

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

Lucile SINCK

**LA DIMERISATION DE L'ARN GENOMIQUE DU VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (HIV-1) : ROLE DANS
L'ENCAPSIDATION SELECTIVE ET L'EPISSAGE**

Soutenue le 29 novembre 2010 devant la commission d'examen:

Dr. Jean-Christophe PAILLART

Directeur de thèse

Dr. Christiane BRANLANT

Rapporteur externe

Dr. Philippe FOSSE

Rapporteur externe

Pr. Mario KELLER

Rapporteur interne

Dr. Marylène MOUGEL

Membre invité

Dr. Roland MARQUET

Membre invité

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

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, Christiane Branlant, Philippe Fossé et Mario Keller, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg, dans l'unité 9002 du CNRS « Architecture et Réactivité de l'ARN » dirigée par Eric Westhof et a été rendu possible grâce au soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Agence National de Recherches sur le Sida et les hépatites virales.

Au sein du laboratoire j'ai eu la chance d'être encadrée par Jean-Christophe Paillart. Mes premiers remerciements s'adressent à toi Chef! Merci pour ton aide précieuse, pour tes encouragements et ta patience. Tu as toujours voulu que je me dépasse et grâce à toi j'ai grandi aussi bien d'un point de vue scientifique que personnel.

Je tiens ensuite à remercier Roland Marquet, qui m'a donné l'opportunité de faire partie de son équipe. Merci de m'avoir fait confiance et pour tes conseils avisés tout au long de ma thèse.

Un grand merci aux membres de mon équipe : Catherine, Valérie, Serena, Delphine, Simon, Céline, Emilie, Gaëlle, Yazan, Cyrille et Ekram pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur écoute au quotidien. J'ai eu beaucoup de chance de passer ces années parmi vous. J'aimerais remercier plus particulièrement Delphine qui a participé à mon projet de thèse et a toujours été prête à répondre à mes questions, à donner un coup de main et à me taquiner... Merci à Simon qui m'a aidé à débiter et a été pour moi une référence. Merci à mes compagnes de thèse, Céline, Emilie et Gaëlle, pour les bons moments passés en votre présence. Enfin, je souhaite bonne chance aux nouveaux venus dans l'équipe, profitez bien de ces moments.

Merci également à tous les membres de l'UPR 9002 qui m'ont supportée durant ces quelques années. Je pense en premier lieu à Clément qui m'a soutenue durant mes premières années de thèse et à Séverine mon amie. Merci pour m'avoir remonté le moral et pour m'avoir bousculée quand j'en avais besoin, merci pour nos fous rires et pour tous les moments passés en ta présence. Je remercie ensuite Guillaume, Philippe Walter, Philippe Wolf, Philippe

Dumas, Dominique, Sondès, Eric, Pascale, Cédric, Olivier, Tom, Pierre, Anne-Catherine, Isabelle, Mattéo, Paola, Sarah, flore et Daniéla. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et pour les petites moqueries de certains qui ont rendu ces années plus douces. Merci à Bertrand qui m'a encouragée pendant la rédaction. Enfin, merci à Monique et Anaïs pour leur présence dans les moments difficiles et à François, Danièle et Sandra pour leur aide informatique et administrative et pour leur grande patience avec moi.

Je remercie vivement Marylène Mougel. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée, pour ton soutien, ton aide et tes conseils. Merci beaucoup à Ludo pour m'avoir formée en qPCR. Merci de m'avoir prêté un bout de ta paillasse et d'avoir supporté mes emprunts continuels de matériel à durée indéterminée... Merci aussi à toute la Mougel Team, Pierre-Jean, Célia, Séb et Bing. Je garderai un souvenir impérissable de mon séjour passé en votre présence.

Je remercie Christiane Branlant pour sa collaboration sur un sujet qui devrait encore avoir un bel avenir et merci à Maryline, qui est venue m'apprendre la technique et a réalisé les expériences.

Merci également à mon oncle, Edmond Lopez, pour toute l'aide qu'il m'a apportée. J'ai appris beaucoup de choses grâce à toi.

Enfin, j'aimerais remercier les personnes les plus importantes de ma vie, mes parents. Pour moi vous avez endossé tous les rôles, tour à tour soutien psychologique, manager, diététicien, sommelier... et enfin auditoire. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi et de m'avoir témoigné tant de fierté. Vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Merci également à tous ceux qui comptent pour moi mais que je n'ai pas cités ici pour m'avoir soutenue et pour croire en moi.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	1
I. Les virus : définitions et classification	1
1. Quelques généralités sur les virus	1
2. La famille des <i>Retroviridae</i>	2
2.1. Un peu d'histoire	2
2.2. Caractéristiques communes aux rétrovirus	3
2.3. Classification	5
3. Le genre des lentivirus	6
II. Le virus de l'immunodéficience humaine de type-1	8
1. L'infection par le HIV-1	8
1.1. Histoire d'une découverte	8
1.2. Origines et variabilité du HIV-1	9
1.3. Modes de transmission	11
1.4. Pandémie de SIDA	12
1.5. Pathogenèse de l'infection virale	13
2. Organisation génétique du HIV-1	15
2.1. L'ADN proviral	15
2.1.1. Les région non codantes	15
2.1.2. Les région codantes	16
2.2. L'ARN génomique	17
3. Le cycle réplcatif	18
3.1. Phase pré-intégrative	20
3.1.1. Entrée dans la cellule hôte	20
3.1.2. Décapsidation et rétrotranscription	21
3.1.3. Import nucléaire	24
3.1.4. Intégration	26
3.2. Phase post-intégrative	28
3.2.1. Expression des gènes viraux	28
3.2.1.1. Transcription du provirus	28
3.2.1.2. Epissage	30
3.2.1.3. Export des ARN viraux	33
3.2.2. Formation des particules virales	34

3.2.2.1.	Traduction	34
3.2.2.2.	Prise en charge de l'ARN génomique	35
3.2.2.3.	Assemblage	35
3.2.2.4.	Bourgeonnement	37
3.2.2.5.	Maturation	38
III.	La dimérisation de l'ARN génomique du HIV-1	40
1.	Nature dimérique du génome	40
2.	Éléments ARN impliqués dans la dimérisation	41
2.1.	Chez HIV-1	41
2.2.	Chez les autres rétrovirus	43
2.2.1.	Rétrovirus simples.....	43
2.2.1.1.	Alpharétrovirus.....	43
2.2.1.2.	Gammarétrovirus.....	43
2.2.2.	Rétrovirus complexes.....	44
2.2.2.1.	Deltarétrovirus.....	44
2.2.2.2.	Spumavirus.....	44
2.2.2.3.	Lentivirus autres que le HIV-1	45
2.3.	Chez des virus autres que les rétrovirus	45
3.	Mécanisme de la dimérisation	47
3.1.	Chez le HIV-1	47
3.1.1.	Initiation de la dimérisation	47
3.1.2.	La NC : un facteur intervenant en <i>trans</i>	48
3.1.3.	Stabilisation du dimère d'ARN génomique	50
3.1.3.1.	Mise en évidence d'une stabilisation du complexe	50
3.1.3.2.	Éléments ARN impliqués dans la stabilisation	52
3.1.3.3.	Mécanisme de stabilisation	55
3.2.	Chez le MLV.....	56
3.3.	Chez le HIV-2	59
4.	Lieu de formation du dimère d'ARN génomique.....	61
4.1.	Cellules ou virions ?.....	61
4.2.	Évidences d'une formation cellulaire.....	62
4.3.	Détermination du lieu cellulaire de formation des dimères	63
5.	Rôles de la dimérisation	66
5.1.	Assemblage et maturation des particules virales.....	66
5.2.	Rétrotranscription et recombinaison	67
5.3.	Traduction et encapsidation.....	68
5.3.1.	La traduction	68
5.3.2.	L'encapsidation.....	70

IV. La sélection de l'ARN génomique du HIV-1.....	72
1. Mécanisme d'encapsidation de l'ARN génomique.....	72
1.1. Le précurseur Gag	72
1.2. Motifs ARN impliqués dans l'encapsidation de l'ARNg.....	73
1.3. Interaction ARN/Protéine	75
1.4. Structure dynamique du complexe	76
2. La voie d'encapsidation de l'ARN génomique.....	77
2.1. Trafic nucléaire.....	78
2.1.1. Transcription et encapsidation	78
2.1.2. Transport nucléo-cytoplasmique	79
2.1.2.1. Export nucléaire et ciblage cytoplasmique.....	79
2.1.2.2. Recrutement nucléaire de l'ARNg par le précurseur Gag.....	81
2.1.2.3. Protéines impliquées dans le ciblage cytoplasmique	81
2.2. Trafic cytoplasmique.....	82
2.2.1. Traduction et encapsidation	82
2.2.2. Régulation de la traduction	83
2.2.2.1. Compétition entre le ribosome et le précurseur Gag	83
2.2.2.2. Rôle de l'oligomérisation du précurseur Gag.....	85
2.2.2.3. Rôle des « processing bodies » et des granules de stress	86
2.2.3. Translocation à la membrane plasmique.....	86
3. Encapsidation d'ARN non génomiques.....	88
3.1. ARN cellulaires	89
3.2. ARN viraux	89
V. Stratégies inhibitrices visant le DIS et/ou la dimérisation	91
1. Stratégies antisens	91
2. Fixation d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides.....	92
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	95
RESULTATS ET DISCUSSIONS	97
I. Etude de la dimérisation <i>in vitro</i> des ARN épissés du HIV-1.....	97
1. Introduction et objectifs.....	97
2. Article : Dimérisation <i>in vitro</i> des ARN épissés du HIV-1.....	98
3. Discussion	108
3.1. Les ARN épissés du HIV-1 dimérisent <i>in vitro</i> par l'intermédiaire d'interactions boucle-boucle au niveau du DIS	108
3.2. Les régions en aval du DIS sont importantes pour la stabilité des dimères	108
3.3. Les ARN épissés forment des hétérodimères avec l'ARNg.....	112

3.4. La formation de dimères est contrainte par la structure	113
II. Etude de la dimérisation <i>ex vivo</i> des ARN du HIV-1	115
1. Introduction et objectifs.....	115
2. Matériels et méthodes.....	116
2.1. Constructions plasmidiques et synthèse d'ARN	116
2.2. Mises au point <i>in vitro</i>	118
2.2.1. Capacité de dimérisation des fragments d'ARN viraux.....	118
2.2.2. Cartographie en solution	118
2.2.2.1. Modification au sulfate de diméthyle.....	118
2.2.2.2. Détection des modifications	119
2.2.3. Capture des dimères d'ARN contenant l'aptamère.....	120
2.3. Mises au point <i>ex vivo</i>	121
2.3.1. Transfection et extraction des ARN et des protéines dans les cellules et dans les virions	121
2.3.2. Test d'activité de la rétrotranscriptase (RT).....	122
2.3.3. Western blot	122
2.3.4. Capture des dimères et vérification par RT-PCR et Northern blot	123
2.3.4.1. RT-PCR.....	123
2.3.4.2. Northern blot	124
3. Résultats	126
3.1. Mises au point <i>in vitro</i>	126
3.1.1. Le choix du site d'insertion du motif aptamère influence la dimérisation des fragments d'ARN <i>in vitro</i>	126
3.1.2. La structure secondaire du DIS est conservée au sein des dimères d'ARN.....	127
3.1.3. La renaturation des ARN viraux défavorise la liaison de l'aptamère à la streptavidine.....	129
3.2. Mises au point <i>ex vivo</i>	131
3.2.1. Les constructions contenant l'aptamère permettent la production de particules virales.....	131
3.2.2. Les constructions ne permettent pas la capture d'ARN <i>ex vivo</i>	132
4. Discussion	134
III. Rôle du DIS dans l'épissage et l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1	139
1. Introduction et objectifs.....	139
2. Approche <i>in vitro</i>	140
2.1. Stratégie expérimentale	140
2.1.1. Construction plasmidique et synthèse d'ARN	140
2.1.2. Epissage <i>in vitro</i> et analyse électrophorétique	140
2.2. Résultats	141
2.3. Discussion	144
3. Article : Le DIS du HIV-1 est impliqué dans la régulation de l'épissage et dans l'encapsidation de l'ARN viral.....	146

IV. Fonctions de la protéine virale Vif dans la dimérisation de l'ARNg du HIV-1.....	178
1. Introduction et objectifs.....	178
2. Article : Vif est une protéine chaperon d'ARN qui pourrait réguler temporellement la dimérisation de l'ARN et les phases précoces de la rétrotranscription du HIV-1	178
3. Vif inhibe la formation de dimères stables induit par la NC sur de larges fragments d'ARN.....	192
4. Discussion	193
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	202
ANNEXES.....	235

ABREVIATIONS

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
BSA	« bovine serum albumin »
C	cytosine
CA	capside
cpm	coup par minute
CPN	complexe du pore nucléaire
CRF	« circulating recombinant form »
CypA	cyclophiline A
Da	dalton
db	double brin
DIS	« dimerization initiation site »
DLS	« dimer linkage structure »
DMEM	« dulbecco modified eagle medium »
DMS	diméthyle sulfate
DNase	endodésoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléotide tri-phosphate
DO	densité optique
DTT	dithiotréitol
ECL	« enhanced chemiluminescence »
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate
EJC	« exon junction complex »
<i>env</i>	« enveloppe »
ESCRT	« endosomal sorting complex required for transport »
FPLC	« fast protein liquid chromatography »

ABREVIATIONS

G	guanine
<i>gag</i>	« group-specific-antigen »
gp	glycoprotéine
GRID	« gay related immunodeficiency syndrome »
HEK	« human embryonic kidney »
IN	intégrase
kb	kilobase
LTR	« long terminal repeat »
M	molaire
MA	matrice
MOPS	« 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid »
NC	nucléocapside
Nef	« negative factor »
NES	« nuclear export signal »
NLS	« nuclear localization signal »
nt	nucléotide
P bodies	« processing bodies »
pb	paire de base
PBS	« primer binding site »
PCR	« polymerase chain reaction »
PIC	« pre-integration complex »
<i>pol</i>	« polymerase »
PPT	« polypurine tract »
PR	protéase
PSI, Ψ	« packaging signal »
R	région répétée en 5' et en 3' de l'ARNg
Rev	« regulator of virion expression »
RNase	ribonucléase
RNP	ribonucléoprotéique
RRE	« rev responsive element »
RT	rétrotranscriptase
RTC	« reverse transcription complex »
SA	site accepteur d'épissage

ABREVIATIONS

SD	site donneur d'épissage
SDS	sodium dodécyl sulfate
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA	« small interfering RNA »
SSD	« salmon sperm DNA »
SU	sous-unité de surface
T	thymine
TAR	« trans-acting responsive element »
Tat	« transcriptional transactivator »
TCA	acide trichloroacétique
TM	sous-unité transmembranaire
TRBP	« TAR RNA binding protein »
TRIM	« tripartite motif protein »
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U	uracile
U3	élément de séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARN génomique
U5	élément de séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARN génomique
UTR	« untranslated region »
Vif	« virion infectivity factor »
VLP	« virus-like particle »
Vpr	« viral protein R »
Vpu	« viral protein U »

Abréviations de noms de virus

ALV	virus de la leucose aviaire
BLV	virus de la leucémie bovine
CAEV	virus caprin de l'arthrite et de l'encéphalopathie
CFV	virus spumeux du chimpanzé
EIAV	virus de l'anémie infectieuse équine
FIV	virus de l'immunodéficience féline
HCV	virus de l'hépatite C
HFV	virus spumeux humain
HIV-1, -2	virus de l'immunodéficience humaine de type 1, de type 2
HTLV-1	virus de la leucémie humaine des lymphocytes T de type 1
LAV	virus associé à des lymphadénopathies
MLV	virus de la leucémie murine
MMTV	virus des tumeurs mammaires de souris
MoMLV	virus de la leucémie murine de Moloney
MPMV	virus murin Mason-Pfizer
MSV	virus du sarcome murin
PFV	virus spumeux de primates
RSV	virus du sarcome de Rous
SIV	virus de l'immunodéficience simienne
VMV	virus visna du mouton (« visna maedi virus »)
WDSV	virus du sarcome du derme de la perche
XMRV	virus xénotropique apparenté au virus de la leucémie murine

INTRODUCTION

I. Les virus : définitions et classification

1. Quelques généralités sur les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, incapables de croître en taille et en volume et de se diviser pour se multiplier (281). Ils ne peuvent se répliquer qu'à l'intérieur d'une cellule vivante en détournant la machinerie de biosynthèse cellulaire. Grâce au milieu extérieur, ils vont pouvoir se propager et infecter d'autres cellules. Le virus se dissémine alors sous forme de virion, une entité nucléoprotéique infectieuse constituée d'un acide nucléique qui lui sert de génome et d'une capsule protéique, la capside, qui protège ce génome. La capside peut être construite selon une symétrie sphérique (icosaédrique) ou hélicoïdale et elle peut être enveloppée d'une bicouche phospholipoprotéique formée de lipides d'origine cellulaire et de protéines virales et cellulaires. Dans le cas des virus nus, la capside contient des protéines qui vont interagir avec des récepteurs cellulaires et permettre l'entrée du virus. Ces protéines de reconnaissance sont contenues dans la bicouche phospholipidique des virus enveloppés.

L'organisation simple des virus a permis leur classification selon quelques principaux critères (26, 53) : la nature de leur matériel génétique (ADN ou ARN, simple brin ou double brin, mono ou multipartite), la polarité du génome (négative, positive ou ambisens), la symétrie de la capside et la présence ou non d'une enveloppe lipidique (Figure 1). Le large panel de virus existant est à l'origine de la diversité des stratégies mises en place pour leur multiplication. Il existe différents modes d'entrée dans la cellule hôte, de synthèse des protéines virales et du matériel génétique, d'assemblage des nouvelles particules virales, de libération hors de la cellule et de dissémination. Les virus ont un spectre d'hôte plus ou moins large et peuvent parasiter l'ensemble des êtres vivants. Chez l'homme, les infections virales sont la première cause de mortalité au monde.

Seuls les virus utilisent l'ARN comme matériel génétique et la grande majorité des virus de vertébrés sont des virus à ARN enveloppés (53) (Figure 1). Par ailleurs, les virus à ARN possèdent une polymérase ARN dépendante qui va permettre la synthèse d'ARN ou d'ADN viraux. Dans tous les cas les ARN polymérases virales n'ont pas d'activités correctrices et

vont introduire des mutations dans le génome lors de la réplication, à l'origine de la notion de quasi-espèce (114, 121). Cette variabilité de séquence peut diminuer la capacité de détection des virus et des cellules infectées par le système immunitaire, ce qui est particulièrement problématique dans la création de vaccins antirétroviraux.

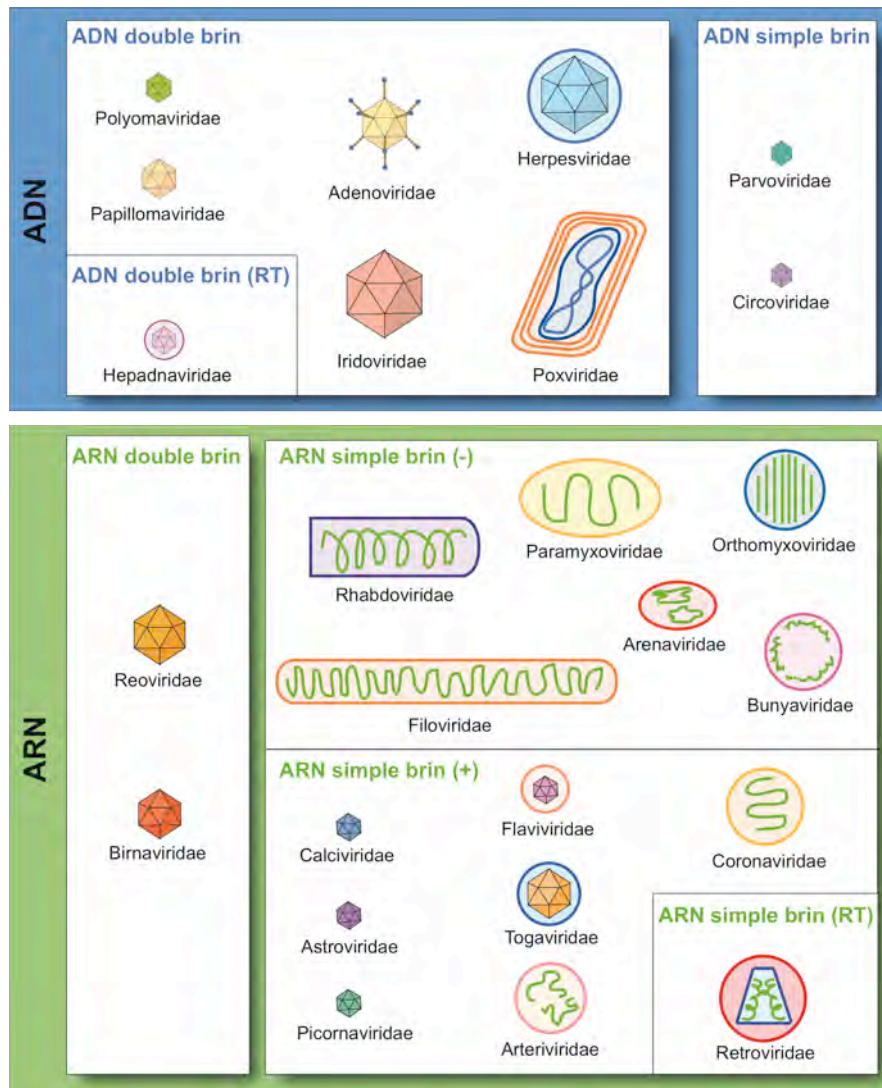


Figure 1 : Les familles de virus infectant les vertébrés (D'après (53)).

2. La famille des *Retroviridae*

2.1. Un peu d'histoire

Les *Retroviridae* constituent une vaste famille de virus qui infectent les invertébrés et les vertébrés. Ils possèdent un génome ARN qui est converti en un ADN bicaténaire lors du cycle

réplicatif par une enzyme virale, la rétrotranscriptase (RT). C'est en 1970, que Howard Temin et David Baltimore découvrent indépendamment chez le virus du sarcome de Rous (RSV) et le virus de la leucémie murine (MLV) l'enzyme « hérétique » qu'est la RT (27, 444). Cette enzyme présente une fonction jusqu'alors inconnue dans la biologie cellulaire : la lecture d'un modèle ARN et sa conversion en une molécule d'ADN. La présence de cette enzyme dans ce groupe d'agents viraux a donné son nom à la famille des *Retroviridae*. Par la suite, cette enzyme a été mise en évidence dans d'autres familles de virus, comme les *Hepadnaviridae* et les *Caulimoviridae* (195).

L'histoire des *Retroviridae* est riche et commence dès le début du siècle dernier. Avant même la caractérisation des virus comme agents microbiens, les danois Vilhelm Ellerman et Oluf Bang ont réussi en 1908 à induire des leucémies chez le poulet par inoculation de filtrats de cellules provenant de tissus leucémiques (122). En 1911, Peyton Rous parvient à transmettre des tumeurs chez le poulet à partir d'un filtrat de tissus cancéreux et confirme ainsi la possibilité d'une étiologie infectieuse dans les processus cancéreux (375). Ces rétrovirus oncogènes sont aujourd'hui connus sous les noms respectifs de virus de la leucose aviaire (ALV) et de virus du sarcome de Rous (RSV).

Il faut attendre plus de quarante ans pour observer le premier rétrovirus de mammifères avec la découverte du virus de la leucémie murine (MLV) en 1957 par Ludwig Gross (181). En 1981, Robert Gallo découvre le premier rétrovirus humain, le HTLV-1 (151) et c'est en 1983 que le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (HIV-1) est identifié par l'équipe de Luc Montagnier (31). La liste des rétrovirus s'allonge encore. En 2006, l'équipe de Joseph DeRisi découvre le XMRV (virus xénotropique apparenté au virus de la leucémie murine) (450). Ce nouveau rétrovirus humain serait associé au syndrome de fatigue chronique et à des cancers de la prostate (131, 180, 271).

La description de nombreux rétrovirus oncogènes animaux a révélé de nouveaux concepts d'interaction entre un virus et son hôte, y compris l'intégration d'acides nucléiques, la transmission verticale du virus, la persistance virale et le processus de latence.

