plus haute affinité présent sur l'ARN mais plutôt à une moyenne des constantes d'affinité de l'ensemble des sites de liaison.

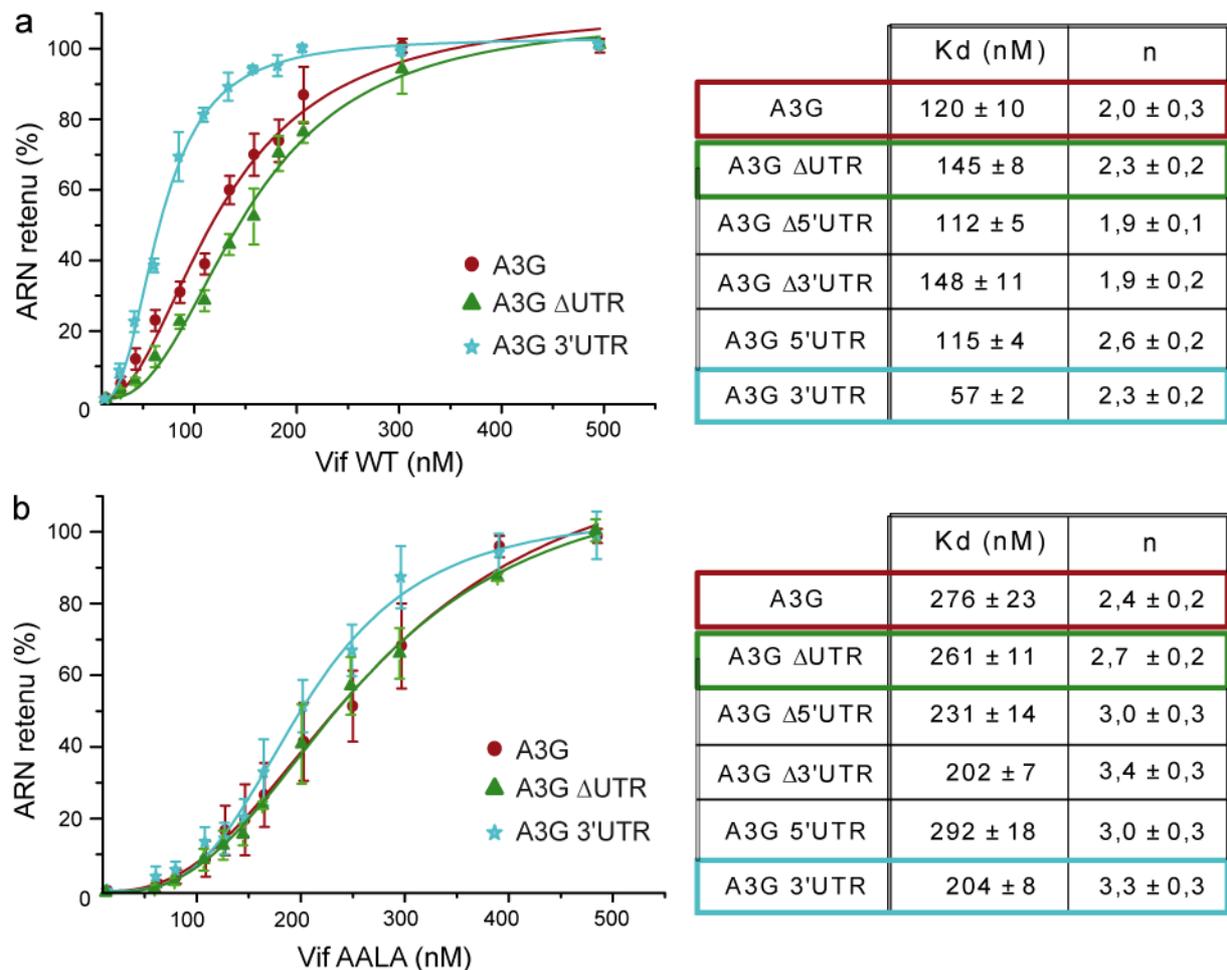


Figure 34 : Courbes d'affinité des protéines Vif WT (a) et AALA (b) pour les différents fragments de l'ARNm d'A3G. Ici représentés l'ARNm complet d'A3G (rouge), l'ARNm A3GΔUTR (vert) et la région 3'UTR d'A3G (bleu).

Comparée à la protéine Vif WT, la protéine Vif AALA présente peu d'affinité pour la région 3'UTR ( $K_d = 204 \pm 8$  nM) (figure 34b). De plus, toutes les valeurs des constantes de dissociation sont augmentées d'un facteur deux à quatre selon l'ARN d'A3G étudié. Ces résultats suggèrent que le domaine de multimérisation est important pour la fixation aux ARN et confère la spécificité d'interaction entre la protéine Vif et ses ARN cibles. Le peu de variation existant entre les facteurs de coopérativité mesurés dans le cas des deux protéines Vif indique également que le motif d'oligomérisation n'intervient pas dans la coopérativité de fixation.

Ces mêmes expériences ont également été réalisées avec une protéine Vif tronquée correspondant aux acides aminés 103-144 (<sup>103</sup>ADQLIHLYYFDCFSESAIRKAILGYRVSPRCEYQAGHNKVG<sup>144</sup>) contenant le doigt de zinc (en gras) dont les résidus liant l'atome de zinc sont soulignés. Différentes concentrations de ce peptide (jusqu'à 60 µM) et de chlorure de zinc ont été testées. Dans toutes les conditions, le motif de doigt de zinc de Vif ne fixe aucun des ARN A3G suggérant que ce domaine ne contribue pas à la fixation de Vif à l'ARN.

#### b. Spectroscopie de fluorescence

L'étude d'interactions entre macromolécules par spectroscopie de fluorescence exploite les propriétés de fluorescence des acides aminés aromatiques. Le signal de fluorescence varie selon l'environnement et selon l'accessibilité au solvant des résidus aromatiques plus ou moins enfouis dans la structure tertiaire de la protéine. Cette propriété permet de suivre de manière indirecte les interactions entre une protéine fluorescente et ses ligands.

La protéine Vif possède de nombreux résidus tryptophanes présents essentiellement dans la région N-terminale : six localisés dans le NTD et deux dans la partie centrale. Cette extrémité N-terminale correspond au domaine de liaison à l'ARN <sup>118,247</sup> et de ce fait, la fluorescence de Vif est très sensible à la fixation des ARN.

Les expériences de spectroscopie de fluorescence ont été effectuées en collaboration avec le Dr Serena Bernacchi, chargée de recherche dans notre équipe. L'interaction entre Vif et l'ARN A3G induit une diminution de l'intensité de fluorescence due à un enfouissement des résidus tryptophanes dans la structure ou à la contribution directe de ces acides aminés dans la fixation. Les courbes d'affinité obtenues sont analysées à l'aide du modèle de McGhee et von Hippel décrivant la fixation coopérative d'une protéine sur un acide nucléique <sup>144</sup>. Cette équation nous permet de déterminer la constante de dissociation  $K_d$ , le facteur de coopérativité  $\omega$  ainsi que la stœchiométrie de la fixation.

Ces expériences ont été menées avec la protéine Vif WT sur les fragments correspondant à différentes parties de l'ARNm d'A3G (*figure 35*).

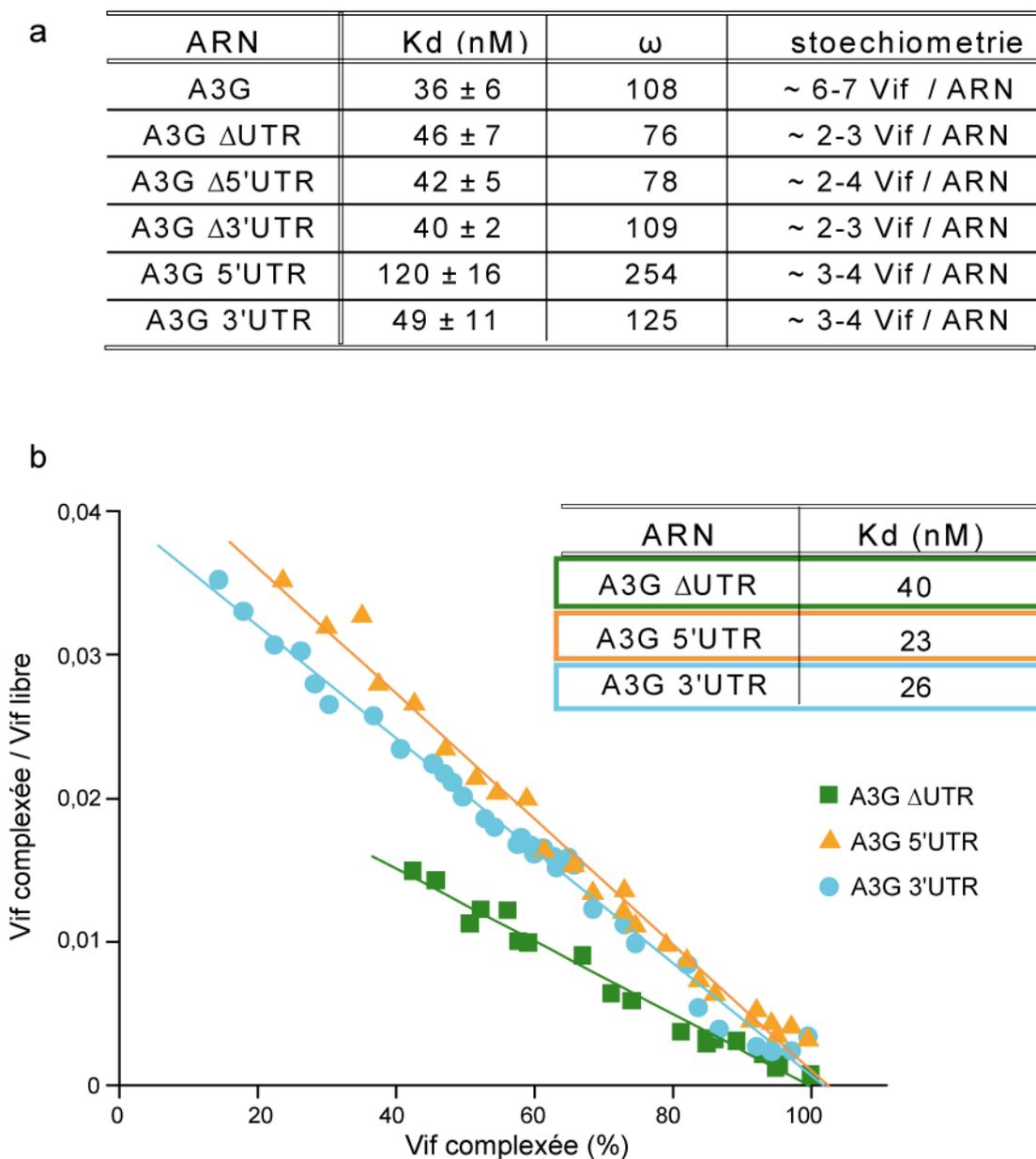


Figure 35 : (a) Résultats des expériences analysées avec l'équation de MacGhee et von Hippel. (b) Représentation de Scatchard des données de fixation de la protéine Vif WT aux ARN A3G ΔUTR (vert), A3G 5'UTR (jaune) et A3G 3'UTR (bleu).

La protéine Vif WT fixe toutes les régions de l'ARNm d'A3G avec une affinité similaire exceptée pour la région 5'UTR (figure 35a). De même, le facteur de coopérativité  $\omega$  est similaire et moyen (~ 100) pour tous les fragments testés sauf pour l'ARN A3G 5'UTR où il atteint le maximum (= 254). La stœchiométrie de la réaction est de 2-3 protéines Vif fixées sur la région codante et 3-4 sur les UTR. Ainsi, la proportion de Vif sur les UTR est d'environ une protéine pour 100 nts et diminue à une protéine pour 400 nts dans le cas de la région codante de l'ARNm d'A3G.

Les constantes de dissociation déterminées par utilisation du formalisme de McGhee et von Hippel correspondent à la moyenne des affinités pour l'ensemble des sites de fixation de Vif sur l'ARNm. Afin d'avoir une estimation de la constante de fixation de Vif pour le site de plus haute affinité présent dans chaque ARN, les données de fluorescence ont été ré-analysées avec l'équation de Scatchard. De manière attendue, ces constantes d'affinité sont plus faibles que les valeurs moyennes déterminées par l'équation de McGhee et von Hippel (*figure 35b*). Ces résultats montrent que Vif fixe de façon similaire le site de plus haute affinité présent dans la séquence codante ou dans les UTR de l'ARNm d'A3G avec une forte affinité ( $K_d \sim 25$  nM).

### c. Cartographie en solution et empreinte

La technique de cartographie en solution permet d'étudier le repliement des ARN. L'emploi de sondes enzymatiques (RNase A, T1 et V1) et chimiques (DMS et CMCT) permet de tester l'accessibilité de chaque nucléotide et ainsi de construire un modèle de structure secondaire de l'ARN étudié. Les conditions expérimentales de cartographie doivent introduire statistiquement au plus une modification ou coupure par molécule. Les modifications / protections sont détectées par extension d'amorce par la RT, la polymérisation s'arrêtant au nucléotide précédant le résidu modifié. Un contrôle d'élongation de l'ARN non modifié permet de détecter les pauses de la RT dues à la présence de structures stables ou à des coupures spontanées de l'ARN. La position des nucléotides accessibles est repérée par référence à un séquençage effectué selon la technique de Sanger<sup>180</sup>.

En collaboration avec Delphine Richer, assistante ingénieur dans notre équipe, nous avons étudié la structure secondaire des régions non traduites de l'ARNm d'A3G. Les modifications de l'ARN sont effectuées en absence (cartographie) ou en présence (empreinte) de la protéine Vif WT afin d'identifier les séquences impliquées dans la fixation de Vif.

Les expériences de cartographie et d'empreinte ont été effectuées sur des ARN correspondant soit à la séquence 5'UTR (*figure 36*) soit à la région 3'UTR d'A3G (*figure 37*). Des résultats similaires sont obtenus lorsque les études sont menées sur l'ARNm complet d'A3G suggérant que les UTR se replient indépendamment de la région codante.

#### i. La région 5'UTR

Nos expériences de cartographie en solution permettent d'établir un modèle de la structure secondaire de la 5'UTR de l'ARNm d'A3G. Cette région se replie en trois domaines

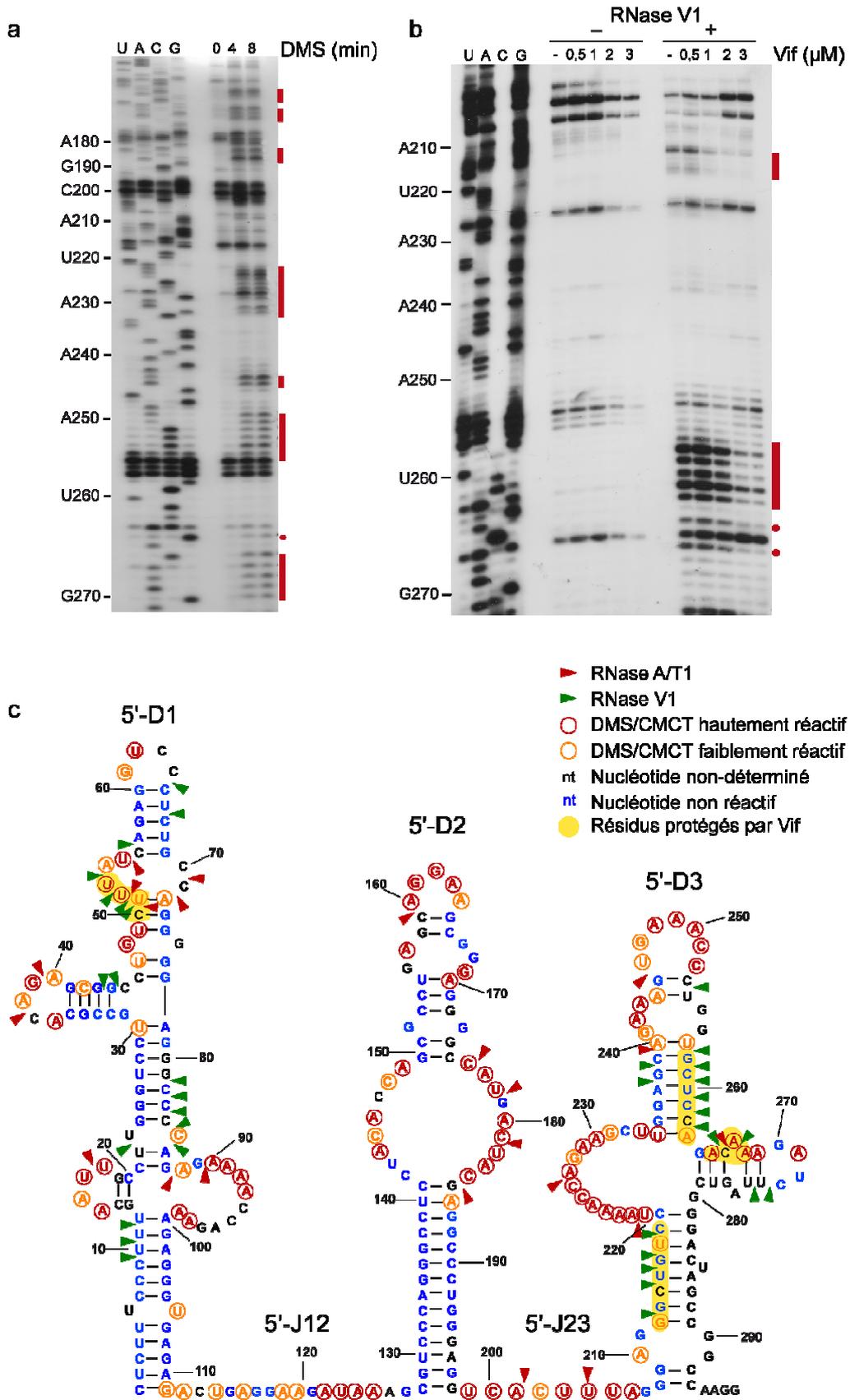


Figure 36: Modèle de la structure secondaire de la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G. Autoradiographies des ARN modifiés au DMS (a) ou clivés par la RNase V1 après protection par Vif (b)

confirment leur existence au niveau de région simple brin. Les résidus dans les tiges des domaines 1, 2 et 3 ne sont généralement pas modifiés exceptés ceux présents aux extrémités des hélices (boucles). Ces résultats sont en accord avec l'existence de trois structures en tige-boucle confirmé par les coupures à la RNase V1 dans les domaines 1 et 3. De plus, la plupart des nucléotides modélisés dans les régions simple brin sont modifiés et / ou clivés par les sondes chimiques et enzymatiques utilisées. L'unique région du modèle dont la structure est ambiguë se situe entre les nts 52-55 de la boucle interne de la tige-boucle D1. Cette boucle est en effet clivée à la fois par les RNases A et V1 et modifiée par le DMS et le CMCT suggérant que ces nts sont non-appariés mais empilés.

Le domaine 1 présente un site de fixation de faible affinité (observée uniquement à 3  $\mu$ M de Vif) au niveau des résidus 46-50. Alors que plusieurs empreintes de Vif sont détectées dans le dernier domaine, aucune n'est observée dans la tige-boucle 2. Dans le domaine 3, trois sites de fixation de Vif ont été précisément déterminés : (1) entre les nts 212-218 localisés dans la partie inférieure de l'hélice 3, (2) au niveau des résidus 257-262 et (3) et des nts 265-267. Ces derniers sites contigus pourraient également ne représenter qu'un site de fixation pour la protéine Vif.

#### ii. La région 3'UTR

De façon similaire à la région 5'UTR, le modèle de structure secondaire de la 3'UTR montre une organisation de cette région en trois domaines (3'D1, 3'D2 et 3'D3) séparés par des jonctions simple brin (3'J12 et 3'J23) (*figure 37*). La jonction 3'J23 est hautement réactive aux sondes chimiques alors que les résidus de 3'J12 sont faiblement modifiés. En effet, cette jonction participerait à la formation d'une hélice avec les résidus de l'extrémité 3' de la région 3'UTR. Les nts de la tige 1 ne sont pas réactifs excepté ceux localisés au niveau de boucle, suggérant une organisation de ce domaine en tige-boucle. La structure du domaine D2 déterminée par l'utilisation des sondes chimiques et enzymatiques est globalement en accord avec notre modèle. La tige supérieure de D2 composée uniquement d'appariements A-U et G-U est très instable et pourrait ne pas exister. Nos données de cartographie sont également en faveur d'une organisation du domaine 3 en tige-boucle excepté pour la partie inférieure de l'hélice. En effet, cette tige pourrait ne pas être présente ou adopter des conformations alternatives suggérées par les clivages aux mêmes positions par la RNase A et la RNase V1 (nts 1643-1648).

Les empreintes de Vif sont observées dans les trois domaines de la région 3'UTR. Dans le premier domaine, les protections induites par Vif recouvrent de courtes régions. Trois autres

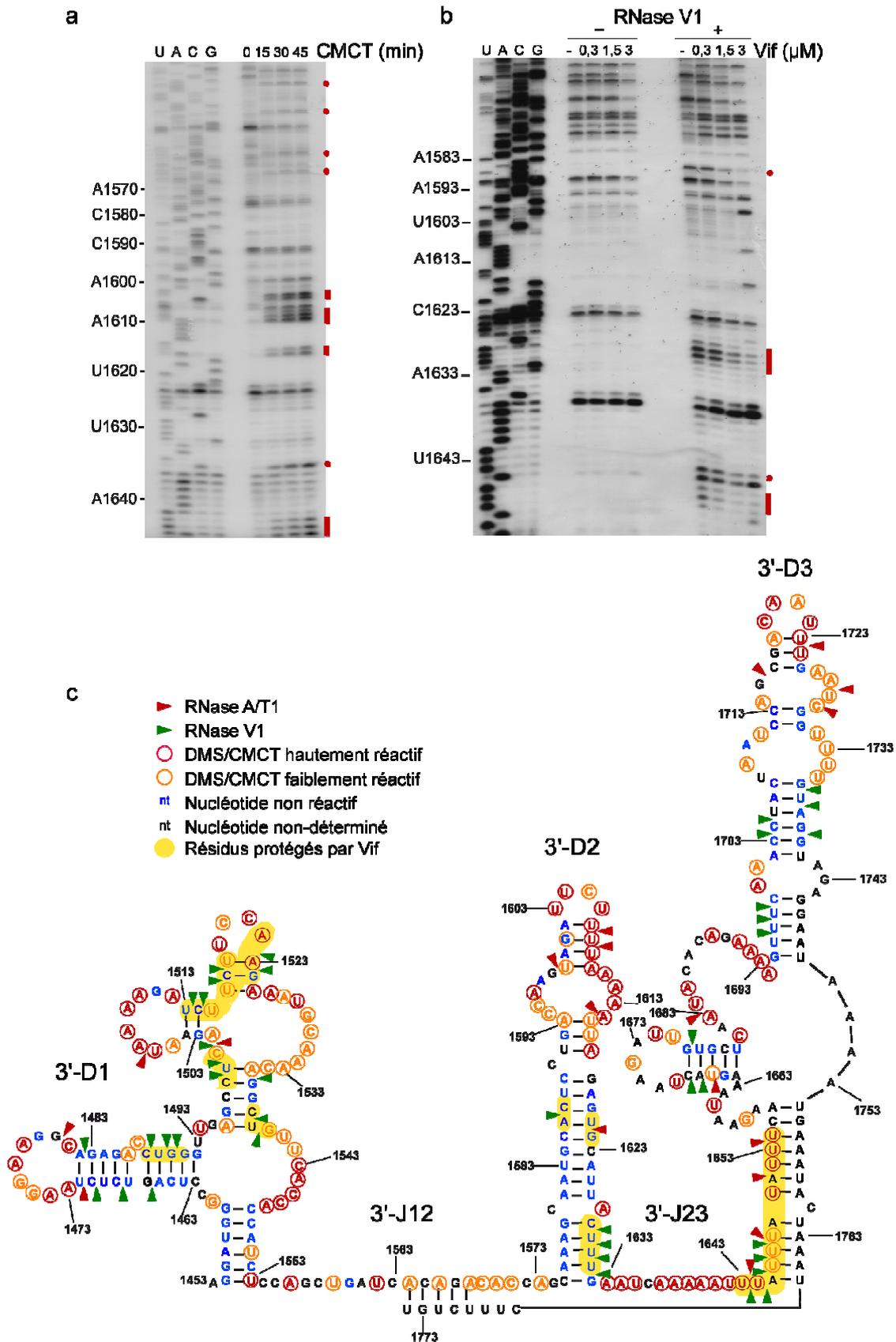


Figure 37: Modèle de la structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm d'A3G. Autoradiographies des ARN modifiés au CMCT (a) ou clivés par la RNase V1 après protection par Vif (b)

sites sont également protégés par Vif : deux dans le domaine 2 et une longue suite de résidus dans le dernier domaine (nts 1643-1654). Ce long enchainement de nts pourrait aussi représenter deux sites de fixation contigus pour la protéine Vif. De manière intéressante, l'inhibition du clivage à la RNase V1 de cette région est observée à la plus faible concentration de Vif (0,3  $\mu$ M) alors que les protections précédentes sont produites uniquement à des concentrations élevées suggérant la présence d'un site de plus haute affinité.

### C. Article : Vif lie l'ARNm d'A3G et inhibe sa traduction

*Manuscrit soumis à NAR*

## HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation

Gaëlle Mercenne, Serena Bernacchi, Delphine Richer, Guillaume Bec, Simon Henriet, Jean-Christophe Paillart<sup>1</sup>, and Roland Marquet<sup>1</sup>

Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg cedex France

<sup>1</sup> Corresponding authors:

- Jean-Christophe Paillart: [jc.paillart@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:jc.paillart@ibmc.u-strasbg.fr)

Phone: + 33 3 88 41 70 35 ; Fax: + 33 3 88 60 22 18

- Roland Marquet: [r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr)

Phone: + 33 3 88 41 70 54 ; Fax: +33 3 88 60 22 18

### ABSTRACT

The HIV-1 viral infectivity factor (Vif) allows productive infection of non-permissive cells (including most natural HIV-1 targets) by counteracting the cellular cytosine deaminases hA3G and hA3F. The Vif-induced degradation of these restriction factors by the proteasome has been extensively studied, but little is known about the translational repression of hA3G and hA3F by Vif, which has also been proposed to participate in Vif function. Here we studied Vif binding to hA3G mRNA and its role in translational repression. Filter binding assays and fluorescence titration curves revealed that Vif tightly binds to hA3G mRNA. Vif overall binding affinity was higher for the 3' untranslated region (UTR) than for the 5'UTR, even though this region contained at least one high affinity Vif binding site (apparent  $K_d = 23$  nM). Mutating the Vif multimerization domain reduced the affinity and specificity of Vif for hA3G mRNA. Several Vif binding sites were identified in 5' and 3' UTRs using RNase footprinting. *In vitro* translation evidenced that Vif inhibited hA3G translation by two mechanisms: a main time-independent process requiring the 5'-UTR and an additional time-dependent, UTR-independent process. Vif-induced translational repression of hA3G was not affected by mutating the Vif multimerization domain.

## INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infects primary T-cells, macrophages and monocytes, ultimately leading to the destruction of the immune system, infection by opportunistic pathogens, and death, if its replication cannot be inhibited. However, these cell lineages possess an innate defense system directed against retroviruses, retrotransposons and retroelements, and HIV-1 had to develop a countermeasure against this protective system in order to be able to infect them. Primary T-cells, macrophages and monocytes, as well as some lymphocyte-derived cell lines, collectively named non-permissive cells, express two related cytosine deaminases, APOBEC3G (hA3G) and APOBEC3F (hA3F) that restrict HIV-1 replication (1,2). However, these antiviral factors are counteracted by the HIV-1 viral infectivity factor (Vif), a basic 23 kDa protein required for HIV-1 propagation *in vivo* and pathogenesis (1,2) (for reviews, see (3-5)).

The N- and C-terminal domains of hA3G and hA3F possess significant similarity to APOBEC1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme. The APOBEC family includes the cellular cytidine deaminases APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3, APOBEC4 and the activation-induced deaminase (AID). In humans, there are seven *apobec3* genes coding for hA3A, hA3B, hA3C, hA3DE, hA3F, hA3G, and hA3H (3-6). Among these proteins, hA3G has the most potent anti-HIV-1 activity, while the activity of hA3F is weaker but significant, and the anti-HIV-1 activity of hA3DE is very weak (3,4). Other APOBEC3 members display potent activities against various viruses and retroelements (3). In the absence of Vif (i.e. in HIV-1  $\Delta vif$ ) hA3G and hA3F are incorporated into HIV-1 and they catalyze cytosine deamination during (-) strand DNA synthesis, ultimately resulting in (i) degradation of the viral DNA and/or (ii) lethal hypermutagenesis (1,2,7-12). Notably, accumulating evidence shows that catalytically inactive hA3G and hA3F mutants also significantly inhibit HIV-1 DNA synthesis and replication (for reviews, see (3-5)), and some of the antiviral effects of these proteins might not require packaging into the viral particles.

HIV-1 Vif decreases the intracellular concentration of hA3G and hA3F and prevents their incorporation into HIV-1 particles (7-9,13-16). HIV-1 Vif suppresses hA3G and hA3F antiviral functions by hijacking a cellular E3 ubiquitin ligase and inducing their degradation by the 26S proteasome (8,10-12,16-18). Even though the Vif induced-degradation of hA3G by the 26S proteasome has been extensively studied, it is not the only mechanism, and possibly not the main mechanism, by which Vif counteracts hA3G and hA3F. Indeed, Vif has been shown to be able to inhibit packaging and antiviral activity of a degradation resistant hA3G variant (19). In one of the first publications in the field, Landau and coworkers reported a 4.6-fold reduction of hA3G synthesis in the presence of Vif and concluded that Vif-induced

degradation of hA3G does not appear to be the primary mechanism by which it blocked hA3G encapsidation (7). It is possible that the Vif -induced, proteasome-dependent, degradation of Vif was underestimated in this study (8,10), but the effect of Vif on hA3G synthesis was confirmed by several independent groups (10,13). The mechanism by which Vif downregulates hA3G translation has never been studied.

Recently, we showed that Vif binds the 5' region of the HIV-1 genomic RNA with high affinity and moderate cooperativity (20,21), and that Vif has an RNA chaperone activity (22). In addition, mutations reducing the affinity of Vif for RNA have been shown to diminish viral replication in non-permissive cells (23), suggesting that RNA binding plays a central role in Vif function. We therefore studied binding of HIV-1 Vif to hA3G mRNA by biochemical and biophysical methods. As the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of mRNAs are often involved in negative translational control by proteins (24,25), we compared Vif binding to the full-length mRNA and RNA fragments corresponding to the 5' and 3' UTRs and to the hA3G coding region. Our results showed that wild-type Vif has a high affinity for the hA3G mRNA, and especially for its 3' UTR. The specificity and high affinity for the 3'-UTR were lost in a Vif mutant that was unable to multimerize. Using chemical and enzymatic footprinting, we identified several Vif binding sites not only in the 3' UTR, but also in the 5'-UTR of hA3G mRNA. Finally, we compared the effect of Vif on the *in vitro* translation of full-length hA3G mRNA and mRNAs lacking the 5' or/and 3' UTR(s) regions. Vif had two negative effects on hA3G translation: a time-dependent, UTR independent effect and a more important time-independent effect that required the 5' UTR. Our results suggest that Vif binding to hA3G mRNA, and particularly to its 5' UTR might be crucial for Vif function, by downregulating hA3G translation.

## MATERIAL AND METHODS

### Plasmid construction

The DNA sequence corresponding to hA3G was obtained after polyA<sup>+</sup> mRNA isolation from H9 cells (PolyATtract® mRNA Isolation Systems - Promega) and RT-PCR analysis (Superscript® – Invitrogen) using a sense primer corresponding to the major transcription site defined by Muckenfuss *et al.* (26) and an antisense primer corresponding to the 3' end of the 3'UTR (Table 1). Amplified PCR products containing the entire APO3G mRNA sequence were digested by EcoRI and XbaI and ligated into pCMV6-XL5 previously digested with the same restriction enzymes. Fragments corresponding to the 5'UTR, the 3'UTR, or the coding region +/- the 5' and/or the 3'UTR of APO3G mRNA were PCR amplified using primers listed in Table 1 and cloned into pCR TOPO 2.1 (Invitrogen), for *in vitro* run off transcription, and

pCMV6-XL5, for *in vitro* translation assays. The resulting plasmids pCMV-hA3G, pCMV-hA3G $\Delta$ UTR, pCMV-hA3G $\Delta$ 5'UTR, and pCMV-hA3G $\Delta$ 3'UTR contain nucleotides 1-1771, 298-1452, 298-1771 and 1-1432 of human APO3G, respectively and pTOPO-hA3G-5'UTR and pTOPO-hA3G-3'UTR contain nucleotides 1-297 and 1454-1771 respectively. The inserts of all plasmids were checked by sequence analysis. All nucleotide positions refer to the transcription start site of the major isoform corresponding to hA3G mRNA in human T cell lines A3.01 (26).

Plasmid pD10 WT-Vif containing a 6His-tag fused at the N terminal domain of Vif lacking the methionine initiation codon was used to perform site-directed mutagenesis (QuickChange mutagenesis – Stratagene) to obtain a Vif protein mutated in the multimerization domain 161PPLP164. The proline residues were replaced by alanines using oligonucleotides vif-M1 et vif-M2 as indicated in Table 1. The presence of the mutation was checked in the resulting plasmid, pD10 AALA-Vif, by DNA sequencing.

### **RNA synthesis and labeling**

After linearization of plasmids pCMV-hA3G, pCMV-hA3G $\Delta$ UTR, pCMV-hA3G $\Delta$ 5'UTR, pCMV-hA3G $\Delta$ 3'UTR, pCRTOP-hA3G5'UTR or pCRTOPO-hA3G3'UTR by *Stu*I or *Xba*I, *in vitro* transcription was performed with bacteriophage T7 RNA polymerase in presence of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P ATP (Amersham) as previously described (27). Internally labeled RNA was purified on denaturing polyacrylamide gels or on agarose gels.

### **Recombinant Vif proteins**

Plasmid pD10WTVif or pD10AALAVif was transformed and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells as described (28). Protein concentration was determined spectrophotometrically using an extinction coefficient of 43,040 cm<sup>-1</sup>•M<sup>-1</sup> at 280 nm.

### **Filter binding assays**

Internally <sup>32</sup>P-labeled full-length or truncated hA3G mRNA (20,000 cpm, final concentration < 2 nM) and 1.5  $\mu$ g of unlabeled *E. coli* total tRNA in 5  $\mu$ l of Milli-Q (Millipore) water were heated for 2 min at 90°C and chilled on ice for 2 min. After addition of tenfold concentrated binding buffer (final concentrations: 30 mM Tris–HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and five units of RNasin (Promega), RNA was renatured for 15 min at 37°C. In parallel, Vif proteins were renatured for 15 min at 37°C in binding buffer supplemented with 0.02% (w/v) bovine serum albumin, and added to RNA in a final volume of 60  $\mu$ l. After incubation for 30 min at 37°C and for 30 min at 4°C in the presence of 0.01% Triton X-100, RNA–protein complexes were loaded onto 0.45  $\mu$ m pore size cellulose filters (Multiscreen<sup>TM</sup> 96-well plate, Millipore), presoaked with 100  $\mu$ l of binding

buffer. After three washes with 100 µl of icecold binding buffer, the filters were air-dried and the radioactivity remaining on the filters was determined by liquid scintillation counting.

### Quantitative analysis of filter-binding assays

The hypothesis underlying filter binding assays is that all RNA-protein complexes are retained on the filter. As we previously showed that Vif binds RNA cooperatively (20,21), filter binding data can be analyzed using the Hill equation for cooperative binding (21). Curve fitting of the experimental data was performed with Origin7 or Prism5 softwares using equation:

$$f = \frac{[L]^{\alpha_H}}{(K_d)^{\alpha_H} + [L]^{\alpha_H}} \quad (\text{Equation 1})$$

where  $f$  corresponds to the RNA fraction retained on the filter,  $[L]$  is the protein concentration,  $\alpha_H$  is the Hill constant and is an index to the cooperativity and  $K_d$  is the ligand concentration at which 50% of the RNA is retained on the filter.

### Steady State Fluorescence Measurements

Fluorescence experiments were recorded in quartz cells at  $20 \pm 0.5$  °C on a Fluoromax-4 fluorometer (HORIBA Jobin-Yvon). The excitation wavelength was 295 nm, the emission wavelength was scanned from 310 to 450 nm, the integration time was 0.1 s, and the excitation and emission bandwidths were 5 nm. Fluorescence titrations were performed by adding increasing amounts of nucleic acid to 100 nM or 50 nM Vif in 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

### Determination of Vif / RNA Binding Parameters

To determine the binding parameters of Vif to the hA3G mRNA fragments, we measured the decrease of the fluorescence intensity,  $I$ , at a fixed concentration of protein in presence of increasing RNA concentrations. The fluorescence intensity was then converted into the intrinsic fluorescence quenching  $Q_{obs}$  in Equation 2:

$$Q_{obs} = \frac{I_0 - I}{I_0} \quad (\text{Equation 2})$$

with  $I_0$  corresponding to the protein fluorescence intensity in absence of nucleic acid. The number of consecutive nucleotides occluded upon binding of one ligand,  $n$ , the observed affinity,  $K_{obs}$ , and the cooperativity parameter,  $\omega$ , were recovered using the model of McGhee and Von Hippel for cooperative binding (29), in Equation 3:

$$\frac{\nu}{L_f} = K_{obs} \cdot (1 - n\nu) \cdot \frac{[(2\omega - 1)(1 - n\nu) + \nu - R]^{n-1}}{[2(\omega - 1)(1 - n\nu)]^{n-1}} \cdot \frac{[1 - (n + 1)\nu + R]^2}{[2(1 - n\nu)]^2} \quad (\text{Equation 3})$$

with  $R = \{[1 - (n + 1)\nu]^2 + 4 \nu(1 - n\nu)\}^{1/2}$ .

Because the McGhee and Von Hippel model was derived with the simplifying assumption of an infinite lattice of binding sites, we introduced a correction factor taking into account the finite lattice size,  $N$  (30). The correction merely amounts to multiplying Equation 3 by the factor  $\frac{N - n + 1}{N}$

For  $\omega = 1$ , Equation 3 simplifies to Equation 4, which corresponds to the Scatchard formulation for non-interacting ligands:

$$\frac{\nu}{L_f} = K_{obs} \cdot (1 - n\nu) \cdot \left( \frac{1 - n\nu}{1 - (n - 1)\nu} \right)^{n-1} \quad (\text{Equation 4})$$

where  $\omega$  corresponds to the binding density (mol of bound protein/mol of nucleotide), and  $L_f$  to the concentration of free protein. These quantities are linked by Equations 5, 6 and 7 as described in (31):

$$\nu = L_b / D_t \quad (\text{Equation 5})$$

$$L_f = L_t - L_b \quad (\text{Equation 6})$$

$$L_b = L_t (Q_{obs} / Q_{max}) \quad (\text{Equation 7})$$

where  $D_t$  is the total nucleotide concentration,  $L_t$  and  $L_b$  are the total and the bound protein concentrations, respectively, and  $Q_{max}$  corresponds to the maximal fluorescence quenching when all protein molecules are bound to nucleic acids. Fitting of experimental data with those equations was performed with an algorithm written with Mathematica (Wolfram Research) (20).

### Chemical modifications of RNA and enzymatic footprinting

Chemical modification experiments were performed on the full-length APO3G mRNA and on the hA3G-5'UTR and hA3G-3'UTR RNAs. RNAs were modified with DMS (Fluka), or CMCT (Merck) after a renaturation procedure in a high ionic strength buffer in the presence of 2  $\mu\text{g}$  of *E. coli* total tRNA. For DMS modification, the reaction was carried out in buffer D1 (50 mM sodium cacodylate, pH 7.5, 300 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) for 4 and 8 min. at 37°C with DMS freshly diluted 1/20 (v/v) in ethanol. For CMCT, modifications were performed at 25°C in buffer D2 (100 mM sodium borate pH 8.0, 300 mM KCl and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) with 5  $\mu\text{l}$  of

freshly dissolved CMCT (42 mg/ml in water) for 15, 30 and 45 min. Reactions were stopped by precipitation in ethanol. Modified/protected bases were detected by extension of a 5' <sup>32</sup>P-labeled primer with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (MP Bio-medicals) as previously described (21) and analyzed on denaturing 8 % polyacrylamide gels.

Enzymatic footprinting experiments were performed on hA3G-5'UTR and hA3G-3'UTR RNAs in the presence of increasing concentrations of Vif using ribonuclease (RNase) V1, T1 and A (Ambion). Briefly, RNA (1  $\mu$ M) was renatured for 15 min in the presence of 2  $\mu$ g of *E. coli* total tRNA in the buffer provided by the manufacturer. After addition of Vif protein (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0  $\mu$ M), Vif-RNA complexes were allowed to form for 30 min at 37°C and 30 min at 4°C. RNases V1, T1 or A were then added and incubation was continued for 15 min at room temperature. Reactions were stopped by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Footprints were detected by primer extension as described above.

### **In vitro translation assays**

The wild-type and mutant Vif proteins, and control AspRS were transcribed and translated for 90 min at 30°C using the Promega TNT T7-coupled reticulocyte lysate system according to the manufacturer's instructions. The synthesized Vif, Vif AALA or AspRS were added on ice to a new transcription/translation mix containing either pCMV-APO3G, APO3G $\Delta$ UTR, APO3G $\Delta$ 5'UTR or APO3G $\Delta$ 3'UTR. The reaction media were then incubated for 15, 30, 45 or 60 min at 30°C and stopped on ice by the addition of SDS-PAGE loading buffer. Proteins were then separated on 12,5% SDS-PAGE and analysed by autoradiography.

## **RESULTS**

### **Filter binding assays**

In order to detect and analyze binding of wild type (WT) HIV-1 Vif to hA3G mRNA, we first performed filter binding assays using either full-length hA3G mRNA, mRNAs deleted of the 5' or the 3'UTR, or RNA fragments corresponding to the 5'UTR, the hA3G coding region, or the 3'UTR, respectively (Fig. 1A). All binding curves displayed a sigmoid shape suggesting that binding of Vif to the hA3G mRNA and the fragments thereof is cooperative (Fig. 2A). The experimental data were adequately fitted with the Hill equation (Fig. 2A), and the apparent dissociation constants ( $K_d$ ) and the Hill constant ( $\alpha_H$ ), which reflect cooperativity, extracted from this analysis are summarized in Table 2. No cooperativity corresponds to  $\alpha_H = 1$ , while  $\alpha_H > 1$  indicates positive cooperativity. In addition,  $\alpha_H$  gives a lower limit of the number of Vif binding sites on RNA.

Comparison of hA3G- $\Delta$ UTR, hA3G-5'UTR, and hA3G-3'UTR RNAs showed that WT Vif bound to these three regions with significant affinity, especially as the binding buffer contained high salt concentration in order to reduced unspecific electrostatic interactions. However, Vif displayed a higher affinity for the 3'UTR of hA3G mRNA, while binding to the coding region was slightly weaker than to the 5'UTR (Fig. 2A and Table 2). These experiments suggested that the 3'UTR of hA3G mRNA contains at least one high affinity Vif binding site. In keeping with this interpretation, WT Vif binds tighter to hA3G and hA3G- $\Delta$ 5'UTR RNAs, which contain the 3' UTR, than to hA3G- $\Delta$ 3'UTR (Table 2). WT Vif appeared to bind all RNA fragments with moderate cooperativity.

Unexpectedly, Vif bound hA3G and hA3G- $\Delta$ 5'UTR RNAs weaker than hA3G-3'UTR RNA, even though these three RNAs contain the same high affinity Vif binding site(s). This result revealed that the assumption that all RNA-protein complexes are retained with the same efficiency on the cellulose membrane was not fulfilled. Instead, retention of the RNA-Vif complexes on the filter probably increased as an increasing number of proteins bound to the same RNA molecule. Even though a theoretical framework has been developed to determine the retention efficiency of RNA-protein complexes in filter binding experiments (32), it could not be applied to our experiments, which involved an unknown number of RNA-protein complexes with different retention efficiencies. Thus, the  $K_d$  values in Table 2 do not correspond to the binding dissociation constant of Vif from the highest affinity binding site present in each RNA fragment, but correspond to a weighted average of the binding dissociation constants of all binding sites present on each RNA.

As Vif multimerization is required to counteract the antiviral activity of hA3G (4,33-35), and as it would also help to explain the cooperative binding of this protein to hA3G mRNA, we mutated the Vif multimerization domain, which has been mapped to the 161PPLP164 motif (Fig. 1) (36). Detailed characterization of the WT and mutant Vif proteins will be described elsewhere (Bernacchi, Mercenne, *et al.*, in preparation). As compared to WT Vif, the mutant Vif AALA protein displayed very little preference for any of the RNA fragments we tested (Fig. 2 and Table 2). While the mutant Vif had a slightly stronger affinity for the isolated 3'UTR than for the 5'UTR, it also displayed a slightly better affinity for the hA3G- $\Delta$ 3'UTR RNA than for the hA3G- $\Delta$ 5'UTR. Thus, it seems that the mutant Vif did not display any significant preference for one of the UTR or for the coding region of the hA3G mRNA. Taken together, these results indicate that the dimerization domain of Vif is required to confer specificity to Vif binding to RNA. However this domain was not required for cooperative binding, since  $\alpha_H$  values were consistently higher for Vif AALA than for WT Vif (Table 2).

### Fluorescence spectroscopy

In order to reinforce the conclusions drawn from the filter binding experiments, we studied Vif binding to the hA3G mRNA by fluorescence spectroscopy. HIV-1 Vif protein contains 8 Trp residues, including 7 that are located in the N-terminal region of Vif, which corresponds to the RNA binding domain (4,36). Thus, Vif displays a high intrinsic fluorescence that is quenched upon binding to nucleic acids (20). While increasing amounts of protein were used to titrate a negligible amount of RNA in the filter binding assays, a constant and non negligible amount (50 or 100 nM) of protein was titrated with increasing amount of nucleic acids in the fluorescence experiments. Thus, the same formalism could not be used to analyze the two kinds of binding curves, and we analyzed the fluorescence binding curves using the McGhee and von Hippel model for cooperative binding (see Material and Methods).

Compared to the filter binding assays, fluorescence titrations consistently yielded lower  $K_{obs}$  (Table 3), as expected if several Vif proteins have to bind to a same RNA molecule to obtain complete retention of the complexes on the filters. Alternatively, this difference might also indicate that some Vif-RNA complexes dissociate during washing of the filters. However, both techniques indicated that WT Vif bound all RNA fragments with moderate cooperativity. Fluorescence titration curves revealed that WT Vif had a high affinity for hA3G-3'UTR RNA, in agreement with filter binding assays, but also for hA3G- $\Delta$ UTR RNA, a feature not observed in the previous experiments (Table 3). As a result, Vif also demonstrated a high affinity for all RNA fragments containing either the 3'UTR or the coding region of hA3G mRNA. Note that as binding cooperativity is not extremely high, the  $K_{obs}$  values derived from the fluorescence titrations are mean values of all binding events quenching the Vif fluorescence, whereas, as previous pointed out, the  $K_d$  values derived from the filter binding assay are affected by the differential retention of the Vif-RNA complexes on the filters. Thus, differences in the  $K_d$  and  $K_{obs}$  values obtained by these two techniques are not completely unexpected.

The fluorescence binding curves also allowed determination of the binding stoichiometry of Vif to the various RNA fragments from the intersection of the initial slope with the fluorescence plateau (Table 3 and data not shown)(20). Indeed, only a limited number of Vif proteins bound to the full-length hA3G mRNA, with as few as 2 to 4 Vif molecules binding to the coding region, and the 3' and 5'UTRs (Table 3). Thus the Vif binding density is  $\leq 1$  protein/ 100 nucleotides in the UTRs and  $\leq 1/400$  nucleotides in the hA3G coding region.

In an attempt to get a better estimation of the binding affinity of Vif for the highest affinity binding site present in each of the hA3G-5'UTR, hA3G- $\Delta$ UTR, and hA3G-3'UTR

RNAs, we analyzed the fluorescence binding data using the Scatchard equation (see Material and Methods). This analysis is justified because these RNAs bound only a few Vif molecules (Table 3). When plotting the fraction of the bound to unbound protein as a function of the fraction of bound protein, the fluorescence binding data was linear over a wide range of RNA concentration (Figure 3), indicating that these data can indeed be used to determine the  $K_d$  of Vif for the highest affinity binding site present in each RNA ( $K_{Sca}$ ). Fitting such data with equation 4 yielded  $K_{Sca}$  values of 23, 26, and 40 nM for hA3G-5'UTR, hA3G-3'UTR, and hA3G- $\Delta$ UTR RNAs, respectively. Expectedly, these values are lower than the "mean values" obtained from the same data with the McGhee and von Hippel equation (Table 3). They reveal that the highest affinity binding sites present in the 5' and 3'UTRs of hA3G mRNA bind Vif equally well, whereas binding to the highest affinity binding site located in the coding region is significantly weaker.

### **RNA probing and footprinting of Vif**

To further investigate Vif binding to hA3G mRNA and its possible role in regulating hA3G translation, we next used chemical and enzymatic probing to determine the secondary structure of this mRNA and enzymatic footprinting to identify Vif binding sites. As the 5' and 3'UTRs play an important role in the translational regulation of many mRNAs (24,25), we focused our structural analysis on these regions.

To test whether the 5' and 3'UTRs fold independently or whether they interact with each other or with the hA3G coding region, we first incubated hA3G-5'UTR RNA with hA3G- $\Delta$ 5'UTR RNA and hA3G-3'UTR RNA with hA3G- $\Delta$ 3'UTR in a high salt and  $Mg^{2+}$  buffer. Agarose gel electrophoresis performed at 4°C revealed no complex, strongly suggesting that no long range interaction takes place between the 5'UTR, the coding region, and the 3'UTR of the hA3G mRNA (data not shown) (37). Accordingly, no significant difference was found when chemical probing was performed on full length hA3G mRNA or on hA3G-5'UTR and hA3G-3'UTR RNAs (Figures 4 and 5, and data not shown).

#### *The 5'UTR of hA3G mRNA*

As indicated by probing with DMS, CMCT, RNase A, and RNase T1, two chemicals and two RNases that specifically modify or cleave unpaired nucleotides, and RNase V1, which cuts paired and stacked residues, the 5'UTR of hA3G mRNA folds into three structured domains separated by single-stranded junctions (Figure 4). Most nucleotides in the 5'-J12 and 5'-J23 junctions were slightly to highly reactive towards chemical and 5'-J23 was also cleaved by RNase A (Fig. 4A and D). The structure of the structured domains (5'-D1 to 5'-D3) was also unambiguous. Most nucleotides in the stems were not reactive, except some moderate reactivity close to some helix ends. In addition, the existence of several

stems in 5'-D1 and 5'-D3 was confirmed by RNase V1 cuts (Fig. 4B, C, and D). On the other hand, as expected, most nucleotides that are single-stranded in our model were strongly modified by chemicals or/and cut by RNases A and T1 (Fig. 4A and D). The only ambiguous region in the 5'-UTR of hA3G mRNA is the 5' strand of the upper internal loop of 5'-D1 (nts 52-55). This loop was simultaneously cleaved by RNases A and V1, while these nucleotides were reactive to CMCT and DMS, suggesting that these nucleotides are unpaired but stacked.

The RNase V1 cleavages in this region increased upon addition of increasing Vif concentration, except at the highest Vif concentration (3  $\mu$ M) at which they almost completely disappear. It is plausible that Vif binds first to the adjacent unstable stem (nts 46-50), increasing stacking of the internal loop, then binds to the loop itself at 3  $\mu$ M Vif. However, this internal loop must be regarded as a weak Vif binding site, considering the Vif concentration at which protection was observed. No Vif footprint was detected in 5'-D2, while several were detected in 5'-D3 (Fig. 4C and D). RNase V1 cleavages at nts 212-218 were strongly inhibited at  $\geq 1$   $\mu$ M Vif, reflecting Vif binding to the lower helix of 5'-D3. Similarly, RNase V1 cleavages at nts 257-262 and RNase V1 and RNase A cleavages at nts 265-267 were strongly protected at 2  $\mu$ M Vif (Fig. 4C and D). These two regions may either represent a unique Vif binding site or two contiguous binding sites.

#### *The 3'UTR of hA3G mRNA*

Chemical and enzymatic probing of the 3-UTR of hA3G mRNA revealed that it also consists in three independent structural domains separated by two single stranded junctions (Fig. 5). Junction 3'-J23 was highly reactive towards chemical probes, while most nucleotides in 3'-J12 were only slightly reactive (Fig. 5A and D). Indeed, the 3'-J12 3' half may form an unstable helix with the very 3' end of the 3'UTR (Fig. 5D). The model structure of 3'-D1 is well supported by experimental data: nucleotides involved in helices were not reactive towards chemicals, except at the end of some helices, and the existence of most helices was supported by RNase V1 cleavages (Fig. 5C and D). The proposed structure of domain 3'-D2 is in good agreement with experimental data, except for a weak RNase A cut after nt U1621, which is located in the middle of a helix, as supported by the lack of reactivity of the neighboring nucleotides (Fig. 5A, B and D). The short apical stem of 3'-D2 consisting only of A-U and G-U base pairs is very unstable and might not exist at all (Fig. 5A and D). The secondary structure of 3'-D3 is in good agreement with the probing data, except for the lower stem of this domain (Fig. 5D). Thus, this stem might not exist, or might adopt alternative conformations, as suggested by cleavage by both RNase A and RNase V1 between nts 1643 and 1648 (Fig. 5B, C, and D).

Vif footprints were observed in the three structured domains (Fig. 5B, C, and D). In 3'-D1, Vif-induced protections were split in several short regions but without a detailed knowledge of its three-dimensional structure, it is difficult to estimate how many Vif molecules bind to this flexible domain. In 3'-D2, the two protected regions located in a continuous helical domain might be too far away to be produced by a single Vif protein. Similarly, it is unclear whether the protections observed in the eleven nucleotides stretch encompassing the 3' end of 3'-J23 and the 5' region of 3'-D3 correspond to a single or two contiguous Vif binding site(s). To note, inhibition of the RNase V1 cleavages in this region was already observed at 0.3  $\mu$ M Vif, while protections in the other domains required higher protein concentrations.

### ***In vitro* translation**

As Vif was found to bind with high affinity to hA3G mRNA, including to the 5' and 3' UTRs which are often involved in translational regulation (24,25), we studied the effects of WT Vif and Vif AALA on *in vitro* translation of full length and truncated versions of hA3G mRNA (Fig. S1 and Fig. 6).

In order to ensure maximal activity of the WT and mutant Vif proteins and to avoid the inhibitory effect of the Vif storage buffer on *in vitro* translation, these proteins or human AspRS, which was used as a reference, were synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation in rabbit reticulocyte lysate. These proteins were then added to new transcription/translation reaction mixtures including expression plasmids allowing translation of hA3G from full-length hA3G, hA3G- $\Delta$ 5'UTR, hA3G- $\Delta$ 3'UTR, or hA3G- $\Delta$ UTR mRNAs. As a control, we also checked the effects of WT Vif and AspRS on the translation of luciferase. Radiolabeled proteins were then analyzed by SDS-PAGE and quantified (Fig. S1 and Fig. 6).

When hA3G was translated from the full-length hA3G mRNA for 15 min, the amount of protein synthesized in the presence of WT Vif was 45 % of that obtained in the presence of AspRS, indicating that Vif strongly repress translation from this mRNA (Fig. S1A and Fig. 6A). Inhibition of translation from hA3G mRNA by WT Vif further increased at longer incubation times, and a ~3 fold reduction of hA3G was observed at 45 min. Importantly, at 15 min, WT Vif did not significantly reduce hA3G synthesis from hA3G- $\Delta$ UTR RNA, indicating that the UTRs of hA3G mRNA play a crucial role in the translational repression mediated by WT Vif (Fig. S1B and Fig. 6A). Further analysis showed that translation from hA3G- $\Delta$ 3'UTR RNA was repressed at the same level as the full-length hA3G mRNA, whereas hA3G- $\Delta$ 5'UTR RNA behaved as hA3G- $\Delta$ UTR RNA (Fig. S1B, C, and D, and Fig. 6A). These results demonstrated that the 5'UTR was necessary and sufficient to allow Vif-mediated translational repression of hA3G. As the incubation time increased to 45 min, WT Vif gradually repressed

hA3G synthesis from all RNAs, including hA3G- $\Delta$ UTR and hA3G- $\Delta$ 5'UTR RNAs. However the amount of hA3G synthesized from these RNAs was always twice that obtained from full-length and hA3G- $\Delta$ 3'UTR RNAs (Fig. 6A). To further ensure that the Vif-mediated translational repression of hA3G was specific, we checked that WT-Vif had no effect on translation of luciferase (Fig. S1E). In addition, adding MG132, a proteasome inhibitor, in the rabbit reticulocyte lysate did not affect the results (data not shown), indicating that we were really looking at differences in protein synthesis, and not at protein degradation.

Finally, we tested whether the Vif multimerization domain played a role in the inhibition of translation. Indeed, the results we obtained with Vif AALA were almost identical to (and don't show any statistically significant difference with) those obtained with WT Vif (Fig. 6B). They demonstrated that the Vif multimerization domain is not required for Vif-mediated repression of hA3G translation, and confirmed the role of the 5' UTR of hA3G mRNA in this process.

## DISCUSSION

In this work, we first analyzed Vif binding to hA3G mRNA using filter binding and fluorescence assays (Fig. 2 and 3, and Tables 2 and 3). Even though both techniques gave rather divergent dissociation constant values (120 and 36 nM, respectively, which will be discussed below) they allow concluding that Vif binds strongly to hA3G mRNA, especially as we used buffers containing high concentrations of monovalent and divalent cations to reduce unspecific electrostatic interactions. We previously showed that Vif binds with high affinity and moderate cooperativity to the 5' region of HIV-1 genomic RNA, while it binds very weakly or doesn't bind at all to the central and 3' regions of this RNA, to *E. coli* tRNAs and 5S RNA, and to the 3' region of *D. melanogaster bicoid* mRNA, indicating that Vif is not an unspecific RNA protein (20,21). Indeed, the  $K_d$  (from filter binding assays) and  $K_{obs}$  (from fluorescence titration curves) values we determined here for Vif binding to hA3G mRNA compare favorably with the  $K_d$  (45 to 79 nM) and  $K_{obs}$  (42 to 70 nM) values for Vif binding to 500 nt long RNA fragments derived from the HIV-1 genomic RNA(20,21).

There are however two noticeable differences between Vif binding to HIV-1 genomic RNA and to hA3G mRNA. First, with the latter RNA, we obtained rather divergent  $K_d$  and  $K_{obs}$  values (compare Tables 2 and 3), whereas  $K_d$  and  $K_{obs}$  values very close with the former RNA (20,21). Second, the binding density of Vif to the hA3G mRNA fragments (one Vif molecule per  $\geq 100$  nts in the UTRs, and per  $\geq 400$  nts in the hA3G coding region (Table 3) was much lower than the one we observed with the HIV-1 RNA fragments (one Vif molecule per  $\sim 10$  nts for RNA fragments derived from the 5' region of HIV-1 genomic RNA (20)). This lower

binding density to hA3G mRNA was confirmed by our RNase footprinting experiments, which showed much more limited protections upon Vif binding to 5' and 3'UTRs of hA3G mRNA (Fig. 4 and 5), than to the 5' region of HIV-1 genomic RNA (21).

Interestingly, this low binding density might explain the divergences between  $K_d$  and  $K_{obs}$  values observed with hA3G mRNA fragments. As explained in the "Results" section, our filter binding data imply that not all complexes formed between Vif and hA3G mRNA fragments were retained with the same efficiency on the nitrocellulose filters. Indeed, retention of the Vif/RNA complexes probably increased with the Vif binding density up to a threshold value above which retention was complete. If the Vif binding density is high, as for the HIV-1 genomic RNA fragments, most Vif-RNA complexes are completely retained on the filters. However, if the binding density is low, a bias is introduced in the filter binding experiments that artificially increases the  $K_d$ . If our assumption is correct the differences in the  $K_d$  and  $K_{obs}$  values should be smaller for the shorter RNAs, which have the higher Vif binding density (Table 3), than for the longer ones. This hypothesis is indeed verified, since the two techniques yielded very similar  $K_d$  and  $K_{obs}$  values for the short hA3G-5'UTR and hA3G-3'UTR RNAs, while divergent values were obtained for the longer RNAs. To summarize, i) both techniques demonstrated that Vif has a stronger affinity for the 3'UTR than for the 5'UTR of hA3G mRNA (Tables 2 and 3) and ii) for longer RNAs,  $K_{obs}$  derived from fluorescence titrations are more reliable than  $K_d$  values derived from filter binding assays. Interestingly, the fluorescence data showed that Vif has also a high affinity for the hA3G coding region (Table 3).

However, the  $K_{obs}$  values extracted from the fluorescence titrations curves using the McGhee and von Hippel model (29) are also mean values of the individual Vif binding sites. As shown in Fig. 3, it was also possible to analyze these data using the Scatchard equation in order to extract the  $K_{Sca}$  value for the binding site having the highest affinity for Vif in hA3G-5'UTR, hA3G-3'UTR, and hA3G- $\Delta$ UTR. This analysis revealed that the highest affinity Vif binding sites present in the 5' and 3'UTRs of hA3G mRNA bind Vif with similar affinity ( $K_{Sca} = 23$  and  $26$  nM, respectively), even though the overall binding of Vif to the 5'UTR is significantly weaker than to the 3'UTR (Tables 2 and 3). Thus, the secondary Vif binding sites located in the 5'UTR must have considerably weaker affinity for this protein than those located in the 3'UTR of hA3G mRNA. By contrast, the  $K_{Sca}$  of the highest affinity Vif binding site in hA3G- $\Delta$ UTR ( $K_{Sca} = 40$  nM), is identical, within experimental errors to  $K_{obs}$  ( $46 \pm 7$  nM), indicating that all binding sites present in the coding region of hA3G mRNA have a similar affinity for Vif.

RNase footprinting revealed 3 to 4 Vif binding sites in the 5'UTR (Fig. 4) and 3 to 6 Vif binding sites in the 3' UTR (Fig. 5), in agreement with the fluorescence data (Table 3). In

addition, while most protections in the 3'UTR were obvious at 1.5  $\mu$ M Vif, only one Vif binding site, located in the lower stem of domain 5'-D3, was clearly detected at 1  $\mu$ M Vif. This observation is in keeping with the overall higher affinity of Vif for the 3' UTR of hA3G mRNA, even though the protein concentrations required observing a footprint could not be directly compared to those used in titration experiments.

In the last part of this study, we analyzed the effect of Vif on the *in vitro* translation of hA3G from full-length hA3G mRNA and mRNAs devoid of the 5'UTR or/and the 3'UTR. Vif induced a two-fold reduction of translation that was strictly dependent on the 5'UTR, while the 3'UTR had no influence on translation (Fig. S1 and 6). Hence, there is no correlation between the relative binding affinity of Vif for the 5' and 3'UTRs and their role in Vif-mediated translational repression. The same conclusion holds true when comparing WT Vif and Vif AALA: mutation of the Vif multimerization domain reduced the affinity and specificity of Vif binding to hA3G mRNA fragments (Table 1), but it didn't significantly affect translation (Fig. 6). These results suggest that Vif does not simply physically prevent scanning of the ribosomes through the 5'UTR of hA3G mRNA, but raise the possibility of a specific mechanism of Vif-mediated translational repression. Mutation of the individual Vif binding sites we identified in the 5'UTR of hA3G mRNA (Fig. 4) should prove very useful in order to decipher this mechanism.

The 5'UTR-dependent translational repression of hA3G by Vif was observed at all incubation times (Fig. 6). In addition, a general repression of hA3G synthesis by Vif was gradually observed at increasing incubation times, irrespective of the mRNA used for its synthesis (Fig. 6). This phenomenon ultimately resulted in a 30-40 % reduction in hA3G synthesis. Several groups previously reported a negative impact of Vif on hA3G translation. Pulse-chase experiments in cells transfected with a tagged hA3G indicated a 30 to 78% decrease in hA3G synthesis in the presence of Vif (7,10,38), while Vif impaired hA3G translation by 70-75 % in an *in vitro*-coupled transcription/translation system (10). Importantly, none of these studies used expression vectors with the authentic 5' UTR of hA3GmRNA (26). Thus, these authors very likely only observed the time-dependent, UTR-independent secondary effect, while they missed the main 5' UTR-dependent, time-independent effect.

Since the seminal publication by Sheehy and colleagues (1), it has become increasingly clear that the function of Vif is to counteract the restriction factors hA3G and hA3F. Even though several mechanisms have been proposed for Vif function, the proteasome-mediated, Vif-induced degradation of these factors has been by far the most studied. In agreement with previous studies suggesting that the RNA binding properties of Vif are essential for its function (23), our present work indicates that Vif binding to hA3G mRNA,

and particularly to its 5'UTR might be crucial for Vif function, by downregulating hA3G translation. Even though other authors already reported a negative effect of Vif on hA3G translational (7,8,10,38), our present work suggest that these authors missed most of the effect by working with expression vectors lacking the authentic 5'UTR of hA3GmRNA. We are presently performing experiments to confirm that Vif binding to the 5'UTR of hA3G mRNA inhibits hA3G synthesis in cells, and to evaluate the contribution of this effect to HIV-1 replication in the presence of hA3G expression (Mercenne *et al.*, in preparation).

## FUNDING

This work was supported by a grant from the French "Agence Nationale de Recherches contre le SIDA" (ANRS) to JCP and RM. GM was supported by fellowships of the French Ministry of Higher Education and Research and of SIDACTION. SH was a fellow of SIDACTION.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Magali Frugier and Philippe Dumas (both from Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS) for the gift of the human AspRS expression plasmid, and the help with curve fitting in Mathematica, respectively.

## REFERENCES

1. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. and Malim, M.H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418, 646-650.
2. Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (2004) A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J*, 23, 2451-2458.
3. Chiu, Y.L. and Greene, W.C. (2008) The APOBEC3 Cytidine Deaminases: An Innate Defensive Network Opposing Exogenous Retroviruses and Endogenous Retroelements. *Annu Rev Immunol*, 26, 317-353.
4. Henriët, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2009) Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 211-232.
5. Holmes, R.K., Malim, M.H. and Bishop, K.N. (2007) APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci*, 32, 118-128.
6. Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. and Navaratnam, N. (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, 79, 285-296.

7. Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H. and Landau, N.R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, 114, 21-31.
8. Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. and Kabat, D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*, 9, 1398-1403.
9. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C. and Malim, M.H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, 9, 1404-1407.
10. Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. and Greene, W.C. (2003) HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*, 12, 591-601.
11. Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. and Yu, X.F. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, 302, 1056-1060.
12. Zheng, Y.H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T. and Peterlin, B.M. (2004) Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*, 78, 6073-6076.
13. Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A. and Strebel, K. (2003) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol*, 77, 11398-11407.
14. Li, J., Potash, M.J. and Volsky, D.J. (2004) Functional domains of APOBEC3G required for antiviral activity. *J Cell Biochem*, 92, 560-572.
15. Liu, B., Yu, X., Luo, K., Yu, Y. and Yu, X.F. (2004) Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J Virol*, 78, 2072-2081.
16. Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M. and Gabuzda, D. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 279, 7792-7798.
17. Conticello, S.G., Harris, R.S. and Neuberger, M.S. (2003) The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol*, 13, 2009-2013.
18. Liu, B., Sarkis, P.T., Luo, K., Yu, Y. and Yu, X.F. (2005) Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase. *J Virol*, 79, 9579-9587.
19. Opi, S., Kao, S., Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Takeuchi, H. and Strebel, K. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J Virol*, 81, 8236-8246.
20. Bernacchi, S., Henriët, S., Dumas, P., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2007) RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: a fluorescence study. *J Biol Chem*, 282, 26361-26368.
21. Henriët, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol*, 354, 55-72.
22. Henriët, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R.J., Marquet, R. and Paillart, J.C. (2007) Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, 35, 5141-5153.
23. Zhang, H., Pomerantz, R.J., Dornadula, G. and Sun, Y. (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, 8252-8261.

24. Chatterjee, S. and Pal, J.K. (2009) Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*, 101, 251-262.
25. Wilkie, G.S., Dickson, K.S. and Gray, N.K. (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, 28, 182-188.
26. Muckenfuss, H., Kaiser, J.K., Krebil, E., Battenberg, M., Schwer, C., Cichutek, K., Munk, C. and Flory, E. (2007) Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res*, 35, 3784-3796.
27. Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1996) Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA<sup>3</sup>(Lys). *Nucleic Acids Res*, 24, 509-514.
28. Yang, X., Goncalves, J. and Gabuzda, D. (1996) Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J Biol Chem*, 271, 10121-10129.
29. McGhee, J.D. and von Hippel, P.H. (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol*, 86, 469-489.
30. Tsodikov, O.V., Holbrook, J.A., Shkel, I.A. and Record, M.T., Jr. (2001) Analytic binding isotherms describing competitive interactions of a protein ligand with specific and nonspecific sites on the same DNA oligomer. *Biophys J*, 81, 1960-1969.
31. Mely, Y., de Rocquigny, H., Sorinas-Jimeno, M., Keith, G., Roques, B.P., Marquet, R. and Gerard, D. (1995) Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA<sup>3</sup>(Lys), *in vitro*, is essentially not specific. *J Biol Chem*, 270, 1650-1656.
32. Woodbury, C.P., Jr. and von Hippel, P.H. (1983) On the determination of deoxyribonucleic acid-protein interaction parameters using the nitrocellulose filter-binding assay. *Biochemistry*, 22, 4730-4737.
33. Miller, J.H., Presnyak, V. and Smith, H.C. (2007) The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block APOBEC3G incorporation with virions. *Retrovirology*, 4, in press.
34. Yang, B., Gao, L., Li, L., Lu, Z., Fan, X., Patel, C.A., Pomerantz, R.J., DuBois, G.C. and Zhang, H. (2003) Potent Suppression of Viral Infectivity by the Peptides That Inhibit Multimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vif Proteins. *J Biol Chem*, 278, 6596-6602.
35. Yang, S., Sun, Y. and Zhang, H. (2001) The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: a requirement for Vif function in the viral life cycle. *J Biol Chem*, 276, 4889-4893.
36. Barraud, P., Paillart, J.C., Marquet, R. and Tisne, C. (2008) Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr HIV Res*, 6, 91-99.
37. Paillart, J.C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (2002) *In vitro* evidence for a long range pseudoknot in the 5'-untranslated and matrix coding regions of HIV-1 genomic RNA. *J Biol Chem*, 277, 5995-6004.
38. Kao, S., Akari, H., Khan, M.A., Dettenhofer, M., Yu, X.F. and Strebel, K. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection. *J Virol*, 77, 1131-1140.