2.2. Caractéristiques communes aux rétrovirus

En dépit de leur grande diversité, les rétrovirus possèdent de nombreux traits communs (81, 426). Ce sont les seuls virus diploïdes. Leur génome est constitué de deux molécules d'ARN monocaténaire homologue de 7 à 12 kb et de polarité positive qui s'associent en

dimère. La stratégie répliquative des rétrovirus est caractéristique. L'ARN génomique (ARNg) viral est tout d'abord converti en ADN bicaténaire par la RT virale lors de la réaction de rétrotranscription. Après import dans le noyau, l'ADN est intégré dans le génome de la cellule hôte sous forme de provirus par l'intégrase (IN) virale. Ce processus est à l'origine du phénomène de persistance virale. La transcription du provirus génère des transcrits coiffés à leur extrémité 5' et polyadénylés à l'extrémité 3' qui servent à la synthèse protéique et à l'assemblage de nouvelles particules virales. Après leur relargage par bourgeonnement, les virions subissent une dernière étape de maturation, afin de devenir infectieux.

L'organisation moléculaire est conservée au sein des rétrovirus (Figure 2A). Ils possèdent tous les gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent respectivement les protéines de structure (matrice, capsid et nucléocapsid), enzymatiques (protéase, rétrotranscriptase et intégrase) et d'enveloppe (surface et transmembranaire). Mais alors que les rétrovirus simples ne comportent que ces trois gènes, les rétrovirus complexes possèdent en plus des phases de lecture ouvertes qui codent pour des protéines auxiliaires et régulatrices impliquées dans la pathogénèse virale. Les régions codantes sont bordées par des régions non-traduites, les LTR (Long Terminal Repeat) qui contiennent de nombreux signaux nécessaires à la propagation du virus. Les LTR et les gènes *gag* et *pol* sont également retrouvés chez les rétrotransposons à LTR, des rétroéléments endogènes mobiles dont le cycle répliquatif est similaire à celui des rétrovirus.

Les rétrovirus ont un diamètre compris entre 80 et 120 nm. Ils sont enveloppés d'une bicouche phospholipidique constituée de lipides d'origine cellulaire et de glycoprotéines virales (Figure 2B). Les glycoprotéines de l'enveloppe sont constituées de deux sous-unités, la sous-unité de surface (SU) et la sous-unité transmembranaire (TM) produites après clivage du précurseur Env par une endoprotéase cellulaire. Sous l'enveloppe se trouve une membrane interne constituée par la protéine de matrice (MA) qui renferme la capsid ou « core », elle-même formée de la protéine de capsid (CA). A l'intérieur du core (dont la forme est caractéristique de chaque genre de rétrovirus) se trouve le dimère d'ARNg viral complexé à la protéine de nucléocapsid (NC). Le core contient également d'autres constituants nécessaires à l'initiation d'un nouveau cycle de répliquacion comme l'ARNt amorce de la rétrotranscription, la rétrotranscriptase (RT), la protéase (PR) et l'intégrase (IN), ainsi que des protéines accessoires dans le cas des rétrovirus complexes.

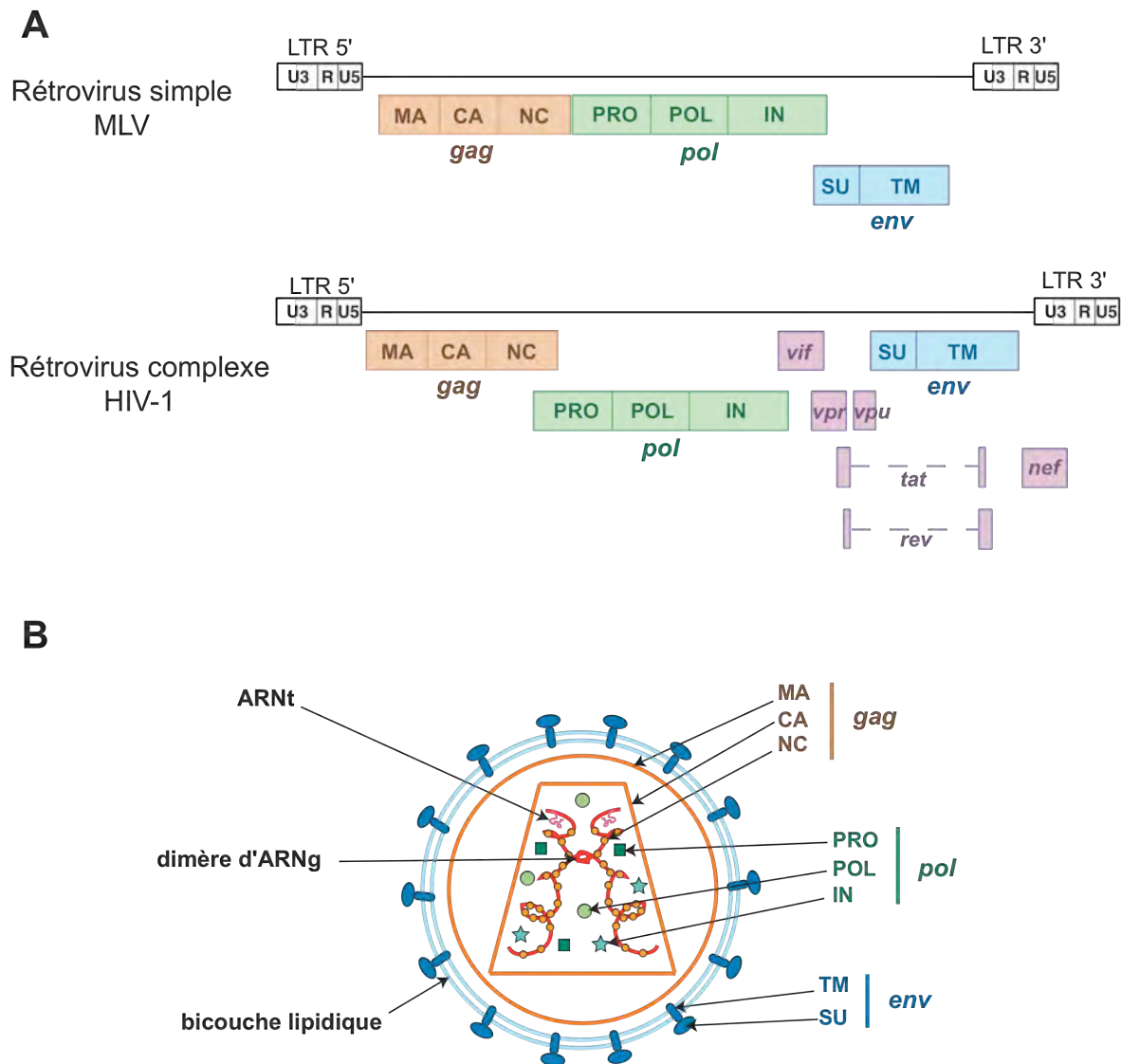


Figure 2 : (A) Organisation génétique des rétrovirus. La position relative des différents cadres de lecture ainsi que les répétitions terminales LTR du virus de la leucémie murine (MLV, rétrovirus simple) et du virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (HIV-1, rétrovirus complexe) sont représentées. (B) Structure schématique d'une particule rétrovirale.

2.3. Classification

La famille des *Retroviridae* comporte sept genres (Tableau 1) (81, 426). Cette classification a été établie grâce à des alignements de séquences nucléotidiques des gènes *pol* qui présentent un haut degré de similarité ainsi que des alignements de séquences protéiques de la RT, la protéine la plus conservée au sein des rétrovirus. Ces sept genres se divisent en deux catégories selon la composition simple ou complexe de leur génome viral. Par ailleurs, cinq genres de rétrovirus sont à l'origine de cancers. Le processus de tumorigénèse peut impliquer des oncogènes, qui favorisent la prolifération cellulaire, cependant, la présence de

ces gènes n'est pas nécessaire à tous les rétrovirus responsables de tumeurs (118, 133). Les lentivirus et les spumavirus, qui n'induisent pas de cancers, ont quant à eux des effets cytopathogènes plus ou moins importants allant jusqu'à la destruction des cellules hôtes.

Genre	Espèces types	Génome	Cancer
Alpharétrovirus	virus de la leucose aviaire, ALV	Simple	oui
Bétarétrovirus	virus des tumeurs mammaires de souris, MMTV	Simple	oui
Gammarétrovirus	virus de la leucémie murine, MLV virus xénotropique apparenté au virus de la leucémie murine, XMRV	Simple	oui
Deltarétrovirus	virus de la leucémie bovine, BLV virus humain T-lymphotrophe, HTLV	Complexe	oui
Epsilonrétrovirus	virus du sarcome du derme de la perche, WDSV	Complexe	oui
Lentivirus	virus de l'immunodéficience humaine, HIV	Complexe	non
Spumavirus	virus spumeux de primates, PFV	Complexe	non

Tableau 1 : Classification des rétrovirus.

3. Le genre des lentivirus

Les lentivirus sont à l'origine de maladies persistantes chroniques à évolution lente. Ils sont spécifiques des mammifères et se classent en cinq séro-groupes selon l'espèce infectée (primate, félin, cheval, chèvre/mouton, bétail) (140). Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence l'existence d'un rétrovirus fossile chez le lapin (165), nommée « Relik », étendant ainsi la répartition des lentivirus (Figure 3).

Les virions renferment tous une capsid de forme conique (426). Celle-ci contient un génome dimérique de grande taille (supérieur à 9 kb) qui code notamment pour des protéines régulatrices impliquées dans la transcription et l'export nucléaire des ARN viraux. Les voies d'assemblages des lentivirus sont caractéristiques. Elles conduisent au bourgeonnement des particules virales dont la libération progressive entraîne la lyse des cellules hôtes.

Les lentivirus peuvent être divisés en deux groupes selon leur tropisme cellulaire. Ainsi, certains lentivirus n'infectent que la lignée monocytes/macrophages comme les virus EIAV,

INTRODUCTION

CAEV et VMV. D'autres, tels que les virus HIV, SIV et FIV, infectent également les lymphocytes T grâce à la reconnaissance des antigènes CD4 présents à leur surface. La destruction des lymphocytes T CD4+ provoque une immunodéficience à l'origine du SIDA. L'organisme infecté est alors sujet à de multiples maladies opportunistes.

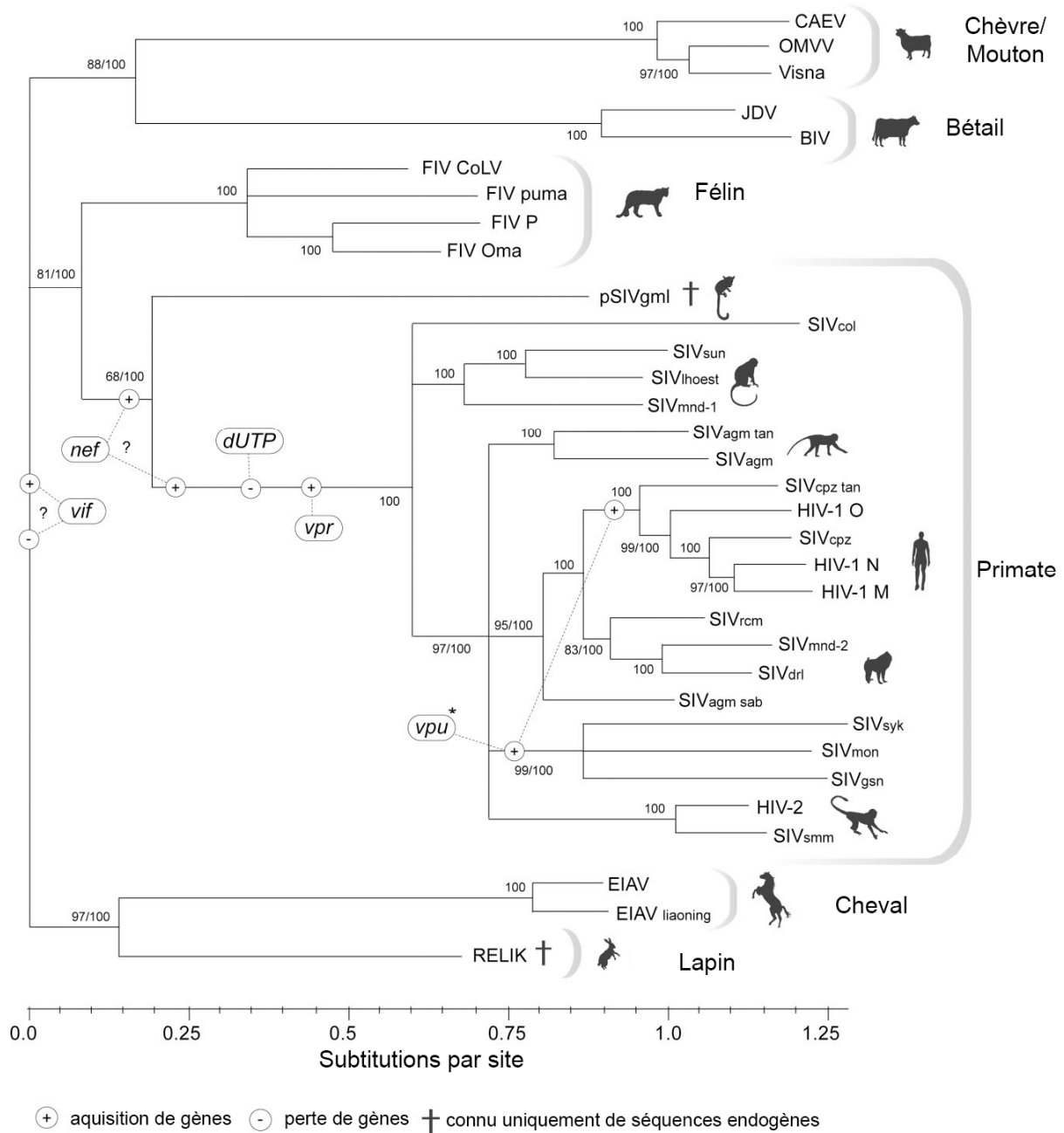


Figure 3 : Relations phylogénétiques entre les lentivirus, adapté de (165). Le nouveau séro-groupe endogène chez le lapin est représenté par une croix.

II. Le virus de l'immunodéficience humaine de type-1

1. L'infection par le HIV-1

1.1. Histoire d'une découverte

Les premiers signes de l'infection par le HIV-1 remontent à la fin des années 1970, mais ce n'est qu'en juillet 1981 que l'existence d'un problème sanitaire est avérée par le centre de contrôle et de prévention des maladies d'Atlanta (Center for Disease Control and Prevention, CDC). A cette époque, des cliniciens de New York et Los Angeles se retrouvent confrontés à une affection particulière qui touche de nombreux homosexuels (175). Les patients présentent une asthénie et une perte de poids significatives, ainsi que des pneumonies et parfois même des formes rares et atypiques de cancer, comme le sarcome de Kaposi qui s'attaque aux leucocytes. Ces manifestations pathologiques sont associées à une déficience du système immunitaire causée par une forte déplétion des cellules lymphocytaires circulantes. Ce nouveau syndrome d'immunodépression, initialement appelé GRID (Gay Related ImmunoDeficiency Syndrome) ou « syndrome gay », se propage rapidement à d'autres types de populations telles que des toxicomanes, des Haïtiens ou encore des hémophiles transfusés. Le terme AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome) ou SIDA en français fait alors son apparition pour désigner la maladie.

A partir de 1982, des cas similaires apparaissent en France. La progression de l'épidémie et l'atteinte des cellules immunitaires suggèrent une origine virale. En 1983, l'équipe de Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier, de l'Institut Pasteur, découvre et isole l'agent responsable du SIDA, un rétrovirus qui prend le nom de LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) (31), alors que de l'autre côté de l'atlantique, l'équipe de Robert Gallo isole un variant du HTLV-I, le HTLV-III (152, 153). En 1985, les génomes du LAV et du HTLV-III sont séquencés, confirmant que ces deux appellations désignent un seul et même virus. Cette même année à l'Institut Pasteur, un second virus est identifié chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest, le LAV-2 (73). Ces deux virus sont rebaptisés en 1986 en Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 et 2 (HIV-1 et HIV-2). Ils présentent des symptômes cliniques et des propriétés structurales similaires ainsi qu'une homologie de séquence de 42%.

L'identification du virus responsable du SIDA a été sujette à controverse durant de nombreuses années. En 1994, le gouvernement américain attribue la paternité de la

découverte à l'équipe française. La polémique est définitivement close après la remise du prix Nobel de médecine en 2008 à Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi.

1.2. Origines et variabilité du HIV-1

L'apparition du HIV est probablement d'origine zoonotique (219, 398). Le passage d'un virus simien, le SIV, à l'homme aurait eu lieu à la fin du XIX^e siècle ou au début du XX^e siècle. A cette époque, en Afrique équatoriale, les singes étaient chassés et servaient de gibiers ou d'animaux de compagnie. La transmission serait due à des expositions à du sang contaminé par morsures ou par blessures lors de l'abattage des animaux (156).

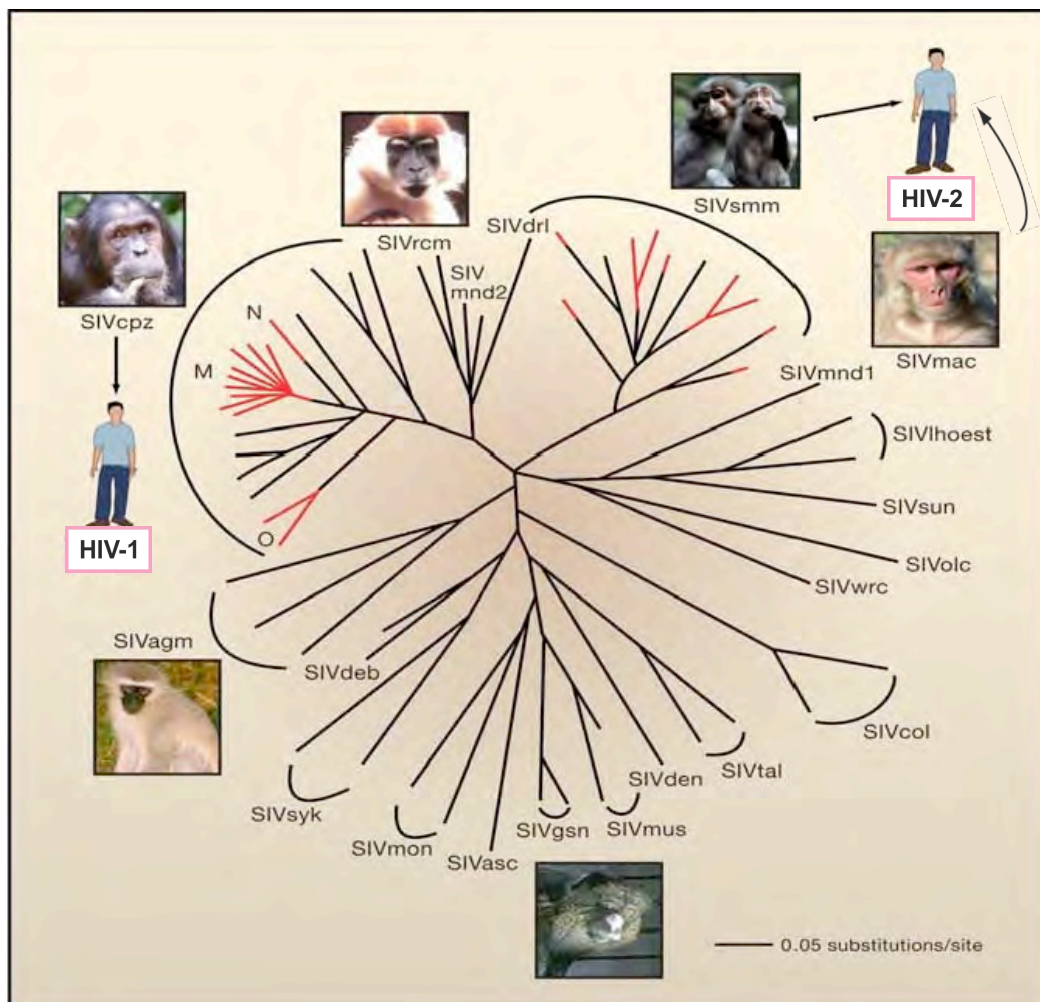


Figure 4 : Arbre phylogénétique des rétrovirus humains (HIV-1 et HIV-2) et de primates (SIV), adapté de (190). Les virus HIV-1 et HIV-2 sont indiqués par des lignes rouges.

INTRODUCTION

Il existe dix-huit espèces de singes vivant en Afrique et en Asie qui peuvent être infectées par le SIV (190). L'analyse phylogénétique des lentivirus (Figure 4) montre que le SIV du chimpanzé (SIVcpz) est le plus apparenté au HIV-1. L'étude des relations évolutives avec le SIVcpz, a permis la subdivision du HIV-1 en trois groupes M (Major), O (Outlier) et N (Non-O/Non-M), qui présentent au moins 30% de dissemblance entre eux. Par ailleurs, un quatrième groupe, le groupe P (Pending), a récemment été identifié chez une patiente camerounaise (349). Ce groupe très proche du SIV du gorille (SIVgor) ne semble présenter aucun événement de recombinaison avec les autres groupes du HIV-1.

Le groupe M est le principal responsable de la pandémie de SIDA à l'heure actuelle. Il comprend douze sous-types, dont neuf sont non recombinants avec 15-20% de différence (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et trois correspondent à des formes recombinantes circulantes (CRF, Circulating Recombinant Form). La répartition géographique des sous-types est variable (Figure 5), ainsi le sous-type B est retrouvé principalement en Europe, en Amérique du nord et en Australie, alors que le sous type C se localise préférentiellement en Afrique. Les groupes O et N sont rares et sont retrouvés quasi exclusivement en Afrique Centrale, l'épicentre de la pandémie (156, 219, 398).

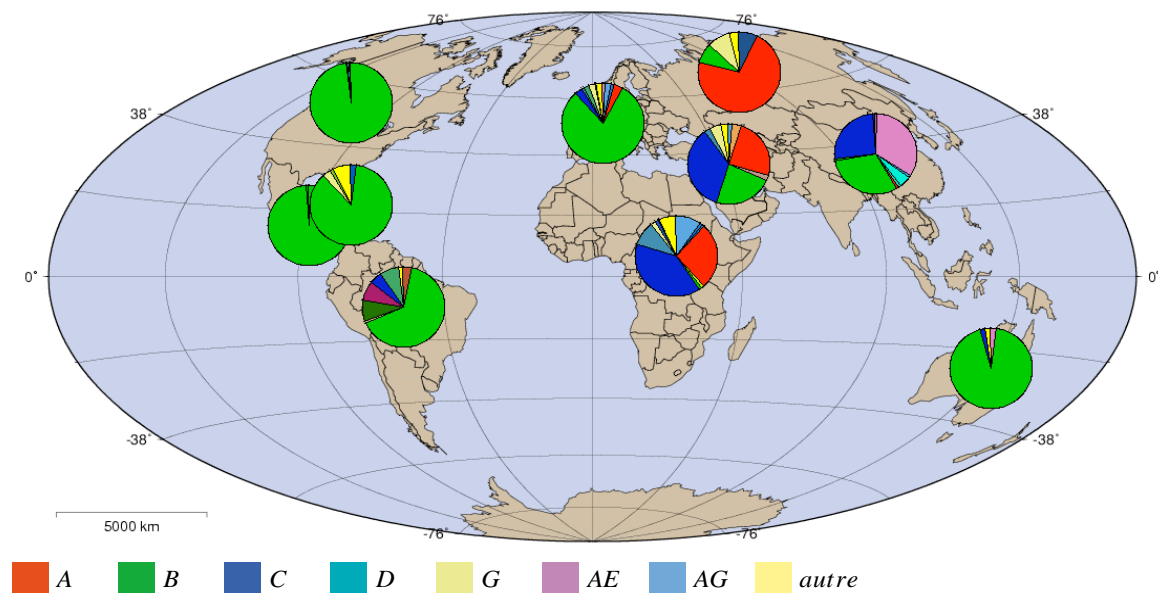


Figure 5 : Planisphere montrant la distribution des sous-types du HIV-1 en 2008. (Source : Laboratoire National de Los Alamos, <http://www.hiv.lanl.gov>).

L'analyse phylogénétique du HIV-2 (Figure 4) montre que ce dernier tient sa source du SIVsmm (infectant les singes sooty mangabeys) et du SIVmac (infectant les macaques). Ces virus partagent une structure génétique identique et sont les seuls lentivirus de primates qui codent pour la protéine auxiliaire Vpx également retrouvée chez le HIV-2. De plus, la zone où le HIV-2 est endémique et l'habitat naturel de ces singes coïncident. L'épidémie de HIV-2, qui n'a pas atteint la même ampleur que celle du HIV-1, est responsable de SIDA principalement en Afrique de l'Ouest. Cette épidémie a conduit à l'émergence de sept sous-types (A, B, C, D, E, F et G) (157, 437).