## TABLES

**Table 1:** Oligonucleotides used in this study

RNA	Primers	
hA3G	pS 1-21	EcoRI-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 1750-1771	XbaI-AAGATTTAGTATTTTCATTT
hA3G-ΔUTR	pS 298-321	EcoRI-GGATGAAGCCTCACTTCAGAAACAC
	pAS 1432-1452	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
hA3G-Δ5'UTR	pS 298-321	EcoRI-GGATGAAGCCTCACTTCAGAAACAC
	pAS 1750-1771	XbaI-AAGATTTAGTATTTTCATTT
hA3G-Δ3'UTR	pS 1-21	EcoRI-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 1432-1452	XbaI-TCAGTTTTCTGATTCTGGAG
hA3G-5'UTR	pST7 1-21	EcoRI-T7-TCTTTCCCTTTGCAATTGCC
	pAS 277-297	StuI-TGGCCGGCTAGTCCCGAC
hA3G-3'UTR	pST7 1454-1478	EcoRI-T7-GGATGGGCCTCAGTCTCTAAGGAAG
	pAS 1750-1771	XbaI-AAGATTTAGTATTTTCATTT
Vif AALA	pSAALA hVif	CCAAAACAGATAAAGGCAGCATTGGCAAGTGTTAGGAACTG
	pASAALA hVif	CAGTTTCCTAACACTTGCCAATGCTGCCTTTATCTGTTTTGG

**Table 2:** Binding parameters derived from the filter binding assays

RNA	$K_d^1$ (nM)	$\alpha_H$	$K_d$ (nM)	$\alpha_H$
	WT Vif		Vif AALA	
hA3G	$120 \pm 10^2$	$2.0 \pm 0.3$	$276 \pm 23$	$2.4 \pm 0.2$
hA3G-Δ5'UTR	$112 \pm 5$	$1.9 \pm 0.1$	$231 \pm 14$	$3.0 \pm 0.3$
hA3G-Δ3'UTR	$148 \pm 11$	$1.9 \pm 0.2$	$202 \pm 7$	$3.4 \pm 0.3$
hA3G-ΔUTR	$145 \pm 8$	$2.3 \pm 0.3$	$261 \pm 11$	$2.7 \pm 0.2$
hA3G-5'UTR	$115 \pm 4$	$2.6 \pm 0.2$	$292 \pm 18$	$3.0 \pm 0.3$
hA3G-3'UTR	$57 \pm 3$	$2.3 \pm 0.2$	$204 \pm 8$	$3.3 \pm 0.3$

<sup>1</sup>  $K_d$  and  $\alpha_H$  were obtained by fitting the experimental data to the Hill equation (see "Materials and Methods").

<sup>2</sup> mean±SD.

**Table 3:** Binding parameters derived from the fluorescence titrations curves

RNA	$K_{obs}$ (nM) <sup>1</sup>	$\omega$ <sup>1</sup>	stoichiometry <sup>3</sup>	RNA length (nts)
hA3G	$36 \pm 6$ <sup>2</sup>	108	~ 6-7 vif / RNA	1773
hA3G- $\Delta$ 5'UTR	$42 \pm 5$	78	~ 2-4 vif/ RNA	1476
hA3G- $\Delta$ 3'UTR	$40 \pm 2$	109	~ 2-3 vif/ RNA	1452
hA3G- $\Delta$ UTR	$46 \pm 7$	76	~ 2-3 vif/ RNA	1155
hA3G-5'UTR	$120 \pm 16$	254	~ 3-4 vif/ RNA	297
hA3G-3'UTR	$49 \pm 11$	125	~ 3-4 vif/ RNA	321

<sup>1</sup>  $K_{obs}$  and  $\omega$  values were obtained by fitting the experimental data to equation 3 (see "Materials and Methods").

<sup>2</sup> mean $\pm$ SD.

<sup>3</sup> the binding stoichiometry was determined graphically from the fluorescence binding curves (see main text).

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1: Schematic representation of the RNA and Vif proteins used in this study.** **A.** Representation of the full-length hA3G mRNA and the truncated RNA. The coding region is indicated by a black box. **B.** Scheme of the Vif protein. The names of the viral and cellular partners that interact with different regions of Vif are indicated. The sequences of the multimerization domain of the WT protein and of the Vif AALA mutant are indicated.

**Figure 2: Titration curves of full-length and truncated hA3G mRNA by Vif determined by filter binding.** Radiolabeled full-length hA3G mRNA or hA3G mRNA fragments were incubated with increasing concentration of WT Vif (**A**) or Vif AALA (**B**), and filtered through a cellulose membrane. The fraction of bound radioactivity is plotted *versus* the concentration of Vif. Curves correspond to the best fit of equation (1) to the experimental data. The data points represent the mean $\pm$  standard deviation of > 10 experiments after exclusion of outliers falling outside of the 95 % confidence interval.

**Figure 3: Scatchard representation of the fluorescence binding data of Vif to hA3G-5'UTR, hA3G-3'UTR, and hA3G- $\Delta$ UTR RNAs.** The ratio of bound to unbound Vif is plotted as a function of the fraction of bound protein.

**Figure 4: Chemical and enzymatic probing of the 5' UTR of hA3G mRNA and RNase footprinting of Vif.** (**A-C**) Representative gels of structure probing with DMS (**A**) and RNase V1 footprinting (**B, C**). Nucleotides modified by DMS (**A**) and RNase V1 cleavages protected by Vif (**B, C**) are indicated by red bars or dots. (**D**) Secondary structure model of the 5' UTR of hA3G mRNA summarizing the experimental data.

**Figure 5: Chemical and enzymatic probing of the 3' UTR of hA3G mRNA and RNase footprinting of Vif.** (A-C) Representative gels of structure probing with CMCT (A) and footprinting using RNase A (B) or RNase V1 (C). Nucleotides modified by CMCT (A) and RNase cleavages protected by Vif (B, C) are indicated by red bars or dots. (D) Secondary structure model of the 3' UTR of hA3G mRNA summarizing the experimental data.

**Figure 6: Effect of Vif on the *in vitro* translation of hA3G.** The amount of hA3G synthesized from full-length hA3G, hA3G-ΔUTR, hA3G-Δ5'UTR, and hA3G-Δ3'UTR RNAs in the presence of WT Vif (A) or Vif AALA (B) was compared to that obtained in the presence of human AspRS. Data are the mean values of four independent experiments ± standard deviations.

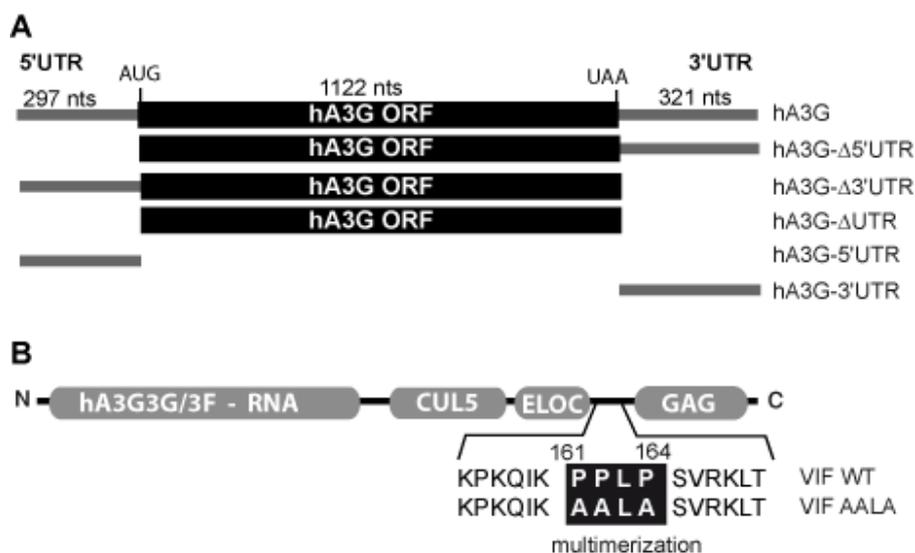


Figure 1: Mercenne et al

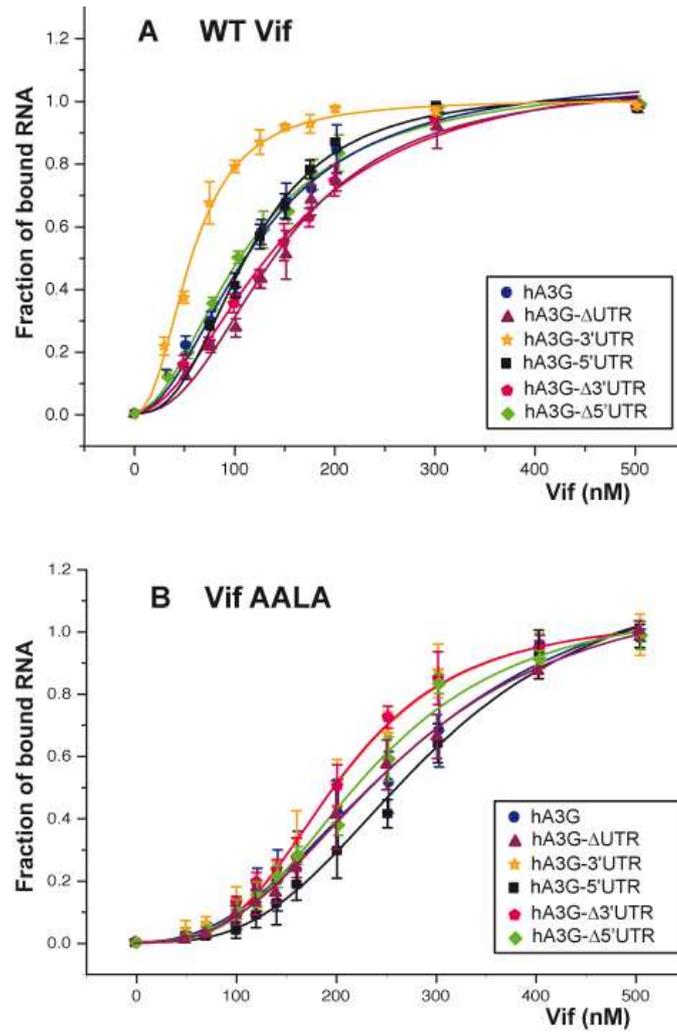


Figure 2: Mercenne et al

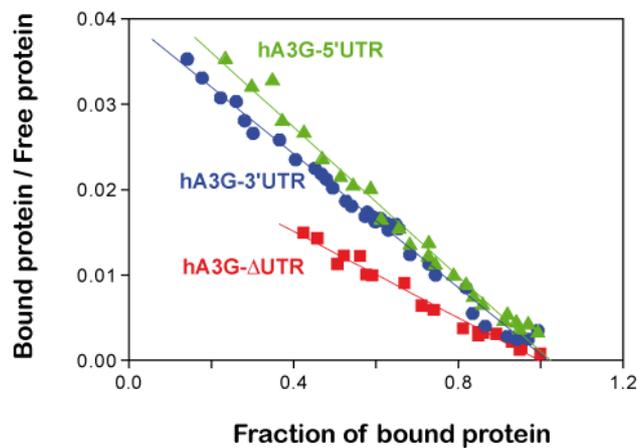


Figure 3: Mercenne et al

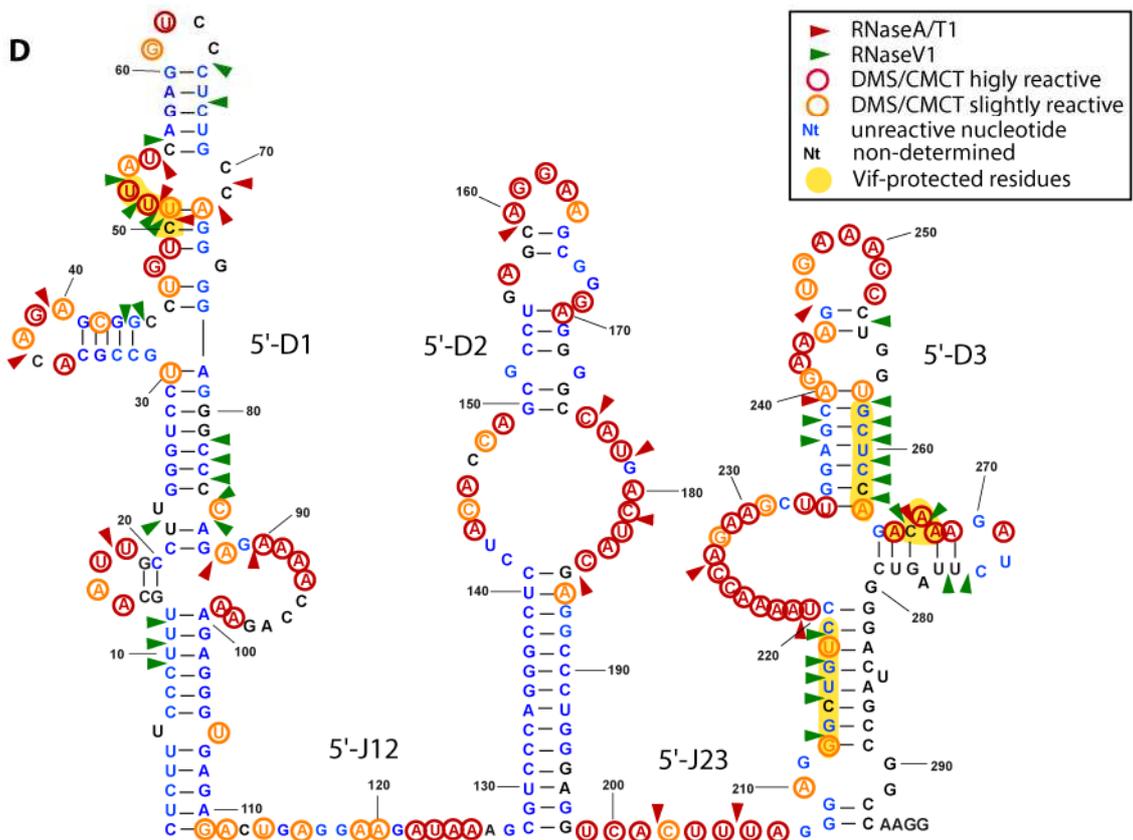
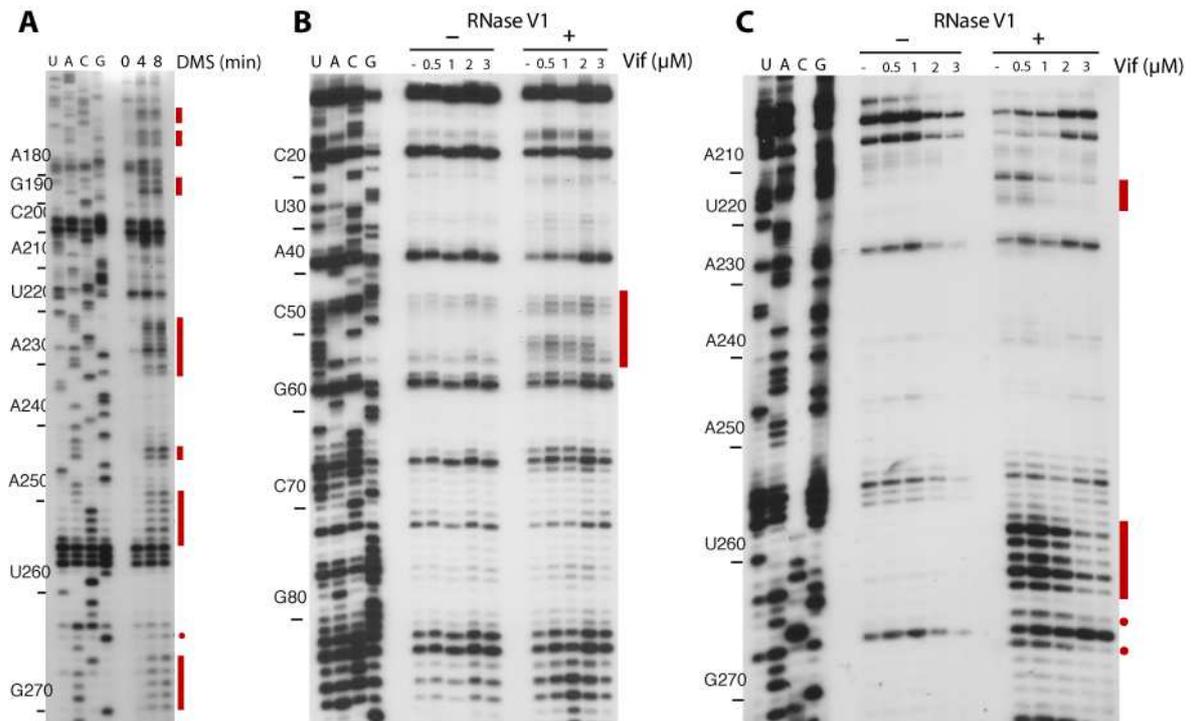


Figure 4: Mercenne et al

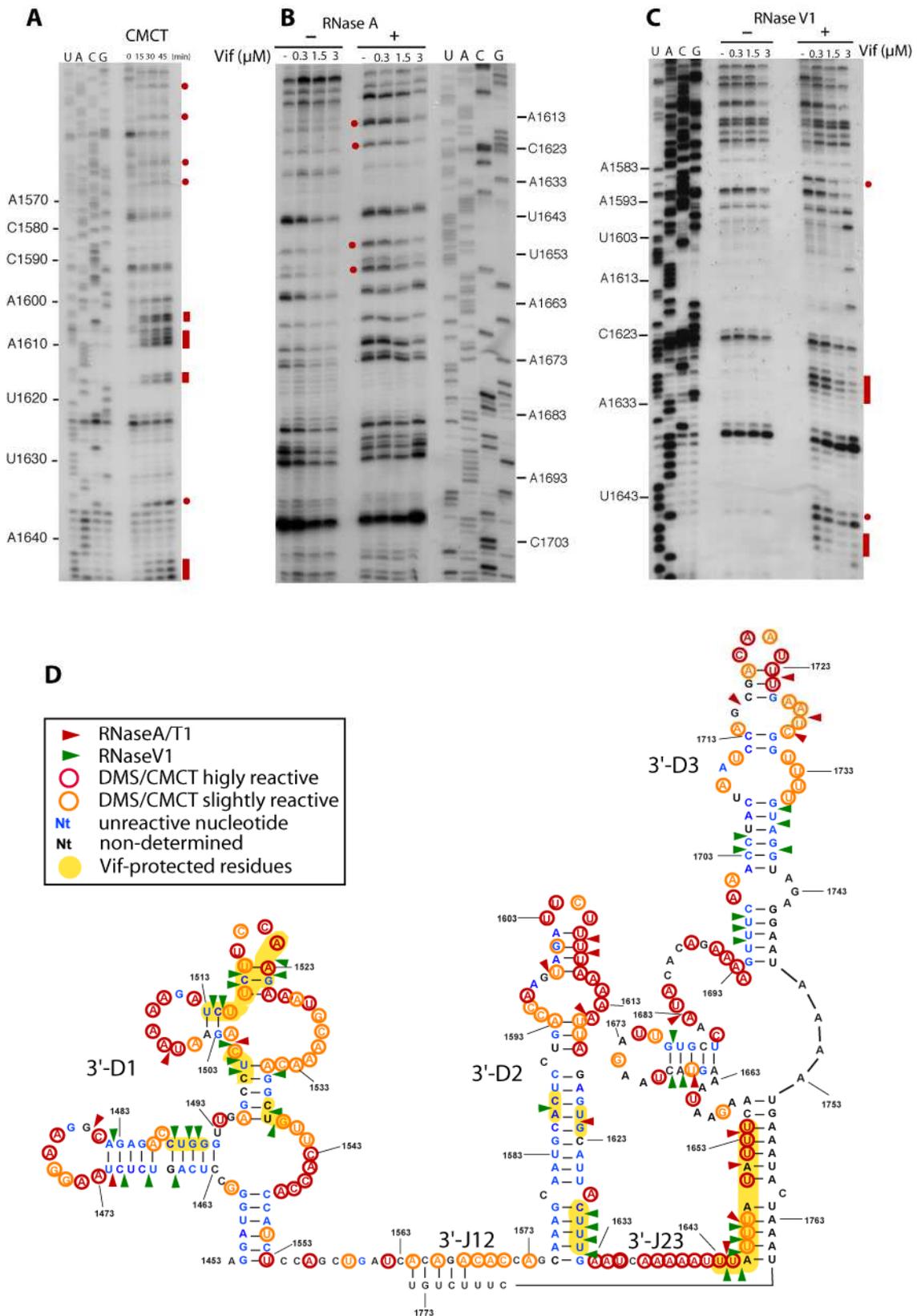


Figure 5: Mercenne et al.

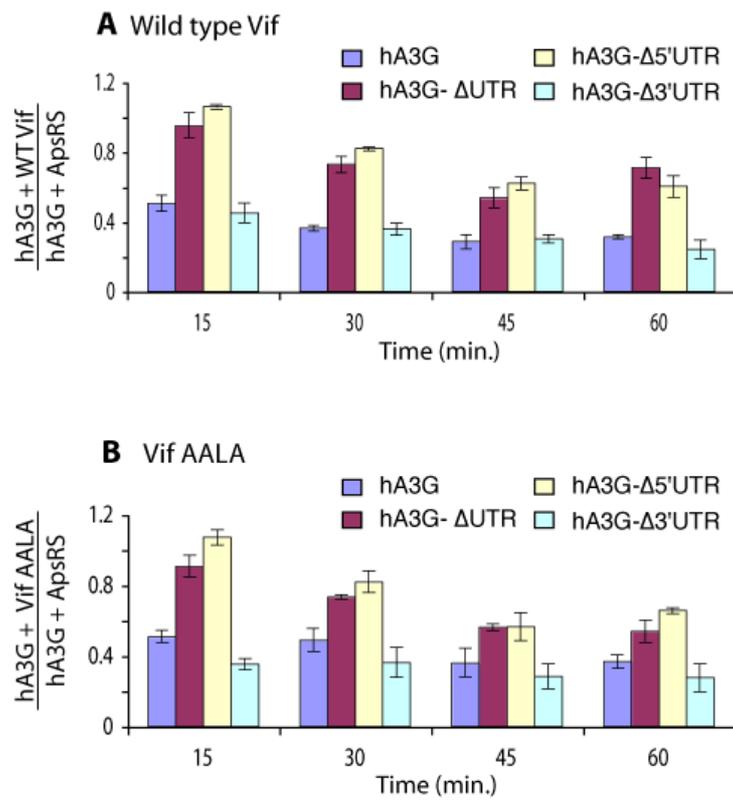


Figure 6: Mercenne et al.

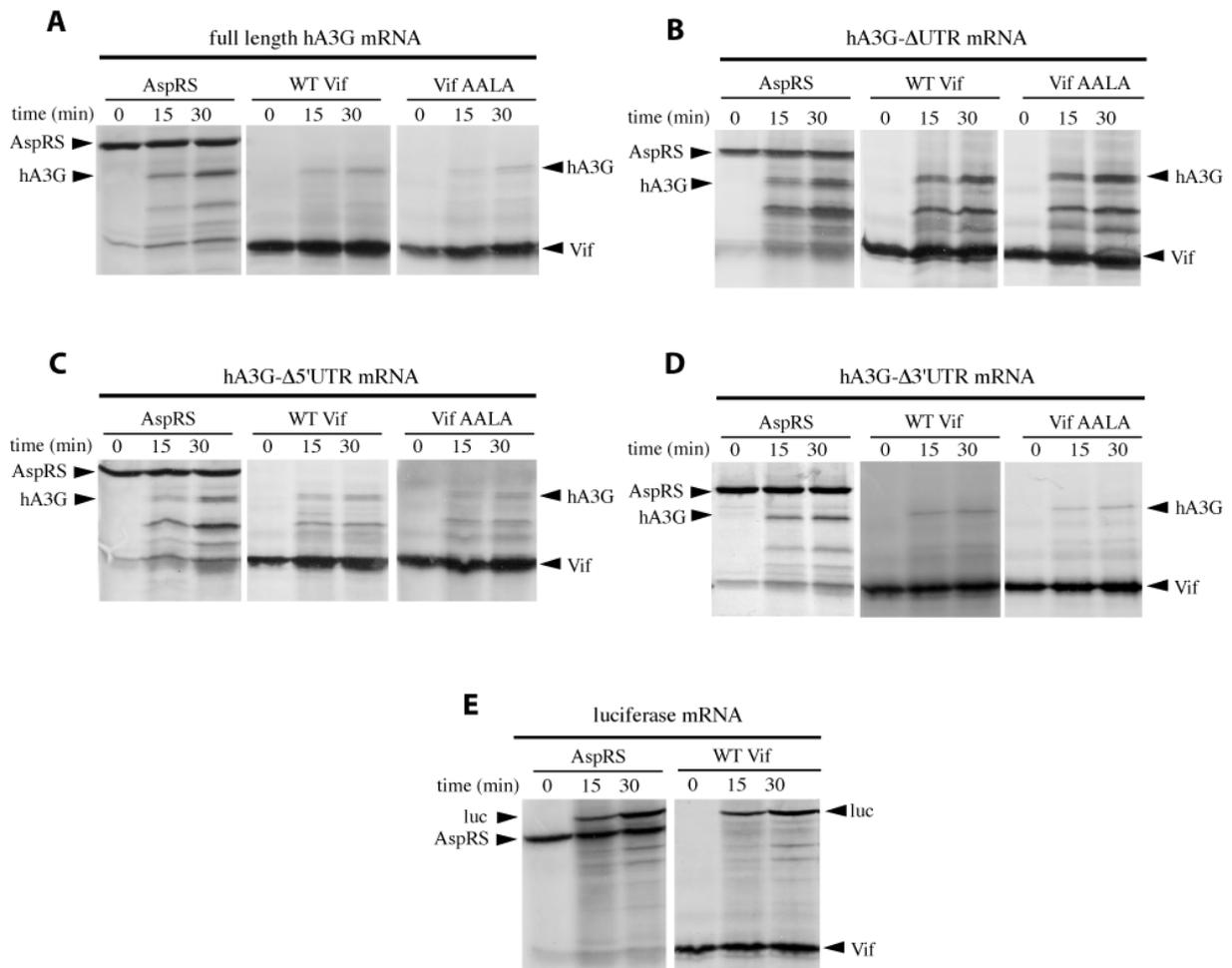


Figure S1: Mercenne et al.

**Figure S1: *In vitro* translation of hA3G.** hA3G was synthesized from full-length hA3G (A), hA3G-ΔUTR (B), hA3G-Δ5'UTR (C), and hA3G-Δ3'UTR (D) RNAs in the presence of human AspRS (as a reference), WT Vif, or Vif AALA for 0, 15, or 30 min. As a control luciferase was translated in the presence of human AspRS and WT Vif (E). The radiolabeled products were analyzed by SDS PAGE.

## D. Discussion

### 1. La protéine Vif fixe l'ARNm d'A3G

Les deux types d'expériences menées pour déterminer l'affinité de fixation de Vif pour les fragments d'ARNm d'A3G ne peuvent pas être analysés par la même équation à cause de la différence de protocoles utilisés. En effet, dans les rétentions sur filtres, des concentrations croissantes de Vif sont ajoutées à une quantité négligeable d'ARN alors que dans les expériences de fluorescence, une quantité constante et non négligeable de Vif (50 ou 100 nM) est titrée par des concentrations croissantes d'ARN A3G.

Les données de fixation montrent que la protéine Vif lie l'ARNm d'A3G. Les constantes de dissociation de Vif déterminées par les expériences de rétention sur filtres en présence d'ARN correspondant aux UTR sont différentes (écart d'un facteur 2 à 4). En effet, nos résultats montrent que Vif présente une meilleure affinité pour la région 3'UTR que pour la 5'UTR.

Cependant, nos résultats de rétention sur filtres et de spectroscopie de fluorescence sont en désaccord. Ainsi, les études de fluorescence montrent que Vif présente une affinité similaire quelque soit l'ARN d'A3G analysé, excepté l'ARN A3G 5'UTR, tandis que les expériences de rétention indiquent que l'affinité de fixation de Vif dépend de l'ARN et plus précisément de la présence de la région 3'UTR. La faible proportion de Vif sur l'ARNm d'A3G (1 Vif / 100 nts sur les UTR et 1 Vif / 400 nts sur la région codante) pourrait expliquer les différences entre les  $K_d$  déterminés par ces deux techniques (*cf article*). Les expériences de rétention sur filtres impliquent que tous les complexes ARN / Vif ne sont pas retenus avec la même efficacité sur les filtres de nitrocellulose. En effet, la rétention des complexes varie probablement avec la proportion de protéines fixées sur l'ARN. Par conséquent, si la densité de liaison est faible, les valeurs des  $K_d$  sont augmentées de manière artificielle comparées à celles obtenues par spectroscopie de fluorescence. Cette hypothèse se vérifie par le peu de différences observées entre les  $K_d$  des courts ARN d'A3G (5' & 3'UTR) déterminés par les deux techniques utilisées, alors que les  $K_d$  obtenus pour les ARN d'A3G plus longs divergent.

La protéine Vif se fixe sur les sites de plus haute affinité présents sur les ARN A3G 5'UTR ou A3G 3'UTR avec une affinité similaire (23 et 26 nM, respectivement) malgré une affinité moyenne de Vif pour l'ARN A3G 5'UTR plus faible que celle observée pour l'ARN A3G 3'UTR. Ces résultats suggèrent que Vif présente une affinité beaucoup plus faible pour les sites secondaires de fixation localisés en 5'UTR que ceux présents sur la 3'UTR. De plus, le

Kd du site de plus haute affinité localisé sur la séquence codante est identique au Kd moyen déterminé par l'équation de McGhee et von Hippel, indiquant que Vif possède une affinité similaire pour tous les sites de fixation présents sur l'ORF d'A3G.

a. Le domaine de multimérisation est impliqué dans la fixation de Vif aux ARN

La fixation de Vif sur l'ARNm d'A3G est coopérative. Cependant, cette coopérativité est similaire quelque soit l'ARN étudié. La seule différence est observée par spectroscopie de fluorescence concernant la région 5'UTR où la coopérativité est élevée. De manière surprenante, la coopérativité est similaire ou légèrement augmentée pour certains ARN lors des expériences avec la Vif AALA suggérant que l'interaction entre les protéines Vif sur un même ARN se produit entre des protéines préalablement associées contrairement à un assemblage de Vif en multimères dépendant de l'ARN.

L'association d'une protéine avec son partenaire ou avec elle-même permet de créer un complexe qui a son utilité propre. Cet assemblage peut être ordonné : l'interaction de deux protéines peut en effet créer une poche de liaison supplémentaire nécessaire à la fixation du partenaire suivant <sup>228</sup>. De plus, l'assemblage en multimères peut engendrer une exposition de domaines structuraux préalablement enfouis dans l'organisation tridimensionnelle de la protéine. Un exemple est celui de la protéine p53 qui en forte concentration et après phosphorylation s'assemble en tétramères, ce qui induit l'exposition du signal NLS et donc son import dans le noyau <sup>37</sup>. Sa multimérisation augmente également son affinité pour l'ADN d'un facteur 100 et module sa capacité à interagir avec d'autres protéines <sup>37</sup>. La mutation du domaine PPLP impliqué dans la multimérisation <sup>239,240</sup> induit une perte d'affinité de fixation de Vif aux ARN. Une hypothèse pour expliquer ce résultat est que l'assemblage de Vif en multimères permet une exposition du NTD nécessaire à la reconnaissance spécifique de l'ARN par Vif. Ainsi, la fixation des ARN d'A3G par la protéine Vif AALA correspondrait en partie à de la fixation aspécifique de Vif sur l'ARN expliquant ainsi un nivelage des valeurs des constantes de dissociation.

b. Les agrégats de Vif sont-ils fonctionnels ?

Lors d'un stress, les protéines cellulaires ont tendance à se déplier spontanément, les régions hydrophobes s'assemblent entre elles et conduisent à l'agrégation des protéines. Les agrégats sont toxiques pour la cellule et sont la cause de plusieurs maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, d'Huntington et de Parkinson <sup>183</sup>. En effet, ils entraînent une perte de fonction pour la cellule (protéine inactive), interagissent avec

d'autres protéines de manière aspécifique ou encore portent atteinte à l'intégrité des membranes cellulaires (l' $\alpha$ -synucléine s'associe à la membrane plasmique des neurones et entraîne la formation de pores provoquant l'apoptose <sup>128</sup>). La protéine Vif forme des agrégats dans les bactéries (utilisées pour la surexpression) mais également une fois purifiée. Avant toute expérimentation, la majorité des agrégats est retirée par ultracentrifugation. Ces agrégats sont probablement la conséquence du manque de structuration de la protéine Vif <sup>7,176</sup> et leur assemblage pourrait être dynamique. Afin de tester cette hypothèse, après ultracentrifugation, les agrégats de Vif ont été resuspendus et utilisés dans des expériences de rétention sur filtres menées sur différentes constructions de l'ARNm d'A3G. De manière intéressante, les valeurs des constantes de dissociation et de coopérativité sont similaires à ceux obtenus avec la Vif « soluble ». Ce résultat suggère que l'association des protéines Vif en agrégats n'est pas figée, ainsi, l'interaction de Vif avec son substrat ARN pourrait permettre une structuration de la protéine Vif et donc dissocier partiellement son assemblage en agrégats. Une autre hypothèse émise est l'existence d'agrégats fonctionnels qui lieraient l'ARN de façon équivalente aux multimères de Vif.

## 2. Les régions UTR de l'ARNm d'A3G sont très structurées

Un ARNm est composé de la séquence codante permettant la synthèse d'une protéine mais également de deux séquences non traduites présentes en amont (5'UTR) ou en aval (3'UTR) de l'ORF. Les UTR peuvent représenter jusqu'à 80 % de la taille totale de l'ARNm <sup>195</sup> et sont souvent très structurées <sup>232</sup>. L'organisation secondaire et tridimensionnelle de l'ARN est importante pour sa fonction (interaction avec des partenaires protéiques : télomérase, le complexe SRP (Signal Recognition Particle), le ribosome...) et pour la régulation au niveau de la traduction dans le cas d'un ARNm. En effet, la structure des UTR est impliquée dans de nombreux processus de régulation traductionnelle au niveau de l'initiation <sup>87</sup>. Ces structures sont généralement des tiges-boucles qui peuvent être la cible de protéines spécifiques ou générales comme les facteurs d'initiation de la traduction (eIF4F principalement). Les régions UTR de l'ARNm d'A3G sont très structurées. En effet, notre modèle suggère que chacune des UTR s'organiseraient en trois tiges-boucles. La présence d'une tige-boucle à l'extrémité 5'-terminale de l'ARNm (domaine 5'D1) suggère que l'efficacité de la traduction de l'ARNm d'A3G est probablement faible due à l'inhibition probable de la fixation des facteurs d'initiation au niveau de la coiffe et du complexe ribosomique 43S. Cette structure peut néanmoins ne pas être très stable ou être modulée par la présence de protéines. L'organisation de la région 3'UTR de l'ARNm d'A3G pourrait également être impliquée dans le processus traductionnel soit directement en inhibant ou stimulant l'interaction avec l'extrémité 5' de l'ARNm (essentielle pour le recyclage des

ribosomes donc pour une traduction efficace) soit indirectement en étant la cible de facteurs protéiques.

Nous avons montré que la protéine Vif interagit avec les UTR de l'ARNm d'A3G. Comme déjà mentionné, les UTR sont généralement la cible de protéines régulatrices de la traduction<sup>232</sup>. Afin d'examiner les conséquences éventuelles de la fixation de Vif sur ces régions, la traduction de la protéine A3G a été étudiée en présence de Vif et les résultats seront détaillés dans la troisième partie.

## II. Caractérisation des protéines Vif sauvage et mutée dans le domaine de multimérisation

### A. Introduction et objectif

Une protéine est composée d'un enchainement d'acides aminés (structure primaire) qui s'organisent en hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ ... (structure secondaire) et qui eux-mêmes se replient pour former la structure tridimensionnelle. Cette organisation est essentielle pour la fonction de la protéine. La connaissance de cette structure tertiaire est très utile afin de comprendre comment une protéine interagit avec ses partenaires et cibler cette interaction par d'éventuels inhibiteurs.

La protéine Vif du VIH-1 est une protéine difficile à surproduire et à purifier en raison de son caractère insoluble. La capacité de Vif à s'agréger complique fortement les études de caractérisation biophysique et biochimique ainsi que la cristallisation. Toutes les études structurales menées jusqu'alors ont été effectuées sur la protéine Vif WT entière ou partiellement tronquée. De plus, des expériences d'électrophorèse en gel natif, de co-immunoprécipitation et de pontage n'ont apporté que peu d'informations sur l'état exact d'oligomérisation de la protéine Vif WT et aucune dans le cas d'une protéine mutée dans le domaine de multimérisation. Comme mentionné à plusieurs reprises, l'oligomérisation de Vif est essentielle à la production de particules virales infectieuses<sup>58,146,239</sup>. Il serait donc intéressant de connaître les conséquences structurales d'une mutation dans le domaine de multimérisation et également de caractériser l'oligomérisation des protéines WT et AALA.

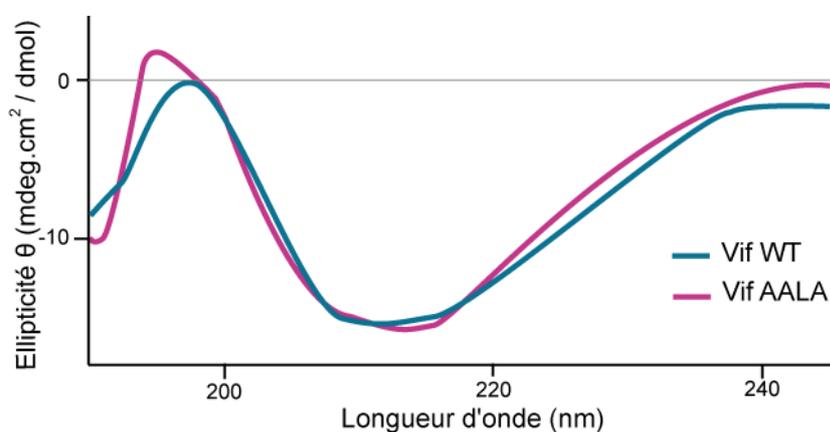
Les étapes de mise au point de surexpression et de purification nous ont permis d'obtenir les protéines Vif WT et AALA en quantité acceptable et suffisamment pure pour permettre des expériences de dichroïsme circulaire (CD, Circular Dichroism), de diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) et de chromatographie d'exclusion. Ces techniques nous apportent des informations sur la structure secondaire et sur le nombre de protéines Vif qui s'assemblent pour former des multimères. L'étude de la Vif AALA nous permet de visualiser les éventuelles différences conformationnelles et d'arrangements causées par la mutation des résidus proline dans le motif PPLP.

## B. Résultats

### 1. Analyse de la structure secondaire des protéines Vif WT et AALA par CD

La plupart des molécules biologiques sont chirales, c'est-à-dire qu'elles ne présentent aucun centre ni plan de symétrie. La lumière polarisée circulairement parvenant à une molécule chirale donne lieu à des phénomènes d'activité optique qui se manifestent par une absorption inégale des composantes droite et gauche de la lumière polarisée. Le CD s'appuie sur ces aspects de l'activité optique des molécules et varie selon la longueur d'onde analysée. La mesure d'un spectre dans le domaine des UV lointains (180-260 nm) fournit des informations sur la structure secondaire des protéines (conformation en hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , boucles et structure désordonnée). Le spectre global de CD d'une protéine correspond à la somme des données caractéristiques de chaque structure secondaire.

En collaboration avec le Dr Serena Bernacchi, nous avons étudié la structure secondaire des protéines Vif sauvage et mutée par CD. Les spectres de CD des protéines Vif WT et AALA sont très similaires. En effet, leur analyse grâce au logiciel Jasco Spectra Manager (Easton, MD) montre peu de différences structurales entre les deux protéines (*figure 38*).



	Vif WT	Vif AALA
Hélice $\alpha$ (%)	12	10
Feuillet $\beta$ (%)	46	50
Boucles (%)	13	12
Désordonnée (%)	29	28

Figure 38: Spectres de dichroïsme circulaire des protéines Vif WT (bleu) et AALA (violet) et analyse des résultats par utilisation du logiciel Jasco Spectra Manager (Easton, MD)

Les résultats de CD montrent que les protéines Vif WT et AALA sont organisées majoritairement en feuillets  $\beta$  (46 et 50 % respectivement). La proportion des hélices  $\alpha$  et des boucles est faible puisque ces deux éléments structuraux ne représentent que 20 % de la structure entière des protéines. Une partie non négligeable (~ 30 %) de la structure demeure totalement désorganisée.

Les conclusions des expériences de CD suggèrent que les substitutions des résidus proline en alanine du motif PPLP du domaine de multimérisation n'altèrent en rien la structure secondaire de la protéine.

## 2. Etude de l'état d'assemblage de Vif sauvage et du mutant AALA

### a. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur encombrement stérique. Ainsi, les grosses molécules sont éluées les premières alors que les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement. L'existence d'une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire permet à partir de l'analyse d'une solution composée de protéines de poids moléculaires connus de déduire la masse des protéines étudiées.

La masse et l'assemblage des protéines Vif WT et AALA ont été analysés par cette technique. Dans les conditions utilisées pour la Vif AALA, la protéine Vif WT précipite. La diminution de la concentration en NaCl (de 150 mM à 50 mM) permet de résoudre ce problème (*figure 39*).

La protéine Vif WT est éluée à 11,25 ml ce qui correspond à une masse moléculaire relative de 209 kDa. La taille de Vif étant de 23 kDa, ce résultat montre que la protéine WT est organisée en un complexe d'environ neuf protéines. En revanche, la protéine Vif AALA est éluée plus tardivement de la colonne (13,95 ml). Ce volume équivaut à l'éluion d'une protéine de 76 kDa, soit trois fois le poids moléculaire de Vif.

La mutation des résidus proline en alanine diminue donc fortement la capacité de Vif à multimériser confirmant que ce motif est impliqué dans l'oligomérisation de la protéine.

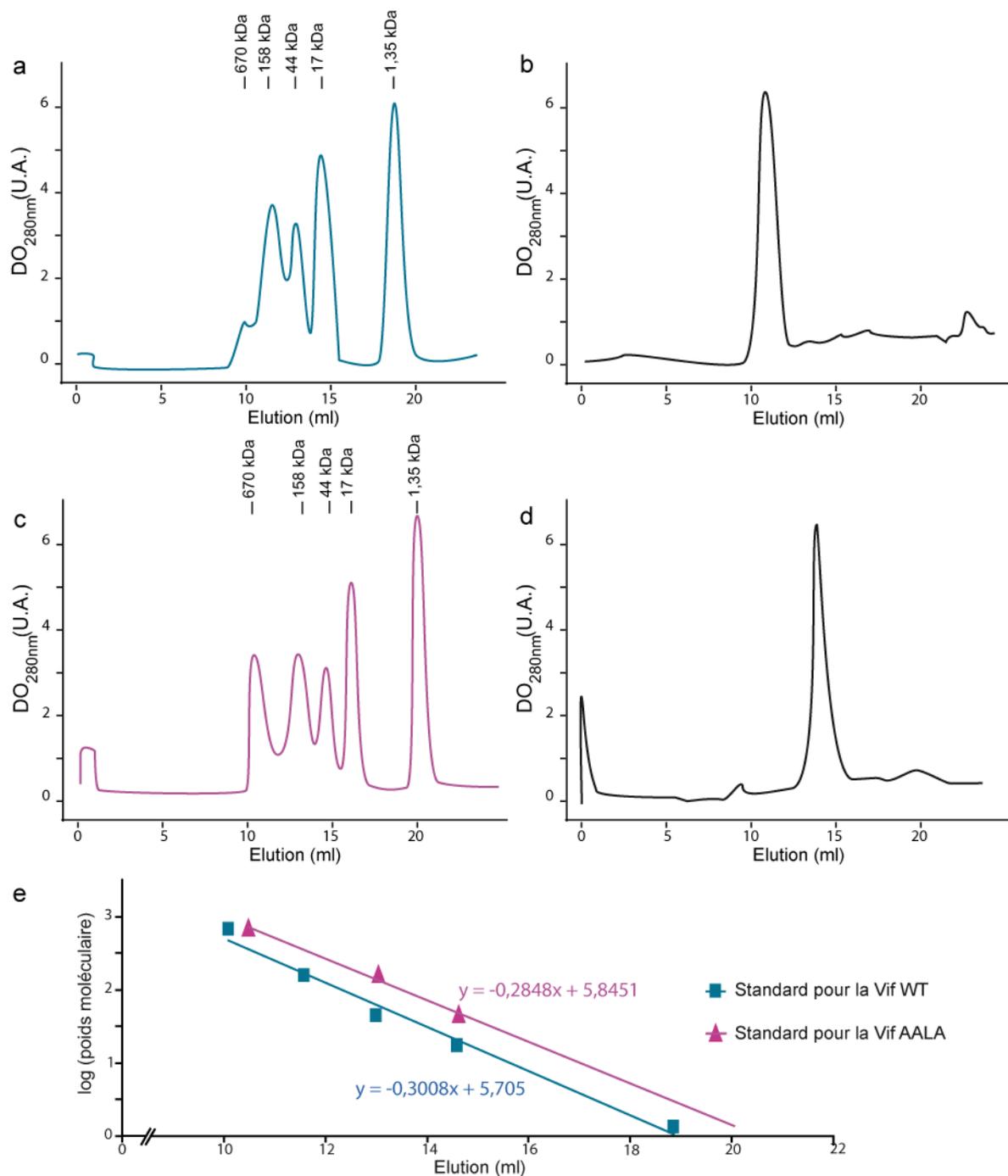


Figure 39 : Elution par chromatographie d'exclusion des protéines Vif WT et AALA Standard de protéines utilisées pour l'analyse de la Vif WT (a) et AALA (c). Profil d'éluion obtenu pour la Vif WT (b) et AALA (d). Graphe reportant la relation linéaire existant entre le volume d'éluion et le logarithme du poids moléculaire.

### b. Diffusion dynamique de la lumière

La DLS permet de caractériser des macromolécules en déterminant leur masse moléculaire, leur dimension ou encore la présence de multiples espèces (dimères, agrégats...). Cette technique est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des particules soumises à

des mouvements thermiques aléatoires (mouvement Brownien). La DLS varie avec le temps et peut être reliée au coefficient de diffusion de la particule analysée, donc à son diamètre.

Avec le Dr Serena Bernacchi, nous avons effectué des mesures de DLS afin d'étudier la taille des multimères des protéines Vif WT et AALA (figure 40).

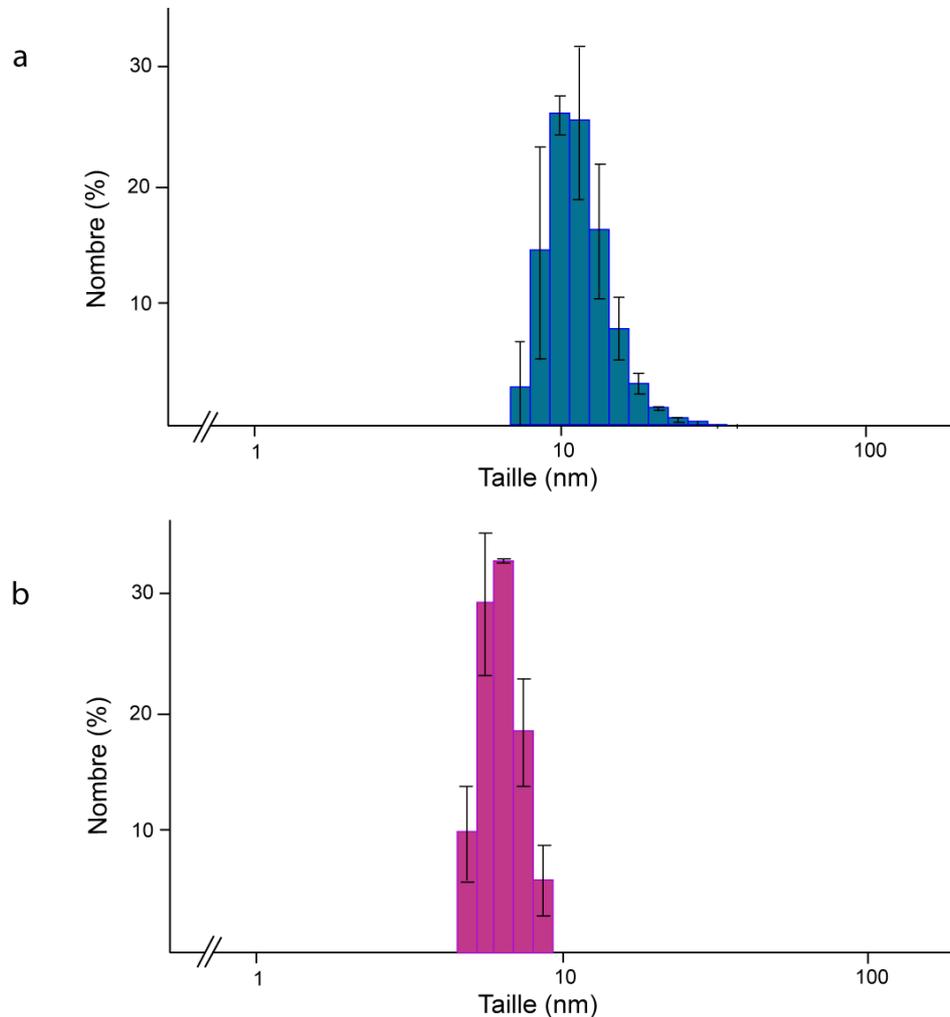


Figure 40 : Spectre de DLS des protéines Vif WT (a) et AALA (b)

Les histogrammes de la protéine Vif WT montrent un diamètre moyen de 10-12 nm qui correspond à des multimères contenant de 6 à 10 protéines. Les mesures de DLS de la protéine Vif AALA permettent d'obtenir un diamètre moyen de 5-6 nm qui équivaut à la présence de monomères ou de dimères de protéine en solution.

## C. Discussion

### 1. La protéine Vif : une protéine intrinsèquement non structurée ?

Les expériences de CD que nous avons menées fournissent les seules informations disponibles sur la structure secondaire réelle de la protéine. En effet, dans la littérature aucune étude n'a été effectuée sur la protéine Vif entière. Les seules études de CD ont visé à analyser la structure du doigt de zinc en présence et en absence de zinc<sup>168</sup> ou du CTD de Vif (résidus 141-192)<sup>176</sup>. Néanmoins, une simulation de l'arrangement secondaire de la protéine Vif entière a été effectuée<sup>10</sup>. Dans cette étude, Balaji *et al.* ont montré que la protéine Vif est majoritairement sous forme désordonnée (43 %) puis composée d'hélices  $\alpha$  (31 %), de boucles (9 %) et enfin de feuillets  $\beta$  (17 %). Une prédiction de structure secondaire de Vif a également été effectuée à la suite de comparaison de plusieurs séquences de la protéine Vif de différents virus VIH et SIV<sup>12</sup>. Ces données suggèrent que Vif comporte une proportion similaire de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  (26 % et 22 %, respectivement), de boucles (13 %) et est majoritairement destructurée (39 %). Ces résultats de modélisation et de prédiction sont partiellement contradictoires avec nos conclusions notamment sur le contenu en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$  où nos expériences montrent des résultats inversés (50 % de feuillets  $\beta$  et 20 % d'hélices  $\alpha$  et de boucles). En revanche, nos résultats sur la proportion de régions destructurées sont en accord avec la littérature. Cette observation peut-être reliée aux conclusions de deux autres équipes qui suggèrent que le CTD de Vif est intrinsèquement non structuré<sup>7,176</sup>.

L'étude de la structure des protéines chez les eucaryotes démontre qu'environ un tiers des protéines synthétisées contiendrait quelques acides aminés voire un domaine entier (rarement la totalité de la protéine) complètement destructurés<sup>74</sup>. Il apparaît de plus en plus que ce manque d'organisation confère à la protéine sa flexibilité / plasticité d'interactions avec plusieurs partenaires. En effet, en interagissant avec un partenaire protéique ou acide nucléique, en étant modifiée post-traductionnellement ou encore en réponse à la fixation d'un ligand, la protéine subirait une transition de conformation d'un état désordonné à un état structuré. Cette hypothèse a également été formulée dans le cas du CTD de la protéine Vif<sup>7,176</sup>. Ce domaine renferme un motif essentiel à la multimérisation mais également des domaines indispensables pour l'interaction avec l'ElonginC, la Culline 5, la partie NC de Gag et également avec la membrane plasmique. Son manque de structuration pourrait permettre à Vif une meilleure flexibilité d'interaction et ainsi de s'adapter à chacun de ces partenaires dans le temps mais également dans l'espace. Reingewertz *et al.* ont effectivement montré

que le CTD de Vif se structure en présence de micelles qui miment l'environnement de la membrane plasmique<sup>176</sup>.

Nos études de CD sur les Vif WT et AALA ne montrent aucune différence significative d'organisation de la structure secondaire de ces deux protéines. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les mutations effectuées concernent les résidus 161-164 inclus dans le CTD de Vif qui serait désordonné<sup>7,176</sup>. De plus, d'après les simulations de la structure tertiaire de la protéine Vif, le motif PPLP se situe à la surface de la protéine dans une boucle<sup>135</sup>. Les substitutions apportées ne changeraient donc pas son organisation structurale.

## 2. La protéine Vif forme des multimères : implication du motif PPLP

Nos expériences de DLS et de chromatographie d'exclusion apportent des conclusions similaires quant à l'organisation des protéines Vif WT et AALA. La protéine Vif WT formerait un complexe composé de 6-10 protéines. La mutation du domaine PPLP diminuerait fortement cette capacité à oligomériser (réduction de 67 à 90 %), la protéine Vif AALA étant, quant à elle, sous forme de dimère ou trimère. Ce dernier résultat est en accord avec les études de Yang *et al.* qui ont observé que la délétion du motif PPLP abolit de 80 % les interactions Vif-Vif<sup>240</sup>.

Des expériences de chromatographie d'exclusion sur le CTD de Vif révèlent que celui-ci s'assemble sous forme de dimère ou de trimère (2,5 fois la masse molaire du CTD)<sup>176</sup>. Ce résultat suggère que d'autres résidus contenus en dehors du CTD seraient également requis pour la multimérisation. La protéine Vif AALA, bien que mutée dans le domaine de multimérisation, persiste sous forme de dimère ou de trimère. Cette observation renforce l'hypothèse que d'autres résidus, en dehors du motif PPLP, sont responsables de la capacité de Vif à s'auto-assembler. Les acides aminés impliqués dans la multimérisation seraient donc dispersés dans le NTD et le CTD de la protéine Vif et pourraient se superposer à des domaines requis pour les autres fonctions de Vif telles que la liaison à l'ARN ou encore l'interaction avec les protéines A3G et A3F.

Les études de pontage (réalisées avec de l'EDC (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide) additionné de sulfo-NHS (N-hydroxysuccinimide)) et d'électrophorèse en gel

natif montrent que la protéine Vif WT peut s'assembler en dimères, trimères et tétramères<sup>7,240</sup>. Le fait que, pour l'instant, aucun autre résultat n'ait montré un ordre d'assemblage supérieur peut s'expliquer par les techniques utilisées. Ainsi, les expériences en gel natif ont été menées en présence de 0,05 % SDS dans le tampon de migration (1 % dans le cas d'un gel SDS-PAGE dénaturant) et en concentrations variables dans le tampon de dépôt (de 0,01 à 2 %) <sup>240</sup>. La faible concentration en SDS utilisée pourrait suffire pour dissocier les complexes de plus haut poids moléculaire. De plus, nous pouvons remarquer la persistance de Vif en haut du gel, probablement au niveau des puits de dépôt <sup>240</sup>. Les protéines Vif assemblées en complexe de plus haut poids moléculaire auraient en effet beaucoup de difficulté à pénétrer le gel et seraient bloquées, ne rendant visible que l'assemblage en dimère, trimère ou tétramère.

L'interaction avec des partenaires protéiques ou encore les modifications post-traductionnelles peuvent influencer la multimérisation des protéines qui module alors leur activité. Ainsi, de nombreux récepteurs situés à la membrane plasmique, après réception d'un signal extracellulaire, dimérisent et deviennent actifs (la voie de signalisation peut alors s'enclencher). Un autre exemple est celui de la protéine A3G : une fois phosphorylée par la PKA, A3G est moins facilement reconnue par la protéine Vif ce qui induit une diminution de son ubiquitination et par conséquent de sa dégradation par le protéasome <sup>192</sup>. La protéine Vif est phosphorylée par des kinases comme la protéine MAPK au niveau des résidus T<sup>96</sup>, S<sup>144</sup>, T<sup>155</sup>, S<sup>165</sup> et T<sup>188</sup> <sup>241,242</sup>. La phosphorylation des résidus T<sup>96</sup> et S<sup>144</sup> est importante pour l'activité de Vif, la mutation de ces sites inhibant la réplication virale <sup>241,242</sup>. Les résidus phosphorylables étant présents majoritairement dans le CTD de Vif, leurs modifications pourraient réguler l'assemblage de Vif en multimères et ainsi moduler son activité tout au long du cycle réplcatif lui permettant d'interagir avec plus ou moins d'affinité avec ses nombreux partenaires comme c'est le cas d'A3G.

### III. Etude de la traduction d'A3G en présence de Vif

#### A. Introduction et objectif

Le génome humain code entre 20 000 et 25 000 gènes et la proportion de gènes exprimés dans une cellule varie de 30 à 50 %. Les cellules d'un organisme multicellulaire ont des structures et des fonctions qui peuvent être très différentes. Toutes les cellules possèdent au départ le même matériel génétique, c'est une régulation fine de l'expression des gènes de la naissance à la mort (développement, mitose...) qui va conduire à la différenciation et à l'acquisition des fonctions propres à chaque type cellulaire. Une fois différenciée, l'expression des gènes n'est pas figée, la cellule doit en effet répondre aux signaux extracellulaires et déclencher / réprimer spécifiquement certaines voies. Afin de réguler l'expression de son information génétique, la cellule a mis en place quatre points de contrôle : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Le contrôle de la traduction est très intéressant pour la cellule. En effet, ce mode de régulation lui confère une plus grande réactivité / flexibilité face aux stimuli extérieurs et permet d'engager une réponse qui peut être réversible. La traduction peut-être régulée de façon globale suite à un stress (par exemple par phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par PKR (*cf introduction, paragraphe III.B.1.b.ii*)) ou individuelle, propre à chaque ARNm. Ce contrôle de la synthèse des protéines peut être effectuée à plusieurs niveaux en agissant sur l'ARN directement ou en bloquant les acteurs essentiels comme les facteurs d'initiation ou encore le ribosome. Ces mécanismes de régulation résultent essentiellement d'interactions entre les UTR d'un ARNm (éléments *cis*) et des protéines (éléments *trans*) qui reconnaissent spécifiquement ces régions souvent très structurées.

Les premiers articles relatant la neutralisation d'A3G par Vif ont montré que Vif inhibe l'accumulation des protéines A3G en agissant au niveau de la traduction<sup>110,141,200</sup>. Le taux d'ARNm d'A3G étant constant en présence de Vif<sup>110,200</sup>, ceci suggère que Vif intervient soit au niveau de la localisation de l'ARN, soit lors du mécanisme de la traduction (initiation, élongation ou encore terminaison). Nous avons montré que Vif se fixe à l'ARNm d'A3G et préférentiellement aux UTR. Nous nous sommes donc intéressés, dans un premier temps, aux conséquences éventuelles de l'interaction de Vif avec l'ARNm d'A3G. Cette étude a été menée sur plusieurs fragments d'ARN correspondant à des régions différentes de l'ARNm d'A3G dans le but de disséquer le rôle de chacune d'entre elles dans la traduction. Le rôle du domaine de multimérisation dans l'inhibition traductionnelle a également été étudié grâce

à la protéine Vif AALA. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à la compréhension du mécanisme d'inhibition traductionnel proprement dit.

## B. Résultats

### 1. Etude de la traduction d'A3G en présence de Vif

#### a. Analyse *in vitro*

Les systèmes de transcription / traduction *in vitro* sont des environnements simplifiés permettant de produire une protéine de manière très rapide à partir d'un plasmide circulaire contenant le gène de la protéine d'intérêt. Après transcription par l'ARN polymérase du bactériophage T7, l'ARN est pris en charge par la machinerie traductionnelle fournie par le lysat de réticulocytes de lapin. Les réticulocytes, globules rouges immatures mais ayant déjà perdu leur noyau, sont lysés puis traités à la nucléase micrococcale afin de détruire les ARNm endogènes et réduire le bruit de fond. Le lysat contient les éléments cellulaires indispensables à la traduction : ARNt, ribosomes ainsi que les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de la traduction. La synthèse des protéines est effectuée en présence d'un mélange d'acides aminés dépourvus de méthionine. En effet, l'ajout en *trans* de méthionine marquée au <sup>35</sup>S permet la détection de la protéine étudiée par autoradiographie.

L'étude de la traduction de la protéine A3G est effectuée par utilisation des systèmes de transcription / traduction *in vitro* en présence de Vif WT, Vif AALA ou de notre contrôle, l'AspRS (*figure 41*).

L'analyse des résultats montrent que la traduction d'A3G en présence de Vif WT et AALA est similaire pour une construction donnée. Ce résultat suggère que le domaine de multimérisation n'intervient pas dans le processus de régulation de la traduction d'A3G.

Lorsque l'ARN produit correspond à l'ARNm complet d'A3G, le taux de protéines A3G synthétisé est fortement réduit en présence de Vif WT et AALA par rapport au contrôle (AspRS) (diminution de  $50 \pm 9$  % à 15 min jusqu'à  $70 \pm 1$  % à 60 min). Ce résultat est également retrouvé lorsque l'ARNm d'A3G est délété uniquement de sa région 3'UTR (A3G  $\Delta$ 3'UTR), la synthèse de protéines étant inhibée de  $45 \pm 14$  % à 15 min et de  $65 \pm 9$  % à 60 min. En revanche, la traduction de l'ARN correspondant uniquement à la séquence codante (A3G  $\Delta$ UTR) ou délété seulement de son extrémité 5'UTR (A3G  $\Delta$ 5'UTR) est peu inhibée à

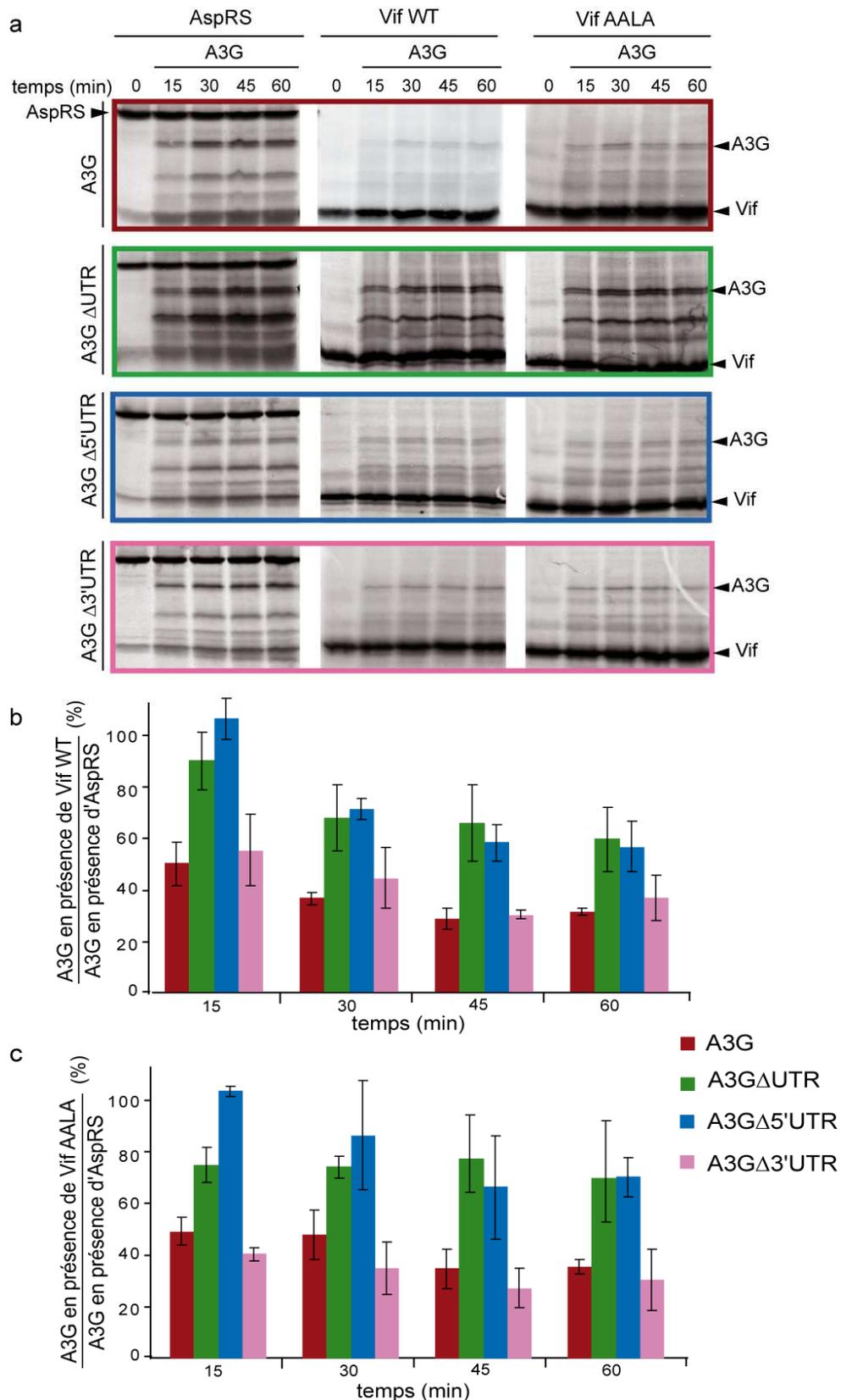


Figure 41: (a) Autoradiographies des gels SDS-PAGE correspondant aux transcriptions / traductions *in vitro* d'A3G, A3G $\Delta$ UTR, A3G $\Delta$ 5'UTR, A3G $\Delta$ 3'UTR en présence d'AspRS, de Vif WT ou Vif AALA pendant 15, 30, 45 et 60 min. Comparaison de la synthèse d'A3G en présence de Vif WT (b) ou Vif AALA (c) par rapport à la production d'A3G en présence d'AspRS.

15 min ( $-10 \pm 11$  % pour A3G  $\Delta$ UTR et  $+7 \pm 8$  % pour A3G  $\Delta$ 5'UTR) et modérément réduite à 60 min ( $-40 \pm 10$  %). Ces résultats suggèrent que la présence de la partie 5'UTR sur l'ARNm est nécessaire à l'inhibition de la traduction d'A3G. Cependant, une inhibition générale de la synthèse d'A3G par la protéine Vif apparaît en fonction du temps et de manière indépendante de l'ARNm d'A3G utilisé. Ces résultats suggèrent que deux mécanismes se superposent : une régulation spécifique résultant de la présence de la 5'UTR et indépendante du temps et une inhibition indépendante de l'ARN qui progresse avec le temps.

La protéine Vif induit la dégradation des protéines A3G par la voie de l'ubiquitine / protéasome. Afin de visualiser l'importance de ce mécanisme par rapport à l'inhibition traductionnelle, nous avons étudié la traduction d'A3G en présence d'un inhibiteur de protéasome (MG132) ou de DMSO (contrôle) (*figure 42*).

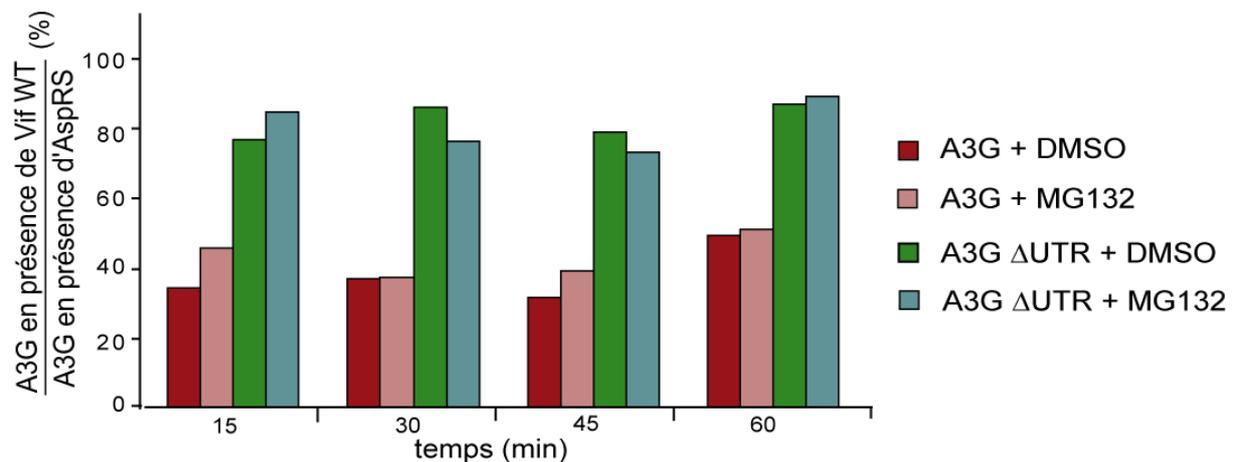


Figure 42 : Comparaison du taux de protéines A3G synthétisées lorsque son ARNm est complet ou délété des deux régions UTR (A3G  $\Delta$ UTR) en présence de Vif WT ou d'AspRS et de DMSO (contrôle) ou de MG132 (inhibiteur du protéasome).

Le MG132 bloque la dégradation des protéines par le protéasome, la diminution de leur taux correspond par conséquent à une inhibition au niveau de la synthèse protéique. L'ajout de DMSO sert de contrôle et permet de comparer l'effet inhibiteur du MG132 (solubilisé dans le DMSO) et d'attribuer les résultats observés uniquement à une inhibition du protéasome et non à la présence du solvant.

L'addition de MG132 ne modifie ni la spécificité ni l'amplitude de l'inhibition de la traduction d'A3G préalablement observée. La réduction d'accumulation des protéines A3G est donc due à une inhibition de la traduction par Vif.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la traduction d'A3G en présence de Vif est liée à la présence de la région 5'UTR sur l'ARNm d'A3G. Afin d'identifier quelle partie de la 5'UTR est importante pour l'inhibition, nous avons commencé par analyser la traduction d'une isoforme de l'ARNm d'A3G isolée au laboratoire qui se révèle être une isoforme minoritaire<sup>149</sup>. Cet ARNm possède une séquence 5'UTR plus courte : seulement les 42 nts de l'extrémité 3'-terminale de la région 5'UTR. Nous avons nommé cet ARNm A3G  $\Delta$ 1-255. La transcription / traduction de cette construction a été étudiée en absence ou en présence de Vif WT et AALA (figure 43).