La grande variété de groupes et sous-types des HIV-1 et 2 s'explique par leur très grande variabilité génétique. Au sein même d'un individu infecté il existe une population polymorphe de virus qui présente une multitude de génomes différents. Cette variabilité s'explique par un taux d'erreur important de la transcriptase inverse, de l'ordre de $1,4 \cdot 10^{-5}$ par cycle de réplication (4), par un taux de réplication du virus très élevé (10000 virions par jour et par cellule infectée) ou encore par le processus de recombinaison.

1.3. Modes de transmission

L'homme vit entouré de singes depuis toujours et ces derniers sont porteurs du SIV depuis des milliers d'années. Pourtant, la large diffusion du HIV n'a eu lieu que tardivement. Les contaminations antérieures seraient ainsi restées isolées et c'est au XX^e siècle avec l'urbanisation, les mouvements de populations, l'évolution des techniques médicales, le changement des comportements sexuels et l'apparition de drogues injectables que la propagation du virus a été facilitée et a donné naissance à une pandémie mondiale.

Ceci est en relation directe avec le mode de transmission du virus qui nécessite des contacts étroits entre individus pour se propager. Ce virus fragile est retrouvé dans tous les liquides biologiques : sang, sperme, sécrétions vaginales, lait maternel, salive, larmes, liquide céphalo-rachidien ou encore urine (www.unaids.org). Il existe trois voies de transmission :

- la voie sexuelle est à l'origine de 80% des infections dans le monde et 70% de ces infections ont lieu au cours de rapports hétérosexuels. La contamination se fait par contact entre les muqueuses et le sang ou les sécrétions sexuelles contaminés ;
- la voie veineuse est un mode de transmission mineur et comporte deux groupes à risque : les malades qui nécessitent des transfusions sanguines et les usagers de drogues injectables.

L'épidémie connaît des records de progression dans la population toxicomane qui reste la plus touchée ;

- la voie materno-fœtale touche essentiellement l'Afrique. La transmission peut se faire à différents moments, durant la grossesse (*in utero*), au moment de l'accouchement et au cours de l'allaitement surtout lorsque la mère est phase de primo-infection. Ce mode de transmission est particulièrement inquiétant en Afrique puisque 60% des personnes infectées sont des femmes (www.unaids.org).

1.4. Pandémie de SIDA

Dans un nombre croissant de pays, les niveaux d'infection ainsi que le nombre de décès liés au HIV sont en baisse. Le monde voit enfin des avancées dans sa riposte au SIDA et de plus en plus de pays offrent l'accès universel aux traitements antirétroviraux et aux services de prévention. Mais le SIDA reste une priorité sanitaire majeure ; l'épidémie continue de défier tous les efforts. Le nombre de personnes infectées continue d'augmenter et dans les pays les plus touchés le SIDA a réduit l'espérance de vie de 20 ans, ralenti la croissance économique et aggravé la pauvreté.

Depuis le début de l'épidémie, plus de 25 millions de personnes sont décédées des suites de l'infection. En 2008, le nombre de personnes vivant avec le HIV dans le monde a atteint un total estimé à 33,4 millions (Figure 6), 20% plus élevé qu'en 2000. L'accroissement traduit les effets combinés de l'impact positif des thérapies antirétrovirales et du taux élevé de nouvelles infections, s'élevant à 2,7 millions pour l'année 2008. Ce taux a diminué dans plusieurs pays d'Afrique grâce à la prévention et aux changements de comportements sexuels, mais il continue d'augmenter en Europe orientale et en Asie. Le nombre de personnes décédées en 2008 est de 2 millions, plus faible qu'en 2004 où il avait atteint son maximum. Cette diminution est due à l'accès aux traitements antirétroviraux multiplié par dix depuis l'année 2000 dans les pays à faibles revenus. Cependant, le nombre de personnes nouvellement infectées est toujours plus élevé que le nombre de personnes traitées.

L'épidémie nous a fait prendre conscience d'une importante disparité dans le domaine de la santé et représente un grand traumatisme au sein des ménages et des communautés. L'Afrique sub-saharienne reste la région la plus lourdement touchée, avec 71% de l'ensemble des nouvelles infections totalisées par le VIH en 2008. Le SIDA y a rendu orphelin plus de 12 millions d'enfants (www.unaids.org).

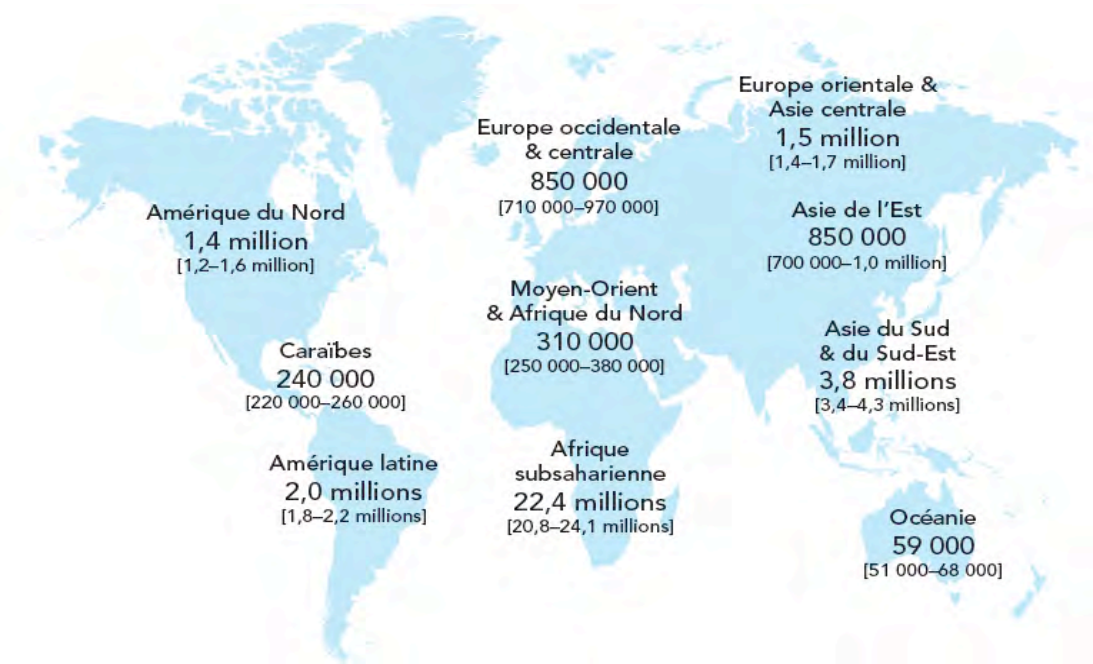


Figure 6 : Nombre d'enfants et d'adultes vivant avec le HIV en 2008. (Source : ONUSIDA, rapport mondial sur l'épidémie de SIDA 2009).

1.5. Pathogenèse de l'infection virale

Le SIDA est causé par une infection chronique du système immunitaire qui conduit à la destruction progressive des cellules piliers de ce système, les lymphocytes T porteurs du récepteur CD4. Cette molécule s'exprime également à la surface d'autres cellules, comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux (94, 229). Lorsqu'un individu est contaminé, la dissémination se fait tout d'abord par l'intermédiaire des cellules dendritiques présentes au niveau des muqueuses. Ces cellules acheminent les virus aux ganglions lymphatiques où ils entrent en contact avec les monocytes/macrophages et les lymphocytes T CD4+ (467). Les virions vont alors pouvoir coloniser la circulation sanguine.

Lors de l'infection par le HIV-1, on distingue trois phases (Figure 7) :

- la primo-infection ou phase aiguë : cette phase dure quelques semaines. La virémie très élevée à ce stade est à l'origine de la dissémination rapide du virus dans tout l'organisme. Parallèlement, le nombre de lymphocytes T chute d'environ 1000 cellules/mm³ à environ 600 cellules/mm³. La lyse des lymphocytes a plusieurs origines, comme les effets cytopathogènes du virus et l'induction de l'apoptose par la cellule infectée. En outre, le système immunitaire s'enclenche ; il reconnaît les antigènes viraux à la surface de la cellule et induit la production

INTRODUCTION

d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid. Ceci correspond à la phase de séroconversion. Ainsi, à la fin de cette phase, la quantité de virus plasmatique décroît ;

- la phase asymptomatique : elle peut durer de nombreuses années. La charge virale est constante et le taux de lymphocytes T commence par augmenter légèrement. Il se crée ensuite un équilibre fragile entre la production de virus et son élimination par le système immunitaire. Puis la tendance s'inverse, les lymphocytes s'activent permettant au virus de se répliquer activement et d'entraîner leur chute jusqu'au seuil de 200 cellules/mm³ ;

- la phase SIDA : elle se déclare lorsque la production des lymphocytes ne compense plus leur destruction. A partir de ce stade, l'organisme produit plusieurs millions de particules virales par jour, le système immunitaire affaibli ne peut plus lutter contre les agressions. De nombreuses maladies opportunistes se développent (tuberculose, pneumocystose), des virus latents se réveillent (comme l'herpesvirus à l'origine du syndrome de Kaposi) aboutissant au décès de l'individu.

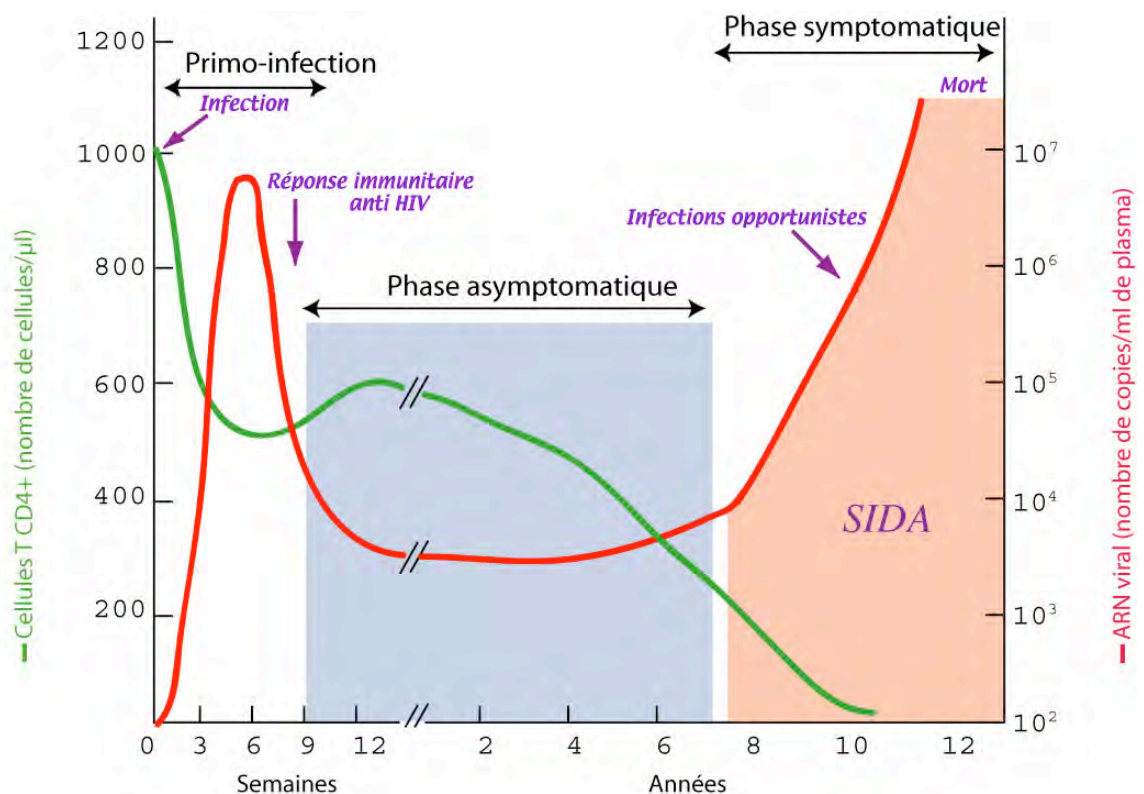


Figure 7 : Evolution de l'infection par le HIV-1 chez des individus ne recevant pas de traitement antiviral, adapté de (81).

2. Organisation génétique du HIV-1

Afin d'établir une infection productive au sein de la cellule hôte, le génome ARN du HIV-1 est tout d'abord convertit en ADN bicaténaire lors de l'étape de rétrotranscription. Une fois intégré dans l'ADN cellulaire, le provirus va permettre la néosynthèse de nombreux ARN viraux, nécessaires à la production de nouvelles particules virales.

2.1. L'ADN proviral

2.1.1. Les régions non codantes

L'ADN proviral est entouré de deux régions non-codantes répétées, les LTR. Ces extrémités sont indispensables à l'étape d'intégration de l'ADN viral et lors de la transcription du génome viral car ils renferment des séquences promotrices qui vont réguler la transcription du provirus par la machinerie cellulaire (363). Chaque LTR se subdivise en trois domaines : U3 (unique à l'extrémité 3' sur l'ARNg) (localisé aux positions -454 à -1 sur le LTR5'), R (redondant sur l'ARNg) (+1 à +94) et U5 (unique à l'extrémité 5' sur l'ARNg) (+95 à +179).

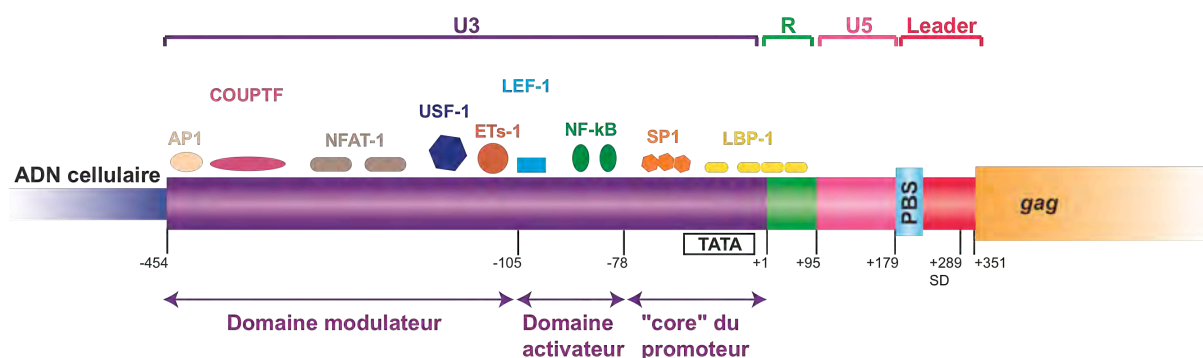


Figure 8 : Représentation du LTR5' sur l'ADN proviral intégré dans le génome de la cellule hôte. Le LTR se divise en 3 régions U3, R et U5. La transcription débute au +1 dans la région R, les sites de fixation reconnus par différents facteurs de transcription de l'ARN polymérase II sont représentés en amont. La position des sites est relative au nucléotide de départ de la transcription.

La région U3 contient les signaux requis pour la transcription par l'ARN polymérase II. Celle-ci s'établit à la frontière entre U3 et R où se situe le site +1. La région promotrice du provirus se divise en trois parties (161) (Figure 8) :

- le « core » du promoteur, localisé aux positions -78 à -1, contient une TATA box en positions -25 à -50. Cette séquence va permettre le recrutement de l'ARN polymérase II et de facteurs de transcription qui formeront le complexe de pré-initiation ;

- le domaine activateur (-104 à -79), va notamment réguler la processivité de la polymérase ;
- le domaine modulateur (-454 à -105) contient des séquences répétées directes de 70 à 100 pb qui vont stimuler la transcription.

2.1.2. Les région codantes

L'ADN génomique du HIV-1 code, comme pour tous les rétrovirus, les polyprotéines de structure, enzymatiques et d'enveloppe (respectivement Gag, Pol et Env). Ce rétrovirus complexe possède également des gènes additionnels codant des protéines régulatrices (Tat et Rev) et auxiliaires (Nef, Vif, Vpu, Vpr) (Figure 9).



Figure 9 : Organisation génétique de l'ADN proviral du HIV-1.

* *Les protéines de structure et enzymatiques :*

Le gène *gag* (« group-specific antigen ») code le précurseur polyprotéique Gag (Pr55^{Gag}) myristylé. Lors de l'étape de maturation, ce précurseur est clivé générant ainsi les protéines de matrice (MAp17), de capsid (CAp24), de nucléocapsid (NCp7) et les polypeptides p1, p2 et p6.

Le gène *pol* (« polymerase ») permet la synthèse d'une polyprotéine renfermant trois protéines enzymatiques : la protéase (PRp12) libérée par un mécanisme d'autocatalyse, l'intégrase (INp32) et la rétrotranscriptase (RTp66/p51). Ces deux dernières protéines sont clivées sous l'action de la protéase virale.

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

* *Les protéines régulatrices et auxiliaires*

Les gènes codant les protéines régulatrices et auxiliaires sont localisés de part et d'autre du gène *env* (Figure 9). Les protéines qui en résultent sont traduites à partir d'ARNm provenant d'un épissage alternatif.

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

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

2.2. L'ARN génomique

La transcription du provirus génère un ARN non-épissé coiffé et polyadénylé de 9,2 kb qui possède des séquences répétées à chacune de ses extrémités. La région 5' terminale de l'ARN non-épissé peut être décomposée en plusieurs domaines structurellement et fonctionnellement indépendants dont la structure secondaire est critique pour leur fonction (Figure 10) :

- la région R se divise en deux domaines structurés en tiges-boucles. Le premier correspond au signal de *trans*-activation de la transcription (TAR), composé des 60 premiers nts de l'ARNg. TAR joue un rôle essentiel dans l'activation transcriptionnelle du génome viral et sert de site de fixation à la protéine Tat (213). Le second domaine renferme le signal de polyadénylation. Malgré la présence de cette séquence aux deux extrémités du génome, la copie présente en 5' n'est pas fonctionnelle ;
- la région U5 contient le PBS (« primer binding site »), site de fixation de l'ARNt_{3^{Lys}} qui sert d'amorce à la rétrotranscription de l'ARNg (230, 284) ;
- plus en aval se trouve la région leader constituée de quatre tiges-boucles (SL1 à SL4) qui contiennent des éléments essentiels à la réplication virale : le site d'initiation de la dimérisation de l'ARN (DIS) (412), le site donneur majeur d'épissage (SD) (323), le signal d'encapsulation de l'ARNg (Ψ) (43) et le codon AUG initiateur de la traduction des précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol}.

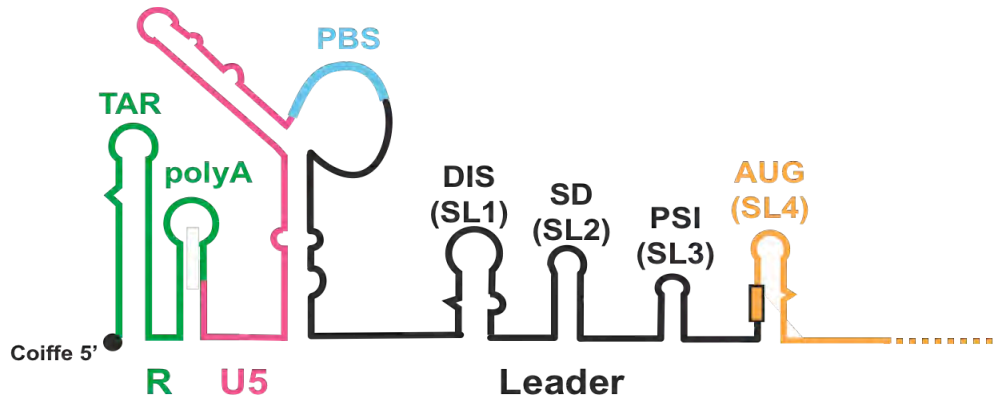


Figure 10 : Modèle de structure secondaire de la région 5' non traduite de l'ARNg et description des différents domaines en tige-boucle.

De nombreuses études structurales de la région 5' de l'ARNg ont permis la mise en évidence d'interactions à longue distance qui seront décrites lors du chapitre III.

L'ARN non-épissé contient également divers signaux internes :

- de nombreux sites donneurs (SD) et accepteurs (SA) d'épissage permettent la production des ARNm viraux mono et multi-épissés *via* un mécanisme d'épissage alternatif (323, 358) ;
- la séquence RRE de 234 nt, située au sein du gène *env*, se retrouve dans tous les ARN viraux non et mono-épissés et conditionne leur export nucléaire. Ce mécanisme nécessite la protéine Rev (287, 475) et la machinerie de transport de la cellule hôte (134, 320, 441) ;
- les séquences polypuriniques PPT 3' (« PolyPurine Tract 3' ») et PPTc (« PPT central »), interviennent dans la rétrotranscription. Le PPT 3' se situe immédiatement en amont de la séquence U3 du LTR 3' du génome viral, tandis que la PPTc se localise dans le cadre ouvert de lecture du gène *pol* (67).

3. Le cycle répliatif

L'infection productive du HIV-1 dépend de la capacité du virus à pénétrer dans le noyau de la cellule hôte et à intégrer son matériel génétique dans l'ADN cellulaire. L'étape charnière d'intégration est à l'origine de la subdivision du cycle de multiplication viral en deux phases. La phase précoce ou pré-intégrative comprend : l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte, la rétrotranscription de l'ARNg viral en un ADN double brin linéaire, l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN

cellulaire hôte. Une fois intégré, le provirus est stable et se réplique avec le génome cellulaire. La phase tardive ou post-intégrative correspond à la transcription du provirus, la traduction des ARN viraux par la machinerie cellulaire, l'assemblage des protéines virales et l'encapsidation de l'ARNg sous forme dimérique, suivi de la libération de la particule virale par bourgeonnement et de sa maturation en particule virale infectieuse (Figure 11).

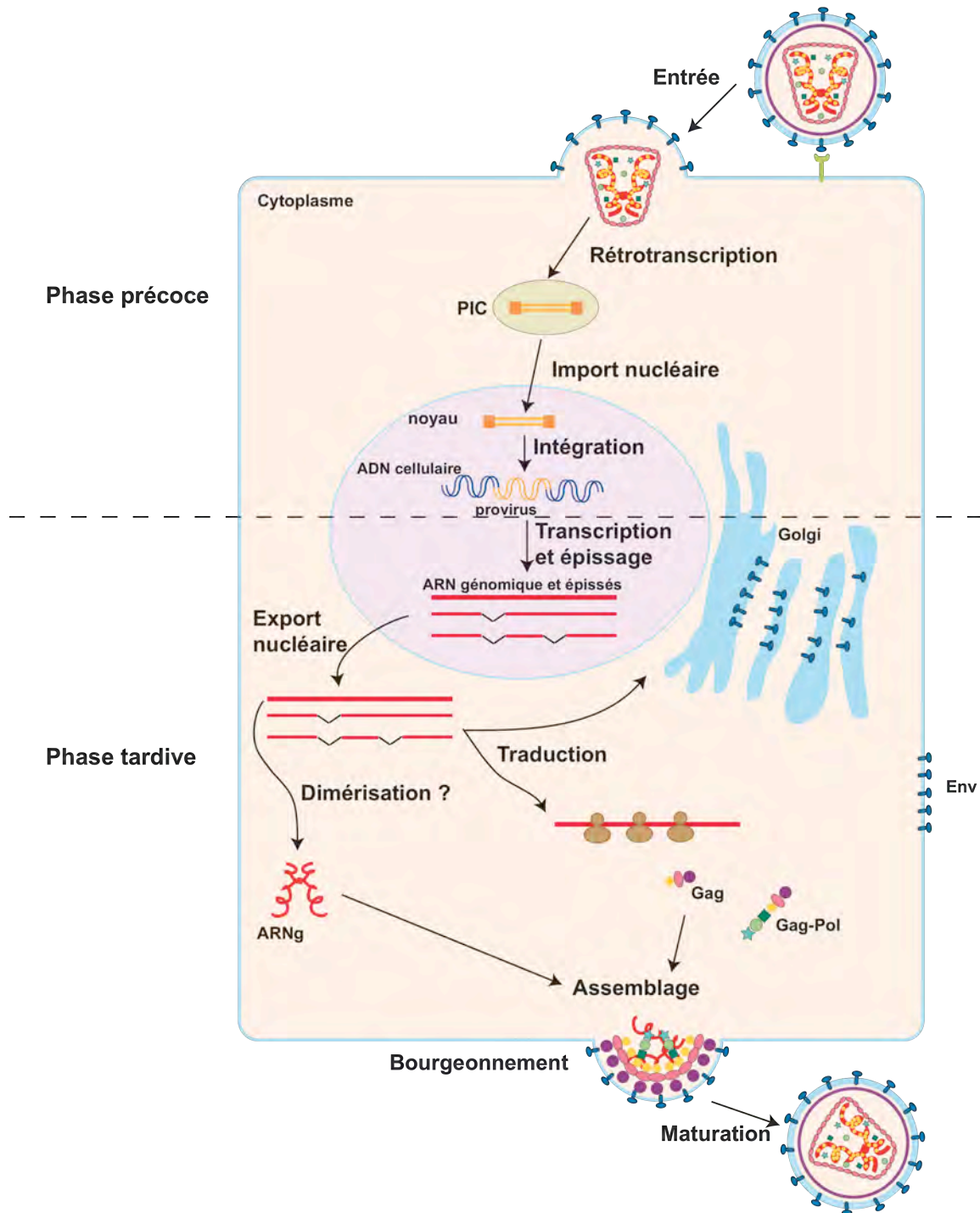


Figure 11 : Cycle répliatif du HIV-1.