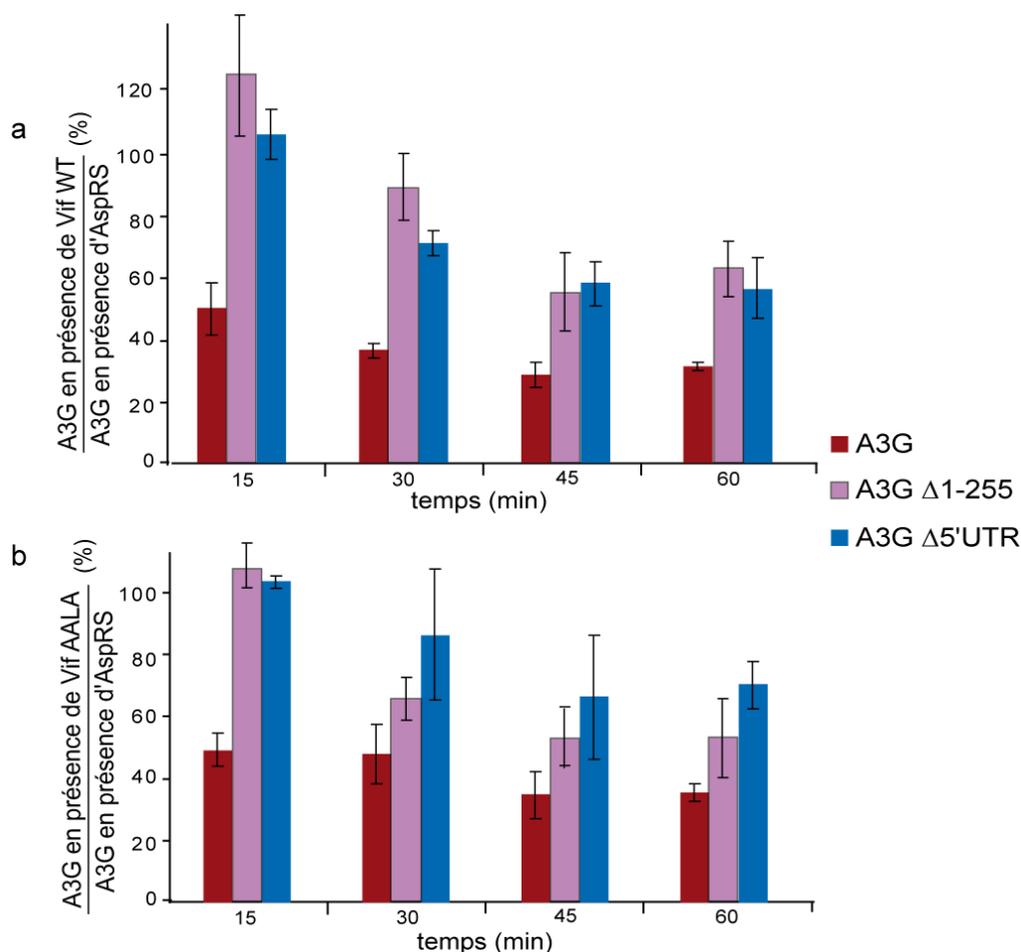


Figure 43 : Comparaison du taux de protéines A3G en présence de Vif WT (a) ou Vif AALA (b) par rapport à A3G produites en présence de l'AspRS

Comme précédemment, l'effet des protéines Vif WT et AALA est similaire, confirmant que le domaine de multimérisation n'est pas impliqué dans la régulation de la traduction d'A3G.

Le taux de protéines produites lorsque l'ARNm est dépourvu de ses 255 premiers nucléotides (A3G  $\Delta$ 1-255) est équivalent à la traduction des ARN correspondant à A3G  $\Delta$ 5'UTR ou A3G  $\Delta$ UTR. Ce résultat suggère que les 42 nucléotides restants de la séquence 5'UTR ne sont pas suffisants pour conférer à Vif la capacité à inhiber la traduction. Il apparaît

donc que les 255 premiers nucléotides de l'ARNm d'A3G sont ou contiennent un élément important pour l'inhibition de la traduction d'A3G par la protéine Vif.

#### b. Etudes *ex vivo*

L'étude de la traduction d'A3G *ex vivo* est effectuée par transfection transitoire de cellules HEK 293T avec des plasmides permettant l'expression de Vif et d'A3G. Les résultats sont analysés soit par test luciférase, soit par western blot selon le type de vecteur utilisé (*cf matériels et méthodes, paragraphe I.A.*).

##### i. Test luciférase

Les tests luciférase permettent la mesure de manière séquentielle des activités de la Firefly Luciférase (fusionnée avec la ou les régions non traduites d'A3G) et de la Rénilla Luciférase (contrôle de l'efficacité de la transfection).

L'activité de la Luciférase est analysée par transfection de quantité constante de vecteur exprimant la Firefly Luciférase (1 µg) fusionnée ou non avec les UTR d'A3G en fonction de quantités croissantes de plasmides Vif WT ou AALA (0,5 – 1 – 2 µg) (*figure 44*). Des « tests de Student » sont réalisés afin de comparer deux à deux les moyennes obtenues pour une construction de la Luciférase et pour une quantité de Vif transfectée donnée (exemple : comparaison de la moyenne obtenue pour la Luciférase seule avec celle d'A3G 5'UTR-Luciférase en présence de 0,5 µg de Vif). Plus la probabilité, *p*, est faible, plus la différence entre les moyennes est significative. La variation du signal luciférase est analysée puis reliée à la présence ou à l'absence des UTR de l'ARNm d'A3G.

La transfection d'un vecteur comportant seulement la séquence codante de la Firefly Luciférase représente notre contrôle. En présence de quantités croissantes de Vif WT ou AALA transfectées, aucun changement significatif de la luminescence n'est observé pour cette construction. Vif n'inhibe donc pas la traduction de la Luciférase lorsque l'ARN étudié est uniquement composé de l'ORF de la Luciférase.

Quelle que soit la quantité de Vif WT transfectée, le profil de variation de la luminescence obtenu pour chacune des constructions analysées est conservé. La présence de la région 5' ou 3'UTR d'A3G en amont ou en aval, respectivement, de l'ORF de la Luciférase produit des résultats similaires : une diminution de la luminescence d'environ 10-15 % en présence de Vif WT. La fusion des deux régions 5' et 3'UTR d'A3G de part et d'autre de la luciférase induit une diminution un peu plus importante de la luminescence (-20 %). La Vif WT inhibe donc plus fortement la traduction quand les deux UTR d'A3G sont présentes. Ceci suggère que les deux régions 5' et 3'UTR jouent un rôle dans l'inhibition traductionnelle.

La traduction de la Luciférase en présence de Vif AALA donne des résultats similaires quelle que soit les constructions observées ( $p < 0,05$ ), une réduction de la luminescence de 10-15 %.

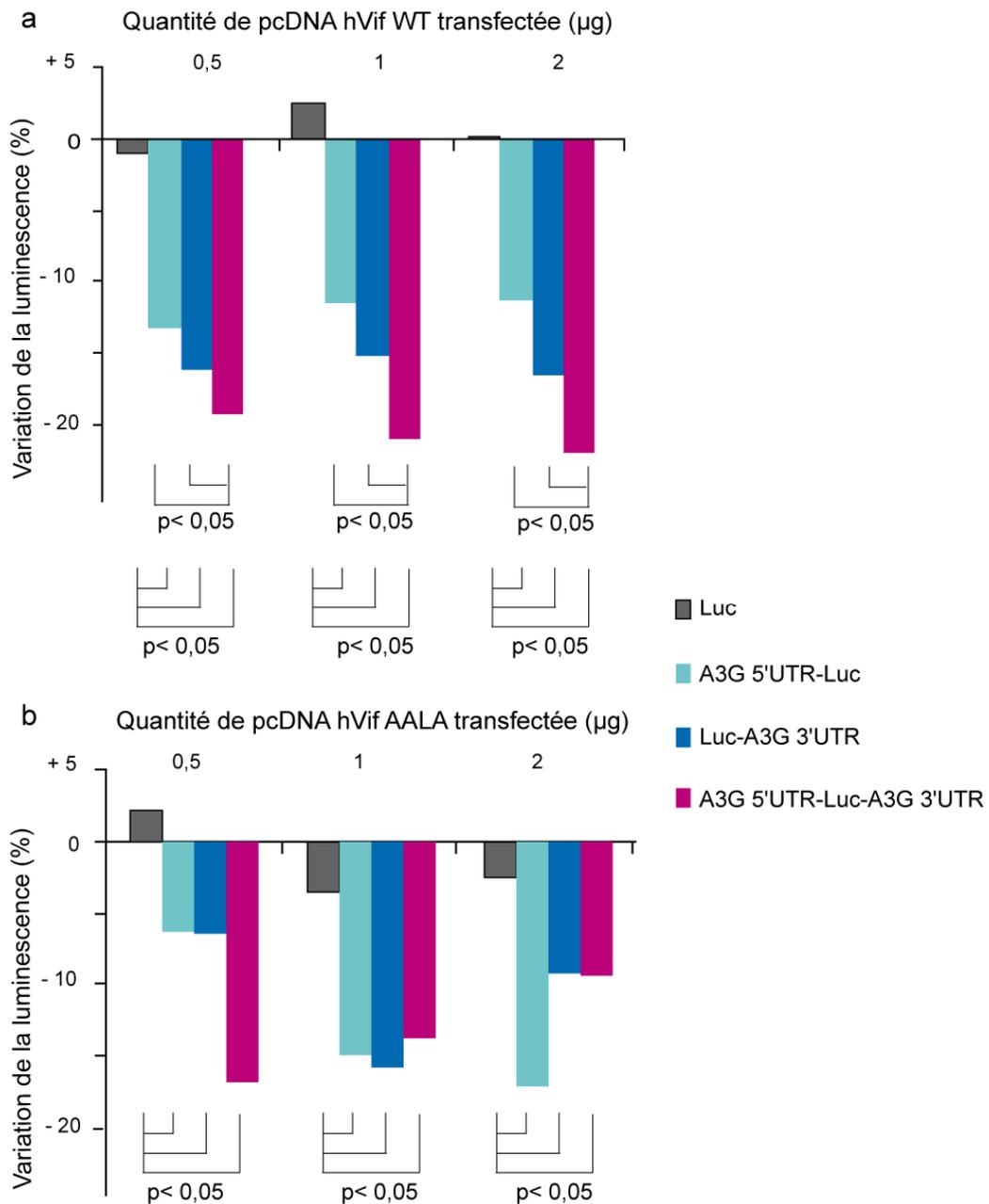


Figure 44 : Variation du signal luciférase en fonction de la présence de la Vif WT (a) ou AALA (b)

Les résultats obtenus avec la Vif WT et avec la Vif AALA sont comparables, les « tests de Student » effectués n'ayant indiqué aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les deux protéines sauf concernant la construction A3G 5'UTR-Luciférase-A3G 3'UTR. Dans ce cas, nos résultats montrent que la traduction de la Luciférase est plus fortement inhibée en

présence de la Vif WT que de la Vif AALA. En effet, en présence de Vif AALA, l'inhibition de luminescence (10-15 %) est similaire lorsqu'une ou deux UTR sont fusionnées à la Luciférase. Ceci suggère que le domaine de multimérisation de Vif est impliqué, mais dans une moindre mesure, dans l'inhibition de la traduction d'A3G.

Nous avons également vérifié que la différence de la luminescence observée n'est pas seulement due à un effet de position d'une séquence en amont ou en aval de l'ORF de la Luciférase. La leptine est une protéine qui régule les réserves de graisse dans l'organisme. Le taux de cette hormone décroît dans les périodes de carence et augmente en réponse à l'alimentation. L'équipe du Dr. Susan Fried a montré que la leptine est régulée de manière traductionnelle par l'insuline qui reconnaît spécifiquement les régions 5' et 3'UTR de l'ARNm de la leptine<sup>129</sup>. Nous avons étudié la variation de luminescence lorsque la région 5'UTR (56 nts) ou une partie de la 3'UTR (462 nts) de l'ARNm de la leptine est fusionnée avec l'ORF de la Firefly Luciférase en présence de la protéine Vif WT (figure 45).



Figure 45: Variation de la luminescence des vecteurs contrôle transfectés en présence de Vif WT.

En présence de Vif et indépendamment de la quantité de plasmide transfectée et du contrôle étudié, aucune variation du signal luciférase n'est observée. Ces résultats suggèrent que la diminution de la luminescence, et par conséquent de la traduction, est spécifique et nécessite la présence de la 5', 3' UTR ou des deux UTR de l'ARNm d'A3G rattachées à l'ORF de la Firefly Luciférase.

#### ii. Western blot

Les constructions d'A3G utilisées dans cette partie sont identiques aux vecteurs utilisés pour les études de transcription / traduction *in vitro*. Après transfection de ces vecteurs (50 ng) en présence de Vif (1 µg), les cellules sont lysées et leur contenu séparé sur gel SDS-PAGE dénaturant puis analysé par western blot. Les protéines A3G, Vif et actine (contrôle utilisé pour la normalisation) sont ensuite détectées par des anticorps spécifiques de chacune

(figure 46). Les expériences sont réalisées en présence d'un inhibiteur du protéasome (ALLN) ou de DMSO (solvant utilisé pour solubiliser ALLN) (figure 46a & b).

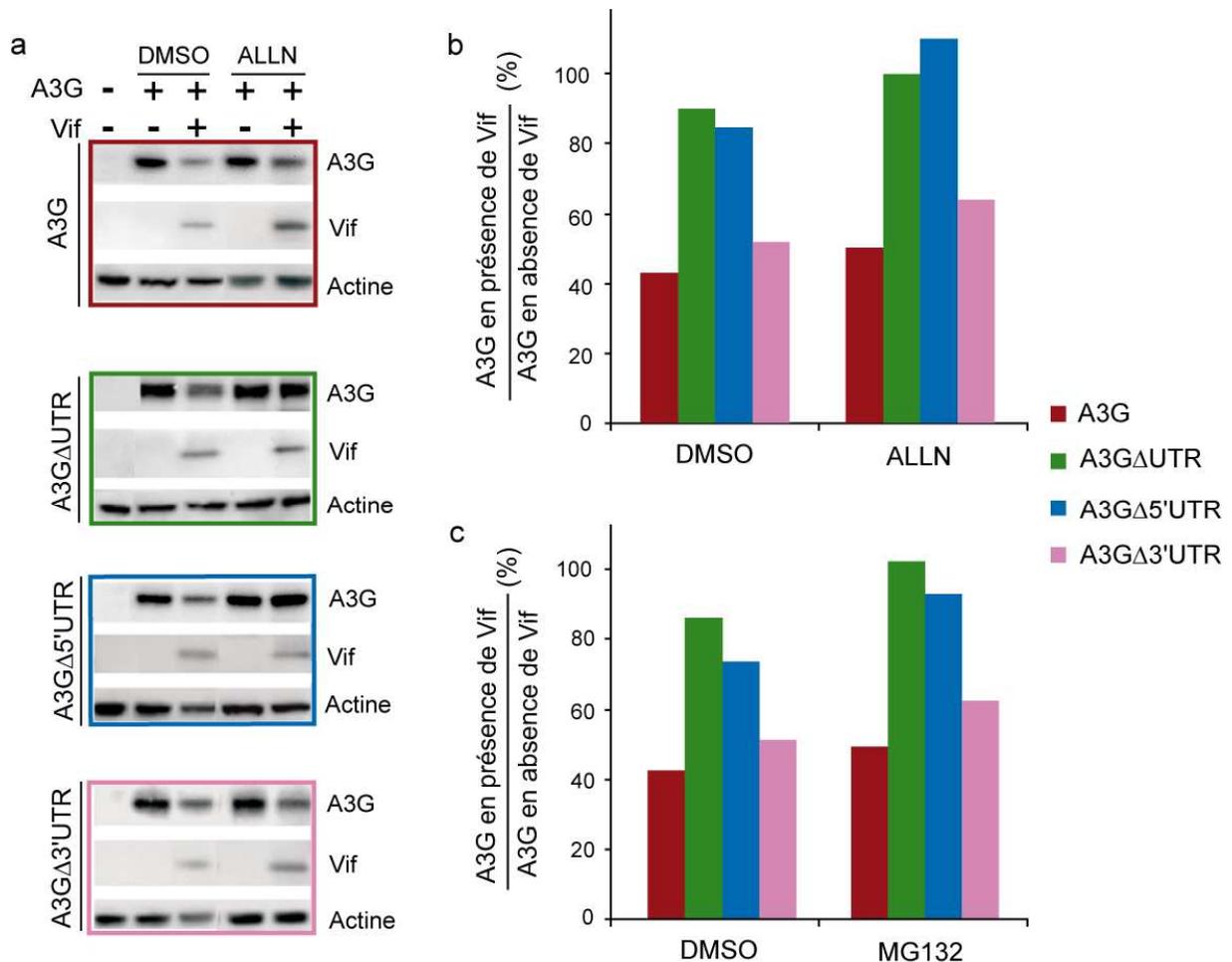


Figure 46 : Western blot (a) et quantification (b) des transfections de différentes constructions permettant l'expression d'A3G (50 ng) en absence ou présence de Vif WT (1  $\mu$ g) et en absence ou en présence d'inhibiteur du protéasome (ALLN). (c) Quantification des résultats obtenus avec les vecteurs d'A3G (1 $\mu$ g) transfectées en absence ou en présence de Vif WT (1  $\mu$ g) et en absence ou en présence d'inhibiteur du protéasome (MG132)

L'addition d'ALLN neutralise le protéasome et permet ainsi d'individualiser l'effet traductionnel de la dégradation mis en place par Vif. Comme auparavant, l'ajout de DMSO dans le milieu de culture cellulaire sert de contrôle et permet de discriminer l'effet inhibiteur de l'ALLN de l'action du solvant.

En présence de DMSO (figure 46a & b), le taux de protéines A3G non régulées par la protéine Vif est très variable selon la construction testée (entre 40 et 90 %) et dépend de la présence de la 5'UTR. La présence d'ALLN dans le milieu de culture montre des différences dans les mécanismes d'inhibition en fonction du vecteur utilisé. En effet, en présence d'un ARNm complet ou d'un ARNm délété de sa région 3'UTR (A3G  $\Delta$ 3'UTR), la traduction est

fortement inhibée par Vif (-50 % et -40 %, respectivement). Or, cette inhibition est levée lorsque la synthèse d'A3G est réalisée à partir d'un ARN dépourvu des régions UTR (A3G  $\Delta$ UTR) ou seulement de la région 5'UTR (A3G  $\Delta$ 5'UTR). Ces résultats suggèrent que la faible proportion du mécanisme de dégradation (entre 10 et 20 %) est indépendant de la construction étudiée et que la région 5'UTR est nécessaire à l'inhibition de la traduction d'A3G par Vif.

Ces expériences ont également été confirmées en utilisant un autre inhibiteur du protéasome (MG132) (*figure 46c*). De même, nous observons une inhibition de la traduction (entre -40 et -50 %) uniquement lorsque la région 5'UTR est présente sur l'ARNm d'A3G, confirmant l'importance de la région 5'UTR pour l'inhibition.

## 2. Analyse du profil de polysomes sur l'ARNm d'A3G en présence de Vif

Le contrôle de la traduction intervient principalement au niveau de l'initiation de la traduction. Pour comprendre les mécanismes de régulation traductionnelle dirigés par Vif, nous avons analysé les complexes de traduction assemblés sur l'ARNm d'A3G par centrifugation sur gradient de sucrose. Le profil de polysomes a été analysé dans le cas de l'ARNm d'A3G (complet ou délété des deux UTR), en absence ou en présence de Vif WT. Peu avant la lyse (30 min), les cellules HEK 293T préalablement transfectées avec les différentes constructions sont mises en culture avec un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) afin de bloquer les ribosomes en progression sur l'ARNm. Les cellules sont ensuite lysées et le contenu cellulaire est déposé sur un gradient de sucrose continu (7-47 %) puis ultracentrifugé afin de séparer les composants cellulaires suivant leur densité. Les fractions du gradient sont récupérées et leur absorbance mesurée simultanément (*figure 47*). Le contenu des fractions est ensuite analysé par western blot (protéines) et par gel d'agarose ou RT-PCR (ARN).

Le profil d'absorbance des différentes fractions ne permet pas d'observer les polysomes directement (*figure 47*). L'analyse des protéines et des ARN de chaque fraction nous fournira des informations sur la présence ou l'absence de la protéine L11 et des ARNr, composants du ribosome et donc indirectement sur la présence des polysomes eux-mêmes.

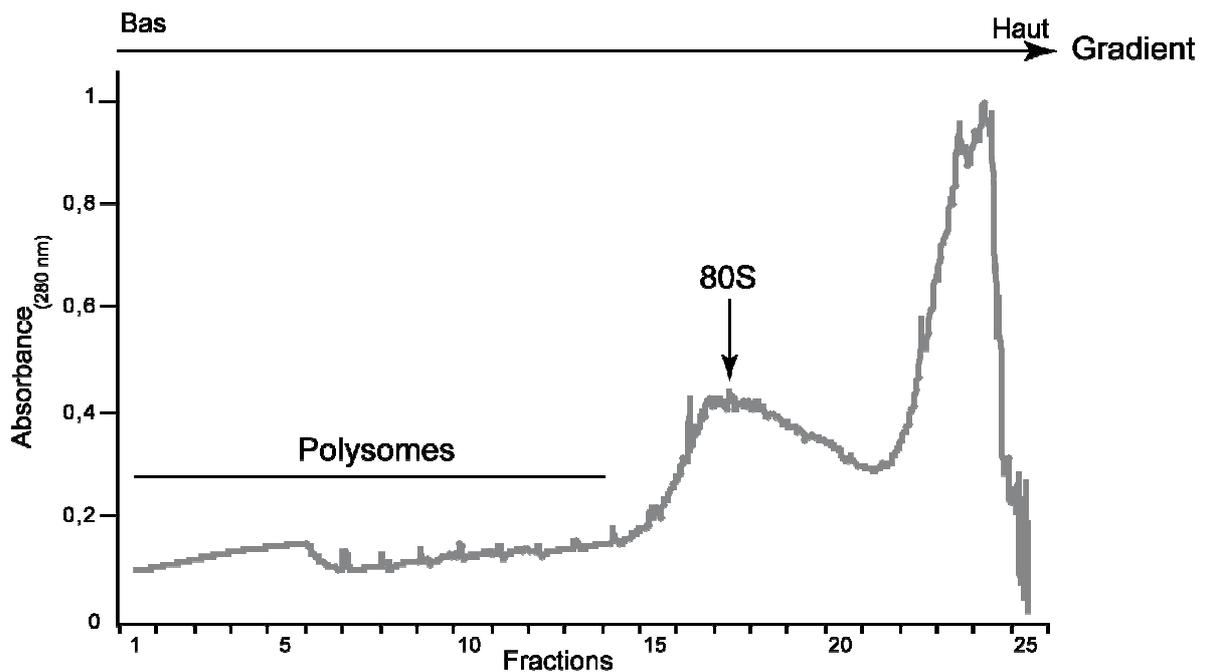


Figure 47 : Profil d'absorption type obtenu lors du prélèvement des fractions d'un gradient de sucrose continu ultracentrifugé après dépôt d'un lysat cellulaire.

#### a. Etude des protéines

Dans le but d'analyser les protéines composant chaque fraction, la moitié est précipitée puis déposée sur gel SDS-PAGE dénaturant et étudiée par western blot par utilisation d'anticorps spécifiques d'A3G, de Vif, de l'actine et de L11.

L'expérience a été menée sur un lysat de cellules précédemment transfectées avec la construction A3G (figure 48) ou A3G  $\Delta$ UTR (figure 49), en absence ou en présence de Vif.

Après avoir vérifié que le taux de protéines A3G est réduit en présence de Vif (figure 48a à droite), nous avons étudié la répartition des protéines L11, A3G et Vif dans les fractions du gradient. L'analyse des fractions montre que la protéine A3G est localisée préférentiellement au niveau des fractions 12 à 20. Cette distribution se superpose à celle de la protéine L11 présente majoritairement dans les fractions 12-19 (reflétant la présence du ribosome 80S) et également, mais en quantité moindre, dans les fractions 4-12 (correspondant aux polysomes). En présence de Vif, le taux de protéines A3G étant fortement diminué, il est donc difficile de conclure quant à un changement d'assemblage / localisation de la protéine A3G qui serait induit par Vif.

L'actine, contrôle de l'expérience, se situe vers le haut du gradient au niveau des fractions 21-25. Cette localisation ne change pas après transfection de Vif suggérant que Vif n'influence pas la répartition de l'actine dans la cellule.

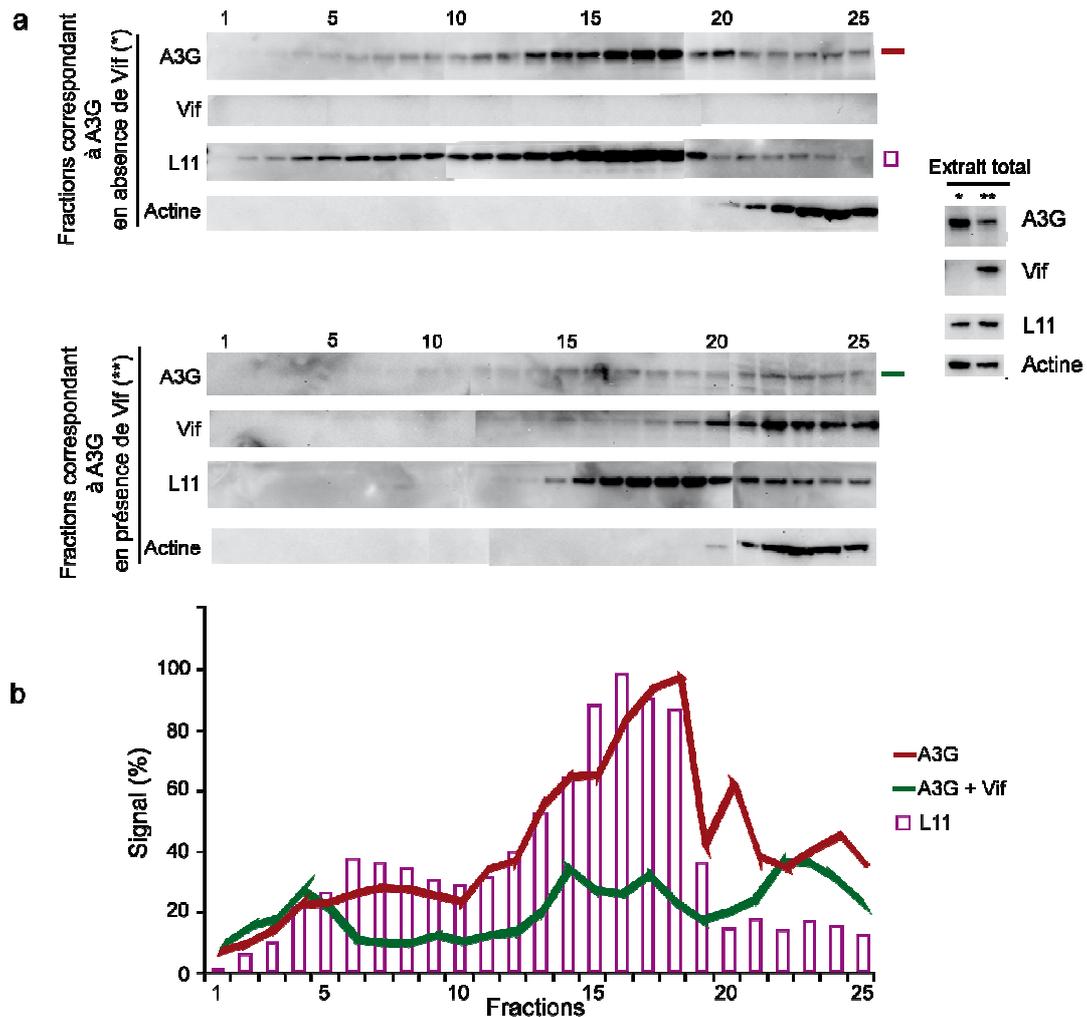


Figure 48 : (a) Western blots des fractions issues des gradients de sucrose de cellules transfectées avec le plasmide permettant la traduction d'A3G à partir de l'ARNm complet en absence (haut) et en présence (bas) de Vif. (b) Quantification des protéines L11 (histogramme) et A3G produites en absence (rouge) ou en présence (vert) de Vif.

Comme dans les études précédentes, le taux de protéines A3G issues de l'ARN A3G  $\Delta$ UTR est pratiquement inchangé en présence de Vif (*figure 49a à droite*). Les protéines synthétisées à partir de l'ARN A3G  $\Delta$ UTR en absence ou en présence de Vif se répartissent majoritairement entre les fractions 12 et 20. La protéine ribosomique L11 se situe majoritairement dans les fractions 15-21 (ribosomes 80S) puis en faible quantité dans les fractions 6-14 (polysomes). Cette répartition se superpose également à celle des protéines A3G que ce soit en absence ou en présence de Vif.

Comme précédemment, l'actine est localisée dans les fractions 21-25, en absence ou en présence de Vif confirmant que Vif n'intervient pas dans la localisation ou l'assemblage en complexes de l'actine dans la cellule.

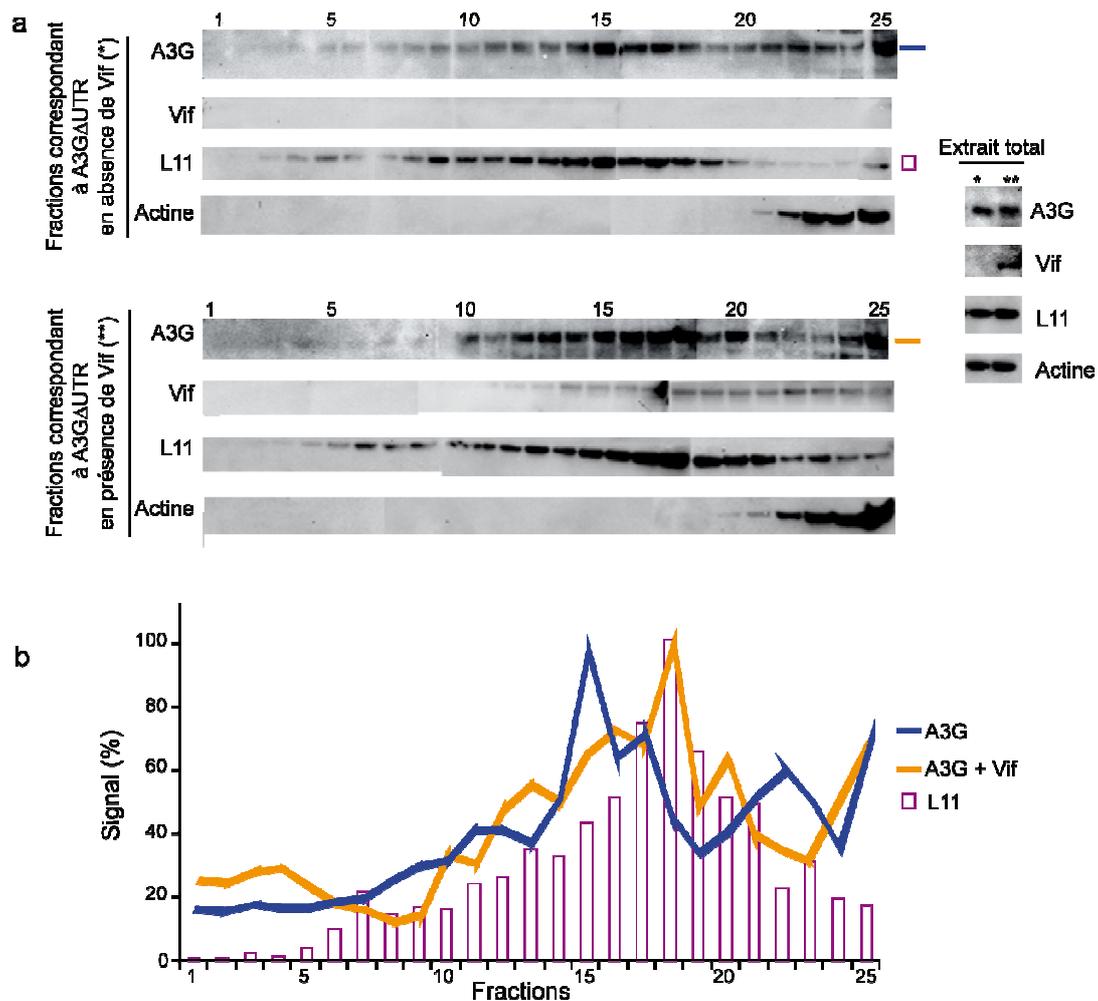


Figure 49 : (a) Western blots des fractions des gradients de sucrose correspondant aux cellules transfectées avec A3G  $\Delta$ UTR en absence (haut) ou en présence (bas) de Vif. (b) Quantification des protéines L11 (histogramme) et A3G produites en absence (bleu) ou en présence (jaune) de Vif.

### b. Etude des ARN

Les ARN des différentes fractions sont extraits et analysés soit directement dans le cas des ARNr soit indirectement par RT-PCR pour les études sur la distribution de l'ARNm d'A3G (complet ou  $\Delta$ UTR) en absence ou en présence de Vif.

#### i. ARNr

Une partie des ARN cellulaires totaux extraits est déposé sur gel agarose afin de visualiser les ARNr et confirmer la localisation des ribosomes 80S et des polysomes (figure 50).

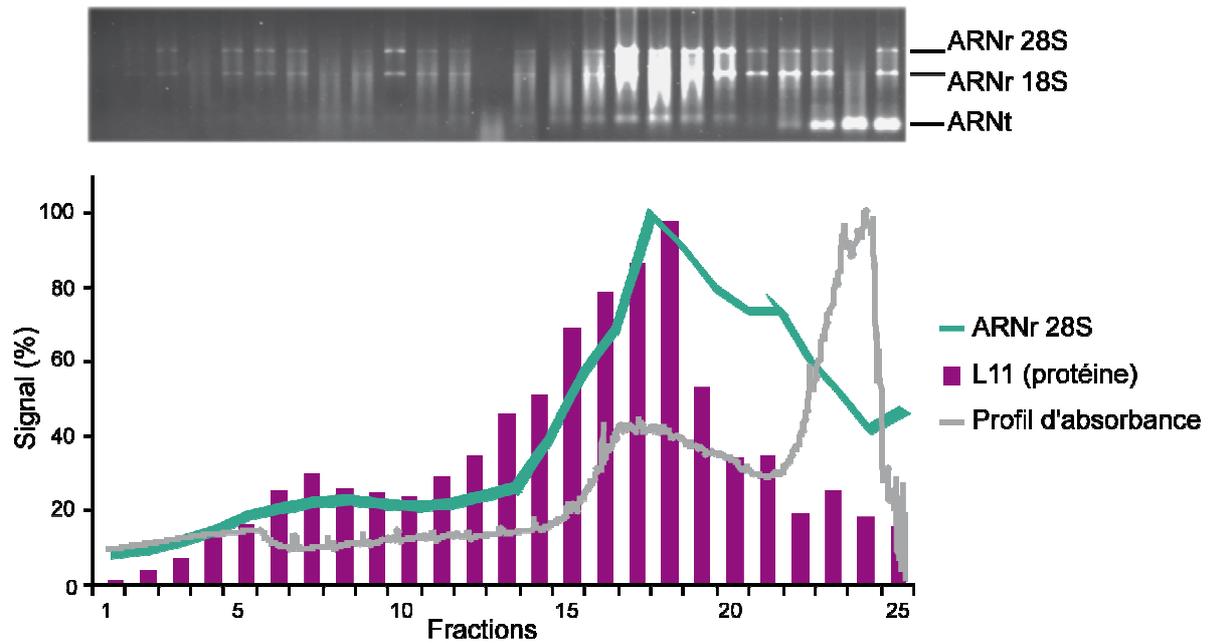


Figure 50: Gel agarose type montrant la distribution des ARNr (vert) dans les gradients de sucrose (a). Moyenne des quantifications effectuées sur la distribution de l'ARNr 28S pour chaque construction analysée. La localisation moyenne de la protéine L11 (histogramme) déterminée précédemment par western blot ainsi que le profil d'absorbance (violet) des fractions d'un gradient sont rappelés.

La majorité des ARNr sont présents dans les fractions 14-25 quelle que soit la construction d'A3G analysée, en absence ou en présence de Vif. Les fractions contenant les ARNr en quantité plus faible (4-13) indiquent la présence des polysomes. Ces résultats combinés avec le profil d'absorbance et la localisation de la protéine L11 montrée par western blot permettent de déterminer la présence des ribosomes 80S dans les fractions 13-19 et les polysomes dans les fractions 4-12.

#### ii. ARNm d'A3G

La répartition des ARNm d'A3G complet (*figure 51*) ou délété des régions UTR (*figure 52*) a été analysée par RT-PCR sur les ARN totaux extraits de chaque fraction du gradient, en absence ou en présence de Vif.

L'ARNm d'A3G en absence de Vif se localise préférentiellement dans les fractions 15 à 25 (*figure 51*). En présence de Vif, l'ARNm d'A3G est en partie relocalisé vers les fractions 7-14. Ce résultat suggère que Vif perturbe l'association de l'ARNm A3G avec ses partenaires induisant un assemblage en complexes de plus haute masse.

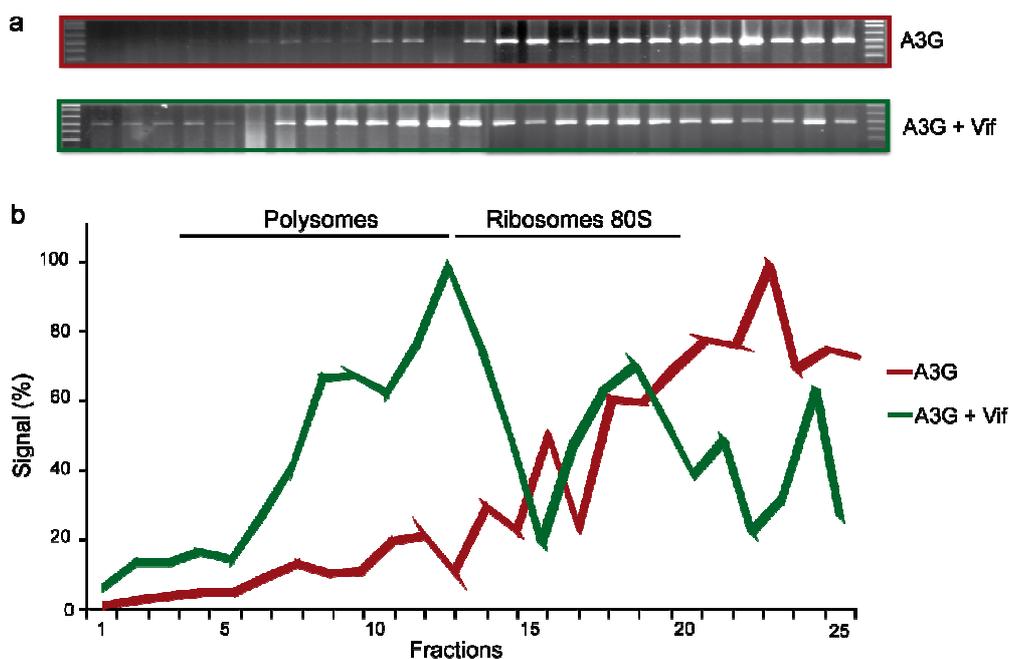


Figure 51 : (a) Gels agarose des RT-PCR effectués sur les fractions de cellules transfectées avec A3G en absence (haut) ou en présence de Vif (bas). (b) Quantification des gels agarose

Comme pour l'ARNm d'A3G entier, en absence de Vif, l'ARNm d'A3G  $\Delta$ UTR se situe majoritairement dans les fractions 17-25 (figure 52). En présence de Vif, l'ARN A3G  $\Delta$ UTR est relocalisé vers les fractions de plus haute densité 1-8. Ainsi, de façon similaire à ce qui est observé pour l'ARNm A3G, Vif induit un changement de localisation de l'ARN dans le gradient suggérant une modification de l'assemblage de l'ARN en complexes dans la cellule.

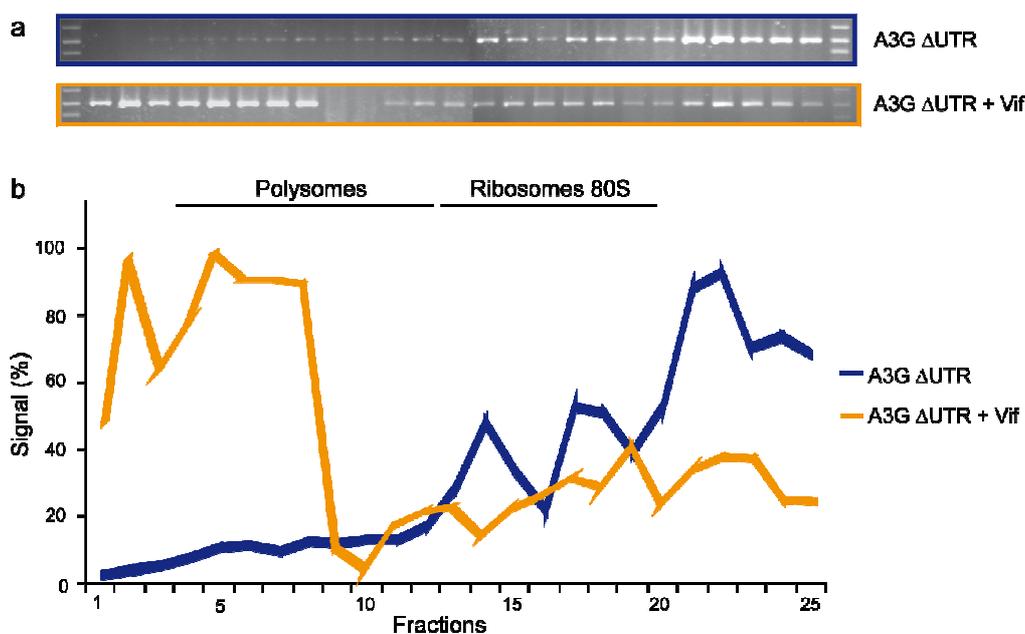


Figure 52 : (a) Gel agarose des RT-PCR effectués sur les cellules transfectées avec A3G  $\Delta$ UTR en absence (en haut) ou en présence (en bas) de Vif et quantification (b)

## C. Discussion

Depuis la découverte du facteur de restriction A3G, peu d'études ont été menées sur l'ARNm d'A3G. Les laboratoires étudiant les relations entre A3G et Vif utilisent en grande majorité des vecteurs d'expression correspondant uniquement à la séquence codante d'A3G. Nos expériences ont permis d'étudier pour la première fois la contribution de chacune des régions composant l'ARNm d'A3G dans l'inhibition de la traduction mise en place par la protéine Vif et de comprendre un peu mieux ce mécanisme.

### 1. Vif inhibe la traduction d'A3G.

- a. Les régions non traduites de l'ARNm d'A3G ne sont pas suffisantes pour permettre une inhibition complète de la traduction.

Nos premières études sur l'implication des UTR de l'ARNm d'A3G dans l'inhibition traductionnelle ont été menées *ex vivo* par des tests luciférase. Ces analyses nous ont permis de nous affranchir de la région codante d'A3G pour nous centrer précisément sur les UTR. Ainsi, nous avons montré que ces régions fusionnées avec l'ORF de la Luciférase ne sont pas très efficaces : Vif WT ou AALA inhibent seulement 10-15 % de la traduction en présence de la 5'UTR ou de la 3'UTR de l'ARNm d'A3G. En revanche, il existe un effet synergique entre les deux régions UTR qui conduit à une légère augmentation de l'inhibition traductionnelle (-20 %) en présence de Vif WT. Cette inhibition, bien que faible, est spécifique des UTR de l'ARNm d'A3G : en effet, la fusion de la Luciférase avec des UTR de l'ARNm de la leptine ne montre aucune inhibition de la traduction en présence de Vif.

- b. La région 5'UTR associée à la séquence codante d'A3G est essentielle pour l'inhibition traductionnelle

La contribution de la région codante d'A3G (associée ou non aux UTR) dans le processus de l'inhibition de la traduction a ensuite été analysée *in vitro* et *ex vivo*.

Nos résultats indiquent que Vif inhibe spécifiquement la traduction de l'ARNm d'A3G (~ -50 %) uniquement en présence de la 5'UTR. Les expériences menées par Stopak *et al.* ont également montré que Vif inhibe la traduction d'A3G d'environ 60 % *in vitro*<sup>200</sup>. Néanmoins, la construction utilisée par ces auteurs ne comporte probablement pas les séquences non traduites de l'ARNm d'A3G (les auteurs utilisant un clone d'expression de la protéine). Ce résultat est quelque peu surprenant au vu des nôtres où la présence de la 5'UTR semble être nécessaire à l'inhibition traductionnelle d'A3G.

Afin d'isoler l'effet traductionnel de la dégradation, les études de traduction ont été effectuées en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132 ou ALLN). L'ajout d'inhibiteur n'induit aucun changement du taux de protéines A3G en présence de Vif dans les expériences *in vitro*, confirmant que la diminution des protéines A3G est principalement la conséquence d'une inhibition traductionnelle. De nombreux articles ont néanmoins montré que la dégradation d'A3G par Vif est un facteur important<sup>45,142,145,190,243</sup>. Nous pouvons expliquer ce résultat par l'absence du protéasome dans les systèmes de réticulocytes de lapin ou par le manque d'un composant essentiel de la machinerie de dégradation. *Ex vivo* et en présence de Vif, le taux de protéines A3G observé est dépendant du vecteur d'expression d'A3G utilisé. En présence de DMSO, les protéines A3G détectées correspondent aux protéines ayant subsisté aux deux mécanismes de régulation : traductionnel et post-traductionnel (dégradation). Le blocage du protéasome dans les cellules permet d'observer uniquement l'inhibition traductionnelle. La présence de la région 5'UTR sur l'ARNm est en effet essentielle pour ce type d'inhibition. Alors que le mécanisme de régulation pour les deux constructions A3G  $\Delta$ 5'UTR et A3G  $\Delta$ UTR intervient principalement au niveau de la dégradation (inhibition levée avec l'ALLN), les deux autres constructions sont, elles, contrôlées majoritairement au niveau de la traduction. Il semblerait que le premier mécanisme de régulation des protéines A3G contrôlé par Vif cible l'ARNm et plus précisément sa traduction. La dégradation est similaire et minoritaire quelle que soit la construction analysée (entre 10 et 20 %). Ces conclusions sont en accord avec les résultats des équipes de Greene et de Strebel qui ont observé que le mécanisme de dégradation d'A3G par le protéasome est minoritaire (~20 %) par rapport au processus d'inhibition traductionnelle (~40 %)<sup>110,200</sup>.

La traduction *in vitro* d'un ARNm correspondant à une isoforme mineure délétée des 255 premiers nucléotides (A3G  $\Delta$ 1-255) est comparable à celle d'un ARN dépourvu de la région 5'UTR entière. Ce résultat suggère que les premiers nucléotides sont importants pour l'inhibition de la traduction. Des exemples connus impliquant les UTR des ARNm indiquent en effet que la partie 5'UTR est une région importante et souvent concernée dans les mécanismes de régulation traductionnelle<sup>232</sup> et que cette séquence est requise dans le processus général de la traduction (essentielle pour la fixation / balayage et reconnaissance du codon initiateur par la sous-unité 40S du ribosome). Les 255 premiers nucléotides de l'ARNm d'A3G pourraient renfermer une structure / séquence nécessaire à la reconnaissance de l'ARN par Vif (*cf partie conclusions & perspectives*). En son absence, l'ARNm A3G serait donc moins efficacement reconnu par la protéine Vif, induisant une absence d'inhibition traductionnelle.

Les UTR d'A3G isolées de la séquence codante sont peu efficaces pour induire une inhibition de la traduction ( $\sim -15 \pm 5 \%$ ). De plus, la traduction d'un ARNm composé uniquement de l'ORF d'A3G suggère que la séquence codante isolée ne représente pas une bonne cible pour la régulation traductionnelle d'A3G. Ces résultats indiquent une nécessité de combinaison de la séquence codante et de la région 5'UTR afin que Vif puisse inhiber la traduction. Une hypothèse pour expliquer ce résultat implique la région 5'UTR qui représenterait un point de nucléation pour Vif. La reconnaissance de la 5'UTR induirait alors un recrutement de Vif tout au long de l'ARNm qui conduirait à une inhibition de la traduction. Cependant, l'effet traductionnel observé semble être dissocié de l'affinité que présente Vif pour un ARN donné. En effet, Vif présente une très bonne affinité pour la région 3'UTR et une affinité plus faible pour la région 5'UTR (*cf partie I*). Les résultats de traduction suggèrent néanmoins que la 3'UTR n'est pas requise et que la séquence codante isolée n'est pas suffisante pour permettre une inhibition traductionnelle malgré l'affinité de Vif pour ces régions. Cette observation sera développée dans la partie « Conclusions & Perspectives ».

Les mécanismes de dégradation et d'inhibition de la traduction permettent de diminuer fortement la quantité de protéines A3G dans la cellule ( $\sim 60 \%$ ). Néanmoins, il demeure une quantité non négligeable de protéines A3G qui pourrait empêcher la production de particules virales infectieuses. Afin de se prémunir de l'action d'A3G, Vif a développé d'autres mécanismes. En effet, il a été proposé que Vif favoriserait la formation des complexes HMM d'A3G, rendant la protéine inactive<sup>79</sup>. Plusieurs études suggèrent également que Vif inhibe l'encapsidation d'A3G dans les virions<sup>109,110,141,190</sup>. Une des hypothèses de l'incorporation d'A3G dans la particule virale serait l'interaction d'A3G avec l'ARNg au niveau de la tige-boucle SL1 requise pour la dimérisation de l'ARN<sup>119</sup>. Nous avons montré au laboratoire que Vif lie l'ARNg au niveau de l'extrémité 5' dont la structure SL1<sup>95</sup>. Vif pourrait donc se lier à la séquence leader de l'ARNg et ainsi masquer les sites de reconnaissance nécessaires à A3G pour être encapsidée.

### c. Le domaine de multimérisation intervient peu ou pas dans l'inhibition traductionnelle

Le comportement de la protéine Vif AALA n'est pas très éloigné de celui de la protéine Vif WT dans les études de traduction. La seule différence entre ces deux protéines est obtenue lorsque les deux régions UTR d'A3G sont fusionnées de part et d'autre de la Luciférase. En effet, l'effet synergique observé pour la protéine Vif WT n'est pas retrouvée dans les expériences menées avec la protéine Vif AALA. Ce résultat suggère que le domaine de

multimérisation de Vif est faiblement impliqué dans l'inhibition traductionnelle d'A3G. Le motif PPLP étant impliqué dans l'interaction de Vif avec les ARNm d'A3G (*cf partie I*), ceci renforce l'hypothèse que la fixation de Vif sur une région particulière de l'ARN ne reflète pas obligatoirement l'importance de cette région dans le mécanisme de régulation traductionnelle.

## 2. Etude du mécanisme de régulation de la traduction d'A3G en présence de Vif

Comme cela a été déjà mentionné, les UTR d'un ARNm peuvent se structurer et être des sites de fixation pour de nombreux facteurs impliqués dans la stabilisation, la localisation, l'initiation ou encore la dégradation des ARNm. La région 5'UTR est une cible fréquente des protéines régulatrices de la traduction<sup>232</sup>. Le cas le plus étudié est celui de l'ARNm de la ferritine permettant le stockage du fer<sup>167</sup> qui présente une séquence 5'UTR près du codon d'initiation, l'élément IRE, reconnu par la protéine IRP1 qui inhibe le balayage du ribosome en absence de fer. Un autre exemple est celui de l'ARNm de p53 (facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire) régulée par la nucléoline<sup>209</sup>. Cette protéine induit et stabilise la formation de structure d'ARNdb dans la séquence 5'UTR de l'ARNm de p53 induisant ainsi une incapacité pour les ribosomes de balayer l'ARNm et conduisant à une inhibition de la traduction. La région 5'UTR étant importante pour l'inhibition de la traduction, Vif pourrait reconnaître spécifiquement des structures présentes sur cette extrémité et induire une diminution de la traduction probablement en interférant au niveau de l'initiation, étape majoritairement régulée dans le contrôle traductionnel des ARNm<sup>56</sup>. Afin de visualiser l'efficacité de la traduction en présence de Vif, nous avons analysé le profil des polysomes présents sur l'ARNm d'A3G délété ou non des UTR, en absence ou en présence de Vif WT. Bien que ces expériences soient préliminaires et demandent confirmation, nos premiers résultats sont encourageants.

### a. Localisation des polysomes et des ribosomes 80S

Le profil d'absorbance des gradients de sucrose ne permet pas de détecter directement les polysomes. Ceci peut s'expliquer par deux raisons principales : par manque de matériel ou par dissociation de la majorité des polysomes. Le manque de matériel semble peu probable compte tenu de la quantité de protéines déposées sur le gradient (4 mg de protéines totales) et de la quantité des ARNr détectés par coloration au BEt. L'explication la plus envisageable est donc une dissociation des polysomes présents sur l'ARNm au profit des ribosomes 80S ou des sous-unités libres (non différenciées des ribosomes 80S par nos études). En effet, les

concentrations de KCl (250 mM) et de MgCl<sub>2</sub> (10 mM) utilisées lors de la lyse et dans les gradients ne sont pas favorables à la préservation des polysomes en cours de traduction sur l'ARNm. De plus, afin de se trouver en phase active de traduction (majorité des polysomes sur les ARNm), les cellules étudiées doivent être au maximum à 80 % de confluence à la fin de l'étape de transfection. Les expériences seront donc à refaire en tenant compte de ces éléments. Néanmoins, par détection de la protéine ribosomique L11 et analyse des ARNr, nous avons déterminé la position des ribosomes 80S (13-19) et des polysomes (4-12) dans le gradient.

b. La protéine A3G s'associe avec les ribosomes ?

En absence ou en présence de Vif, la protéine A3G (issue de l'ARN A3G ± UTR) est présente dans les fractions 12-20, c'est-à-dire les fractions associées aux ribosomes 80S. L'interaction d'A3G avec les ribosomes pourrait accélérer le taux de traduction de certains ARNm. En effet, Huang *et al.* ont proposé qu'A3G inhiberait l'action de certains miARN dans les P bodies et les SG et augmenterait la synthèse des ARNm ciblés probablement en stimulant leur association avec les polysomes<sup>100</sup>. Cependant, la présence d'A3G dans les fractions ribosomiques n'implique pas obligatoirement une interaction. Une autre possibilité est donc qu'A3G s'assemble dans la cellule en complexes de masse équivalente aux ribosomes ce qui expliquerait une co-détection à la fois d'A3G et des ribosomes.

c. La protéine Vif stimule l'assemblage de l'ARNm d'A3G en complexes de haute masse

L'étude de la distribution des ARNm d'A3G dans les fractions des gradients montre, qu'en absence de Vif, l'ARNm d'A3G ± UTR est majoritairement retrouvé dans les fractions 15-25. Ces fractions ne correspondant pas aux polysomes, ce résultat suggère que l'ARNm d'A3G est faiblement traduit. En présence de Vif, l'ARNm complet d'A3G est partiellement relocalisé dans les fractions de plus haute densité où migrent les polysomes. Cependant, nous avons montré que Vif inhibe la traduction d'A3G dans le cas de l'ARNm complet d'A3G. Ce résultat suggère que l'ARNm d'A3G ne s'associe pas avec les polysomes en présence de Vif. Une autre explication serait que Vif fixe l'ARNm d'A3G et le transporte dans un « compartiment » à l'écart de toute traduction où l'ARN s'assemblerait en complexes de haute densité. Il est intéressant de noter qu'en présence d'A3G uniquement, la protéine Vif est retrouvée dans les P bodies et les SG<sup>229</sup>. Il a également été montré qu'A3G fixe son propre ARNm dans les P bodies et les SG<sup>40</sup>. Une des hypothèses est que Vif stimule l'assemblage de l'ARNm en complexes HMM dans les P bodies ou les SG. Le taux d'ARNm d'A3G étant relativement

stable en présence de Vif, l'ARNm d'A3G serait donc stocké dans ces granules sans être dégradé. Les P bodies et les SG contiennent en effet des protéines impliquées dans l'inhibition de la traduction qui permettent la préservation de l'ARNm de la dégradation. En effet, la liaison de la coiffe par le facteur d'initiation eIF4E complexé avec 4E-T bloque le recrutement de eIF4G (empêche l'initiation) et prévient la reconnaissance de la coiffe par les enzymes de « décoiffage ». Les protéines Dhh1p, Pat1p, RCK / p54 et CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding protein) sont également des facteurs généraux de l'inhibition traductionnelle <sup>60</sup>.

L'ARNm A3G  $\Delta$ UTR est lui aussi déplacé après expression de Vif mais de manière différente dans les fractions 1-8. Nous avons montré que même si Vif ne réduit pas la production d'A3G quand son ARNm est délété des UTR, sa traduction n'est pas pour autant stimulée. Cet ARNm n'est donc pas associé aux polysomes de manière renforcée en présence de Vif. De manière similaire à l'ARNm complet d'A3G, Vif ciblerait donc l'ARNm A3G  $\Delta$ UTR et stimulerait son assemblage en complexe de haute densité mais sans en inhiber la traduction. Ces complexes seraient de composition variable selon l'ARNm A3G analysé.

Des expériences complémentaires sont nécessaires (notamment sur les ARN A3G  $\Delta$ 5'UTR et A3G  $\Delta$ 3'UTR) pour la compréhension totale de ce phénomène ainsi que pour élucider le compartiment choisi par Vif pour transporter les ARNm d'A3G loin de la machinerie traductionnelle. De plus, afin de quantifier précisément les différents ARNm dans les fractions, nous allons ré-analyser ces expériences par PCR quantitative.



## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les virus VIH-1 délétés du gène Vif issus de cellules non-permissives (cellules naturelles de l'infection) ne sont pas infectieux. En 1998, des expériences d'hétérocaryons entre une cellule permissive et une cellule non-permissive ont permis d'affirmer l'existence d'un facteur de restriction présent uniquement dans les cellules non-permissives et contrecarré par la protéine Vif<sup>136,193</sup>. Cinq ans plus tard, ce facteur de restriction a été identifié : A3G<sup>189</sup>. Dès lors, de nombreux laboratoires ont étudié la manière dont A3G inhibe la production de particules virales infectieuses et quels sont les mécanismes développés par Vif pour contourner cette défense immunitaire innée.

Parmi ces mécanismes, il a été montré que Vif inhibe la traduction d'A3G<sup>110,141,200</sup>. Cependant, le processus lui-même n'a jamais été étudié. Mon travail de thèse a permis de mieux comprendre le mécanisme de régulation de la traduction d'A3G par la protéine Vif du VIH-1.

### I. Vif : une protéine virale flexible et multimérique

#### A. Vif : une protéine intrinsèquement non structurée ?

Nous avons montré que la protéine Vif est majoritairement structurée sous forme de feuillets  $\beta$  mais qu'une large partie est également totalement désorganisée. Cette région déstructurée semble se localiser principalement dans le domaine CTD<sup>7,176</sup>. Il a été proposé que l'extrémité C-terminale de Vif s'organise en présence de ses partenaires<sup>7,176</sup>. La protéine Vif a tendance à s'agréger probablement par association des régions hydrophobes non-structurées. Cependant, nous avons montré que les agrégats se dissocient (au moins partiellement) en présence de l'ARNm d'A3G afin de le complexer. Ce changement d'état pourrait s'expliquer par une structuration de la protéine Vif induite par la fixation aux ARN. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer des études de CD sur la protéine Vif en présence de ses partenaires protéiques (ElonginB / C, Cullin 5, A3G...) ou encore d'ARN (ARNg ou ARNm d'A3G). De plus, les expériences de CD ne permettent d'avoir qu'une estimation de la structure de Vif, une structure tridimensionnelle (cristallographie aux rayons X ou RMN) est donc nécessaire. Depuis de nombreuses années, plusieurs laboratoires ont tenté de cristalliser Vif. Les récents travaux ayant montré que Vif est une protéine partiellement désorganisée qui se structure probablement en présence de ses ligands<sup>7,176</sup> pourraient aider à la conception de nouvelles stratégies de cristallisation. En effet, il semble approprié de tenter de co-exprimer la protéine Vif avec un

de ses partenaires puis de purifier le complexe. Ce protocole devrait permettre de réduire l'agrégation de la protéine Vif et faciliter ainsi le processus de purification puis de cristallisation.

## B. Importance du motif PPLP pour la formation de multimères de la protéine Vif

Nos expériences ont permis de confirmer que la protéine Vif est une protéine multimérique et que le domaine PPLP est nécessaire à l'oligomérisation de Vif. En effet, nous avons montré que la protéine Vif WT s'organise en complexes de 6-10 protéines alors qu'une protéine mutée dans le motif PPLP perd majoritairement sa capacité à multimériser (formation de dimères ou de trimères). La substitution des résidus proline de cette séquence en alanine ne suffit pas à abroger totalement l'auto-assemblage de Vif. Ce résultat suggère que d'autres résidus en dehors du domaine PPLP participent à la multimérisation. De plus, Reingewertz *et al.* ont montré que le CTD s'assemble sous forme de dimère ou de trimère<sup>176</sup>, indiquant que les autres résidus impliqués dans la multimérisation doivent se trouver dans le NTD. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier des mutants de Vif délétés du domaine CTD et examiner leur capacité à s'assembler, soit par DLS soit par chromatographie d'exclusion.

## II. Vif lie l'ARNm d'A3G et inhibe sa traduction

Nous avons montré que Vif se fixe sur l'ARNm d'A3G avec une coopérativité moyenne et que le domaine de multimérisation PPLP semble impliqué dans cette liaison et notamment dans la spécificité d'interaction. Ce dernier résultat sera confirmé par les études de spectroscopie de fluorescence avec la protéine Vif AALA sur l'ARNm d'A3G mais également sur l'ARNg du VIH-1. La protéine Vif semble ne se fixer qu'au niveau de trois sites sur la 5'UTR de l'ARNm d'A3G et présenter le moins d'affinité pour cette séquence. Cependant, nos expériences de traduction suggèrent que cette région est essentielle à l'inhibition de la synthèse d'A3G. De plus, la capacité de Vif à multimériser ne paraît pas être impliquée dans ce mécanisme. Ces résultats indiquent que le nombre des sites de fixation de Vif et / ou son affinité pour un ARN ou un fragment d'ARN *in vitro*, n'est pas obligatoirement un gage de son importance dans l'inhibition traductionnelle. En effet, il a été montré que la liaison d'une seule protéine sur la séquence 5'UTR d'un ARNm pouvait être suffisante pour bloquer la progression du ribosome (lors de l'étape de balayage) en stabilisant une structure secondaire (exemple de la protéine IRP1 et de l'ARNm de la ferritine<sup>167</sup>). Il ne serait donc pas indispensable que Vif recouvre entièrement l'ARN ou que Vif ait une forte affinité pour une région pour inhiber la traduction. La fixation de Vif au niveau d'un seul site de haute

affinité sur la région 5'UTR de l'ARNm serait donc suffisante pour la régulation traductionnelle.

### A. Identification des résidus présents sur l'ARNm d'A3G essentiels à la fixation et à l'inhibition traductionnelle par la protéine Vif

L'étude d'une isoforme minoritaire de l'ARNm d'A3G dépourvu des 255 premiers nts montre que les résidus restants ne sont pas suffisants pour permettre à Vif de bloquer la traduction. Les études structurales des UTR de l'ARNm et d'empreinte de Vif sur ces régions indiquent que la 5'UTR s'organise en trois tiges-boucles distinctes et que Vif se fixe majoritairement sur le domaine 5'D3 englobant les nts 208 à 293. La délétion des 255 premiers résidus induit un remaniement structural et par conséquent une disparition de cette structure secondaire. Bien qu'un des sites de fixation de Vif soit toujours inclus (nts 258-268) dans l'isoforme mineure, il est possible que Vif reconnaisse en premier lieu la structure pour enfin se fixer spécifiquement sur son site et inhiber la traduction. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la fixation de la protéine Vif sur un mutant de l'ARNm d'A3G délété des 200 premiers nts qui préserverait le dernier domaine structuré. Simultanément, la traduction de cette isoforme devra être étudiée en présence de Vif dans les systèmes *in vitro* et *ex vivo*. De plus, afin de vérifier l'importance de la séquence reconnue par Vif par rapport à la structure, des mutations compensatoires des nts 212-219 et 258-268 (sites de fixation de Vif) et des résidus partenaires pour la formation de l'hélice (résidus 282-289 et 234-239, respectivement) pourraient être effectuées. L'importance des autres sites de fixation de Vif sera également testée en mutant les résidus impliqués comme décrits ci-dessus. Les études de fixation et de traduction seront alors entreprises sur ces constructions comme précédemment.

Les sites de fixation de la protéine Vif ont été identifiés par les études d'empreinte en utilisant uniquement les sondes enzymatiques (RNases A, T1 et V1). Afin de compléter la détection éventuelle de sites de liaison supplémentaires, il serait intéressant d'utiliser des sondes chimiques comme le Fe(II)-EDTA ou NMIA<sup>233</sup> (spécifique du squelette sucre-phosphate). De plus, la structure des UTR de l'ARNm d'A3G a uniquement été étudiée. Une analyse approfondie de l'organisation secondaire de l'ARNm complet serait également une expérience à mener.

## B. Etude des domaines de la protéine Vif responsables de l'inhibition de la traduction d'A3G

La protéine Vif fixe l'ARN par la présence d'un domaine de liaison localisé en N-terminal<sup>118,247</sup>. Cependant, nous ne savons pas si ce domaine est suffisant pour permettre une inhibition de la traduction d'A3G. De plus, la protéine Vif est phosphorylée sur divers résidus et cette modification est importante pour son activité ; la mutation de certains de ces sites (T<sup>96</sup> et S<sup>144</sup>) inhibant la réplication virale<sup>241,242</sup>. Il serait donc intéressant d'effectuer des études de mutagenèse dirigée afin d'étudier les résidus impliqués dans l'inhibition de la traduction.

Les expériences de traduction *ex vivo* que nous avons réalisées ont été effectuées en présence d'un clone d'expression de la protéine Vif. Afin de se rapprocher un peu plus du contexte naturel, il sera primordial de refaire les études précédemment menées dans un contexte viral entier. Ainsi, la traduction des différentes constructions de l'ARNm d'A3G sera analysée en présence d'un clone moléculaire classique (exemple : pNL4.3) délété ou non de Vif. De plus, l'encapsidation d'A3G dans les particules virales du VIH-1 sera étudiée afin de détecter une éventuelle différence du taux d'incorporation d'A3G en fonction de la construction utilisée. Ces expériences pourraient nous permettre d'estimer l'importance du mécanisme de régulation des protéines A3G (inhibition traductionnelle et dégradation) par rapport aux autres mécanismes utilisés par la protéine Vif pour contrecarrer A3G (formation des complexes HMM, compétition au niveau des sites d'encapsidation au niveau de l'ARNg...).

## III. Vif stimule l'assemblage de l'ARNm d'A3G en complexe de haut poids moléculaire

Nous avons montré que la traduction d'A3G est inhibée par la protéine Vif et que la présence de la 5'UTR sur l'ARNm d'A3G est essentielle à ce mécanisme. Néanmoins, le processus exact de l'inhibition reste inconnu. Dans le but d'élucider la voie par laquelle Vif bloque la synthèse d'A3G, nous avons étudié le profil des polysomes sur l'ARNm en présence de Vif. Bien que ces expériences demandent à être confirmées et ré-analysées, notamment par PCR quantitative, ces résultats semblent indiquer que Vif induit l'association de l'ARNm (complet ou délété des UTR) d'A3G en complexes de haut poids moléculaire. Ces complexes seraient différents et dépendants de la construction de l'ARNm d'A3G compte tenu que la traduction de l'ARNm A3G  $\Delta$ UTR n'est pas inhibée. Ces études ont été réalisées

en présence d'une concentration en sels et magnésium qui pourraient être suffisantes pour dissocier les ribosomes présents sur les ARNm. Afin de valider nos conclusions, ces mêmes expériences seront refaites en présence de sels et de magnésium en concentrations plus faibles. De plus, nos premières études ont été effectuées sur deux des quatre constructions dont nous disposons au laboratoire. Ces mêmes analyses devront donc être effectuées avec les deux autres ARN d'A3G (A3G  $\Delta$ 5'UTR et A3G  $\Delta$ 3'UTR) afin de valider l'importance de la région 5'UTR dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle mis en place par Vif et ainsi de constater l'effet de la présence de la 5'UTR sur l'ARNm dans la formation de l'un ou l'autre type de complexes de haute densité.

La protéine A3G, son ARNm ainsi que la protéine Vif (en présence uniquement d'A3G) sont localisées dans les P bodies et les SG<sup>40,70,125,229</sup>. Une des hypothèses que nous avons formulée est que Vif transporte l'ARNm d'A3G dans les P bodies et / ou les SG où il est séquestré à l'écart de la machinerie traductionnelle. Cependant, nous ignorons si l'association de l'ARNm en complexe est une conséquence de sa localisation dans les P bodies et / ou les SG ou si l'ARNm est préalablement associé en complexe pour le transport ; complexe qui sera par la suite éventuellement complété par les protéines de ces granules. De manière intéressante, dans la cellule, la traduction de certains ARNm s'effectue de manière localisée (ARNm *oskar*, *bicoid*...). Ce mécanisme est impliqué dans le développement et l'embryogénèse (notamment chez la drosophile et le xénope), la croissance axonale dans les neurones ou encore dans la migration cellulaire<sup>20</sup>. L'adressage des ARNm est médié par un complexe ribonucléoprotéique appelé granule de transport. Certaines protéines composant ces granules sont communes à celles retrouvées dans les P bodies ou les SG et représentent le core du complexe où se fixent, dans un second temps, les facteurs spécifiques de chaque ARNm<sup>20</sup>. Ces protéines régulent le mouvement, inhibent la traduction durant le transport, jouent sur la stabilité / dégradation de l'ARNm ou permettent l'association de plusieurs ARNm identiques ou différents<sup>20</sup>. La purification des complexes contenant l'ARNm d'A3G (complet ou composé uniquement de l'ORF) nous permettra d'identifier les protéines et / ou acides nucléiques impliqués dans chacun des complexes. L'assemblage en complexe de l'ARNm A3G  $\Delta$ UTR n'empêchant pas la traduction, la comparaison des constituants des deux complexes nous permettra d'identifier les protéines spécifiques de celui contenant l'ARNm complet d'A3G et d'obtenir une première indication sur le mécanisme de l'inhibition traductionnelle de l'ARNm d'A3G.

La traduction peut être inhibée à différents niveaux (initiation, élongation, terminaison) et de diverses manières : blocage de la reconnaissance de la coiffe par eIF4F, de la circularisation de l'ARNm ou de l'assemblage / progression / relargage du ribosome, modulation de la taille de la queue polyA, multimérisation de l'ARNm... La plupart des ARNm régulés au

niveau traductionnel sont contrôlés au niveau de l'initiation <sup>56</sup>. Afin de savoir si Vif inhibe la traduction au niveau de cette étape, des expériences *in vitro* avec des complexes d'initiation reconstitués seront menées. L'interaction de Vif avec les facteurs d'initiation sera également testée par des études de co-immunoprécipitation.