3.1. Phase pré-intégrative

3.1.1. Entrée dans la cellule hôte

L'infection d'une cellule débute par l'attachement d'un virion à sa surface *via* une reconnaissance spécifique entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et des récepteurs enchâssés dans la membrane plasmique. L'antigène CD4 est le récepteur majeur du HIV-1, mais d'autres protéines de surface sont requises pour l'entrée de la capsid virale. Ces co-récepteurs, appartenant à la famille des récepteurs à chimiokines, diffèrent selon le tropisme du virus. Dans les premiers jours de l'infection, les souches virales sont de tropisme M ; elles n'infectent que la lignée monocytes/macrophages et nécessitent la présence du co-récepteur CCR5 (109). Puis apparaissent des souches T-tropiques qui infectent également les lymphocytes T et requièrent le co-récepteur CXCR4 (7, 39). Lors de la dissémination dans l'organisme, les virus se multiplient et accumulent de nombreuses mutations. La grande variabilité du gène de l'enveloppe est impliquée dans des mécanismes essentiels de l'infectivité virale ; elle est à l'origine de la formation du site de liaison au co-récepteur et entraîne le passage des souches au tropisme T beaucoup plus cytopathogène (390).

La glycoprotéine Env est constituée d'un domaine de surface gp120 et d'un domaine transmembranaire gp41. Lors de sa synthèse elle s'associe en trimère et est maturée par clivage de ses deux sous-unités. L'entrée du virus débute par l'interaction entre la protéine gp120 et le récepteur CD4 au niveau de radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et sphingolipides présents à la surface de la cellule hôte. Ceci est à l'origine d'un changement conformationnel de la protéine gp120 qui va rendre accessible le domaine de liaison au co-récepteur. La fixation du co-récepteur aboutit à l'exposition du domaine N-terminal hydrophobe de la protéine gp41 et à son insertion dans la membrane plasmique (205). La protéine gp41 adopte alors une structure stable à six hélices qui induit un rapprochement des membranes du virion et de la cellule infectée (478). L'association entre la queue cytoplasmique de gp41 et la capsid virale régule la fusion et le relargage du core dans le cytoplasme de la cellule hôte (300, 409, 470) (Figure 12). D'autres molécules de surface interviennent également dans l'entrée du virus, comme les protéoglycanes héparanes sulfates, LFA-1 et la nucléoline qui stabilisent l'interaction entre la protéine gp120 et le récepteur CD4 (448), ou la protéine PDI (Protein Disulfide Isomerase) qui interagit avec le récepteur CD4 et facilite le réarrangement conformationnel de gp120 par réduction de ponts disulfure (379).

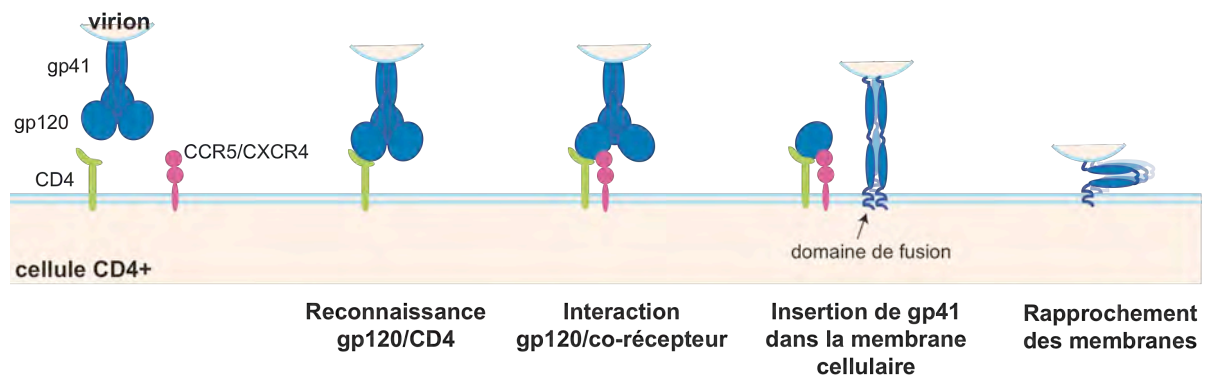


Figure 12 : Mécanisme d'entrée du HIV-1 dans la cellule hôte (D'après (300, 409)). L'attachement des virions aux cellules cibles s'effectue par la reconnaissance spécifique entre le récepteur CD4 et la glycoprotéine d'enveloppe gp120. Une deuxième interaction entre gp120 et le co-récepteur (CCR5 ou CXCR4) déclenche un changement conformationnel exposant le peptide de fusion de gp41 qui s'ancre dans la membrane de la cellule cible. Le réarrangement conformationnel de gp41 permet le rapprochement des membranes et induit la fusion.

Le HIV-1 entre naturellement par fusion à la membrane plasmique. Cependant, ce virus est également capable d'initier efficacement une infection par endocytose. Ce dernier mécanisme implique une protéine cellulaire, la dynamine, qui induit un remodelage du réseau d'actine sous-membranaire à l'origine de la formation de vésicules d'endocytose. Après internalisation du virus, le core est libéré dans le cytoplasme grâce à une diminution de pH dans les vésicules provoquant la fusion des membranes virales et endosomales (305). Très récemment, l'équipe de Johnson Mak a montré que la majorité des virions qui pénètrent dans les lymphocytes T contiennent encore leur membrane, soutenant l'hypothèse d'une entrée prépondérante par endocytose (résultats non publiés, Fonseca-Pereira et al., Retroviruses Meeting, New-York-USA 2010).

3.1.2. Décapsidation et rétrotranscription

Après fusion membranaire avec la cellule cible, le core viral pénètre dans le cytoplasme où la capsid est déstructurée pour servir de base à l'architecture du complexe de rétrotranscription. Au sein de ce complexe l'ARNg est converti en un ADN double brin essentiel à la poursuite du cycle de multiplication.

* *La décapsidation :*

Durant cette étape la structure conique qui entoure le core se désassemble, la protéine de capsid est alors relarguée dans le cytoplasme (136). La décapsidation tout comme l'entrée du core dans la cellule hôte est liée mécaniquement aux propriétés physiques des virions. Le

clivage protéolytique du précurseur Gag lors de la maturation des particules virales rend la capsidie métastable (143, 468) et diminue l'affinité de la matrice pour l'enveloppe (187) facilitant ainsi la fusion avec la cellule hôte et la dissociation de la capsidie. De plus, ceci empêche l'entrée précoce de particules immatures.

La décapsidation dépend de facteurs viraux (CA, MA, IN, Vif et Nef) et cellulaires, mais son mécanisme reste mal connu. Il a récemment été montré que IN et Vif interagissent avec de nombreuses protéines impliquées dans la voie d'ubiquitination par le protéasome requise pour la décapsidation (231). D'autres facteurs cellulaires facilitent également la décapsidation, comme la troponine 3 (résultats non publiés, Shah et al., Fassati et al., Retroviruses Meeting, New-York-USA 2010) ou la cyclophiline A (CypA), une protéine cytoplasmique ubiquitaire encapsidée dans les virions (145, 154). Cette peptidyl-propyl isomérase reconnaît la capsidie et son interaction va induire un réarrangement conformationnel des protéines de capsidie. Il a été proposé que IN permet le maintien de l'interaction entre CypA et CA (52). Certains facteurs cellulaires vont agir négativement sur la décapsidation, comme la protéine TRIM5 α qui cible la capsidie et bloque l'infection avant l'étape de rétrotranscription (414). Les mécanismes d'action précis des facteurs cellulaires n'ont pas encore été élucidés (387, 388).

De nombreuses controverses subsistent sur le lieu de décapsidation des cores. Les modèles classiques suggèrent que la capsidie virale se dissocie rapidement après fusion membranaire conduisant à la libération du complexe de rétrotranscription (136). Cependant, il a été proposé que cet événement pourrait survenir aux abords des pores nucléaires (17), ce qui faciliterait le processus de rétrotranscription et conduirait à la maturation du complexe de rétrotranscription (RTC) en complexe de pré-intégration (PIC).

* *La rétrotranscription :*

Cette étape a lieu au sein du RTC qui contient en plus de l'ARNg viral, l'ARNt₃^{Lys}, des ARNm viraux, de nombreuses protéines virales (MA, CA, NC, Vpr, Vpu, Vif, Nef, IN et RT) ainsi que quelques protéines cellulaires. La RT est une enzyme multifonctionnelle qui possède à la fois une activité ADN polymérase ARN et ADN dépendante et une activité RNase H qui permet le clivage de l'ARN dans un duplex ARN/ADN. Elle se structure en un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique p66 et d'une sous-unité régulatrice p51. La sous-unité p51 est générée par clivage du domaine RNase H C-terminal de la sous-unité p66.

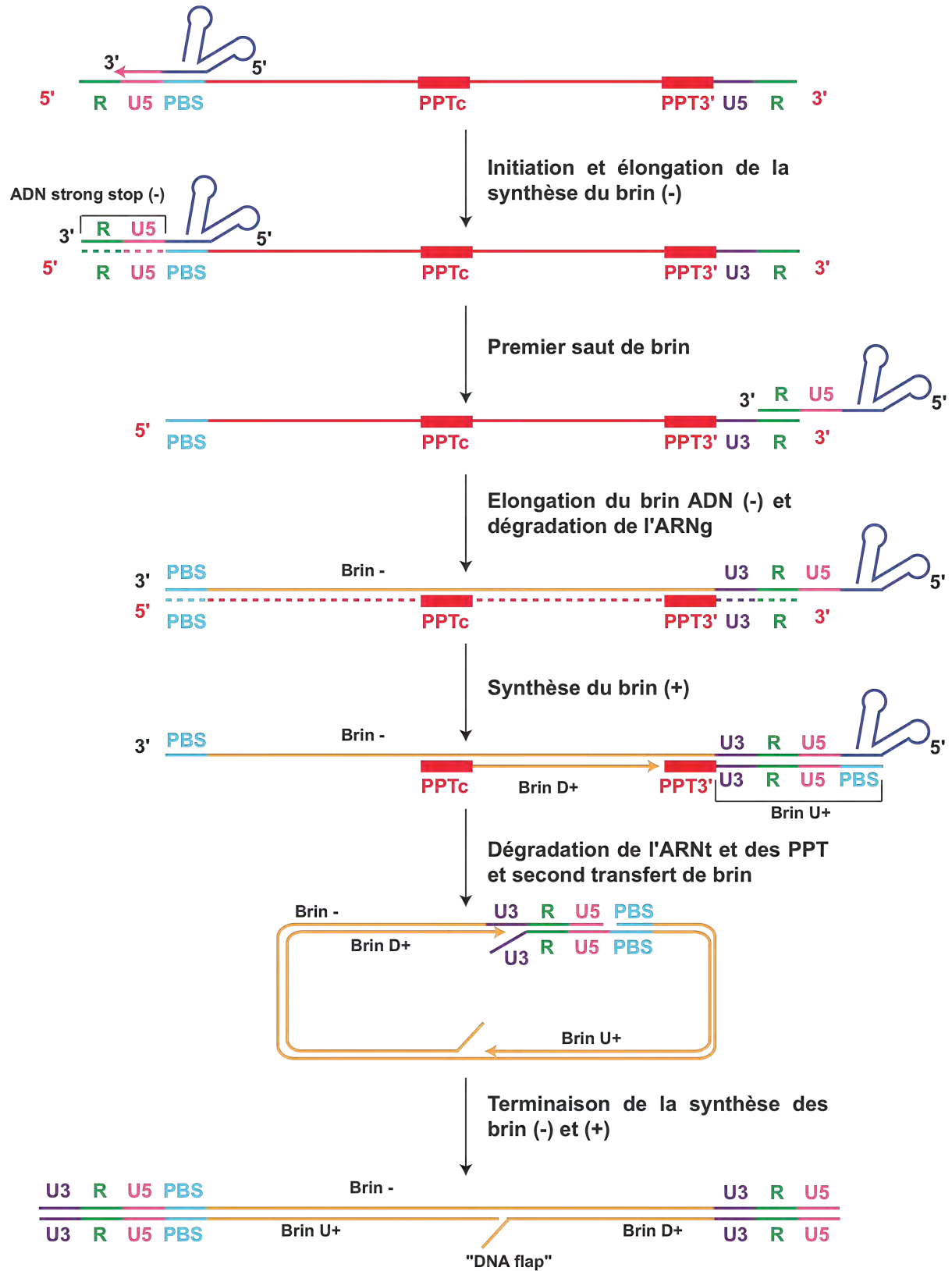


Figure 13 : Rétrotranscription de l'ARNg du HIV-1.

La conversion de l'ARNg en ADN double brin se caractérise par différentes étapes (32) (Figure 13) :

- lors de l'initiation de la rétrotranscription, les 18 nucléotides de l'extrémité 3' OH de l'ARNt₃^{lys} s'hybrident à l'ARNg, au niveau du PBS. Cette amorce est alors allongée jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN et génère un brin d'ADNc de polarité (-), l'ADN strong-stop (-). L'ARNg contenu dans l'hybride ARN/ADN est dégradé simultanément par l'activité RNase H de la RT ;
- l'ADN strong-stop (-) contient une séquence répétée R qui est également présente à l'extrémité 3' de l'ARNg. Cette séquence permet le premier saut de brin et sa translocation sur l'ARNg. La synthèse d'ADN continue alors jusqu'au PBS. L'ARNg est à nouveau dégradé à l'exception de deux séquences riches en purines, les séquences PPT ;
- la synthèse d'ADN de polarité positive est initiée au niveau des séquences PPT formant ainsi les brins U+ (généralisé à partir du PPT 3') et D+ (généralisé à partir du PPT central). Après polymérisation d'une portion de l'ARNt encore fixé, créant une copie du PBS sur l'ADN strong-stop U+, l'amorce ARNt ainsi que les séquences PPT sont éliminées par la RNase H ;
- lors du second transfert de brin, les copies complémentaires du PBS présentent sur les ADN strong-stop (-) et (+) s'apparient et la polymérisation d'ADN se termine générant ainsi les LTR. La synthèse d'ADN (+) à partir du PPT central est à l'origine de la formation d'une structure à trois brins d'ADN, le « DNA flap » qui signale la fin de la rétrotranscription et permettrait la formation du PIC, essentiel à l'étape d'import nucléaire.

3.1.3. Import nucléaire

Le HIV-1, comme tous les lentivirus, se distingue des autres rétrovirus par sa capacité à infecter de façon productive des cellules quiescentes. Il s'agit notamment des macrophages et des lymphocytes T quiescents, qui constituent des cibles majeures au cours de l'infection (30, 249). Pour accéder au génome d'une cellule, l'ADN viral issu de la transcription inverse doit être transporté à travers le cytoplasme puis franchir l'enveloppe nucléaire. Le HIV a donc développé un mécanisme actif assurant l'import nucléaire. Au cours de sa synthèse, l'ADN viral est acheminé jusqu'au noyau par l'intermédiaire du réseau microtubulaire (61) au sein d'un complexe ribonucléoprotéique dont la composition varie durant la migration. La capsid virale ainsi que la formation du « DNA flap » à la fin de la rétrotranscription permettent la maturation du RTC en PIC (49). Ce complexe recrute alors la machinerie cellulaire d'import

nucléaire et induit la translocation du génome viral *via* les complexes des pores nucléaires (CPN).

Le PIC est un complexe de 56 nm de diamètre constitué des protéines virales Vpr, MA, NC, RT et IN (303) et de quelques protéines cellulaires (HMG (135), LEDGF (270)), dont certaines sont impliquées dans l'import nucléaire :

- le rôle de la MA a été initialement relié à une interaction directe avec l'importine α , grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) localisé dans sa région N-terminale (455). Mais l'implication de ce motif dans l'import nucléaire du PIC a été ultérieurement controversée (364) et les études initiales n'ont pas été confirmées par d'autres groupes ;
- la protéine Vpr cible rapidement le noyau après infection (278) bien qu'aucun motif connu d'adressage nucléaire n'ait pu être caractérisé dans sa séquence. Son accumulation nucléaire résulte d'un mécanisme indépendant des voies classiques d'import nucléaire (204). Plusieurs équipes ont révélé que Vpr interagit directement avec les nucléoporines et permettrait l'ancrage de l'ADN viral aux CPN (252). Vpr pourrait également induire des ruptures locales et transitoires de l'enveloppe nucléaire générant un accès direct au compartiment nucléaire (103) ;
- l'intégrase est en étroite interaction avec l'ADN viral et possède un tropisme nucléaire se traduisant par une localisation cellulaire exclusivement nucléaire (350). Elle possède un motif atypique de localisation nucléaire reconnu par l'importine α (350), mais cette séquence ne serait pas impliquée dans l'import nucléaire (348). Certaines études en cours suggèrent que IN pourrait interagir avec la transportine-SR2 afin d'acheminer l'ADN viral dans le noyau. Ainsi, les mécanismes responsables de l'activité de IN restent obscurs, mais son association à l'ADN viral est indispensable à l'import nucléaire (198) ;
- la CA qui ne fait pas partie du PIC, est présente aux abords des pores nucléaires et pourrait permettre l'interaction avec les nucléoporines ;
- enfin, le « DNA flap » pourrait directement influencer la localisation nucléaire de l'ADN viral en interagissant avec certaines protéines virales ou cellulaires présentes ou recrutées au niveau du PIC. En effet, il a été montré que la propagation de virus produisant un ADNc dépourvu du « DNA flap » (F-) est altérée et que l'ADN s'accumule dans le cytoplasme sous forme non intégrée (476). Cependant, des études par PCR quantitative indiquent que des virus F- entrent dans le noyau de lymphocytes T primaires avec la même efficacité que des virus sauvages. Ainsi les défauts de propagation ne seraient pas corrélés à des défauts d'import nucléaire et le rôle du « DNA flap » dans ce mécanisme reste sujet à controverse (267).

3.1.4. Intégration

Après un transport actif du PIC dans le noyau, l'ADN viral est intégré de manière covalente dans les chromosomes. Le provirus est alors présent de manière permanente et héréditaire dans le génome cellulaire. Cette étape finale de la phase précoce est réalisée par IN qui entre dans le noyau à moins de cent copies (183, 303). Cette enzyme dimérique catalyse deux réactions de trans-esterification temporellement distinctes conduisant à la formation du provirus (86). La première a lieu dans le cytoplasme et correspond à une attaque nucléophile en 3' des LTR sur chaque brin de l'ADN viral. Le clivage consécutif de l'ADN est à l'origine de la formation d'extrémités 3' rentrantes qui présentent alors invariablement un dinucléotide CA comprenant un groupement hydroxyle libre. La seconde réaction a lieu dans le noyau et permet le transfert du génome viral dans le chromosome. IN utilise les groupements hydroxyles libres pour réaliser une nouvelle attaque nucléophile entraînant la coupure de l'ADN cellulaire. Les extrémités 3' de l'ADN proviral sont alors reliées à l'ADN chromatinien, puis des ligases cellulaires vont permettre la réparation et le remplissage des discontinuités complétant ainsi la réaction d'intégration (Figure 14).

L'intégration de l'ADN viral présent au sein du PIC ne se fait pas au hasard dans l'ADN de l'hôte condensé dans la chromatine. Les propriétés locales de la chromatine influencent la sélection du site d'intégration (56). Dans le cas du HIV-1, IN va favoriser une insertion dans les gènes où la chromatine est moins condensée et où la transcription est active (184, 262, 392), suggérant que le PIC s'engage dans des interactions préférentielles avec la chromatine. La localisation du site d'intégration est directement responsable de l'établissement d'une infection productive ou de la latence et il a été proposé que la structure de la chromatine serait à l'origine du maintien de la latence.

Le PIC est constitué de nombreuses protéines virales mais aucune étude n'établit à l'heure actuelle lesquelles, hormis IN, subsistent dans le noyau au point d'intégration (430). Certaines protéines cellulaires font également partie du PIC, comme les protéines BAF, HMG et LEDGF/p75. La protéine BAF « Barrier to Autointegration » permettrait le rapprochement entre l'ADN viral et les lamines nucléaires, dont l'émerine, jouant ainsi un rôle dans la localisation nucléaire du PIC (148). Les protéines HMG sont capables de moduler la structure de la chromatine et la transcription (135). Il a été proposé qu'elles interagissent avec les LTR et induisent la relaxation de leur structure facilitant ainsi l'intégration (263). La protéine LEDGF/p75 semble quant à elle être le médiateur de l'attachement à la chromatine. Cette protéine nucléaire est ubiquitaire et s'associe étroitement avec la chromatine. Elle interagit *via*

INTRODUCTION

son extrémité C-terminale avec le dimère d'IN et *via* son extrémité N-terminale avec la chromatine et permet ainsi la fixation du PIC au point d'insertion (299). Il a récemment été montré que la protéine virale Rev, synthétisée en phase post-intégrative, interagit avec IN et LEDGF avec pour conséquence l'inhibition de l'intégration. Rev permettrait ainsi de limiter la surinfection de la cellule hôte (178).

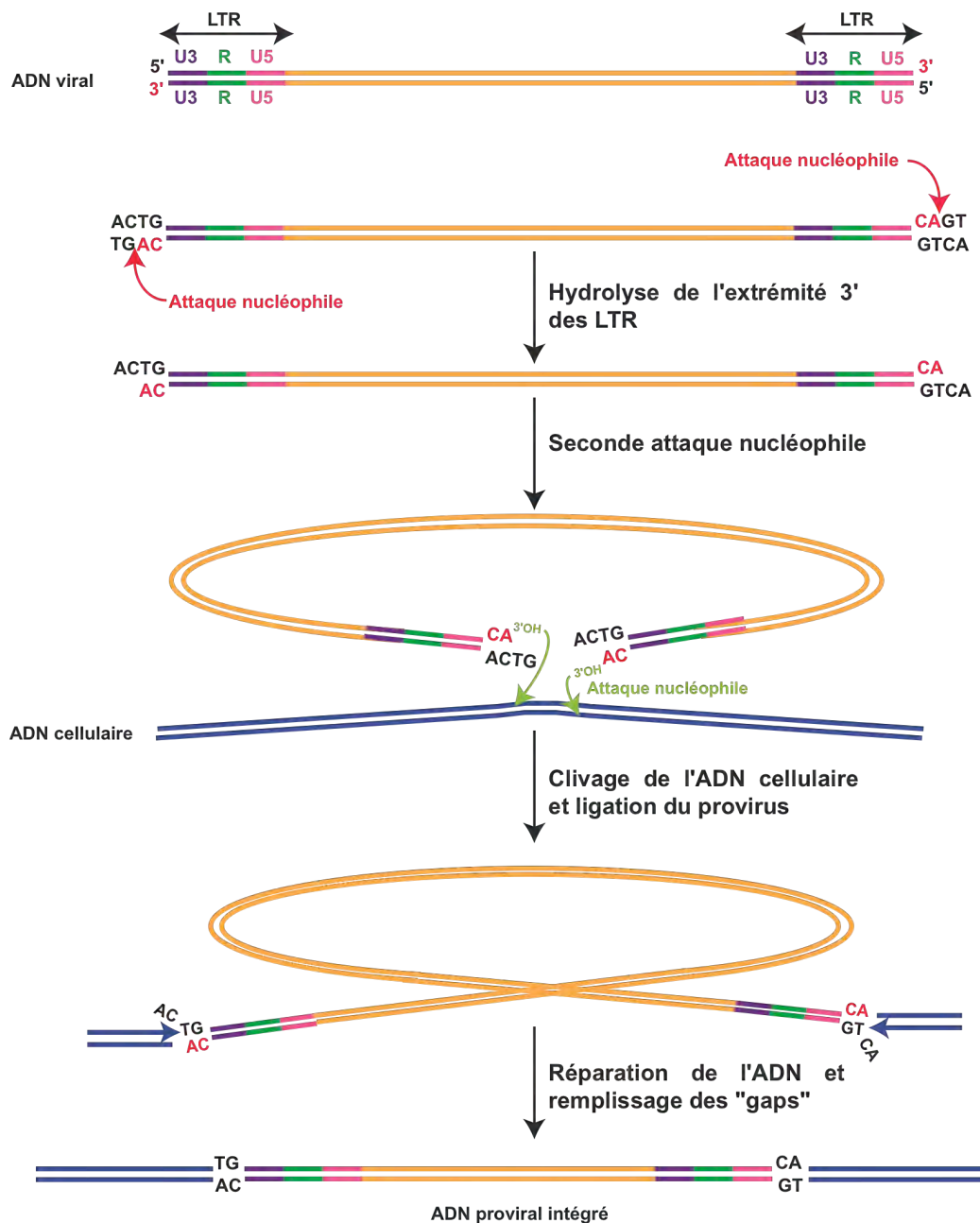


Figure 14 : Intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire.