Afin de valider notre hypothèse de localisation du complexe contenant l'ARNm d'A3G dans les P bodies et / ou les SG, des expériences de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) seront effectuées. La localisation de l'ARNm dans la cellule sera confirmée par superposition du signal avec celui obtenu par immuno-fluorescence de protéines spécifiques de chacun des compartiments (DCP1 pour les P bodies et PABP pour les SG par exemple). Ces études seront réalisées avec les différentes constructions de l'ARNm d'A3G pour visualiser une éventuelle différence de localisation de l'ARN dans la cellule. Nos expériences de western blot sur les fractions issues des gradients de sucrose ont également montré que la protéine A3G se localise dans les fractions contenant le ribosome 80S. Dans le but d'étudier une éventuelle interaction avec le ribosome, il serait intéressant de mener dans un premier temps des expériences de co-immunoprécipitation entre la protéine A3G et les protéines ribosomiques (L11 par exemple, pour lequel nous disposons déjà d'un anticorps).

La protéine A3G s'assemble également en complexes de haut poids moléculaire (HMM) dans les P bodies et les SG qui peuvent être convertis en LMM par traitement aux RNases. Ces complexes HMM ne présentent pas d'activité désaminase et il a été proposé que Vif stimule l'assemblage d'A3G en HMM <sup>79</sup>. Afin de tester une éventuelle variation de l'assemblage des protéines A3G issues de nos différentes constructions, il serait intéressant de purifier ces complexes HMM en absence et en présence de Vif et d'analyser leur composition en protéines et acides nucléiques.

A3G n'est pas l'unique protéine de la famille des cytosines désaminases à présenter une activité anti-rétrovirale contre le VIH-1. En effet, une autre protéine, A3F a également été identifiée comme facteur de restriction. De manière similaire à A3G, A3F est dégradée par la protéine Vif *via* la voie de l'ubiquitine / protéasome. Il serait donc intéressant d'étudier si Vif inhibe également sa traduction. Des études préliminaires dans notre laboratoire ont dès lors montré que Vif fixe l'ARNm d'A3F. De plus amples analyses sont encore à mener afin de découvrir si Vif bloque effectivement la traduction d'A3F et si le mécanisme employé est similaire à celui utilisé pour inhiber la production de la protéine A3G.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adamson, C. S., and Freed, E. O.:** Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol*, 55: 347-87, 2007.
2. **Alcami, A., and Koszinowski, U. H.:** Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol*, 8(9): 410-8, 2000.
3. **Anderson, E. C., and Lever, A. M.:** Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol*, 80(21): 10478-86, 2006.
4. **Arakawa, T.; Ejima, D.; Tsumoto, K.; Obeyama, N.; Tanaka, Y.; Kita, Y.; and Timasheff, S. N.:** Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem*, 127(1-2): 1-8, 2007.
5. **Arhel, N. J.; Souquere-Besse, S.; Munier, S.; Souque, P.; Guadagnini, S.; Rutherford, S.; Prevost, M. C.; Allen, T. D.; and Charneau, P.:** HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J*, 26(12): 3025-37, 2007.
6. **Arrigo, S. J., and Chen, I. S.:** Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev*, 5(5): 808-19, 1991.
7. **Auclair, J. R.; Green, K. M.; Shandilya, S.; Evans, J. E.; Somasundaran, M.; and Schiffer, C. A.:** Mass spectrometry analysis of HIV-1 Vif reveals an increase in ordered structure upon oligomerization in regions necessary for viral infectivity. *Proteins*, 69(2): 270-84, 2007.
8. **Baba, M.:** Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res*, 71(2-3): 301-6, 2006.
9. **Bach, D.; Peddi, S.; Mangeat, B.; Lakkaraju, A.; Strub, K.; and Trono, D.:** Characterization of APOBEC3G binding to 7SL RNA. *Retrovirology*, 5: 54, 2008.
10. **Balaji, S.; Kalpana, R.; and Shapshak, P.:** Paradigm development: comparative and predictive 3D modeling of HIV-1 Virion Infectivity Factor (Vif). *Bioinformatics*, 1(8): 290-309, 2006.
11. **Barboric, M.; Nissen, R. M.; Kanazawa, S.; Jabrane-Ferrat, N.; and Peterlin, B. M.:** NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, 8(2): 327-37, 2001.
12. **Barraud, P.; Paillart, J. C.; Marquet, R.; and Tisne, C.:** Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr HIV Res*, 6(2): 91-9, 2008.
13. **Barre-Sinoussi, F. et al.:** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599): 868-71, 1983.
14. **Bennasser, Y.; Yeung, M. L.; and Jeang, K. T.:** HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem*, 281(38): 27674-8, 2006.
15. **Bennett, R. P.; Presnyak, V.; Wedekind, J. E.; and Smith, H. C.:** Nuclear Exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding. *J Biol Chem*, 283(12): 7320-7, 2008.
16. **Bennett, R. P.; Salter, J. D.; Liu, X.; Wedekind, J. E.; and Smith, H. C.:** APOBEC3G subunits self-associate via the C-terminal deaminase domain. *J Biol Chem*, 283(48): 33329-36, 2008.

17. **Berger, E. A.; Murphy, P. M.; and Farber, J. M.:** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17: 657-700, 1999.
18. **Bernacchi, S.; Henriot, S.; Dumas, P.; Paillart, J. C.; and Marquet, R.:** RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: a fluorescence study. *J Biol Chem*, 282(36): 26361-8, 2007.
19. **Berthoux, L.; Sebastian, S.; Sokolskaja, E.; and Luban, J.:** Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(41): 14849-53, 2005.
20. **Besse, F., and Ephrussi, A.:** Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12): 971-80, 2008.
21. **Bogerd, H. P., and Cullen, B. R.:** Single-stranded RNA facilitates nucleocapsid: APOBEC3G complex formation. *Rna*, 14(6): 1228-36, 2008.
22. **Bolinger, C., and Boris-Lawrie, K.:** Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology*, 6: 8, 2009.
23. **Bowie, A. G., and Unterholzner, L.:** Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 8(12): 911-22, 2008.
24. **Brass, A. L.; Dykxhoorn, D. M.; Benita, Y.; Yan, N.; Engelman, A.; Xavier, R. J.; Lieberman, J.; and Elledge, S. J.:** Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 319(5865): 921-6, 2008.
25. **Burnett, A., and Spearman, P.:** APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J Virol*, 81(10): 5000-13, 2007.
26. **Camaur, D., and Trono, D.:** Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol*, 70(9): 6106-11, 1996.
27. **Cancio, R.; Spadari, S.; and Maga, G.:** Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J*, 383(Pt. 3): 475-82, 2004.
28. **Carr, J. M.; Davis, A. J.; Coolen, C.; Cheney, K.; Burrell, C. J.; and Li, P.:** Vif-deficient HIV reverse transcription complexes (RTCs) are subject to structural changes and mutation of RTC-associated reverse transcription products. *Virology*, 351(1): 80-91, 2006.
29. **Carr, J. M.; Davis, A. J.; Feng, F.; Burrell, C. J.; and Li, P.:** Cellular interactions of virion infectivity factor (Vif) as potential therapeutic targets: APOBEC3G and more? *Curr Drug Targets*, 7(12): 1583-93, 2006.
30. **Carroll, M. C.:** Complement and humoral immunity. *Vaccine*, 26 Suppl 8: I28-33, 2008.
31. **Carter, C. W., Jr.:** The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution. *Biochimie*, 77(1-2): 92-8, 1995.
32. **Cavrois, M.; Neidleman, J.; and Greene, W. C.:** The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog*, 4(6): e1000051, 2008.
33. **Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M.; and Kim, P. S.:** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 89(2): 263-73, 1997.

34. **Chelico, L.; Sacho, E. J.; Erie, D. A.; and Goodman, M. F.:** A model for oligomeric regulation of APOBEC3G cytosine deaminase-dependent restriction of HIV. *J Biol Chem*, 283(20): 13780-91, 2008.
35. **Chen, K. M.; Harjes, E.; Gross, P. J.; Fahmy, A.; Lu, Y.; Shindo, K.; Harris, R. S.; and Matsuo, H.:** Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature*, 452(7183): 116-9, 2008.
36. **Chendrimada, T. P.; Gregory, R. I.; Kumaraswamy, E.; Norman, J.; Cooch, N.; Nishikura, K.; and Shiekhattar, R.:** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051): 740-4, 2005.
37. **Chene, P.:** The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*, 20(21): 2611-7, 2001.
38. **Chiu, Y. L., and Greene, W. C.:** The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol*, 26: 317-53, 2008.
39. **Chiu, Y. L.; Soros, V. B.; Kreisberg, J. F.; Stopak, K.; Yonemoto, W.; and Greene, W. C.:** Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*, 435(7038): 108-14, 2005.
40. **Chiu, Y. L.; Witkowska, H. E.; Hall, S. C.; Santiago, M.; Soros, V. B.; Esnault, C.; Heidmann, T.; and Greene, W. C.:** High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42): 15588-93, 2006.
41. **Chun, T. W. et al.:** Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387(6629): 183-8, 1997.
42. **Cimarelli, A.; Sandin, S.; Hoglund, S.; and Luban, J.:** Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol*, 74(7): 3046-57, 2000.
43. **Ciuffi, A.; Llano, M.; Poeschla, E.; Hoffmann, C.; Leipzig, J.; Shinn, P.; Ecker, J. R.; and Bushman, F.:** A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med*, 11(12): 1287-9, 2005.
44. **Clavel, F. et al.:** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761): 343-6, 1986.
45. **Conticello, S. G.; Harris, R. S.; and Neuberger, M. S.:** The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol*, 13(22): 2009-13, 2003.
46. **Cullen, B. R.:** Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature*, 433(7021): 26-7, 2005.
47. **Cullen, B. R.:** Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, 28(8): 419-24, 2003.
48. **D'Agostino, D. M.; Felber, B. K.; Harrison, J. E.; and Pavlakis, G. N.:** The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol*, 12(3): 1375-86, 1992.
49. **Dang, Y.; Wang, X.; Esselman, W. J.; and Zheng, Y. H.:** Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol*, 80(21): 10522-33, 2006.
50. **Dannull, J.; Surovoy, A.; Jung, G.; and Moelling, K.:** Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues. *Embo J*, 13(7): 1525-33, 1994.

51. **Dau, B., and Holodniy, M.:** Novel targets for antiretroviral therapy: clinical progress to date. *Drugs*, 69(1): 31-50, 2009.
52. **Davis, L. E. et al.:** Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology*, 42(9): 1736-9, 1992.
53. **Dayton, A. I.; Sodroski, J. G.; Rosen, C. A.; Goh, W. C.; and Haseltine, W. A.:** The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell*, 44(6): 941-7, 1986.
54. **Delelis, O.; Parissi, V.; Leh, H.; Mbemba, G.; Petit, C.; Sonigo, P.; Deprez, E.; and Mouscadet, J. F.:** Efficient and specific internal cleavage of a retroviral palindromic DNA sequence by tetrameric HIV-1 integrase. *PLoS ONE*, 2(7): e608, 2007.
55. **Dettenhofer, M.; Cen, S.; Carlson, B. A.; Kleiman, L.; and Yu, X. F.:** Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol*, 74(19): 8938-45, 2000.
56. **Diaz-Guerra, E.; Vernal, R.; Cantero, W.; Mullner, E. W.; and Garcia-Sanz, J. A.:** Translation controlled mRNAs: new drug targets in infectious diseases? *Infect Disord Drug Targets*, 8(4): 252-61, 2008.
57. **Ding, S. W., and Voinnet, O.:** Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3): 413-26, 2007.
58. **Donahue, J. P.; Vetter, M. L.; Mukhtar, N. A.; and D'Aquila, R. T.:** The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology*, 377(1): 49-53, 2008.
59. **Eckstein, D. A. et al.:** HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity*, 15(4): 671-82, 2001.
60. **Eulalio, A.; Behm-Ansmant, I.; and Izaurralde, E.:** P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1): 9-22, 2007.
61. **Felice, B.; Cattoglio, C.; Cittaro, D.; Testa, A.; Miccio, A.; Ferrari, G.; Luzi, L.; Recchia, A.; and Mavilio, F.:** Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. *PLoS ONE*, 4(2): e4571, 2009.
62. **Finlay, B. B., and McFadden, G.:** Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, 124(4): 767-82, 2006.
63. **Fisher, A. G. et al.:** The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature*, 320(6060): 367-71, 1986.
64. **Fletcher, T. M., 3rd; Brichacek, B.; Sharova, N.; Newman, M. A.; Stivahtis, G.; Sharp, P. M.; Emerman, M.; Hahn, B. H.; and Stevenson, M.:** Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *Embo J*, 15(22): 6155-65, 1996.
65. **Fu, W.; Sanders-Beer, B. E.; Katz, K. S.; Maglott, D. R.; Pruitt, K. D.; and Ptak, R. G.:** Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue): D417-22, 2009.
66. **Fujii, K.; Hurley, J. H.; and Freed, E. O.:** Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat Rev Microbiol*, 5(12): 912-6, 2007.
67. **Furukawa, A. et al.:** Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *Embo J*, 28(4): 440-51, 2009.

68. **Gallego, J. et al.:** Rev binds specifically to a purine loop in the SL1 region of the HIV-1 leader RNA. *J Biol Chem*, 278(41): 40385-91, 2003.
69. **Gallo, R. C. et al.:** Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599): 865-7, 1983.
70. **Gallois-Montbrun, S.; Kramer, B.; Swanson, C. M.; Byers, H.; Lynham, S.; Ward, M.; and Malim, M. H.:** Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol*, 81(5): 2165-78, 2007.
71. **Ganser-Pornillos, B. K.; Yeager, M.; and Sundquist, W. I.:** The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 18(2): 203-17, 2008.
72. **Gantier, M. P., and Williams, B. R.:** The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(5-6): 363-71, 2007.
73. **Garcia, J. V., and Miller, A. D.:** Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol*, 143(1): 52-5, 1992.
74. **Garza, A. S.; Ahmad, N.; and Kumar, R.:** Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation. *Life Sci*, 84(7-8): 189-93, 2009.
75. **Gelderblom, H. C.; Vatakis, D. N.; Burke, S. A.; Lawrie, S. D.; Bristol, G. C.; and Levy, D. N.:** Viral complementation allows HIV-1 replication without integration. *Retrovirology*, 5: 60, 2008.
76. **Gheysen, D.; Jacobs, E.; de Foresta, F.; Thiriart, C.; Francotte, M.; Thines, D.; and De Wilde, M.:** Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*, 59(1): 103-12, 1989.
77. **Goff, S. P.:** Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(4): 253-63, 2007.
78. **Goffinet, C. et al.:** HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe*, 5(3): 285-97, 2009.
79. **Goila-Gaur, R.; Khan, M. A.; Miyagi, E.; Kao, S.; Opi, S.; Takeuchi, H.; and Strebel, K.:** HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology*, 372(1): 136-46, 2008.
80. **Goila-Gaur, R.; Khan, M. A.; Miyagi, E.; and Strebel, K.:** Differential sensitivity of "old" versus "new" APOBEC3G to human immunodeficiency virus type 1 vif. *J Virol*, 83(2): 1156-60, 2009.
81. **Gomez, C., and Hope, T. J.:** The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*, 7(5): 621-6, 2005.
82. **Gooch, B. D., and Cullen, B. R.:** Functional domain organization of human APOBEC3G. *Virology*, 379(1): 118-24, 2008.
83. **Gotte, M.; Li, X.; and Wainberg, M. A.:** HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys*, 365(2): 199-210, 1999.
84. **Gottlinger, H. G.; Sodroski, J. G.; and Haseltine, W. A.:** 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(15): 5781-5, 1989.
85. **Gougeon, M. L.:** Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol*, 3(5): 392-404, 2003.

86. **Gould, S. J.; Booth, A. M.; and Hildreth, J. E.:** The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19): 10592-7, 2003.
87. **Gray, N. K., and Hentze, M. W.:** Regulation of protein synthesis by mRNA structure. *Mol Biol Rep*, 19(3): 195-200, 1994.
88. **Greatorex, J.; Gallego, J.; Varani, G.; and Lever, A.:** Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. *J Mol Biol*, 322(3): 543-57, 2002.
89. **Groom, H. C.; Anderson, E. C.; Dangerfield, J.; and Lever, A. M.:** Rev regulates translation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 RNAs. *J Gen Virol*, 2009.
90. **Hamilton, G.:** Virology: the gene weavers. *Nature*, 441(7094): 683-5, 2006.
91. **Han, Y.; Wang, X.; Dang, Y.; and Zheng, Y. H.:** Demonstration of a novel HIV-1 restriction phenotype from a human T cell line. *PLoS ONE*, 3(7): e2796, 2008.
92. **Harboe, M., and Mollnes, T. E.:** The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med*, 12(4): 1074-84, 2008.
93. **Harris, R. S., and Liddament, M. T.:** Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol*, 4(11): 868-77, 2004.
94. **Hatzioannou, T.; Perez-Caballero, D.; Yang, A.; Cowan, S.; and Bieniasz, P. D.:** Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29): 10774-9, 2004.
95. **Henriet, S.; Richer, D.; Bernacchi, S.; Decroly, E.; Vigne, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Paillart, J. C.; and Marquet, R.:** Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol*, 354(1): 55-72, 2005.
96. **Henriet, S.; Sinck, L.; Bec, G.; Gorelick, R. J.; Marquet, R.; and Paillart, J. C.:** Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, 35(15): 5141-53, 2007.
97. **Hladik, F.; Lentz, G.; Akridge, R. E.; Peterson, G.; Kelley, H.; McElroy, A.; and McElrath, M. J.:** Dendritic cell-T-cell interactions support coreceptor-independent human immunodeficiency virus type 1 transmission in the human genital tract. *J Virol*, 73(7): 5833-42, 1999.
98. **Ho, D. D., and Bieniasz, P. D.:** HIV-1 at 25. *Cell*, 133(4): 561-5, 2008.
99. **Holden, L. G.; Prochnow, C.; Chang, Y. P.; Bransteitter, R.; Chelico, L.; Sen, U.; Stevens, R. C.; Goodman, M. F.; and Chen, X. S.:** Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature*, 456(7218): 121-4, 2008.
100. **Huang, J.; Liang, Z.; Yang, B.; Tian, H.; Ma, J.; and Zhang, H.:** Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem*, 282(46): 33632-40, 2007.
101. **Huang, M.; Orenstein, J. M.; Martin, M. A.; and Freed, E. O.:** p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol*, 69(11): 6810-8, 1995.
102. **Huthoff, H.; Autore, F.; Gallois-Montbrun, S.; Fraternali, F.; and Malim, M. H.:** RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog*, 5(3): e1000330, 2009.

103. **Ishikawa, J. et al.:** Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics*, 26(3): 527-34, 1995.
104. **Jacks, T.; Power, M. D.; Masiarz, F. R.; Luciw, P. A.; Barr, P. J.; and Varmus, H. E.:** Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 331(6153): 280-3, 1988.
105. **Janeway, C. A., Jr.:** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13(1): 11-6, 1992.
106. **Jarmuz, A.; Chester, A.; Bayliss, J.; Gisbourne, J.; Dunham, I.; Scott, J.; and Navaratnam, N.:** An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, 79(3): 285-96, 2002.
107. **Johnson, W. E., and Sawyer, S. L.:** Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics*, 61(3): 163-76, 2009.
108. **Kadowaki, N.:** Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int*, 56(3): 193-9, 2007.
109. **Kao, S.; Goila-Gaur, R.; Miyagi, E.; Khan, M. A.; Opi, S.; Takeuchi, H.; and Strebel, K.:** Production of infectious virus and degradation of APOBEC3G are separable functional properties of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Virology*, 369(2): 329-39, 2007.
110. **Kao, S.; Khan, M. A.; Miyagi, E.; Plishka, R.; Buckler-White, A.; and Strebel, K.:** The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol*, 77(21): 11398-407, 2003.
111. **Kao, S. Y.; Calman, A. F.; Luciw, P. A.; and Peterlin, B. M.:** Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330(6147): 489-93, 1987.
112. **Karacostas, V.; Wolffe, E. J.; Nagashima, K.; Gonda, M. A.; and Moss, B.:** 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(2): 661-71, 1993.
113. **Kataropoulou, A.; Bovolenta, C.; Belfiore, A.; Trabatti, S.; Garbelli, A.; Porcellini, S.; Lupo, R.; and Maga, G.:** Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res*, 2009.
114. **Kazazian, H. H., Jr.:** Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303(5664): 1626-32, 2004.
115. **Keckesova, Z.; Ylinen, L. M.; and Towers, G. J.:** The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29): 10780-5, 2004.
116. **Kedersha, N. et al.:** Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169(6): 871-84, 2005.
117. **Kelly, J.; Beddall, M. H.; Yu, D.; Iyer, S. R.; Marsh, J. W.; and Wu, Y.:** Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology*, 372(2): 300-12, 2008.
118. **Khan, M. A.; Aberham, C.; Kao, S.; Akari, H.; Gorelick, R.; Bour, S.; and Strebel, K.:** Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the

- nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol*, 75(16): 7252-65, 2001.
119. **Khan, M. A.; Goila-Gaur, R.; Opi, S.; Miyagi, E.; Takeuchi, H.; Kao, S.; and Strebel, K.:** Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology*, 4: 48, 2007.
120. **Khan, M. A. et al.:** Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol*, 79(9): 5870-4, 2005.
121. **Khatua, A. K.; Taylor, H. E.; Hildreth, J. E.; and Popik, W.:** Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J Virol*, 83(2): 512-21, 2009.
122. **Khorchid, A.; Halwani, R.; Wainberg, M. A.; and Kleiman, L.:** Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol*, 76(8): 4131-7, 2002.
123. **Kobayashi, M.; Takaori-Kondo, A.; Miyauchi, Y.; Iwai, K.; and Uchiyama, T.:** Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem*, 280(19): 18573-8, 2005.
124. **Konig, R. et al.:** Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*, 135(1): 49-60, 2008.
125. **Kozak, S. L.; Marin, M.; Rose, K. M.; Bystrom, C.; and Kabat, D.:** The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem*, 281(39): 29105-19, 2006.
126. **Kreisberg, J. F.; Yonemoto, W.; and Greene, W. C.:** Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med*, 203(4): 865-70, 2006.
127. **Kupzig, S.; Korolchuk, V.; Rollason, R.; Sugden, A.; Wilde, A.; and Banting, G.:** Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic*, 4(10): 694-709, 2003.
128. **Lashuel, H. A.; Petre, B. M.; Wall, J.; Simon, M.; Nowak, R. J.; Walz, T.; and Lansbury, P. T., Jr.:** Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol*, 322(5): 1089-102, 2002.
129. **Lee, M. J.; Yang, R. Z.; Gong, D. W.; and Fried, S. K.:** Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem*, 282(1): 72-80, 2007.
130. **Lever, A.; Gottlinger, H.; Haseltine, W.; and Sodroski, J.:** Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol*, 63(9): 4085-7, 1989.
131. **Li, Y.; Li, X.; Stremlau, M.; Lee, M.; and Sodroski, J.:** Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J Virol*, 80(14): 6738-44, 2006.
132. **Lopez-Verges, S.; Camus, G.; Blot, G.; Beauvoir, R.; Benarous, R.; and Berlioz-Torrent, C.:** Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40): 14947-52, 2006.
133. **Luo, K.; Liu, B.; Xiao, Z.; Yu, Y.; Yu, X.; Gorelick, R.; and Yu, X. F.:** Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol*, 78(21): 11841-52, 2004.

134. **Luo, K.; Xiao, Z.; Ehrlich, E.; Yu, Y.; Liu, B.; Zheng, S.; and Yu, X. F.:** Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32): 11444-9, 2005.
135. **Lv, W.; Liu, Z.; Jin, H.; Yu, X.; Zhang, L.; and Zhang, L.:** Three-dimensional structure of HIV-1 Vif constructed by comparative modeling and the function characterization analyzed by molecular dynamics simulation. *Org Biomol Chem*, 5(4): 617-26, 2007.
136. **Madani, N., and Kabat, D.:** An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol*, 72(12): 10251-5, 1998.
137. **Maldarelli, F.; Martin, M. A.; and Strebel, K.:** Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol*, 65(11): 5732-43, 1991.
138. **Malim, M. H., and Emerman, M.:** HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*, 3(6): 388-98, 2008.
139. **Malim, M. H.; Hauber, J.; Le, S. Y.; Maizel, J. V.; and Cullen, B. R.:** The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338(6212): 254-7, 1989.
140. **Mansky, L. M., and Temin, H. M.:** Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, 69(8): 5087-94, 1995.
141. **Mariani, R.; Chen, D.; Schrofelbauer, B.; Navarro, F.; Konig, R.; Bollman, B.; Munk, C.; Nymark-McMahon, H.; and Landau, N. R.:** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, 114(1): 21-31, 2003.
142. **Marin, M.; Rose, K. M.; Kozak, S. L.; and Kabat, D.:** HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*, 9(11): 1398-403, 2003.
143. **McDonald, D.; Vodicka, M. A.; Lucero, G.; Svitkina, T. M.; Borisy, G. G.; Emerman, M.; and Hope, T. J.:** Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, 159(3): 441-52, 2002.
144. **McGhee, J. D., and von Hippel, P. H.:** Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol*, 86(2): 469-89, 1974.
145. **Mehle, A.; Strack, B.; Ancuta, P.; Zhang, C.; McPike, M.; and Gabuzda, D.:** Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 279(9): 7792-8, 2004.
146. **Miller, J. H.; Presnyak, V.; and Smith, H. C.:** The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block virion incorporation of APOBEC3G. *Retrovirology*, 4: 81, 2007.
147. **Miyauchi, K.; Kim, Y.; Latinovic, O.; Morozov, V.; and Melikyan, G. B.:** HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*, 137(3): 433-44, 2009.
148. **Mlotshwa, S.; Pruss, G. J.; and Vance, V.:** Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci*, 13(7): 375-82, 2008.

149. **Muckenfuss, H.; Kaiser, J. K.; Krebil, E.; Battenberg, M.; Schwer, C.; Cichutek, K.; Munk, C.; and Flory, E.:** Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res*, 35(11): 3784-96, 2007.
150. **Mujtaba, S.; He, Y.; Zeng, L.; Farooq, A.; Carlson, J. E.; Ott, M.; Verdin, E.; and Zhou, M. M.:** Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell*, 9(3): 575-86, 2002.
151. **Muriaux, D.; Mirro, J.; Harvin, D.; and Rein, A.:** RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(9): 5246-51, 2001.
152. **Nauseef, W. M.:** How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*, 219: 88-102, 2007.
153. **Navarro, F.; Bollman, B.; Chen, H.; Konig, R.; Yu, Q.; Chiles, K.; and Landau, N. R.:** Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology*, 333(2): 374-86, 2005.
154. **Neil, S. J.; Eastman, S. W.; Jouvenet, N.; and Bieniasz, P. D.:** HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog*, 2(5): e39, 2006.
155. **Neil, S. J.; Sandrin, V.; Sundquist, W. I.; and Bieniasz, P. D.:** An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe*, 2(3): 193-203, 2007.
156. **Neil, S. J.; Zang, T.; and Bieniasz, P. D.:** Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177): 425-30, 2008.
157. **Nguyen, D. G.; Booth, A.; Gould, S. J.; and Hildreth, J. E.:** Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*, 278(52): 52347-54, 2003.
158. **Nguyen, D. H., and Hildreth, J. E.:** Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*, 74(7): 3264-72, 2000.
159. **Nguyen, K. L.; Ilano, M.; Akari, H.; Miyagi, E.; Poeschla, E. M.; Strebel, K.; and Bour, S.:** Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology*, 319(2): 163-75, 2004.
160. **Nisole, S.; Lynch, C.; Stoye, J. P.; and Yap, M. W.:** A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36): 13324-8, 2004.
161. **Nomaguchi, M.; Fujita, M.; and Adachi, A.:** Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect*, 10(9): 960-7, 2008.
162. **Onafuwa-Nuga, A. A.; Telesnitsky, A.; and King, S. R.:** 7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. *Rna*, 12(4): 542-6, 2006.
163. **Ono, A.; Ablan, S. D.; Lockett, S. J.; Nagashima, K.; and Freed, E. O.:** Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41): 14889-94, 2004.
164. **Ono, A., and Freed, E. O.:** Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24): 13925-30, 2001.
165. **Ott, D. E.:** Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol*, 18(3): 159-75, 2008.

166. **Pan, Q.; Rong, L.; Zhao, X.; and Liang, C.:** Fragile X mental retardation protein restricts replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, 387(1): 127-35, 2009.
167. **Pantopoulos, K.:** Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci*, 1012: 1-13, 2004.
168. **Paul, I.; Cui, J.; and Maynard, E. L.:** Zinc binding to the HCCH motif of HIV-1 virion infectivity factor induces a conformational change that mediates protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49): 18475-80, 2006.
169. **Perelson, A. S.; Neumann, A. U.; Markowitz, M.; Leonard, J. M.; and Ho, D. D.:** HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255): 1582-6, 1996.
170. **Pion, M.; Graneli-Piperno, A.; Mangeat, B.; Stalder, R.; Correa, R.; Steinman, R. M.; and Piguet, V.:** APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med*, 203(13): 2887-93, 2006.
171. **Prestwich, R. J.; Harrington, K. J.; Pandha, H. S.; Vile, R. G.; Melcher, A. A.; and Errington, F.:** Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8(10): 1581-8, 2008.
172. **Prochnow, C.; Bransteitter, R.; Klein, M. G.; Goodman, M. F.; and Chen, X. S.:** The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature*, 445(7126): 447-51, 2007.
173. **Ptak, R. G. et al.:** Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24(12): 1497-502, 2008.
174. **Purcell, D. F., and Martin, M. A.:** Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, 67(11): 6365-78, 1993.
175. **Qian, S.; Zhong, X.; Yu, L.; Ding, B.; de Haan, P.; and Boris-Lawrie, K.:** HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(2): 605-10, 2009.
176. **Reingewertz, T. H.; Benyamini, H.; Lebendiker, M.; Shalev, D. E.; and Friedler, A.:** The C-terminal domain of the HIV-1 Vif protein is natively unfolded in its unbound state. *Protein Eng Des Sel*, 22(5): 281-7, 2009.
177. **Rhodes, D. A.; de Bono, B.; and Trowsdale, J.:** Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology*, 116(4): 411-7, 2005.
178. **Richter, S. N.; Frasson, I.; and Palu, G.:** Strategies for inhibiting function of HIV-1 accessory proteins: a necessary route to AIDS therapy? *Curr Med Chem*, 16(3): 267-86, 2009.
179. **Rosen, C. A.; Terwilliger, E.; Dayton, A.; Sodroski, J. G.; and Haseltine, W. A.:** Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(7): 2071-5, 1988.
180. **Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A. R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463-7, 1977.
181. **Sawyer, S. L.; Emerman, M.; and Malik, H. S.:** Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals. *PLoS Pathog*, 3(12): e197, 2007.

182. **Sayah, D. M.; Sokolskaja, E.; Berthoux, L.; and Luban, J.:** Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature*, 430(6999): 569-73, 2004.
183. **Scheper, W., and Hoozemans, J. J.:** Endoplasmic reticulum protein quality control in neurodegenerative disease: the good, the bad and the therapy. *Curr Med Chem*, 16(5): 615-26, 2009.
184. **Schroder, A. R.; Shinn, P.; Chen, H.; Berry, C.; Ecker, J. R.; and Bushman, F.:** HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4): 521-9, 2002.
185. **Schwartz, O.; Marechal, V.; Le Gall, S.; Lemonnier, F.; and Heard, J. M.:** Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*, 2(3): 338-42, 1996.
186. **Schwartz, S.; Felber, B. K.; and Pavlakis, G. N.:** Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol*, 12(1): 207-19, 1992.
187. **Sharova, N.; Wu, Y.; Zhu, X.; Stranska, R.; Kaushik, R.; Sharkey, M.; and Stevenson, M.:** Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction. *PLoS Pathog*, 4(5): e1000057, 2008.
188. **Shedlock, D. J.; Hwang, D.; Choo, A. Y.; Chung, C. W.; Muthumani, K.; and Weiner, D. B.:** HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis. *Apoptosis*, 13(9): 1088-99, 2008.
189. **Sheehy, A. M.; Gaddis, N. C.; Choi, J. D.; and Malim, M. H.:** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898): 646-50, 2002.
190. **Sheehy, A. M.; Gaddis, N. C.; and Malim, M. H.:** The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, 9(11): 1404-7, 2003.
191. **Shehu-Xhilaga, M.; Crowe, S. M.; and Mak, J.:** Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol*, 75(4): 1834-41, 2001.
192. **Shirakawa, K.; Takaori-Kondo, A.; Yokoyama, M.; Izumi, T.; Matsui, M.; Io, K.; Sato, T.; Sato, H.; and Uchiyama, T.:** Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol*, 15(11): 1184-91, 2008.
193. **Simon, J. H.; Gaddis, N. C.; Fouchier, R. A.; and Malim, M. H.:** Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med*, 4(12): 1397-400, 1998.
194. **Smith, J. A., and Daniel, R.:** Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol*, 1(4): 217-26, 2006.
195. **Sonenberg, N.:** mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Genet Dev*, 4(2): 310-5, 1994.
196. **Sonza, S.; Maerz, A.; Deacon, N.; Meanger, J.; Mills, J.; and Crowe, S.:** Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol*, 70(6): 3863-9, 1996.
197. **Soros, V. B.; Yonemoto, W.; and Greene, W. C.:** Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog*, 3(2): e15, 2007.

198. **Stanley, B. J.; Ehrlich, E. S.; Short, L.; Yu, Y.; Xiao, Z.; Yu, X. F.; and Xiong, Y.:** Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *J Virol*, 82(17): 8656-63, 2008.
199. **Stenglein, M. D.; Matsuo, H.; and Harris, R. S.:** Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization. *J Virol*, 82(19): 9591-9, 2008.
200. **Stopak, K.; de Noronha, C.; Yonemoto, W.; and Greene, W. C.:** HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*, 12(3): 591-601, 2003.
201. **Stopak, K. S.; Chiu, Y. L.; Kropp, J.; Grant, R. M.; and Greene, W. C.:** Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem*, 282(6): 3539-46, 2007.
202. **Strack, B.; Calistri, A.; Craig, S.; Popova, E.; and Gottlinger, H. G.:** AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114(6): 689-99, 2003.
203. **Strebel, K., and Khan, M. A.:** APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology*, 5: 55, 2008.
204. **Stremlau, M.; Owens, C. M.; Perron, M. J.; Kiessling, M.; Autissier, P.; and Sodroski, J.:** The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977): 848-53, 2004.
205. **Stremlau, M. et al.:** Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14): 5514-9, 2006.
206. **Suzuki, Y., and Craigie, R.:** The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(3): 187-96, 2007.
207. **Svarovskaia, E. S.; Xu, H.; Mbisa, J. L.; Barr, R.; Gorelick, R. J.; Ono, A.; Freed, E. O.; Hu, W. S.; and Pathak, V. K.:** Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem*, 279(34): 35822-8, 2004.
208. **Swingler, S. et al.:** HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med*, 5(9): 997-103, 1999.
209. **Takagi, M.; Absalon, M. J.; McLure, K. G.; and Kastan, M. B.:** Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*, 123(1): 49-63, 2005.
210. **Tian, C.; Wang, T.; Zhang, W.; and Yu, X. F.:** Virion packaging determinants and reverse transcription of SRP RNA in HIV-1 particles. *Nucleic Acids Res*, 35(21): 7288-302, 2007.
211. **Towers, G. J.:** The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology*, 4: 40, 2007.
212. **Towers, G. J.; Hatziioannou, T.; Cowan, S.; Goff, S. P.; Luban, J.; and Bieniasz, P. D.:** Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med*, 9(9): 1138-43, 2003.
213. **Tritel, M., and Resh, M. D.:** Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol*, 74(13): 5845-55, 2000.

214. **Tsodikov, O. V.; Holbrook, J. A.; Shkel, I. A.; and Record, M. T., Jr.:** Analytic binding isotherms describing competitive interactions of a protein ligand with specific and nonspecific sites on the same DNA oligomer. *Biophys J*, 81(4): 1960-9, 2001.
215. **Ugolini, S.; Mondor, I.; and Sattentau, Q. J.:** HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol*, 7(4): 144-9, 1999.
216. **Umbach, J. L., and Cullen, B. R.:** The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev*, 23(10): 1151-64, 2009.
217. **Varatharajan, L., and Thomas, S. A.:** The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: Summary of current knowledge and recommendations for further research. *Antiviral Res*, 2009.
218. **Varthakavi, V.; Heimann-Nichols, E.; Smith, R. M.; Sun, Y.; Bram, R. J.; Ali, S.; Rose, J.; Ding, L.; and Spearman, P.:** Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand as a human host restriction to HIV-1 release overcome by Vpu. *Nat Med*, 14(6): 641-7, 2008.
219. **Varthakavi, V.; Smith, R. M.; Bour, S. P.; Strebel, K.; and Spearman, P.:** Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25): 15154-9, 2003.
220. **von Schwedler, U. K. et al.:** The protein network of HIV budding. *Cell*, 114(6): 701-13, 2003.
221. **Wang, G. P.; Ciuffi, A.; Leipzig, J.; Berry, C. C.; and Bushman, F. D.:** HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res*, 17(8): 1186-94, 2007.
222. **Wang, T.; Tian, C.; Zhang, W.; Luo, K.; Sarkis, P. T.; Yu, L.; Liu, B.; Yu, Y.; and Yu, X. F.:** 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G. *J Virol*, 81(23): 13112-24, 2007.
223. **Wang, T.; Tian, C.; Zhang, W.; Sarkis, P. T.; and Yu, X. F.:** Interaction with 7SL RNA but not with HIV-1 genomic RNA or P bodies is required for APOBEC3F virion packaging. *J Mol Biol*, 375(4): 1098-112, 2008.
224. **Wedekind, J. E.; Gillilan, R.; Janda, A.; Krucinska, J.; Salter, J. D.; Bennett, R. P.; Raina, J.; and Smith, H. C.:** Nanostructures of APOBEC3G support a hierarchical assembly model of high molecular mass ribonucleoprotein particles from dimeric subunits. *J Biol Chem*, 281(50): 38122-6, 2006.
225. **Wei, P.; Garber, M. E.; Fang, S. M.; Fischer, W. H.; and Jones, K. A.:** A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92(4): 451-62, 1998.
226. **Weiss, R. A.:** The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, 3: 67, 2006.
227. **Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Harrison, S. C.; Skehel, J. J.; and Wiley, D. C.:** Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 387(6631): 426-30, 1997.
228. **Whitty, A.:** Cooperativity and biological complexity. *Nat Chem Biol*, 4(8): 435-9, 2008.
229. **Wichroski, M. J.; Robb, G. B.; and Rana, T. M.:** Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog*, 2(5): e41, 2006.

230. **Wiegand, H. L.; Doehle, B. P.; Bogerd, H. P.; and Cullen, B. R.:** A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J*, 23(12): 2451-8, 2004.
231. **Wiegers, K.; Rutter, G.; Kottler, H.; Tessmer, U.; Hohenberg, H.; and Krausslich, H. G.:** Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol*, 72(4): 2846-54, 1998.
232. **Wilkie, G. S.; Dickson, K. S.; and Gray, N. K.:** Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, 28(4): 182-8, 2003.
233. **Wilkinson, K. A.; Gorelick, R. J.; Vasa, S. M.; Guex, N.; Rein, A.; Mathews, D. H.; Giddings, M. C.; and Weeks, K. M.:** High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol*, 6(4): e96, 2008.
234. **Willis, M. S.; Hogan, J. K.; Prabhakar, P.; Liu, X.; Tsai, K.; Wei, Y.; and Fox, T.:** Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: a study of reagent effects and interactions. *Protein Sci*, 14(7): 1818-26, 2005.
235. **Wu, L., and KewalRamani, V. N.:** Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, 6(11): 859-68, 2006.
236. **Wu, Y., and Marsh, J. W.:** Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, 293(5534): 1503-6, 2001.
237. **Xiao, Z.; Ehrlich, E.; Luo, K.; Xiong, Y.; and Yu, X. F.:** Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *Faseb J*, 21(1): 217-22, 2007.
238. **Xu, H.; Chertova, E.; Chen, J.; Ott, D. E.; Roser, J. D.; Hu, W. S.; and Pathak, V. K.:** Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology*, 360(2): 247-56, 2007.
239. **Yang, B.; Gao, L.; Li, L.; Lu, Z.; Fan, X.; Patel, C. A.; Pomerantz, R. J.; DuBois, G. C.; and Zhang, H.:** Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins. *J Biol Chem*, 278(8): 6596-602, 2003.
240. **Yang, S.; Sun, Y.; and Zhang, H.:** The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: a requirement for Vif function in the viral life cycle. *J Biol Chem*, 276(7): 4889-93, 2001.
241. **Yang, X., and Gabuzda, D.:** Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J Biol Chem*, 273(45): 29879-87, 1998.
242. **Yang, X.; Goncalves, J.; and Gabuzda, D.:** Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J Biol Chem*, 271(17): 10121-9, 1996.
243. **Yu, X.; Yu, Y.; Liu, B.; Luo, K.; Kong, W.; Mao, P.; and Yu, X. F.:** Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, 302(5647): 1056-60, 2003.
244. **Yu, Y.; Xiao, Z.; Ehrlich, E. S.; Yu, X.; and Yu, X. F.:** Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev*, 18(23): 2867-72, 2004.
245. **Zennou, V.; Perez-Caballero, D.; Gottlinger, H.; and Bieniasz, P. D.:** APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol*, 78(21): 12058-61, 2004.

246. **Zennou, V.; Petit, C.; Guetard, D.; Nerhbass, U.; Montagnier, L.; and Charneau, P.:** HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, 101(2): 173-85, 2000.
247. **Zhang, H.; Pomerantz, R. J.; Dornadula, G.; and Sun, Y.:** 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(18): 8252-61, 2000.
248. **Zhou, H. et al.:** Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe*, 4(5): 495-504, 2008.
249. **Zhou, T.; Han, Y.; Dang, Y.; Wang, X.; and Zheng, Y. H.:** A novel HIV-1 restriction factor that is biologically distinct from APOBEC3 cytidine deaminases in a human T cell line CEM.NKR. *Retrovirology*, 6(1): 31, 2009.
250. **Zhu, Y., and Gao, G.:** ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA Biol*, 5(2): 65-7, 2008.

## ANNEXES

**CUCUUUCCCUUUGCAAUUGCCUUGGGUCCUGCCGCACAGAGCGGCCUGUCUUUAU**  
**CAGAGGUCCUCUGCCAGGGGGAGGGCCCCAGAGAAAACCAGAAAGAGGGUGAGA**  
**GACUGAGGAAGAUAAAGCGUCCAGGGCCUCCUACACCAGCGCCUGAGCAGGAAG**  
**CGGGAGGGGCCAUGACUACGAGGCCUUGGGAGGUCACUUUAGGGAGGGCUGUCCU**  
**AAAACCAGAAGCUUGGAGCAGAAAGUGAAACCUGGUGCUCCAGACAAAGAUCUU**  
**AGUCGGGACUAGCCGGCCAAGGAUG**AAGCCUCACUUCAGAAACACAGUGGAGCGA  
 AUGUAUCGAGACACAUUCUCCUACAACUUUUUAUAAUAGACCCAUCCUUUCUGUC  
 GGAAUACCGUCUGGCUGUGCUACGAAGUGAAAACAAAGGGUCCCUCAAGGCCCCC  
 UUUGGACGCAAAGAUCUUUCGAGGCCAGGUGUAUUCGAAACUUAAGUACCACCCA  
 GAGAUGAGAUUCUCCACUGGUUCAGCAAGUGGAGGAAGCUGCAUCGUGACCAGG  
 AGUAUGAGGUCACCUGGUACAUAUCCUGGAGCCCCUGCACAAAGUGUACAAGGGA  
 UAUGGCCACGUUCCUGGCCGAGGACCCGAAGGUUACCCUGACCAUCUUCGUUGCC  
 CGCCUCUACUACUUCUGGGACCCAGAUUACCAGGAGGCGUUCGCAGCCUGUGUC  
 AGAAAAGAGACGGUCCGCGUGCCACCAUGAAGAUAUGAAUUAUGACGAAUUUCA  
 GCACUGUUGGAGCAAGUUCGUGUACAGCCAAAGAGAGCUAUUUGAGCCUUGGAAU  
 AAUCUGCCUAAAUAUUAUUAUUAUACUGCACAUCAUGCUGGGGGAGAUUCUCAGAC  
 ACUCGAUGGAUCCACCCACAUUCACUUUCAACUUUAACAAUGAACCUUGGGUCAG  
 AGGACGGCAUGAGACUUAACUGUGUUAUGAGGUGGAGCGCAUGCACAAUGACACC  
 UGGGUCCUGCUGAACCAGCGCAGGGGCUUUCUAUGCAACCAGGCUCCACAUAAAC  
 ACGGUUUCUUGAAGGCCGCAUGCAGAGCUGUGCUUCCUGGACGUGAUUCCCUU  
 UUGGAAGCUGGACCUGGACCAGGACUACAGGGUUACCCUGCUUCACCUCUGGAGC  
 CCCUGCUUCAGCUGUGCCCAGGAAAUGGCUAAAUUCAUUUCAAAAACAAACACG  
 UGAGCCUGUGCAUCUUCACUGCCCAGCAUCUAUGAUGAUCAAGGAAGAUGUCAGGA  
 GGGGUGCGCACCCUGGCCGAGGCUGGGGCCAAAAUUCAAUAAUGACAUACAGU  
 GAAUUUAAGCACUGCUGGGACACCUUUGUGGACCACCAGGGAUGUCCCUUCCAGC  
 CCUGGGAUGGACUAGAUGAGCACAGCCAAGACCUGAGUGGGAGGCUGCGGGCCAU  
 UCUCAGAAUCAGGAAAAC**UGAAGGAUGGGCCUCAGUCUCUAAGGAAGGCAGAGA**  
**CCUGGGUUGAGCCUCAGAAUAAAAGAUUCUUCUCCAAGAAUGCAAACAGGCUGU**  
**UCACCACCAUCUCCAGCUGAUCACAGACACCAGCAAAGCAAUGCACUCCUGACCA**  
**AGUAGAUUCUUUAAAAUAGAGUGCAUUAUUCUUGAAUCAAAAAUUAUUUAUA**  
**UUUCAAGAAUAAAGUACUAAGAUUGUGCUCAAUACACAGAAAAGUUUCAACCUA**  
**CUAAUCCAGCGACAAUUGAAUCGGUUUUGUAGGUAGAGGAAUAAAUGAAUAC**  
**UAAUCUUUCUGU**

Annexe 1 : Séquence de l'isoforme majeure de l'ARNm d'A3G composé de la région 5' UTR (297 nts) (en vert) suivie de la région codante (1155 nts) (en noir) et de la région 3'UTR (321 nts) (en bleu). Les codons d'initiation (AUG) et de terminaison (UGA) sont indiqués en rouge. La partie 5'UTR soulignée correspond à la région retrouvée dans l'isoforme mineure produite au laboratoire

a. Séquence de la protéine Vif de l'isolat NL4.3 (192 acides aminés)

MENRWQVMIVWQVDRMRINNTWKRLVKHHMYISRKAKDWFYRHHYESTNPKISSEVHIPLGDA  
KLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI EWRRKRYSTQVDPDLADQLIHLHYFDCFSESAIRNTI  
LGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLALAALIKPKQIK**PPLP**SVRKLTEDRWNKPKQTKGHRGS  
HTTNGH

b. Séquence de la protéine Vif de l'isolat pHXB2 (192 acides aminés)

MENRWQVMIVWQVDRMRIRTWKSLVKHHMYVSGKARGWYRHHYESPHPRISSEVHIPLGDA  
RLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI EWRRKRYSTQVDPELADQLIHLYFDCFSDSAIRKAL  
LGHIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLALAALITPKKIK**PPLP**SVTKLTEDRWNKPKQTKGHRGS  
HTMNGH

Annexe 2 : Séquences des protéines Vif de l'isolat NL4.3 (a) et HBXB2 (b).

Les résidus soulignés reflètent les différences d'acides aminés entre les deux séquences (89,1 % d'identité et 94,3 % de similarité). Le motif PPLP est indiqué en rouge.

# Interaction de la protéine Vif du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) avec l'ARNm d'APOBEC3G/3F : Régulation au niveau traductionnel

Gaëlle MERCENNE, Simon HENRIET, Serena BERNACCHI, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART

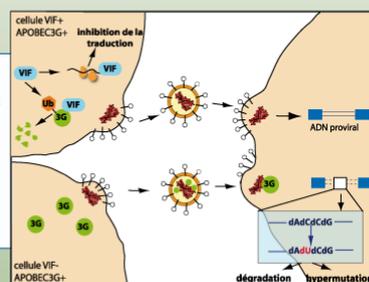


CNRS UPR 9002 - Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire - 15 rue René Descartes F-67084 STRASBOURG

## Introduction

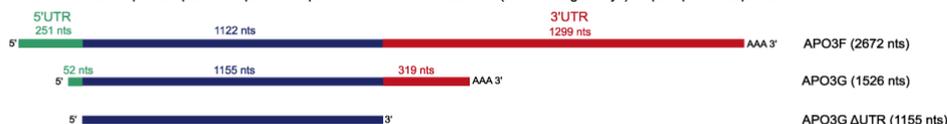
La protéine Vif (Viral infectivity factor) du VIH-1 est une protéine basique de 23 kDa essentielle pour la pathogénicité du virus. Dans les cellules dites restrictives ou non permissives (lymphocytes T CD4+, monocytes/macrophages), Vif contrecarre l'effet antiviral de deux cytidines désaminases cellulaires, APOBEC3G (APO3G) et APO3F d'une part en induisant leur dégradation par la voie du protéasome et d'autre part en réduisant leur synthèse protéique (1) (2).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de Vif dans la régulation traductionnelle des protéines APO3G/3F, nous avons dans un premier temps étudié sa fixation aux ARNm complets ou à des fragments d'ARN correspondants aux régions codantes et/ou 5' et 3' non traduites d'APO3G/3F par des expériences de rétention sur filtre, compétition et de spectroscopie de fluorescence. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de Vif sur la traduction des protéines APO3G/3F en lysat de réticulocytes de lapin à partir d'ARN mutants contenant ou non les régions 5' et 3' non traduites.



## Fixation de Vif aux ARNm d'APO3G et APO3F

Les ARNm complets d'APO3G/3F ou des fragments d'ARN correspondant aux régions codantes et/ou aux régions non traduites ont été synthétisés par transcription *in vitro*. L'affinité de la protéine Vif pour ces ARN est alors étudiée par compétition et par des expériences de rétention sur filtre (filter binding assays) ou par spectroscopie de fluorescence.

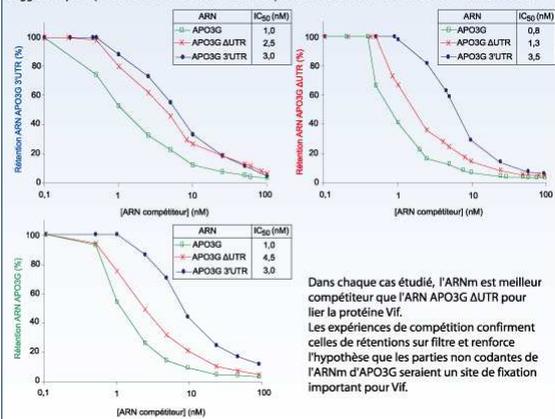


### Rétention sur filtre et compétition

Plusieurs constructions ont été testées en rétention sur filtre :

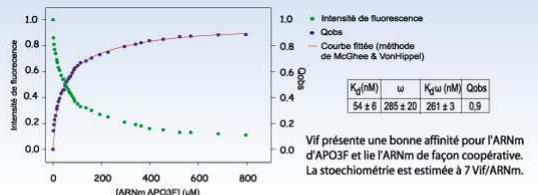
ARN	Kd (nM)
5' AAA 3' APO3F	133 ± 3
5' AAA 3' APO3G	97 ± 5
5' 3' APO3G ΔUTR	114 ± 8
5' 3' APO3G 1-524 (524 nts)	82 ± 7
5' 3' APO3G 514-1006 (492 nts)	62 ± 1
5' 3' APO3G 1008-1516 (508 nts)	49 ± 4
5' 3' APO3G 1199-1516 3'UTR (319 nts)	55 ± 4

La protéine Vif lie les ARNm d'APO3F/3G avec une bonne affinité (Kd entre 97 et 133 nM). Tandis que la constante d'affinité de Vif augmente (Kd = 114 nM) lorsque les parties non traduites de l'ARNm d'APO3G sont déletées, elle diminue fortement (Kd = 55 nM) en présence de la partie 3'UTR uniquement. Ces résultats suggèrent que la protéine Vif se fixerait au niveau des parties 5' et/ou 3' non codantes de l'ARNm d'APO3G.



Dans chaque cas étudié, l'ARNm est meilleur compétiteur que l'ARN APO3G ΔUTR pour lier la protéine Vif. Les expériences de compétition confirment celles de rétentions sur filtre et renforce l'hypothèse que les parties non codantes de l'ARNm d'APO3G seraient un site de fixation important pour Vif.

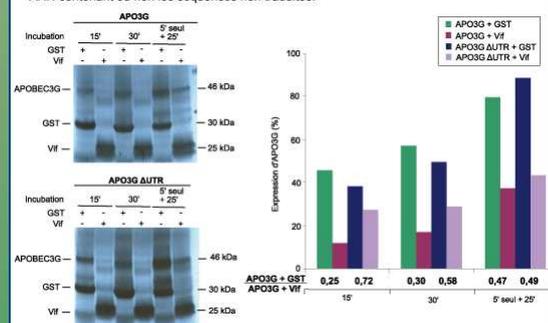
### Suivi de la fixation de Vif à l'ARNm d'APO3F par fluorescence



Vif présente une bonne affinité pour l'ARNm d'APO3F et lie l'ARNm de façon coopérative. La stoichiométrie est estimée à 7 Vif/ARNm.

## Transcription/traduction *in vitro*

L'effet de Vif sur la traduction d'APO3G est testée en lysat de réticulocytes de lapin sur des ARN contenant ou non les séquences non traduites.



En présence de Vif, la traduction d'APO3G est fortement inhibée (-75% pour 15 min de traduction). En revanche, Vif a peu d'effet sur la traduction d'un ARN dépourvu des régions non codantes 5' et 3'. Ces résultats suggèrent que Vif inhiberait la traduction d'APO3G en se fixant au niveau des parties non traduites.

## Conclusion et Perspectives

Pour contrer l'action d'APOBEC3G, deux mécanismes de régulation coexistent: la dégradation d'APO3G par le système ubiquitine-protéasome et l'inhibition de la traduction (1). Nous avons montré que la protéine Vif se fixe avec une plus grande affinité sur l'ARN d'APO3G lorsque les parties non traduites sont présentes et que la partie 3'UTR semble être un site de haute affinité. De plus, en utilisant le système de transcription/traduction *in vitro*, nous avons observé que Vif inhibe plus fortement la traduction d'APO3G lorsque les parties non codantes sont présentes sur l'ARN. Vif se fixerait donc au niveau des régions 5' et/ou 3' non traduites de l'ARNm d'APO3G afin d'en inhiber la traduction.

Nous envisageons à présent d'identifier plus précisément les sites de fixation de Vif sur l'ARNm d'APO3G/3F par mutagenèse dirigée et cartographie en solution et de confirmer l'effet traductionnel de Vif par des expériences de co-transfection de plasmides exprimant les protéines APO3G/3F et Vif.

## Références

- (1) Sheehy et al., (2002) *Nature*
- (2) Kao et al., (2003) *J. Virol.*



INSERM  
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

# Interaction of HIV-1 Vif with APOBEC3G/3F mRNA: Regulation at Translational Level

G. Mercenne, S. Henriot, S. Bernacchi, R. Marquet & J.-C. Paillart

UPR 9002, Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur - CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg (FRANCE)

IBMC - UPR 9002  
15 rue Descartes  
67084 STRASBOURG Cedex  
FRANCE  
E-mail: g.mercenne@ibmc.u-strasbf.fr  
Tel. (33)33 88 41 70 91  
Fax: (33)33 88 60 22 18

### Introduction

HIV-1 Vif (Viral infectivity factor) is a 23 kDa auxiliary protein essential for viral pathogenesis. In restrictive or non-permissive cells (T lymphocytes, T CD4+, monocytes/macrophages), Vif effect on the mechanism mediated by two host cell cytosolic deaminases, APOBEC3G (APO3G) and APOBEC3F (APO3F), on the one hand, and ubiquitination and proteasomal pathway and on the other hand decreasing their translational inhibition by an unknown mechanism (1) (2).

### Methods

- Filter-binding assays

To gain further insights in the role played by Vif in translational regulation of APO3G/3F proteins, we first characterized its binding to full length mRNA or truncated RNAs corresponding to coding regions and/or 5' and 3' untranslated regions (UTR) of APO3G/3F by filter-binding assays, competition and steady-state fluorescence spectroscopy. In a second step, we analyzed the effect of Vif on the translation of APO3G proteins in reticulocyte lysate systems using mutant RNAs containing or not the 5' and 3' untranslated regions.

### Results

#### Filter-binding assays and competition

Full length APO3G/3F mRNA or RNA fragments corresponding to coding and/or untranslated regions were synthesized by *in vitro* run off transcription. Affinity of Vif protein for these RNAs was then studied by filter binding assays and competition.

- Filter-binding assays

RNA	Kd1	Kd2
APO3G (397 nt)	60.0 ± 1.80	2.19 ± 0.07
APO3G Δ5'UTR (184 nt)	32.61 ± 8.51	3.53 ± 0.23
APO3G Δ3'UTR (137 nt)	36.3 ± 14.52	3.51 ± 0.23
APO3G Δ5'UTR (184 nt)	45.24 ± 10.79	3.69 ± 0.75
APO3G Δ3'UTR (137 nt)	61.15 ± 24.66	2.70 ± 0.23
APO3G Δ5'UTR (184 nt)	59.91 ± 4.52	3.28 ± 0.23
APO3G Δ3'UTR (137 nt)	58.18 ± 11.20	3.28 ± 0.66
APO3G Δ5'UTR (184 nt)	18.72 ± 3.75	6.15 ± 1.77
APO3G Δ3'UTR (137 nt)	18.84 ± 1.20	6.15 ± 1.77
APO3G Δ5'UTR (184 nt)	18.21 ± 4.24	6.15 ± 1.77

### Conclusion

In order to counteract the antiviral effect of APO3G, two mechanisms of regulation coexist: (1) the degradation of APO3G proteins by the ubiquitination/proteasome pathway and (2) the inhibition of translation. We showed that Vif protein binds with higher affinity APO3G RNA when the untranslated regions are present and that the 3'UTR seems to be a high affinity binding site. Using reticulocyte lysate systems, we observed that Vif strongly inhibit the translation of APO3G when the untranslated regions are present on the mRNA. Our results suggest that Vif preferentially binds the 3' and/or 5' untranslated regions of APO3G mRNA and inhibits its translation.

### Fluorescence spectroscopy

Analysis of binding parameters shows a Kd at 34 nM and high value for the binding cooperativity (n).

Parameter	Value
Kd (nM)	34 ± 4
n	250 ± 20

### in vitro transcription/translation

Effect of Vif on the translation of APO3G was tested in rabbit reticulocyte lysate systems using various mutants containing or not the 5' and 3' untranslated regions.

### Competition

We showed that APO3G Δ5'UTR RNA competes APO3G mRNA with the same efficiency than full length mRNA and that APO3G Δ3'UTR competes as well as APO3G Δ5'UTR RNA. Moreover, APO3G is a better competitor than APO3G Δ3'UTR. So, the 3'UTR would be a preferential binding site for Vif.

### Conclusion

In presence of Vif, APO3G translation is strongly inhibited (~75% for 15 min of translation). However, Vif has little effect on translation of a RNA mutant containing 3' untranslated regions. These results suggest that Vif inhibits APO3G translation by binding preferentially the untranslated regions.

(1) Sheehy et al., (2002) Nature  
(2) Sheehy et al., (2003) Mol Cell

INSERM  
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Annexe 4: Poster présenté au « CROI » (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections), Los Angeles (CA, USA), 25/02/2007-28/02/2007

# Vif regulates APOBEC3G translation by binding to its messenger RNA



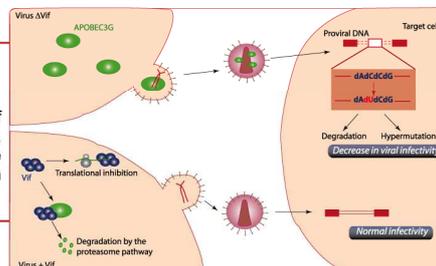
Gaëlle MERCENNE, Serena BERNACCHI, Simon HENRIET, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART

UPR 9002, Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur - CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg (FRANCE)



## Introduction

HIV-1 Vif (Viral infectivity factor) is a 23 kDa auxiliary protein essential for viral pathogenicity. In restrictive or non-permissive cells (CD4+ T lymphocytes, monocytes, macrophages), Vif efficiently counteracts the antiviral mechanism mediated by two host cell cytidine deaminases, APOBEC3G (APO3G) and APO3F inducing on one hand their degradation through the ubiquitination and proteasomal pathway and on the other hand, a translational inhibition by an unknown mechanism.

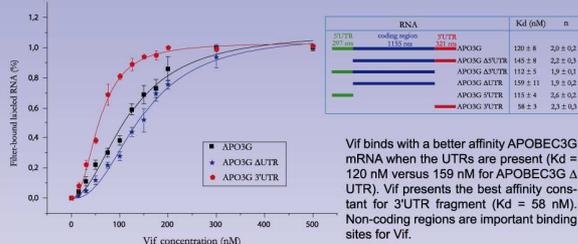


## Vif binding to APOBEC3G mRNA

Full length APOBEC3G mRNA or RNA fragments corresponding to coding and/or untranslated regions were synthesized by *in vitro* run off transcription. Affinity of Vif protein for these RNAs was then studied by filter binding assays and fluorescence spectroscopy.

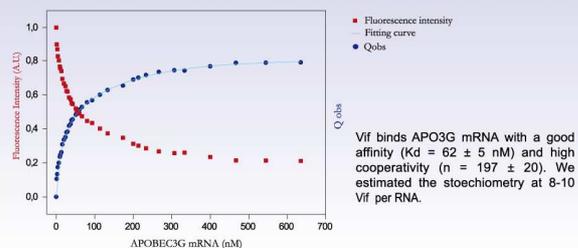
### 1 Filter-binding assays

Radiolabeled RNAs were incubated with bacterial expressed Vif to form complexes. After filtration, Vif/RNA complexes were measured and affinity constant and cooperativity factor were determined by fitting the curves with the Hill equation.



### 2 Fluorescence spectroscopy

Using the natural fluorescence of Trp residues contained in the N-terminus of protein, we performed fluorescence spectroscopy study. The fluorescence intensity of 150nM of Vif was recorded as a function of RNA concentration (expressed in nucleotides).

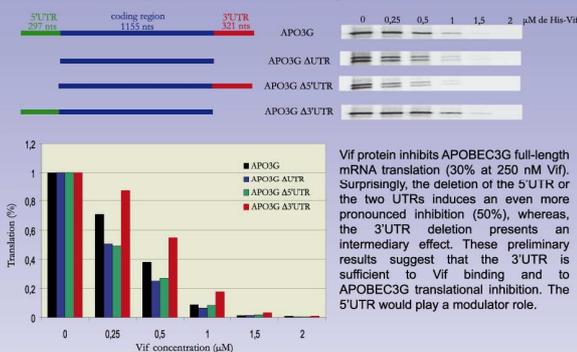


## APOBEC3G translational inhibition by Vif

In order to correlate the binding effect of Vif to APO3G mRNA, we studied *in vitro* and *ex vivo* APO3G translation in presence of Vif.

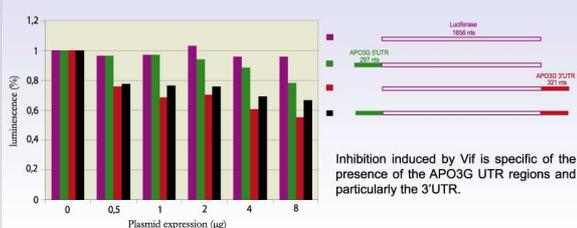
### 1 In vitro translation inhibition

Effect of Vif on *in vitro* translation of APO3G was tested in rabbit reticulocyte lysate systems using various mutants containing or not the 5' and 3' untranslated regions.



### 2 Ex vivo translation inhibition

UTR regions of APOBEC3G mRNA were cloned upstream, downstream or on both sides of the luciferase gene. After co-transfections of these plasmids with a Vif expressing vector, the luciferase expression was measured.



## Discussion and Perspectives

In order to counteract the antiviral effect of APO3G, two mechanisms of regulation coexist: (1) the degradation of APO3G proteins by the ubiquitination /proteasome pathway and (2) the inhibition of translation. We showed that Vif protein binds with higher affinity APO3G mRNA when the untranslated regions are presents and that the 3'UTR seems to be a high affinity binding site. Using reticulocyte lysate systems, we observed that Vif strongly inhibits the translation of APO3G proteins when the untranslated regions are present on the mRNA. Our results suggest that Vif preferentially binds the 3' and/or 5' untranslated regions of APO3G mRNA and inhibits its translation.

We are in the process of identifying precisely the binding sites of Vif on APO3G mRNA by probing in solution and site directed mutagenesis and studying the direct translational effect of Vif by co-transfection experiments of vectors expressing APOBEC3G and Vif proteins.

## Acknowledgments

We acknowledge K. Strelbe for providing Vif expressing vector (pcDNA hVif).



Annexe 5 : Poster présenté au « Keystone symposia conference » sur la pathogénèse du VIH, Banff (Alberta, Canada), 27/03/2008-01/04/2008

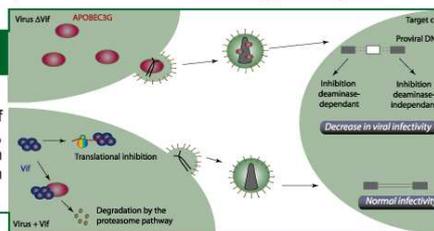
# Vif regulates APOBEC3G translation by binding to its messenger RNA


 Gaëlle MERCENNE, Serena BERNACCHI, Delphine RICHER, Simon HENRIET, Jean-Christophe PAILLART & Roland MARQUET 

UPR 9002, Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg - CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg (FRANCE)

## Introduction

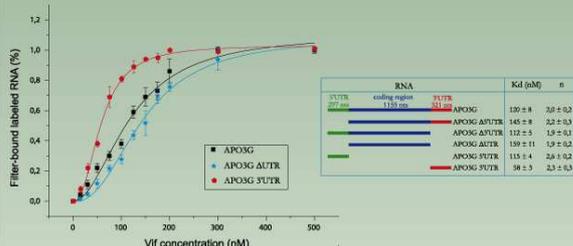
HIV-1 Vif (Viral infectivity factor) is a 23 kDa auxiliary protein essential for viral pathogenicity. In restrictive or non-permissive cells (CD4+ T lymphocytes, monocytes, macrophages), Vif efficiently counteracts the antiviral mechanism mediated by host cell cytidine deaminases, APOBEC3G and APOBEC3F inducing on one hand their degradation through the ubiquitination and proteasomal pathway and on the other hand, their translational inhibition by an unknown mechanism.



## Vif binds to APOBEC3G mRNA

### 1 Filter-binding assays

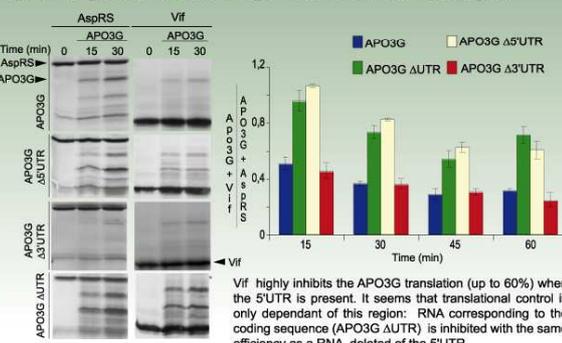
Radiolabeled RNAs were incubated with bacterial expressed Vif to form complexes. After filtration, Vif/RNA complexes were measured and affinity constant and cooperativity factor were determined by fitting the curves with the Hill equation.



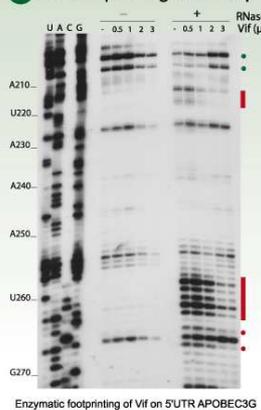
Vif binds with a better affinity APOBEC3G mRNA when the UTRs are present (Kd = 120 nM versus 159 nM for APOBEC3G ΔUTR). Vif presents the best affinity constant for 3'UTR fragment (Kd = 58 nM). Non-coding regions are important binding sites for Vif.

## Vif inhibits APOBEC3G translation

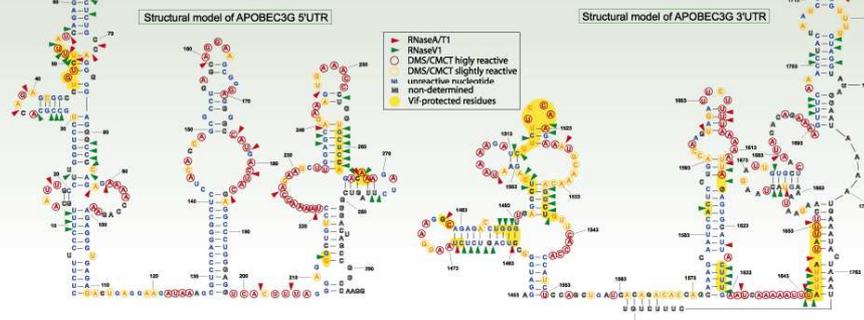
Effect of Vif on *in vitro* translation of APOBEC3G was tested in rabbit reticulocyte lysate systems using various mutants containing or not the 5' and 3' untranslated regions.



### 2 In vitro probing and footprinting experiments



We determined the secondary structure of the untranslated regions of APOBEC3G mRNA by using different enzymatic and chemical probes. Then, we precisely analyzed Vif binding sites on APOBEC3G UTRs. We showed that Vif is able to protect regions of both the 5' & 3' UTRs of APO3G mRNA. Protected regions are more spread on the 3'UTR, thus confirming the filter-binding assays conclusions.



## Discussion and Perspectives

In order to counteract the antiviral effect of APO3G, two mechanisms of regulation coexist: (1) the degradation of APO3G proteins by the ubiquitination/ proteasome pathway and (2) the inhibition of translation. We showed that Vif protein binds with higher affinity APO3G mRNA when the untranslated regions are present and that the 3'UTR is a high affinity binding site. Using reticulocyte lysate systems, we observed that Vif strongly inhibits the translation of APO3G proteins when the 5' untranslated region is present on APO3G mRNA. Our results suggest that Vif preferentially binds the 3' UTR but the 5'UTR seems to be sufficient to allow the translational inhibition by Vif.

Studies aiming at determining the translational effect of Vif on APOBEC3G proteins directly in transfected cells are ongoing.

## Acknowledgments

We acknowledge K.Strebel for providing Vif expressing vector (pcDNA hVif).

This work is supported by  **anRS** agence nationale des recherches sur le sida et les hépatites virales



Annexe 7 : Mon affiche de thèse. Merci à Fabrice.