3.2. Phase post-intégrative

Alors que la phase précoce dépend essentiellement des enzymes virales apportées dans la cellule au sein du core, la phase post-intégrative requiert quant à elle la machinerie cellulaire afin de produire ses messagers et de synthétiser l'ensemble des protéines virales nécessaires à l'assemblage de nouvelles particules virales.

3.2.1. Expression des gènes viraux

3.2.1.1. Transcription du provirus

Après son intégration dans l'ADN cellulaire, le provirus est transcrit par l'ARN polymérase II, générant ainsi des transcrits coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Ce mécanisme se décompose en deux étapes. La première débute par un événement préalable d'initiation de la transcription. L'ARN polymérase est peu processive et ne produit que de courts transcrits non polyadénylés correspondant aux cinquante premiers nucléotides de l'ADN proviral (403). Au cours de l'infection virale, une réaction inflammatoire s'enclenche induisant un relargage de cytokines par les macrophages. Les cytokines vont alors activer la cellule infectée et permettre la libération du facteur NF- κ B séquestré dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau. Cette protéine va alors se fixer au domaine activateur du promoteur et induire la phase précoce de la transcription en réduisant la compaction de la chromatine au niveau des LTR par activation d'une histone acétyl-transférase (360). Les protéines Vpr et IN importées au sein du PIC semblent également favoriser le remodelage de la chromatine résultant en une activation de la transcription (228, 357). Le facteur SP-1 en interaction avec le core du promoteur va alors stimuler l'élongation (452). Lors de cette phase, une quantité minimale d'ARN non-épissé est synthétisée et soumise à un épissage alternatif conduisant à la formation d'ARN viraux multi-épissés. Après leur export dans le cytoplasme, les ARN multi-épissés sont traduits par la machinerie cellulaire afin de générer les protéines régulatrices Nef, Rev et Tat. Les protéines Rev et Tat qui présentent une NLS sont alors importées dans le noyau (90, 447).

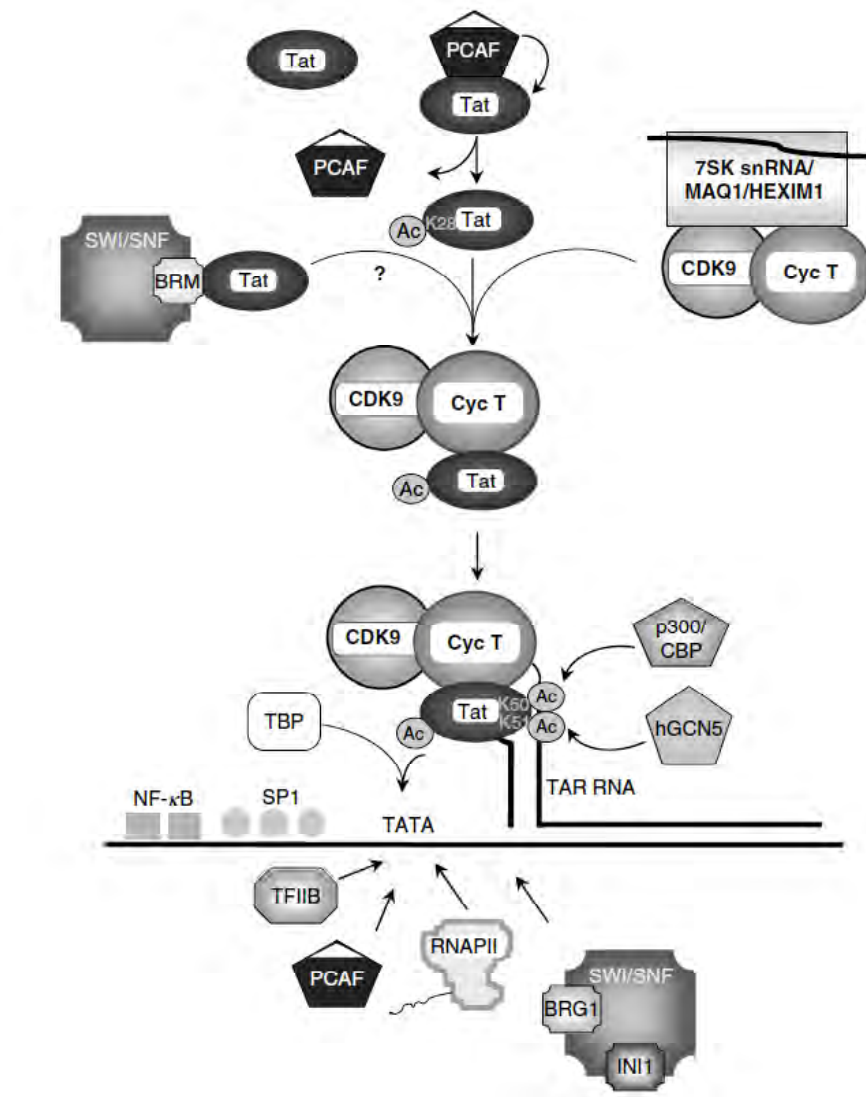


Figure 15 : Recrutement des facteurs cellulaires nécessaires à l’activation de la transcription par la protéine virale Tat (159). Une fois acétylée par le complexe PCAF, la protéine Tat interagit fortement avec le complexe pTEFb (cycT/Cdk9) et augmente l’affinité du complexe pour le signal TAR présent sur l’ARN. L’acétylation ultérieure de Tat par les complexes p300/CBP et hGCN5 permet le relargage du complexe pTEFb et contribue au recrutement de l’ARN polIII et des complexes TBP, TFIIB, PCAF et SWI/SNF nécessaires à la transcription.

La protéine trans-activatrice Tat joue un rôle majeur dans la phase tardive de l’expression du génome viral. Elle est à l’origine de l’assemblage de nombreux facteurs de transcription, qui vont favoriser l’initiation et l’élargissement de la transcription. L’activité transcriptionnelle augmente alors d’un facteur 100. Tat interagit avec les ARN viraux en cours de synthèse *via* l’élément TAR présent à leur extrémité 5’ (41, 59, 159). L’association va permettre le recrutement d’un complexe d’élargissement de la transcription, p-TEFb (288) (Figure 15). Ce complexe, composé de la protéine kinase Cdk9 et de la cycline T1 (225, 334), est responsable de la phosphorylation du domaine C-terminal de l’ARN polymérase qui va promouvoir

l'élongation en augmentant la processivité de l'enzyme. De récentes études de cristallographie montrent que Tat adopte une structure complémentaire à la surface du complexe p-TEFb et réalise des contacts avec la cycline T1, ainsi qu'avec la boucle-T de la kinase Cdk9 (Figure 16). Tat va induire de nombreux changements conformationnels du complexe d'élongation, favorisant son activité (436). L'augmentation de l'efficacité transcriptionnelle permet d'accroître la quantité d'ARN pré-messagers qui vont soit rester non-épissés, soit être soumis à un épissage alternatif, générant ainsi, en plus des ARN multi-épissés déjà efficacement produits en phase précoce de transcription, les ARN mono-épissés nécessaires à l'expression de l'enveloppe et des protéines virales accessoires.

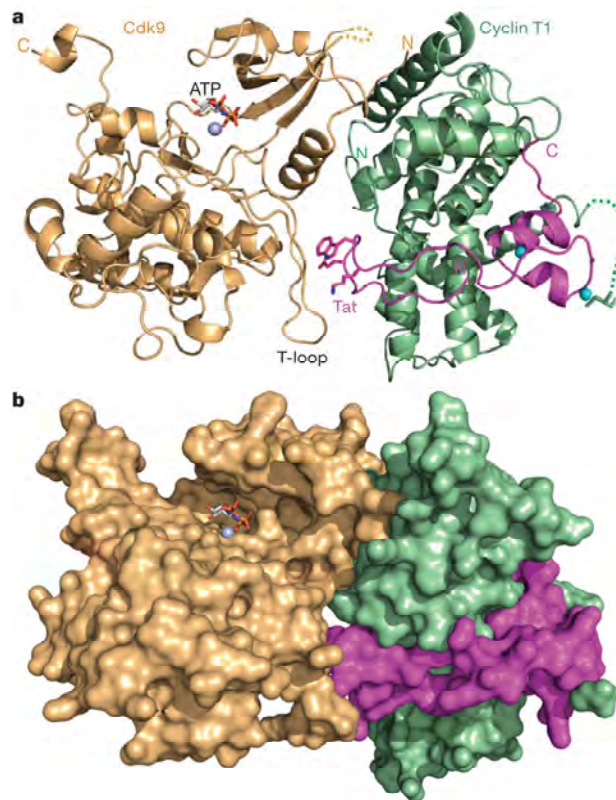


Figure 16 : Structure cristallographique du complexe pTEFb-Tat-ATP (436). (a) Représentation en ruban. (b) Représentation de la surface du complexe. Cdk9 est représentée en beige, la cycline T1 en vert et Tat en rose. Le complexe s'associe avec une molécule d'ATP (en rouge) et des atomes de zinc (gris) et de magnésium (bleu clair).

3.2.1.2. Epissage

Après sa synthèse au sein du noyau, l'ARN non-épissé a plusieurs destinées dans la cellule : il sert à la fois d'ARNm pour la synthèse des protéines structurales et enzymatiques, de génome lors de l'assemblage des particules virales et d'ARN pré-messager nécessaire à la

INTRODUCTION

production des ARN viraux épissés codant pour les protéines auxiliaires, régulatrices et d'enveloppe. Pour augmenter sa capacité codante, le pré-messager qui renferme plusieurs introns est soumis à un épissage alternatif à l'origine de plus de quarante ARNm épissés regroupés en trois classes (289, 442) (Figure 17) :

- l'ARN non-épissé de 9 kb permet la synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol ;
- les ARN mono-épissés de 4 kb générés par élimination du premier intron codent les protéines Env, Vpr, Vpu et Vif ;
- les ARN multi-épissés de 2 kb qui ne contiennent plus d'introns, expriment les protéines Nef, Rev et Tat.

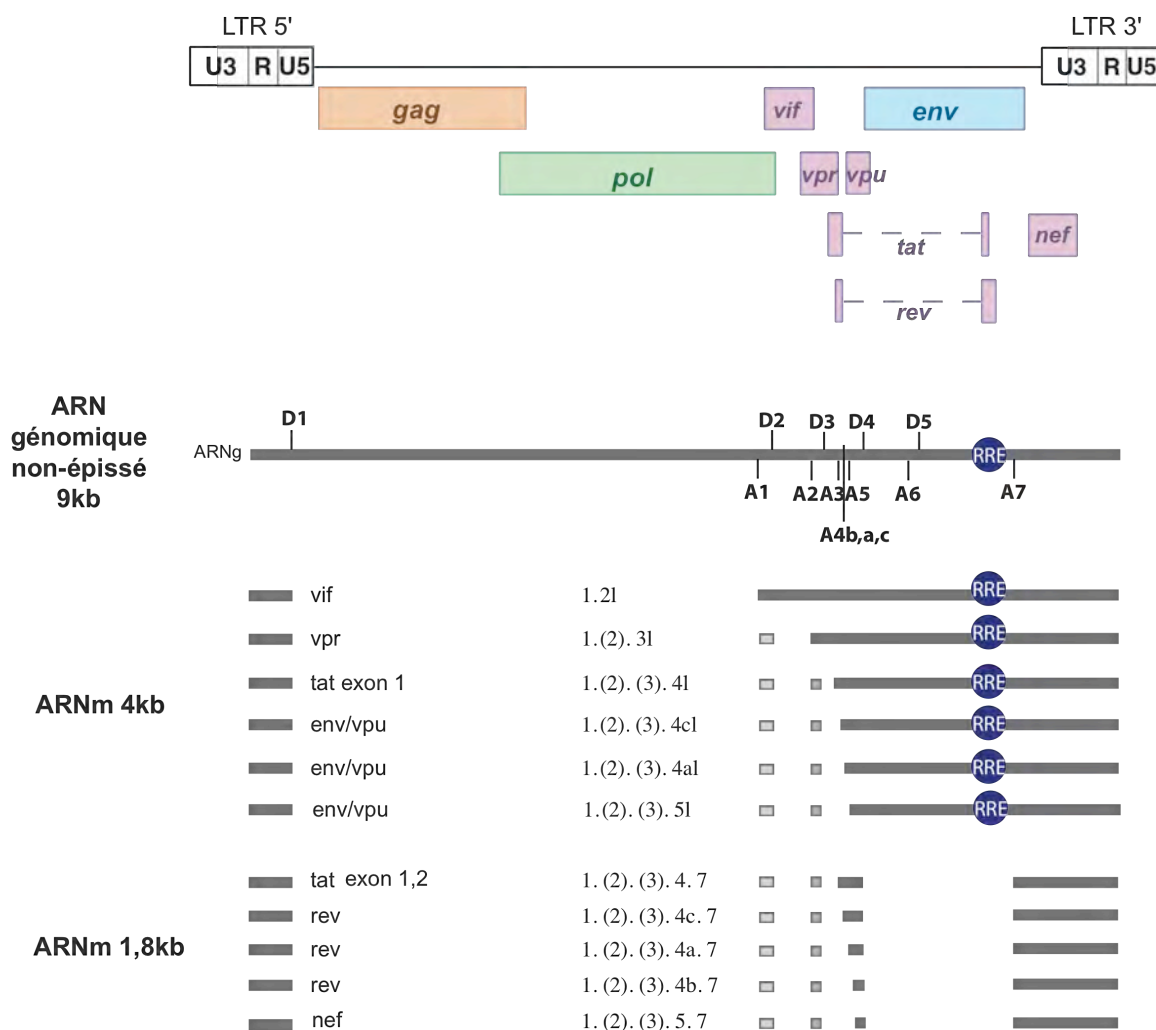


Figure 17 : Profil d'épissage de l'ARNg du HIV-1, adapté de (289). En haut les séquences codantes sont représentées sur l'ADN proviral. La transcription permet la synthèse d'un ARN pré-messager qui contient de nombreux sites donneurs (SD) et accepteurs (SA) d'épissage. L'épissage alternatif est à l'origine de la production d'ARN mono (4kb) et multi-épissés (1,8kb), les exons qui composent les ARN épissés majeurs sont indiqués. Les espèces désignées par un "I" correspondent aux ARN qui ne sont pas complètement épissés. L'exon 1 non-codant est présent sur tous les ARN épissés du HIV-1.

L'utilisation combinée de cinq SD et de neuf SA d'épissage est nécessaire à la formation des transcrits viraux qui seront présent à différents taux dans la cellule infectée. L'emploi systématique du SD majeur d'épissage, SD1 (SL2), afin d'éliminer le premier intron est à l'origine d'une structuration commune de l'extrémité 5' des ARN épissés viraux qui présentent tous les régions R, U5 et le site d'initiation de la dimérisation (Figure 18). L'extrémité 5' entre en interaction avec différents facteurs cellulaires et viraux qui vont réguler le devenir des ARN épissés dans la cellule.

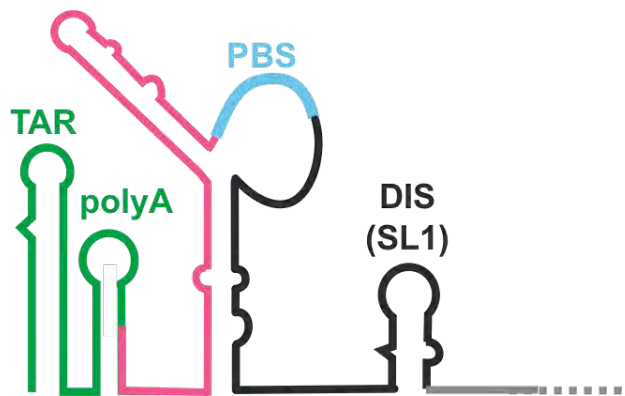


Figure 18 : Structure secondaire de la région 5'UTR commune à tous les ARN viraux épissés. Des séquences non traduites de taille variable peuvent également se retrouver en aval du DIS en fonction des ARNm viraux.

Seule la moitié des ARN viraux synthétisés subit l'épissage (422). Afin d'instaurer un équilibre entre les quantités d'ARN épissés et non-épissés, essentiel à la multiplication virale, l'usage des sites d'épissage doit être régulé. Des analyses préalables centrées sur les sites d'épissages eux-mêmes ont montré que les sites donneurs sont hautement actifs alors que les sites accepteurs présentent une activité sub-optimale (408). La nature des sites accepteurs n'est pas le seul point de régulation. Il a été établi que des séquences exoniques et introniques influencent également l'utilisation individuelle des sites accepteurs. Ces séquences de régulation se divisent en trois groupes : les séquences exoniques activatrices d'épissage (ESE, « exon splicing enhancers») facilitent la reconnaissance et l'utilisation du site accepteur adjacent alors que les séquences exoniques (ESS, « exon splicing silencers») et introniques (ISS, « intron splicing silencers») inhibitrices d'épissage suppriment l'utilisation du site (10, 11, 201, 292, 439). D'une manière générale, les séquences ESS et ISS contiennent des sites de liaison aux membres de la famille des protéines hnRNP A/B ou hnRNP H (66, 115). Une fois fixées, ces protéines bloquent l'utilisation du SA adjacent. Les séquences ESE, qui juxtaposent ou chevauchent les ESS, lient quant à elles certains membres de la famille des

protéines SR qui vont faciliter le recrutement ou la stabilisation de facteurs d'épissage cellulaires qui lient le site accepteur (290, 472, 473). L'action compétitive des séquences inhibitrices et activatrices d'épissage permet de déterminer le taux d'expression d'un messenger.

L'activation d'un SA d'épissage induit sa reconnaissance par la machinerie cellulaire et l'élimination de l'intron situé en amont. Le spliceosome va alors permettre l'association stable du complexe EJC (Exon-Jonction Complex) sur l'ARN épissé nouvellement formé. Ce complexe, déposé 20 à 24 nucléotides en amont de la jonction exon-exon (250), reste associé au transcrit jusqu'à la synthèse protéique. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme l'export nucléaire, la traduction et la reconnaissance de codons non sens prématurés *via* le système NMD (Non-sense RNA Mediated Decay). Ces fonctions sont permises grâce à la structure dynamique de l'EJC qui contient un cœur invariant (constitué des protéines eIF4AIII, MLN51, MAGOH et Y14), mais s'associe et se dissocie à de nombreuses protéines régulatrices lors du cheminement de l'ARN (250, 251). La fixation de l'EJC en amont des jonctions exon-exon après la réaction d'épissage laisse supposer qu'il est présent à l'extrémité 5' de tous les ARN viraux épissés.

3.2.1.3. Export des ARN viraux

Après leur synthèse et leur maturation dans le noyau, les ARN viraux sont exportés dans le cytoplasme. Le transport nucléo-cytoplasmique fait appel à différents mécanismes qui impliquent une interaction complexe avec le pore nucléaire induit par divers facteurs d'export cellulaires. Les ARN multi-épissés synthétisés lors de la phase précoce utilisent les voies classiques d'export des ARNm cellulaires dépendantes du complexe TAP. Ce complexe s'associe à l'EJC et entre en interaction directe avec les nucléoporines (214, 394). Une fois dans le cytoplasme ces ARNm sont traduits en protéines Nef, Rev et Tat.

La phase tardive de la transcription favorise la formation d'ARN non et mono-épissés qui sont séquestrés dans le noyau par la présence de séquences introniques et de séquences de rétention nucléaires spécifique du HIV-1 localisées dans les gènes *gag*, *pol* et *env* (286, 374). Ces ARN viraux contiennent tous un intron chevauchant le gène *env* qui renferme un élément de structure complexe, organisé en tige-boucles, le RRE, capable de lier la protéine Rev et d'induire l'export des ARNm (80, 287, 432). La protéine Rev possède un NLS et un NES qui lui confèrent une propriété de navette entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques.

Lorsqu'une quantité suffisante de Rev est produite, celle-ci retourne dans le noyau où elle va tout d'abord stimuler l'accumulation des ARN non et mono-épissés (352). Puis, sa liaison avec le RRE va permettre l'exposition de son domaine NES (90) et le recrutement du complexe d'export CRM-1/Ran GTP (89). Les ARN non et mono-épissés sont alors transportés jusqu'aux polysomes pour leur traduction (Figure 19).

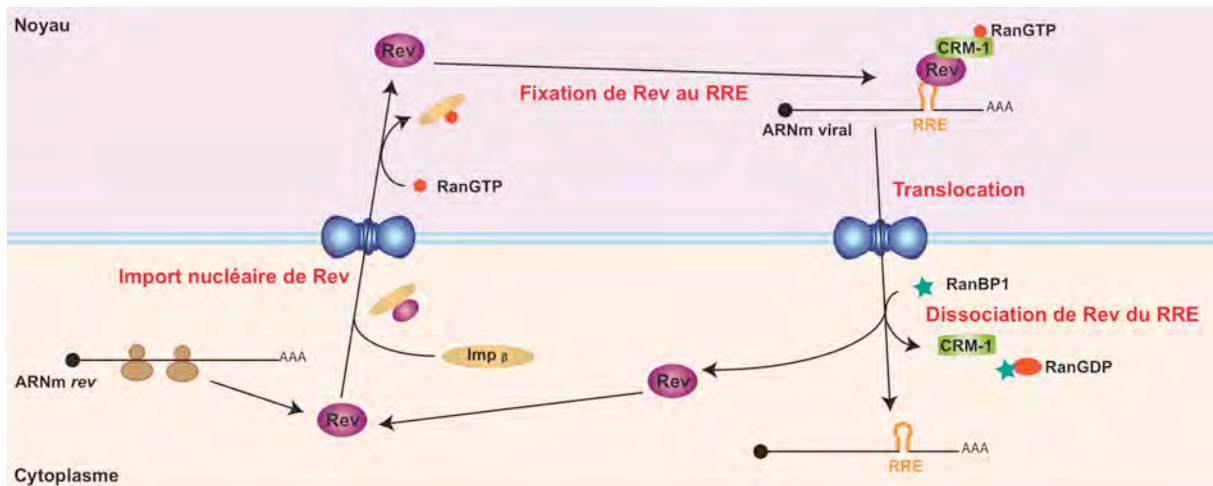


Figure 19 : Transport nucléocytoplasmique Rev-dépendant des ARN non et mono-épissés (adapté de (89)).

3.2.2. Formation des particules virales

3.2.2.1. Traduction

Une fois acheminés dans le cytoplasme, les transcrits viraux recrutent la machinerie cellulaire de synthèse protéique et sont traduits par un mécanisme coiffe-dépendant classique. Cependant, les ARN *env/vpu* et *gag/gag-pol* bi-cistroniques requièrent des mécanismes de régulation traductionnelle supplémentaires :

- au sein du messenger *env/vpu*, les séquences codantes sont chevauchantes et le codon AUG initiateur de la traduction de Vpu se localise en amont de celui de Env. Les séquences de reconnaissance de ce premier codon d'initiation présentent un consensus faible. Le ribosome va alors pouvoir passer au travers lors de la lecture du messenger par un mécanisme de « leaky scanning » et initier la traduction au deuxième codon AUG permettant ainsi la synthèse de la protéine Env (393) ;
- les séquences codantes *gag* et *pol* présentes sur l'ARN non-épissé ne sont pas en phase. Dans 5% des cas, le ribosome va réaliser un décalage du cadre de lecture (-1) en fin de traduction du précurseur Gag, à l'origine d'une perte de reconnaissance du terminateur de la

traduction de Gag et de la poursuite de la synthèse protéique. Ce mécanisme permet la production du précurseur Gag-Pol (200) dans un rapport optimal pour la formation de particules virales infectieuses. Il existe également quelques isoformes de la protéine Gag produites grâce à une entrée directe du ribosome au niveau d'IRES situées en amont et aval de l'AUG initiateur de la traduction et utilisées préférentiellement lors de la phase G2/M du cycle cellulaire (51, 368).

Il a récemment été montré que la protéine Rev intervient dans la régulation traductionnelle par une interaction directe avec l'extrémité 5' terminale de tous les messagers viraux *via* le site d'initiation de la dimérisation (DIS) (150, 176, 179). À faible concentration, Rev stimulerait la synthèse protéique, alors qu'elle l'inhiberait à forte concentration.

3.2.2.2. Prise en charge de l'ARN génomique

Le HIV-1 encapside deux molécules d'ARNg qui s'associent en dimère par l'intermédiaire du site d'initiation de la dimérisation (DIS) localisé à leur extrémité 5' terminale. Il a été proposé que la dimérisation (1) (qui fera l'objet du chapitre III) et le taux de protéine Gag cytoplasmique (15) puissent réguler la transition entre la traduction et l'étape d'encapsidation de l'ARNg sous sa forme dimérique, le précurseur Gag permettant le transport de l'ARNg jusqu'au site d'assemblage. Les mécanismes de recrutement, de transport et d'encapsidation de l'ARNg sont complexes et seront détaillés dans le chapitre IV.

3.2.2.3. Assemblage

Les particules virales sont constituées d'une enveloppe lipidique où sont ancrées les glycoprotéines de l'enveloppe et renferment le core viral composé du génome et des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol}. Le Pr55^{Gag} comporte les protéines virales structurales (MA, CA, NC) ainsi que trois peptides (p2, p1 et p6). Le Pr160^{Gag-Pol} contient en plus les enzymes virales (Figure 20A). Gag joue un rôle central dans le processus d'assemblage : sa seule expression suffit pour produire des pseudo-particules virales (VLP) (164). Dans les cellules infectées, la formation de nouvelles particules virales nécessite l'association de Gag et de Gag-Pol avec l'ARNg d'une part et avec la membrane plasmique d'autre part. Ces mécanismes sont pilotés par Gag, qui comporte différents domaines nécessaires à l'assemblage. Le domaine « I », contenu dans la NC, facilite la multimérisation des précurseurs sur l'ARNg, le domaine « M », situé à l'extrémité N-terminale de la MA, dirige le

complexe à la membrane plasmique et le domaine « L », qui correspond au peptide p6, intervient dans le bourgeonnement des virions.

Dans le cytoplasme, Gag interagit avec la région leader de l'ARNg grâce au domaine NC formant ainsi des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) viraux. La partie centrale de la NC, présentant une structure globulaire formée de deux doigts de zinc, est indispensable au recrutement spécifique de l'ARNg (335). La fixation du précurseur Gag à l'ARNg permet alors sa multimérisation (72, 317). En effet, la NC comprend des déterminants requis pour l'interaction entre précurseurs (domaine « I ») qui permettent la formation de complexes Gag/Gag-Pol (223) conduisant à un changement de conformation du domaine de matrice. L'exposition d'un groupement myristylé situé à l'extrémité amino-terminale de la MA (domaine « M ») va permettre l'adressage de la RNP à la membrane plasmique et son encrage au niveau de radeaux lipidiques (380). Par ailleurs, la partie N-terminale de la MA forme un domaine globulaire constitué de quatre hélices, à la surface duquel est regroupée une série d'acides aminés basiques qui interagissent avec le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂), contenu dans les radeaux lipidiques, permettant ainsi de stabiliser la liaison (381) (Figure 20B).

Le domaine MA interagit également avec les protéines Env. Ces protéines sont produites dans le réticulum endoplasmique, glycosylées dans le Golgi et secrétées jusqu'à la membrane plasmique où elles s'associent en trimère pour former des spicules. Moins d'une dizaine de spicules pour 1500 copies de Gag est observée par virion infectieux (160). Chaque monomère de Env est synthétisé sous forme d'un précurseur gp160 qui est maturé par une endoprotéase cellulaire. Le clivage du précurseur aboutit à la formation d'une sous-unité de surface gp120 et d'une sous-unité transmembranaire gp41 qui sont associées de manière non covalente. La protéine cellulaire TIP47 (« Tail-Interacting protein of 47kDa) sert d'adaptateur entre les glycoprotéines Env et le Gag. À la membrane plasmique, TIP47 interagit avec le domaine C-terminal de la MA et la queue cytoplasmique de la gp41 favorisant ainsi l'incorporation des spicules dans les virions (276).

À la fin de l'assemblage, la matrice est associée à la face interne de l'enveloppe, la CA qui joue un rôle dans la cohésion mécanique du virus formera le core conique, contenant le génome viral composé d'un dimère d'ARNg recouvert de molécules de NC. Chez la plupart des rétrovirus, dont le HIV-1, l'assemblage du core se fait de façon concomitante au bourgeonnement viral et à la maturation protéolytique de Gag et Gag-Pol par la protéase virale, pour donner un virion enveloppé contenant les protéines matures.

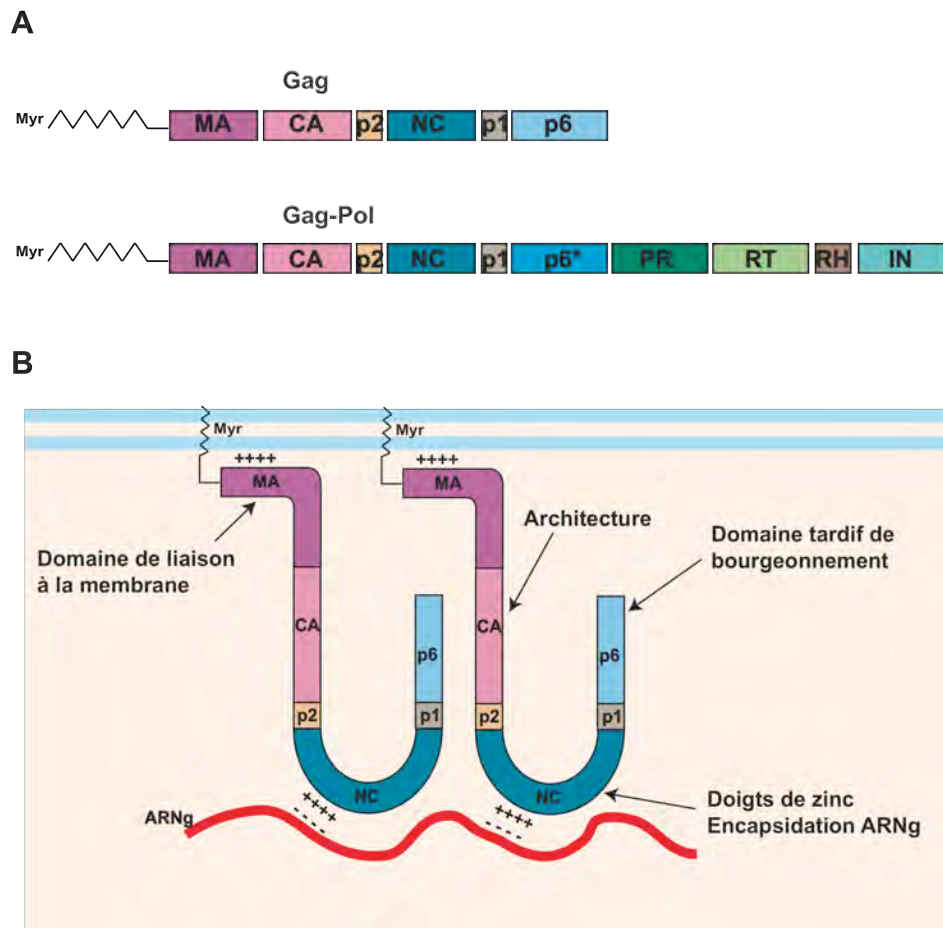


Figure 20 : Mécanisme d'assemblage du HIV-1, adapté de (83). (A) Composition des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol. (B) Association de Gag à la membrane plasmique et à l'ARNg.

3.2.2.4. Bourgeonnement

Le bourgeonnement des particules virales, classiquement décrit à la membrane plasmique, a été observé dans les macrophages au niveau de compartiments intracellulaires (330) apparentés aux endosomes tardifs (361). Une polémique s'est alors engagée sur le lieu réel du bourgeonnement viral. L'enveloppe du HIV-1 est fortement enrichie en sphingomyéline et en cholestérol. Elle reflète la composition du site de bourgeonnement et correspond bien à celle des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Elle est également proche de celle des endosomes tardifs. De plus, de nombreuses protéines membranaires sont ancrées dans l'enveloppe. Selon les cas, elles correspondent aux marqueurs des radeaux lipidiques ou à ceux des endosomes (322). Ainsi, un quasi-consensus semble s'établir sur le fait que les deux sites peuvent coexister. Le bourgeonnement est majoritairement observé au niveau des endosomes dans les macrophages (330, 347) et de la membrane plasmique dans les lymphocytes. La libération des virions à la membrane plasmique serait associée au caractère

aigu des infections, caractérisé par une production virale massive, des effets cytopathiques importants et une forte mortalité cellulaire, ce qui n'est pas le cas lors de l'exocytose des virions par fusion des endosomes tardifs à la membrane plasmique.

Dans les deux cas, le virus détourne la voie cellulaire d'expulsion des exosomes, le système VPS (« Vesicular Protein Sorting ») afin de libérer les virions. Ce système est composé des complexes ESCRT-I, -II et -III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le précurseur Gag recrute les éléments nécessaires au relargage des virions (168) grâce à son domaine p6 (domaine « L »). Ce peptide permet l'interaction avec des membres du complexe ESCRT-I, Tsg101 et AIP-1/Alix, requis lors des phases tardives du bourgeonnement et de la libération des particules virales. Lors de l'étape d'initiation du bourgeonnement, le peptide p6 s'associe à Tsg101 par l'intermédiaire d'une liaison entre son domaine tardif PTAP et l'extrémité N-terminale de Tsg101 (355). Le domaine p6 comporte également un motif YPLTSL qui permet le recrutement de la protéine AIP-1 facilitant ainsi le relargage des particules virales (424). Les protéines Tsg101 et AIP-1 peuvent également interagir ensemble directement *via* un motif PTAP contenu par AIP-1 (296, 424).

3.2.2.5. Maturation

Les premiers détails concernant le déroulement de l'étape de maturation émergent d'études de microscopie électronique. Alors que la particule immature contient une large couche dense aux électrons localisée immédiatement en dessous de l'enveloppe, la particule mature renferme une structure conique en son centre. Le processus de maturation permet une restructuration des composants à l'intérieur des virions, caractérisée par un réarrangement radical des précurseurs Gag et Gag-Pol nécessaire à la production de virions infectieux.

Lors de l'assemblage, les précurseurs Gag et Gag-Pol multimérisent. Les interactions entre précurseurs Gag-Pol entraînent le rapprochement des domaines de protéase qui vont dimériser afin de former une protéase active. Cette auto-activation va entraîner une coupure protéolytique initiale conduisant à la libération de l'enzyme. La protéase va ensuite cliver les précurseurs Gag et Gag-Pol de manière séquentielle (446, 464) à l'origine de la libération des protéines structurales et enzymatiques. Le premier clivage a lieu à la jonction p2/NC et induit la condensation de la RNP renfermant le dimère d'ARNg. Puis deux clivages intermédiaires ont lieu : le premier à la jonction MA/CA permet le relâchement des contraintes structurales exercées sur les protéines de capsidie nécessaire à la formation du core conique, la matrice

INTRODUCTION

restant quant à elle fixée à l'enveloppe ; le deuxième a lieu à la jonction p1/p6. La forme conique caractéristique de la particule virale et la structure finale des complexes formés par l'interaction de la NC avec le dimère d'ARNg n'apparaissent qu'après les dernières coupures entre CA/p2 et NC/p1 (Figure 21). La structuration de la RNP est accompagnée d'une maturation du dimère d'ARNg caractérisée par une augmentation de sa stabilité thermique (415) qui pourrait dépendre des produits de clivage du précurseur Gag. Ce dernier point sera développé dans le chapitre III.

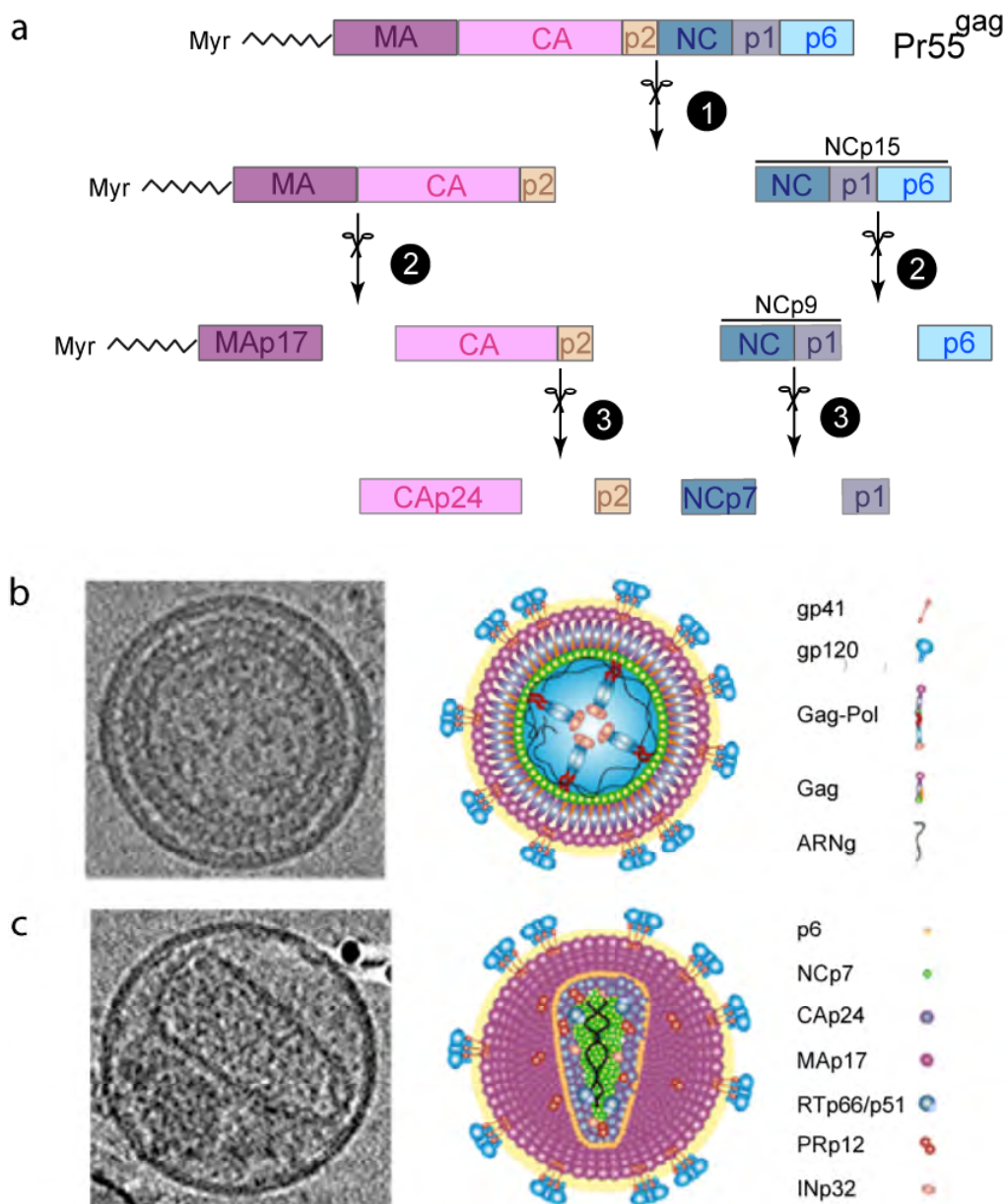


Figure 21 : Maturation des particules virales. (a) Clivage séquentiel du précurseur Pr55^{Gag} par la protéase virale. Schéma et coupe transversale de particule virale immature (b) et mature (c) obtenus par cryo-tomographie électronique (Source (155)).

III. La dimérisation de l'ARN génomique du HIV-1

L'encapsulation de deux copies d'ARNg est indispensable à l'établissement d'un nouveau cycle de multiplication. Dans les virions, ces deux molécules ne sont pas indépendantes, mais fortement associées, formant ainsi un dimère compact. La dimérisation du génome, caractéristique unique des rétrovirus, est un événement clé qui régule différentes étapes du cycle répliatif et dépend d'éléments en *cis* présents sur l'ARNg et de protéines virales agissant en *trans*. Ce chapitre a pour but de dégager une vision globale du mécanisme de dimérisation de l'ARN et d'en déterminer les implications dans la multiplication virale.

1. Nature dimérique du génome

Les premières preuves de l'existence d'un génome dimérique proviennent de l'étude de divers rétrovirus aviaires et murins dans les années 60. Le génome de ces rétrovirus présentait une constante de sédimentation en gradient de sucrose de l'ordre de 70S (371) correspondant à des poids moléculaires nettement supérieurs à la majorité des génomes viraux connus. Des expériences de traitement à la chaleur ont ensuite montré, chez le RSV, que le génome ARN de 62S pouvait passer à une forme de 36S et que l'agrégation de cette molécule était à l'origine de la formation de l'ARN 62S (119).

La première réelle compréhension de ce phénomène date de 1975. Des analyses du virus endogène félin RD-114 par microscopie électronique ont permis la visualisation d'une structure en forme de Y dans le génome viral, appelée « rabbit ears » et correspondant à l'association de deux molécules d'ARN par une de leurs extrémités (235) (Figure 22). Il a été montré que les extrémités libres comportaient une séquence poly-adénylée, caractéristique des extrémités 3' terminales, signifiant que la liaison était établie par l'intermédiaire de la région 5' terminale des ARN viraux. Le domaine d'interaction a été appelé structure de liaison des dimères (DLS, « Dimer Linkage Structure») (36). Par la suite, des structures similaires ont été décrites pour de nombreux gammarétrovirus (318). Cette observation s'est finalement étendue à l'ensemble des rétrovirus. La conservation du DLS au sein des rétrovirus était alors l'évidence du rôle important de la dimérisation de l'ARN dans le processus répliatif.

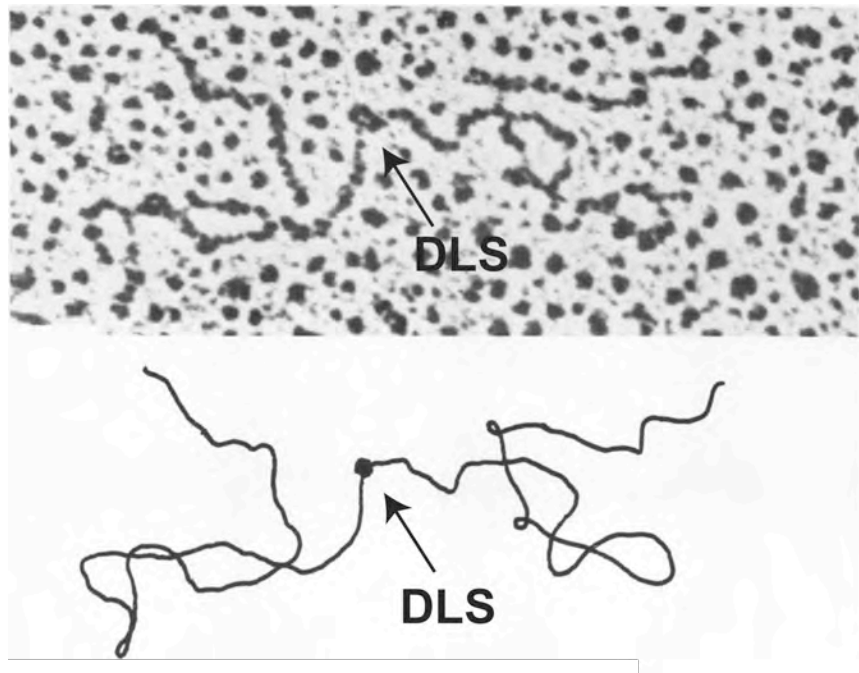


Figure 22 : Cliché de microscopie électronique d'un dimère d'ARN de RD-114 (235). Après extraction des virions, l'ARN a été partiellement dénaturé dans un mélange urée/formamide à 80% contenant 0,09 M de cations puis étalé sur grille. Un tracé de la molécule est représenté en bas, la DLS est indiquée par une flèche.

2. Éléments ARN impliqués dans la dimérisation

2.1. Chez HIV-1

La DLS du HIV-1 a été originellement identifiée grâce à des études *in vitro*. Des fragments d'ARN synthétiques contenant la région 5'UTR pouvaient former deux bandes majeures sur gel natif après incubation à 37°C et à forte concentration saline. La bande du bas présentait une taille attendue pour la molécule d'ARN seule, alors que la bande du haut correspondait au dimère d'ARN (99, 294). Cette approche a par la suite permis de déterminer la contribution des séquences présentes à l'extrémité 5' de l'ARNg dans le mécanisme de dimérisation.

L'utilisation de courts transcrits correspondants à des régions variables de l'extrémité 5' terminale de l'ARNg, dans des expériences de dimérisation *in vitro*, a démontré que la DLS du HIV-1 inclut les 311 premiers nucléotides (Figure 23), bien qu'il ait d'abord été proposé que la région 311-415 soit nécessaire et suffisante pour l'interaction ARN-ARN (99). Un fragment d'ARN comportant les séquences 1-311 dimérise dix fois plus vite qu'un ARN contenant la région 311-415 (295). De plus la délétion de la région 311-415 ne modifie pas la

capacité de dimérisation de l'ARNg (243). Ainsi, les régions localisées en amont du SD sont nécessaires à la dimérisation.

La structure secondaire de l'extrémité 5' terminale, qui inclut la DLS, a été prédite par des analyses bioinformatiques, phylogénétiques ainsi que par des expériences de cartographies en solution grâce à l'utilisation de nombreuses sondes chimiques et enzymatiques (35, 77, 95, 176, 337, 459, 465). Cette région, la plus conservée du génome, présente une structure consensus (décrite dans la partie II.2.2) constituée de sept tiges-boucles essentielles à la réplication virale (Figure 23). Chaque domaine structural est indépendant et possède une fonction propre (régulation de la transcription, polyadénylation, rétrotranscription, dimérisation, épissage, encapsidation et traduction).

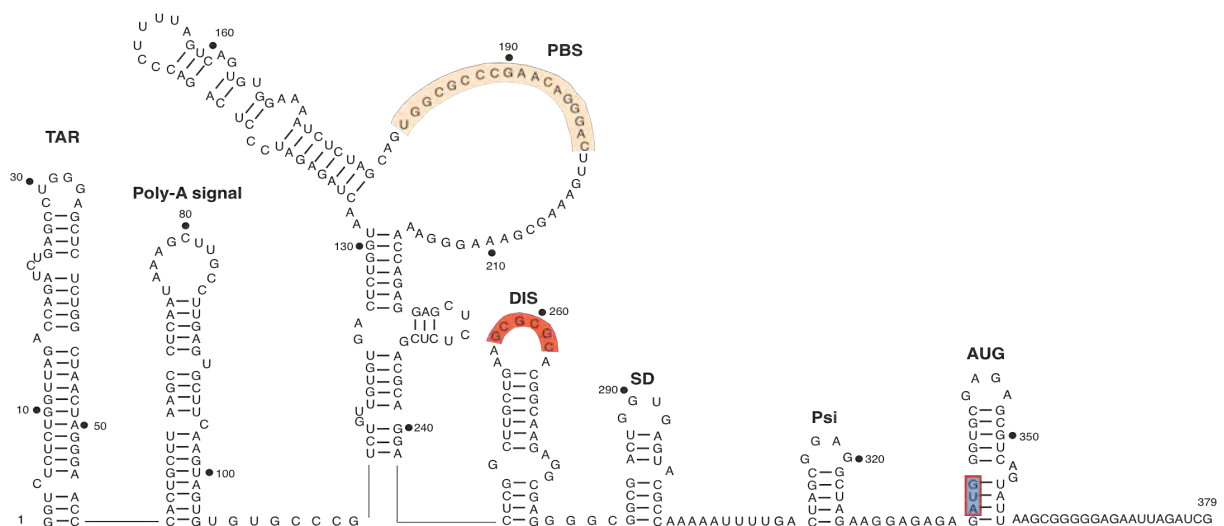


Figure 23 : Modèle de structure secondaire de l'extrémité 5' UTR de l'ARNg du HIV-1 (sous-type A) adapté de (337). Les différentes tiges-boucles qui composent cette extrémité sont représentées, elles contiennent le TAR, le polyA, le PBS, le DIS, le SD, le PSI et l'AUG. La séquence autocomplémentaire est indiquée en rouge, le PBS en beige et l'AUG en bleu

Les nucléotides clés impliqués dans la dimérisation, identifiés par interférence des modifications chimiques et mutagenèse dirigée (243, 316, 338, 342, 412), se localisent dans la tige boucle SL1 qui a été nommée le site d'initiation de la dimérisation (DIS). Cette tige-boucle de 35 nucléotides, localisée entre le PBS et le SD aux positions 243-277 de l'isolat MAL du HIV-1 (Figure 24), comporte une séquence palindromique de six nucléotides au sein d'une boucle de neuf nucléotides permettant l'établissement de liaisons ARN-ARN (Figure 23). Une délétion de la tige-boucle (338, 412) ou l'utilisation d'un oligonucléotide antisens

ciblant la séquence autoccomplémentaire abolissent complètement la dimérisation d'un fragment d'ARN 1-615 *in vitro* (274, 316, 411).

2.2. Chez les autres rétrovirus

La plupart des rétrovirus étudiés jusqu'à maintenant présentent, comme le HIV-1, une séquence de liaison des dimères de type palindromique. Celle-ci n'est pas toujours suffisante pour promouvoir une dimérisation fonctionnelle et, selon le rétrovirus, d'autres types de séquences et de structures sont alors requises.

2.2.1. Rétrovirus simples

2.2.1.1. Alpharétrovirus

Dans le cas de ALV, le processus de dimérisation semble similaire à celui du HIV-1. Une étude de dimérisation *in vitro* de différents fragments d'ARN correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNg a permis de déterminer la localisation précise du site de dimérisation. L'interaction ARN-ARN s'établit dans la région 5' non codante par l'intermédiaire d'une tige-boucle L3 qui présente une séquence autoccomplémentaire de six nucléotides au centre d'une boucle de huit nucléotides. Comme pour le HIV-1 cette tige-boucle est localisée en amont du SD, en position 241-297 (351) (Figure 24).

Les éléments *cis* impliqués dans la dimérisation du RSV ont également été déterminés par des études de dimérisation *in vitro*. Dans un premier temps, il a été proposé que les séquences 485-530 et 531-634, structurées en tiges-boucles imparfaites initiaient la dimérisation (253). Plus tard, une séquence autoccomplémentaire (L3) capable d'induire l'interaction ARN-ARN *in vitro* a été identifiée en amont du SD aux positions 241-297 (144) (Figure 24). Les régions situées en aval du codon AUG initiateur de la traduction de *gag* (nts 400 à 650) ne sont pas nécessaires à la dimérisation *in vitro*.

2.2.1.2. Gammarétrovirus

Dans le cas du MLV, plusieurs études de cartographies en solution ont établi la structure secondaire de la région 5'UTR. Ces expériences suggèrent, lorsqu'un dimère est préformé, que de nombreuses tiges-boucles localisées en amont du SD participent au processus de dimérisation (313, 445). Les tiges-boucles A (204-228) et B (278-303) comportent des boucles pseudo-palindromiques DIS-1 (GGCC) et DIS-2 (AGCU) et sont capables

d'interaction ARN-ARN. Mais les déterminants majeurs de la dimérisation sont les tiges-boucles C (316-352) et D (355-374) qui initient la formation d'un complexe boucle-boucle grâce à la présence d'un dinucléotide GC dans leur boucle. De plus, ces structures constituent le core du domaine d'encapsidation nécessaire à l'empaquetage de l'ARNg au sein des particules virales (163, 188, 283) (Figure 24).

De récents travaux indiquent que la DLS du MoMSV comporte une région compacte d'environ 170 nts suffisante pour initier la dimérisation de l'ARNg (21). Des études de dimérisation *in vitro* et de cartographie en solution de cette région ont montré qu'elle est constituée de trois éléments structuraux majeurs localisés en aval du SD en position 205-374 (Figure 24) : les séquences autoccomplémentaires, PAL1 et PAL2, forment des interactions ARN-ARN de respectivement 10 et 16 pb (283) ; des séquences additionnelles permettent la stabilisation du dimère (282) et se structure en un domaine en double tige-boucle SL1-SL2 (19, 20, 163).

2.2.2. Rétrovirus complexes

2.2.2.1. Deltarétrovirus

La structure du site de dimérisation du BLV a été déterminée par des expériences de mutagenèse dirigées, d'oligonucléotides antisens et de cartographie en solution de l'extrémité 5' terminale. La dimérisation *in vitro* est initiée par une région localisée en aval du SD aux positions 322-369 (Figure 24) qui contient le domaine U5, PBS et les 30 nts localisés à l'extrémité 3' du PBS (215, 216). Cette région est également impliquée dans l'encapsidation de l'ARNg (236, 291).

Le HTLV-1 comporte également une séquence autoccomplémentaire de 14 nts localisée en aval du SD à l'extrémité 5' du PBS (308) (Figure 24). Ce motif serait requis pour la dimérisation de l'ARNg car sa suppression induit la formation d'ARN monomériques *in vitro* (177, 248, 309).

2.2.2.2. Spumavirus

La dimérisation des spumavirus a été très peu étudiée. Néanmoins, il a été montré, grâce à l'étude de différents fragments de l'ARNg du HFV, que la dimérisation implique trois sites compris dans une région de 159 nts à l'extrémité 5' terminale de l'ARN (132). Le site SI est chevauchant au PBS, le site SII comporte une séquence palindromique de 10 nts requise pour l'initiation de la dimérisation (58), enfin, le site SIII se localise dans le gène *gag* (Figure 24).

2.2.2.3. Lentivirus autres que le HIV-1

Le mécanisme de dimérisation du HIV-2 présente certaines différences avec celui du HIV-1. De multiples éléments de dimérisation ont été décrits au sein de sa région leader : la tige-boucle SL1 (409 à 436) homologue à celle du HIV-1, contient également une séquence autoccomplémentaire et est à l'origine de la formation de dimères stables (112, 239) ; une seconde séquence palindromique localisée à l'extrémité 3' du PBS (302 à 380) permet la formation de dimères de moindre stabilité (208, 239) ; enfin une séquence palindromique de 10 nts a été localisée dans le signal d'encapsidation (380 à 400) de l'ARNg et serait impliquée dans la régulation de la dimérisation *in vitro* (22, 238) (Figure 24). Des changements conformationnels de l'ARNg provoqués par la NC permettraient la transition de la forme peu stable à la forme stable. Comme pour le HIV-1, les éléments majeurs de la dimérisation de l'ARNg du HIV-2 sont localisés en amont du SD.

La dimérisation du SIV a été analysée par des études de dimérisation *in vitro* et de mutagenèse dirigée. Comme pour le HIV-1 et le HIV-2, une courte tige-boucle SL1, comportant une séquence autoccomplémentaire de 6 nts entourée de purines non appariées, a été localisée en aval du SD (182, 208, 461). Ce motif représente le premier déterminant de dimérisation et d'encapsidation pour le SIVcpz et le SIVmac et leur DLS s'étend depuis le PBS jusqu'au codon initiateur de la traduction (182, 461), alors que pour le SIVsm, le premier déterminant de dimérisation semble être localisé dans le PBS (208) (Figure 24). Dans les deux cas, la dimérisation s'initie par l'intermédiaire d'interactions boucle-boucle (208).

2.3. Chez des virus autres que les rétrovirus

Il existe d'autres virus capables de former des dimères. L'exemple le mieux caractérisé est celui du virus de l'hépatite C (HCV), appartenant à la famille des flavivirus. Ce virus enveloppé comporte un génome à ARN positif de 9,6 kb constitué d'une longue région codante. Cette région est entourée de séquences 5' et 3'UTR très structurées (268) qui comportent toutes les deux un domaine de 55 nts renfermant une séquence palindromique. Il a été montré que le palindrome de 16 nts est capable d'initier la dimérisation de l'ARNg du HCV *in vitro* (199). C'est pourquoi, ce palindrome a été nommé séquence de liaison des dimères (DLS) par analogie à celle des rétrovirus (199). Le mécanisme de dimérisation ainsi que sa signification biologique reste à être élucidés. De surcroît, la famille des flavivirus n'encapside qu'une seule copie d'ARN au sein de leurs virions et la dimérisation de l'ARNg du HCV n'a pas été mise en évidence *in vivo* (407).

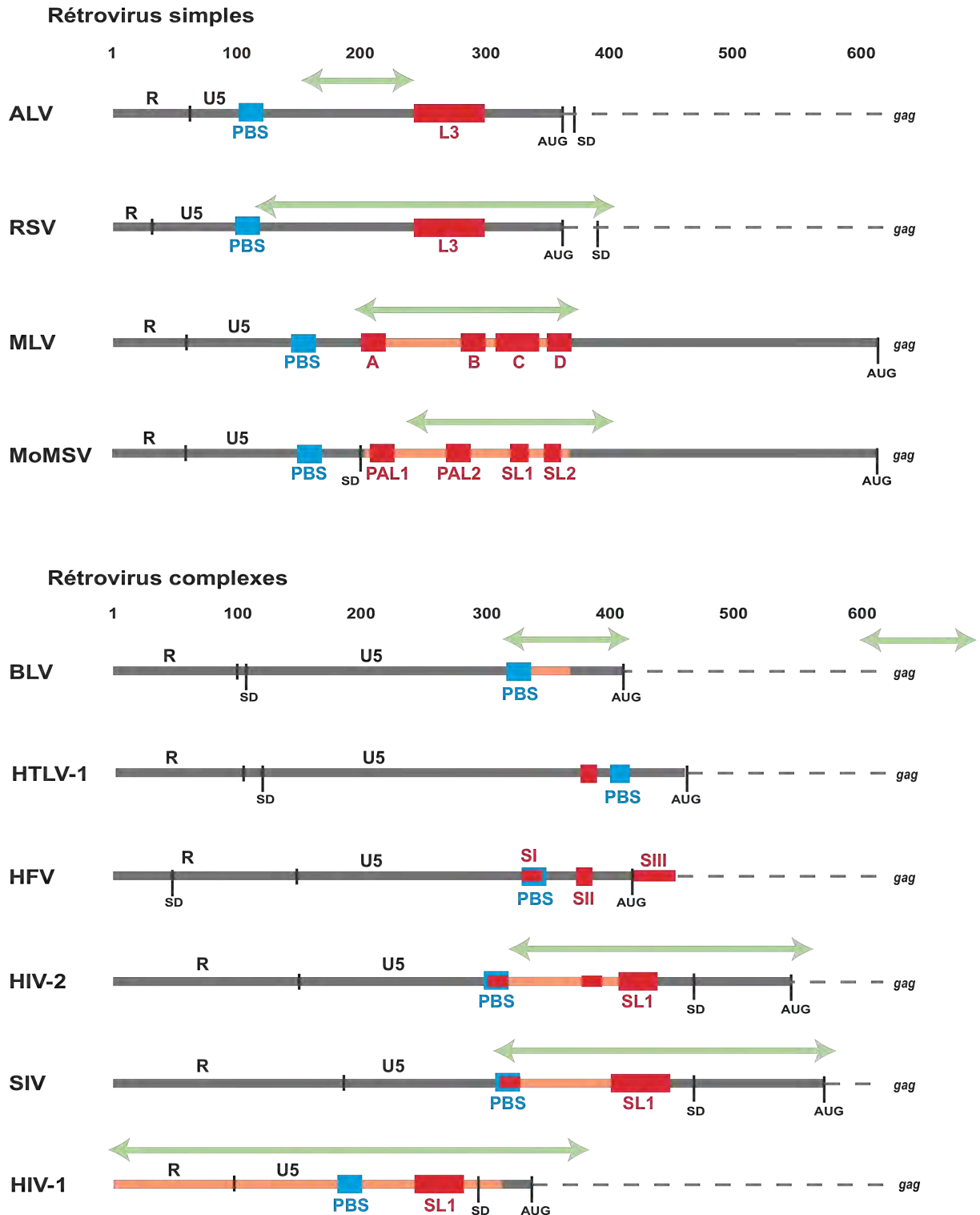


Figure 24 : Localisation de la région de dimérisation (DLS) des rétrovirus. Le domaine de dimérisation est indiqué par un trait orange et les tiges-boucles impliquées dans l'interaction ARN-ARN par des boîtes rouges. Les flèches vertes correspondent aux domaines majeurs d'encapsidation, la position de ce domaine n'a pas encore été déterminée pour le HTLV-1 et le HFV. Les boîtes bleues signalent la position du PBS. Lorsque le SD et le codon AUG initiateur de la traduction sont présents, ils sont indiqués d'un trait noir vertical.

3. Mécanisme de la dimérisation

Seuls les mécanismes de dimérisation des ARN des rétrovirus les plus étudiés à l'heure actuelle (HIV-1, HIV-2 et MLV) seront décrits dans ce chapitre.

3.1. Chez le HIV-1

3.1.1. Initiation de la dimérisation

La nature palindromique du DIS du HIV-1 (Figure 25A) permet l'établissement de liaisons classiques de type Watson-Crick entre deux molécules d'ARN contenant cette même séquence (79, 315, 338, 412). L'interaction est à l'origine de la formation d'un complexe boucle-boucle (Figure 25B et 25C), dont la structure a été résolue par résonance magnétique nucléaire et cristallographie aux rayons-X (129, 224, 429) (Figure 27). Une mutation qui détruit la séquence autocomplémentaire inhibe la dimérisation de l'ARNg (338, 341, 343, 412). En revanche, l'introduction d'une mutation compensatoire restaure le processus. Toutefois, toutes les séquences palindromiques ne sont pas capables de promouvoir la dimérisation. La plupart des souches du HIV-1 en circulation contiennent une séquence de type GCGCGC (sous-type B, D et F) (Figure 24A), GUGCGC (un virus de sous-type A) ou GUGCAC (tous les autres sous-types) (420). Seul un petit nombre d'autres palindromes peut se substituer avec succès aux séquences canoniques (246) et leur taille est limitée à 6 nt. Il n'existe ainsi théoriquement que 64 palindromes de 6 nt capables d'induire la dimérisation.

Les expériences de sélection qui ont permis la mise en évidence des séquences palindromiques aptes à diriger la dimérisation montrent qu'au plus deux liaisons de type A-U peuvent être tolérées dans l'interaction (273). De plus, les deux nucléotides centraux ont un rôle crucial dans la stabilité du complexe suggérant qu'ils peuvent constituer le point de nucléation du dimère (336). Un article récent, utilisant des expériences de sélection *ex vivo*, a montré l'importance des nucléotides dans la boucle du DIS (196). Les auteurs ont généré une banque de plasmides contenant le génome du HIV-1 de sous-type B dont le DIS (de type GCGCGC) a été muté aléatoirement. Après 100 jours d'infection des cellules avec cette banque, la séquence DIS des variants émergents a été analysée. Il a été observé une perte de diversité du palindrome et un retour fréquent à la séquence sauvage GCGCGC. Par ailleurs, d'autres séquences ont été mises en évidence : les deux séquences naturelles GUGCAC et GUGCGC, ainsi que 6 autres séquences dont la majorité contient un dinucléotide GC en son centre. Ces variants renferment préférentiellement une séquence d'au moins 4 nts riche en

GC, mettant en évidence que la stabilité du complexe boucle-boucle formé est le facteur principal de la conservation de la séquence autocomplémentaire (273) et suggérant son avantage sélectif (196). La nature restrictive du DIS suggère également que le processus de formation des dimères est très spécifique ou que le DIS possède d'autres rôles dépendant de sa séquence. Par ailleurs, le DIS pourrait simplement avoir subi des contraintes évolutives en relation avec son rôle dans le cycle réplcatif. L'apparition d'une nouvelle séquence, garantissant la stabilité du dimère, aurait alors pu initier la divergence de certains sous-types.

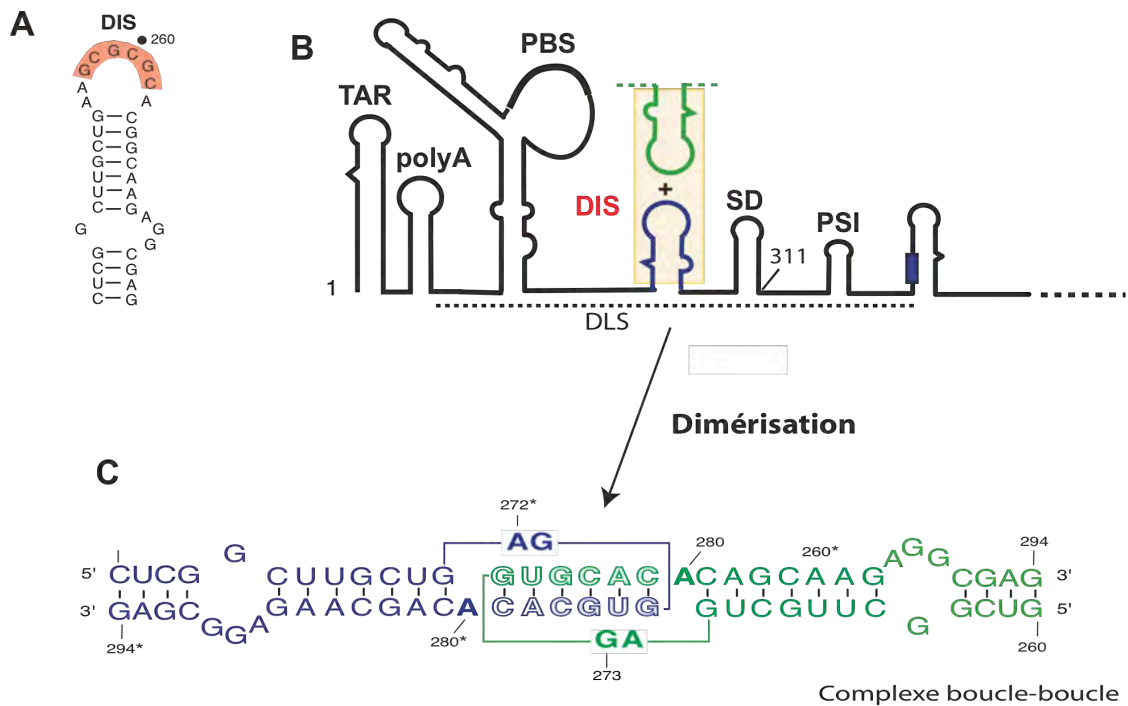


Figure 25 : Mécanisme d'initiation de la dimérisation chez le HIV-1 adapté de (339). (A) Structure de la tige boucle SL1. La séquence autocomplémentaire est entourée en orange. (B) Formation du complexe boucle-boucle. Les deux régions impliquées dans la dimérisation sont indiquées dans le rectangle jaune. (C) Structure du complexe boucle-boucle. Les nucléotides responsables de l'interaction sont indiqués en fond blanc, les purines qui les entourent sont en gras.

3.1.2. La NC : un facteur intervenant en *trans*

Dans les virions matures, le dimère d'ARN est complexé à la NCp7 (99). Cette petite protéine basique de 55 acides aminés possède deux "doigts de zinc" de type CCHC (Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys) (X étant un résidu variable) (84, 256). Ces motifs localisés en positions 14-28 et 29-35 sont séparés par une courte séquence de liaison. Ils présentent une forte affinité pour le zinc (301) et permettent la formation de complexes tétra-coordonnés responsables de l'établissement d'interactions avec les acides nucléiques (38). Des études

INTRODUCTION

RMN ont montré que la fixation de zinc induit la formation de domaines globulaires nécessaires à la stabilisation de la structure tertiaire de la NC et à son activité *in vivo* (312, 417, 428). Des mutations inhibant la liaison du zinc ont pour conséquence la production de virions non infectieux dépourvus de génome (5, 174). Les régions amino et carboxy-terminales de la NC sont peu structurées et très flexibles (Figure 26). Elles sont respectivement essentielles à la reconnaissance du génome et à l'assemblage des particules virales (172, 438).

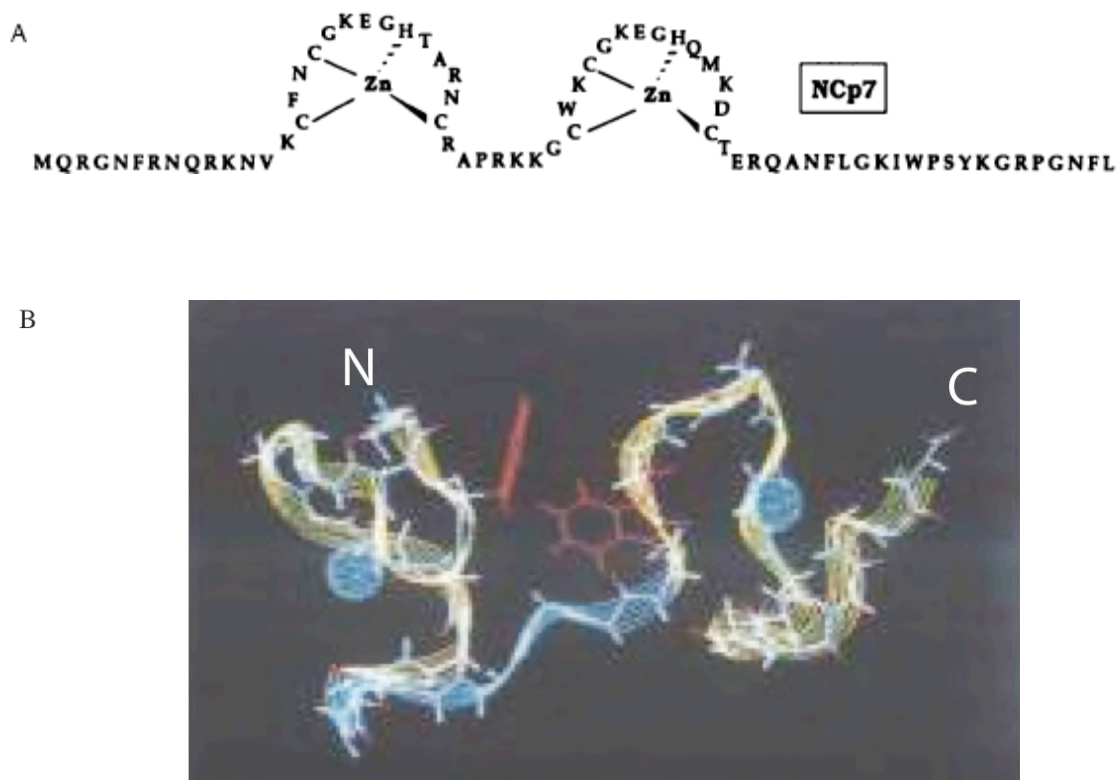


Figure 26 : La protéine de nucléocapside. (A) Séquence de la NCp7. Le complexe tétra-coordonné avec le zinc est indiqué (312) (B) Représentation en ruban du squelette de la NCp9. Les “doigts de zinc” sont représentés en jaune. Les atomes de zinc sont indiqués par des sphères bleues. Le domaine de liaison est représenté en bleu. Les extrémités amino et carboxy-terminales sont indiquées par N et C. Les chaînes latérales des résidus aromatiques Phe16 et Trp37 sont représentées en rouge (312).

Des études *in vitro* ont mis en évidence la capacité de liaison de la NCp7 aux acides nucléiques. Elle interagit préférentiellement avec les acides nucléiques simple-brins et présente une forte affinité pour l'ARN viral (242). *Ex vivo*, le domaine NC de Gag interagit avec l'extrémité 5' de l'ARNg et plus particulièrement avec les quatre tiges-boucles qui composent la région leader (SL1 à SL4) (5). De plus, des virus chimériques contenant une

séquence leader et un gène *gag* non homologues ne sont plus infectieux, ce qui suggère que le processus de reconnaissance (qui fera l'objet du chapitre IV) est hautement spécifique (44).

Après maturation des particules virales, la NC va se lier sur toute la longueur de l'ARN, une molécule recouvrant environ 7 nts (449, 471). De plus, la NC présente une activité chaperonne des acides nucléiques essentielle à la réplication virale (365). Elle permet la reconnaissance et l'hybridation de séquences nucléotidiques complémentaires et entraîne un réarrangement conformationnel des acides nucléiques. Il a ainsi été montré qu'elle favorise l'hybridation de l'ARN_{t₃^{lys}} à l'ARN_g et le saut de brin lors de l'étape de rétrotranscription (104, 206). Elle active également la dimérisation *in vitro* des ARN de MLV (47, 356), RSV (46), ALV (6) et HIV (315). Dans le cas du HIV-1, elle entraîne la conversion d'un complexe boucle-boucle préformé en un complexe plus stable (315) et la formation directe de dimères stables (104, 261).

D'autres domaines de Gag interviennent également dans la dimérisation de l'ARN_g. En effet, il a été montré que des mutations de l'extrémité C-terminale du domaine de MA de RSV sont à l'origine de l'encapsidation de l'ARN_g sous forme monomérique (158). Les auteurs proposent que la distribution intracellulaire de la MA serait impliquée dans la dimérisation de l'ARN. Cependant, le rôle de la matrice dans la dimérisation de l'ARN_g du HIV-1 n'a pas encore été mis en évidence.

3.1.3. Stabilisation du dimère d'ARN génomique

Au sein des virions le complexe boucle-boucle subit une maturation correspondant à une augmentation de sa stabilité thermique. Ce mécanisme dépend de séquences présentes sur l'ARN_g et d'une interaction directe avec le précurseur Gag à l'origine de changements conformationnels du dimère d'ARN (146).

3.1.3.1. Mise en évidence d'une stabilisation du complexe

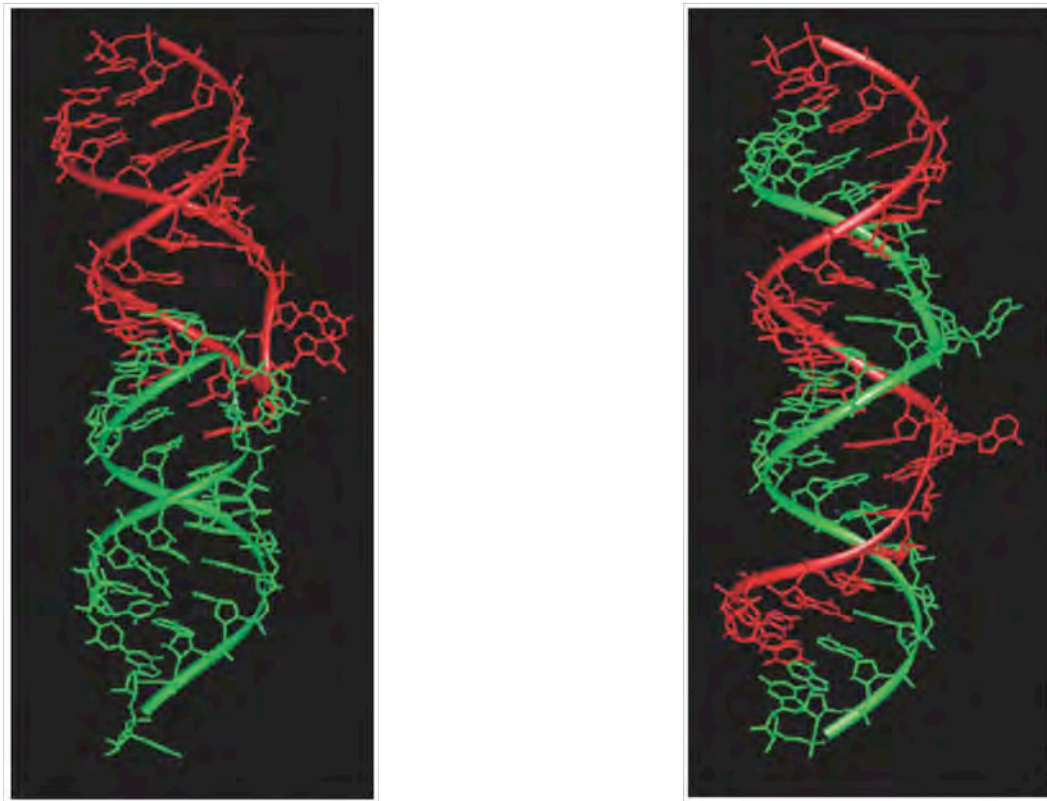
Certains résidus dans la boucle du DIS sont essentiels à la stabilisation des dimères *in vitro*. La séquence autoccomplémentaire est en effet entourée de résidus puriniques dont la conservation est absolue au sein des virus HIV et SIV (273). Chez le HIV-1, la boucle du DIS contient deux purines en 5' du palindrome et une en 3' qui restent non appariées après formation du complexe boucle-boucle (Figure 25A). Il a été suggéré par des expériences de

cartographies en solution et d'interférence chimique que ces nts jouent un rôle structural important par l'établissement d'interactions non canoniques (343).

Par ailleurs, deux structures différentes du complexe ARN-ARN ont été résolues *in vitro* par RMN et cristallographie aux rayons-X grâce à l'utilisation de courts fragments d'ARN contenant la tige-boucle SL1 (127, 129, 224, 429). La première correspond au complexe boucle-boucle généré par un contact initial au niveau du DIS, la seconde met en évidence la formation d'un duplex étendu qui présente une stabilité thermique supérieure à celle du complexe boucle-boucle (Figure 27). La description des structures cristallographique du DIS de l'ARNg du HIV-1 des sous-types A (boucle de type 272-**AGGUGCACA**-280), B (boucle de type 272-**AAGCGCGCA**-280) et F (boucle de type 272-**AAGUGCACA**-280), montre que dans le complexe boucle-boucle les deux motifs SL1 présentent un alignement coaxial parfait, à l'exception des résidus puriniques conservés A272 et R273 qui se structurent en une région non appariée située à l'extérieur de l'alignement (« bulge-out »). Dans le duplex étendu, le résidu R273 entre en interaction non canonique avec le résidu A280 et se relocalise à l'intérieur de la structure hélicoïdale du complexe (« bulge-in »). Sur la base de ces structures cristallographiques, il a été proposé que la transition du complexe boucle-boucle au duplex étendu pourrait impliquer un clivage symétrique par trans-estérification au niveau des résidus puriniques des deux molécules d'ARN suivi d'une religation croisée (127, 129). Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée pour le moment. Cependant, les résidus puriniques pourraient être impliqués dans la stabilisation du complexe ARN-ARN observée après assemblage et relargage des virions (277).

Le passage du complexe boucle-boucle au duplex étendu pourrait également s'expliquer par une progression de l'interaction ARN-ARN le long de la tige de SL1 entraînant la conversion des liaisons intramoléculaires de la tige en liaisons intermoléculaires. De surcroît, la tige SL1 comporte une courte séquence non appariée métastable de 3 nts (Figure 25A) qui peut favoriser le passage d'une forme à l'autre (176, 404). *Ex vivo*, des délétions de cette boucle interne ou du haut de la tige de SL1 diminuent le taux de dimères dans les virions mais n'affectent pas leur stabilité thermique (404), suggérant un mécanisme plus complexe de stabilisation du dimère d'ARN au sein des particules virales et laissant un doute quant à la formation d'un duplex étendu *ex vivo*.

A



B

complexe boucle-boucle

duplex étendu

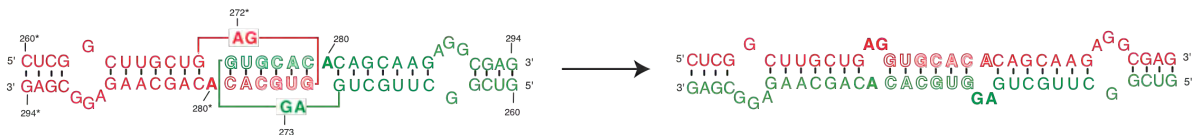


Figure 27 : Structure des complexes ARN-ARN mis en évidence *in vitro*. (A) Structures cristallographiques du complexe boucle-boucle (à gauche) et du duplex étendu (à droite) réalisées à partir de fragments d'ARN de 23 nts contenant le DIS. Les deux molécules d'ARN sont représentées en vert et rouge (B) Modèle de stabilisation *in vitro* du dimère d'ARNg de 23 nts, montrant le passage du complexe boucle-boucle au duplex étendu. (339).

3.1.3.2. Éléments ARN impliqués dans la stabilisation

Il a été mis en évidence que d'autres séquences présentes à l'extrémité 5' de l'ARNg sont requises pour la dimérisation, certaines étant localisées en amont du DIS, d'autres se situant dans la région entourant le codon d'initiation de la traduction de Gag. Ces séquences peuvent être impliquées dans la stabilisation du complexe soit par l'établissement d'interactions intermoléculaires à courte distance, soit par la formation d'interactions intra- et intermoléculaires à longue distance.

Des expériences de microscopie électronique ont permis d'identifier un deuxième point de contact du dimère localisé en amont de SL1 (12, 191). Ce site pourrait correspondre à la

séquence palindromique contenue dans la partie apicale de TAR ou à celle présente dans la boucle du polyA, mais l'implication directe de ces séquences reste incertaine :

- le palindrome présent au sein de TAR est capable d'initier la formation de complexes boucle-boucle *in vitro* en présence de la NC, mais il n'est que partiellement accessible, réduisant ainsi son implication dans l'établissement d'interactions boucle-boucle lors de la phase d'initiation de la dimérisation (12). De plus, le rôle de TAR a récemment été étudié en générant un variant du HIV-1 ne nécessitant pas TAR pour la transcription. Il a ainsi été montré que celui-ci n'est essentiel à la réplication virale que de par son rôle dans l'activation de la transcription (100) ;
- le palindrome contenu dans le signal de polyadénylation ne semble pas non plus intervenir dans l'établissement d'interactions intermoléculaires lors de la dimérisation. Il a été montré, par hydrolyse progressive des extrémités 5' et 3' de l'ARNg et par mutagénèse dirigée, que ce palindrome serait impliqué dans des interactions à longue distance avec une courte région présente dans la séquence codant la protéine de matrice (95, 340, 459) (Figure 28). En outre, l'établissement de cette interaction à longue distance a été proposé par phylogénie pour tous les isolats du HIV-1 ainsi que chez certains lentivirus, comme le HIV-2 et le SIV (95, 340). Cependant, lorsque celle-ci est perturbée, la réplication virale n'est pas affectée, suggérant qu'elle ne possède pas non plus un rôle prépondérant dans la formation du dimère ou dans sa stabilisation.

Le rôle joué par des séquences entourant le site d'initiation de la traduction dans la dimérisation de l'ARNg a été mis en évidence par notre équipe. Il a été montré que deux régions situées en aval du SD sont directement impliquées dans la stabilité thermique du dimère d'ARN *in vitro* (338, 343). La première, localisée juste en amont du codon initiateur de la traduction du gène *gag* et la seconde, dans la partie apicale de la tige-boucle SL4. L'amplitude de la stabilisation dépend de la séquence autoccomplémentaire du DIS. Ainsi, il pourrait y avoir une interaction directe entre le DIS et la région entourant le codon d'initiation du gène *gag* due à l'établissement de liaisons Watson-Crick classiques, ou à la formation de structures moins habituelles, mais ceci n'a pas encore été déterminé.

En insérant un deuxième DLS dans le gène *env*, l'équipe de Sakuragi a généré des génomes à deux DLS distants de plus de 5 kb qui restent à l'état monomérique au sein des virions grâce à la formation d'interactions intramoléculaires entre les deux DLS. Les régions nécessaires au maintien de ces liaisons ont été localisées à la jonction R/U5 (entre le polyA et

le PBS), à la jonction U5/leader (entre le PBS et l'extrémité 3' de SL1) et autour du codon AUG de Gag (383), suggérant qu'elles sont toutes requises pour la dimérisation. La région localisée à la jonction U5/leader, qui contient le DIS, est impliquée dans l'interaction initiale, alors que les régions de jonction R/U5 et entourant l'AUG pourraient quant à elles permettre une orientation correcte des deux molécules d'ARN ou la maturation du dimère *in vivo* grâce à l'établissement d'interaction à longue distance. De surcroît, il a été proposé que la région située entre le polyA et le PBS puisse interagir avec le codon AUG (1, 197, 418) (Figure 28). Cette seconde interaction à longue distance est également très conservée dans tous les isolats du HIV-1, HIV-2 et SIV (95, 340, 459), cependant son rôle exact dans le mécanisme de dimérisation et de stabilisation du dimère d'ARN reste sujet à débat.

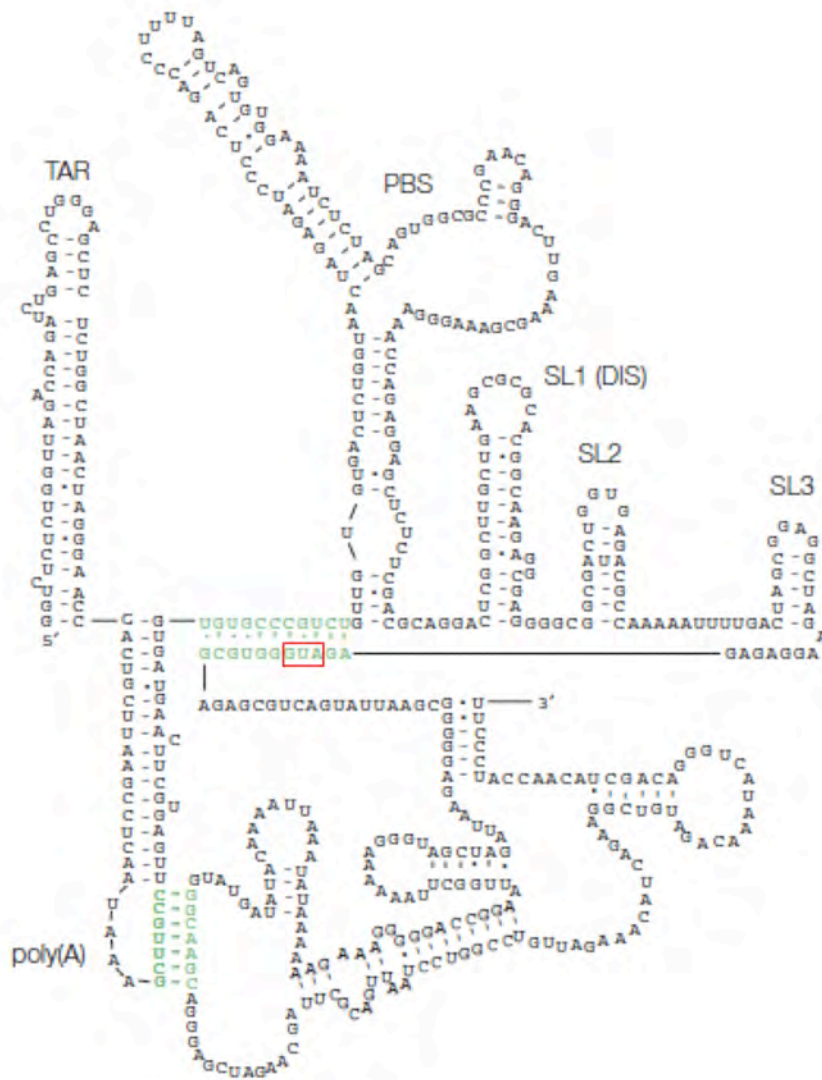


Figure 28 : Structure secondaire prédite de la région 5' terminale de l'ARNg du HIV-1. L'interaction à longue distance entre le polyA et le gène *gag* est représentée ainsi qu'une interaction entre la région U5 et le codon d'initiation de la traduction (92). L'AUG est encadré en rouge.

3.1.3.3. Mécanisme de stabilisation

Les protéines virales jouent un rôle important dans la maturation du dimère viral. Pendant ou juste après assemblage des particules virales, la protéase clive les précurseurs Gag et Gag-Pol libérant ainsi les protéines virales. La maturation de la particule virale à l'origine du changement de conformation du virus s'accompagne alors d'une restructuration du dimère d'ARNg. Des études récentes indiquent que la stabilisation des dimères s'effectue en trois étapes (415) et serait directement dépendante de l'état de maturation de la NC qui présente une activité chaperonne d'ARN (189) :

- la première étape a été mise en évidence dans les virions immatures ou possédant une protéase inactive. L'ARN isolé de ces virions est en majorité monomérique et lorsqu'il présente une conformation dimérique, celle-ci se dissocie à faible température. Des analyses de Northern blot en conditions natives ont montré que le dimère migre lentement et qu'il présente une température de fusion de l'ordre de 37°C ;
- lors de la seconde étape, le dimère adopte une conformation intermédiaire. Il migre plus vite que celui précédemment observé ;
- l'étape finale de maturation génère un dimère très stable qui migre encore plus vite et dont la température de fusion est de l'ordre de 55°C.

Ainsi, lors du processus de dimérisation, l'interaction initiale au niveau du DIS conduirait à la formation du complexe boucle-boucle. Puis, le clivage protéolytique du précurseur Gag entraînerait une progression de l'interaction le long de SL1 induit par la NC pouvant correspondre à un duplex étendu ou à un autre complexe. En effet, dans le cas de ALV, l'équipe de Philippe Fossé a montré par des expériences de dimérisation *in vitro* en présence de NC que l'extension des interactions n'est pas complète et s'arrête à la moitié de la tige-boucle L3, ce qui pourrait également être le cas pour HIV-1 (6, 351). Enfin, la maturation du dimère s'achèverait grâce à l'établissement de points de contacts additionnels sur l'ARNg qui pourraient être présents tout au long de la molécule d'ARN.

De nombreuses régions de la NCp7 seraient impliquées dans la dimérisation de l'ARNg, comme son extrémité N-terminale, les deux doigts de zinc ainsi que la courte séquence qui les relie (212). En outre, il a été montré que des mutations empêchant la maturation du précurseur Gag ont un impact important sur la stabilité du dimère. Les clivages successifs de Gag augmentent la condensation de l'ARN. Ceci pourrait être dû à une stimulation de l'activité chaperonne de la NCp7 par rapport aux intermédiaires de clivage NCp15 et NCp9 et à l'établissement de multiples interactions ARNg/NC et NC/NC (139, 189, 304). Cette

hypothèse est étayée par une récente étude mettant en évidence que la NCp7 et la NCp9 sont impliquées dans la maturation des dimères *ex vivo*, à l'inverse de la NCp15 (203). Ainsi, les différents états de maturation de la NC pourraient diriger le processus de maturation.

Le clivage protéolytique des précurseurs Gag et Gag-Pol joue également un rôle complexe dans la maturation du dimère qui ne dépend pas que de l'activité chaperonne de la NC, le précurseur Gag possédant lui-même une activité chaperonne (137). Des défauts de maturation des complexes ARN-ARN ont été observés lorsque le rapport Gag/Gag-Pol n'est pas optimal (400). Ainsi la formation de dimères stables pourrait être liée à la maturation globale du virion. En effet, la destruction de l'hélice $\alpha 1$ de la CA entraîne un défaut de maturation de la particule virale sans altérer le clivage des polyprotéines virales. La stabilité du dimère d'ARN issu de ce mutant est comparable à celle d'une souche PR (-) et inférieure de plus de 10°C à celle de la souche sauvage (211). Ce résultat suggère que la maturation morphologique du virion est liée à la stabilité du dimère d'ARN et, bien que ce dernier mécanisme reste incompris, la structuration du core faciliterait la maturation complète du dimère d'ARNg (146).

3.2. Chez le MLV

Quatre tiges-boucles, A (209 à 236), B (278 à 303), C (310 à 352) et D (355 à 374), très conservées au sein des rétrovirus murins (445), sont impliquées dans la dimérisation (Figure 24) de l'ARNg de MLV. Des études de cartographie en solution des 630 premiers nts de l'ARNg à l'état monomérique et dimérique (313, 445), révèlent des différences de réactivité entre ces deux formes, reflétant de nombreux changements conformationnels induits par la dimérisation (313) (Figure 29). Il a ainsi été proposé que la dimérisation correspond à un processus en deux étapes (283) fortement activé en présence de la NC (167).

Tout d'abord, les motifs C et D initient la dimérisation grâce à la formation de complexes boucle-boucle intermoléculaires *via* l'appariement entre les dinucléotides GC présents au sein de leurs boucles (91, 106, 226). Cette première interaction est à l'origine d'un changement conformationnel de l'extrémité 5' terminale de l'ARNg, plus particulièrement au niveau des motifs A et B.

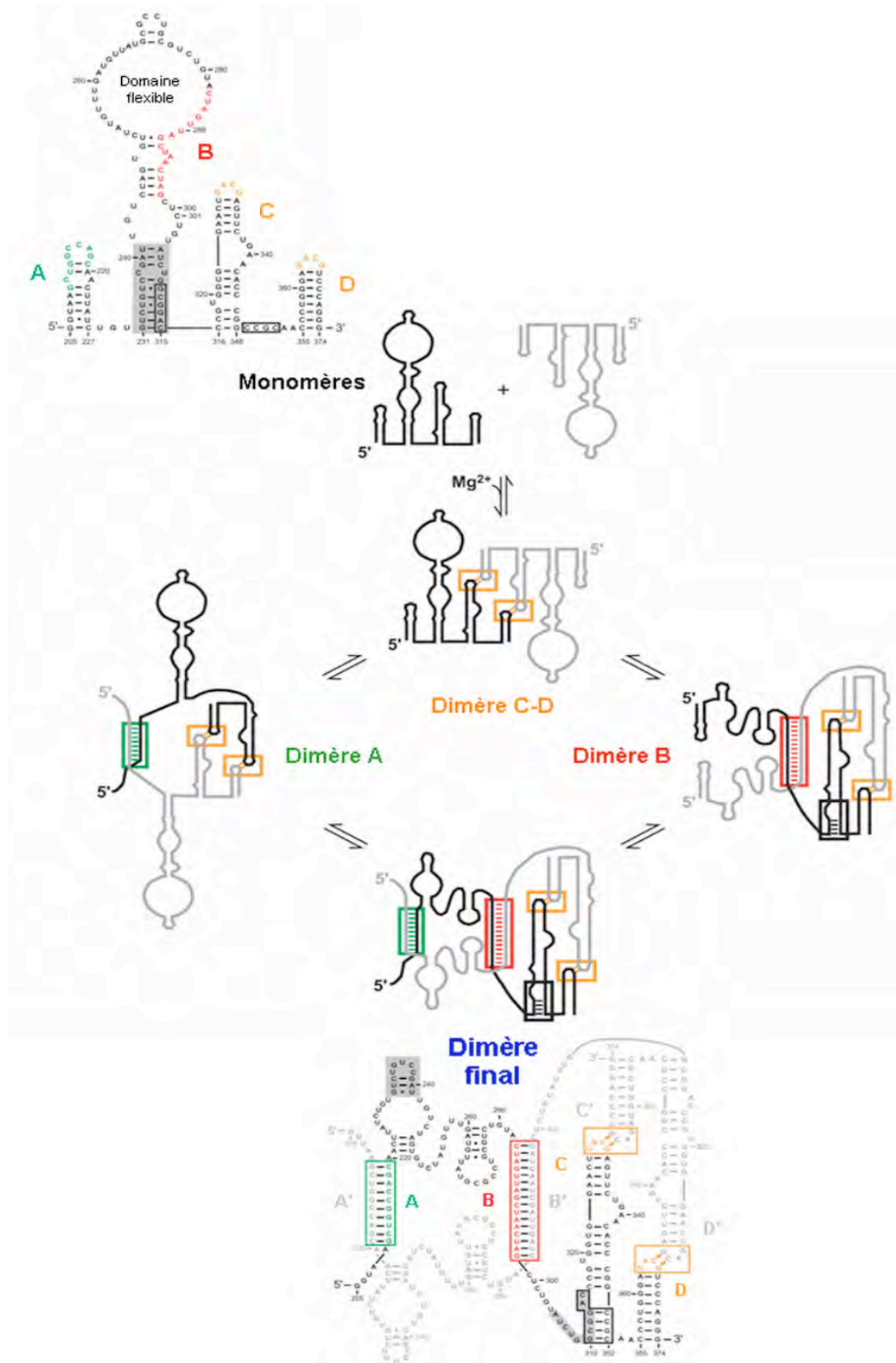


Figure 29 : Modèle de dimérisation de l'ARN de MoMLV, adapté de (163). La structure secondaire des motifs A, B, C et D est indiquée. La partie basale de la structure secondaire contenant le domaine flexible et le motif B est grisée. Les nucléotides impliqués dans l'extension de la tige du motif C sont encadrés en noir. L'ion divalent Mg²⁺ active la formation du complexe boucle-boucle entre les motifs C et D. Ce complexe permet ensuite l'extension du duplex entre les motifs A ou motifs B de chaque ARN. Ce complexe est ensuite converti en dimère stable par appariement entre les motifs A/A' et B/B'.

Concernant le motif B, il a été montré qu'une délétion de 10 nts (290 à 299) dans ce motif ou que l'utilisation d'un oligonucléotide antisens dirigé contre la région 275-291 altèrent la dimérisation d'un fragment d'ARNg de MLV comportant la région 5' terminale (167). Par ailleurs, le changement de conformation induit par la première étape de dimérisation permet l'exposition d'un palindrome AGCU localisé dans la boucle du motif B. Ce palindrome, nommé DIS-2, permet la formation d'un deuxième complexe boucle-boucle (283) qui pourrait ensuite être converti en duplex étendu.

Il a également été montré que les nts 210-230 du motif A subissent un réarrangement conformationnel lors de la dimérisation. L'étude de cette région a mis en évidence des propriétés de dimérisation (445) similaires à celle obtenue pour le motif B (331). De la même manière, un réarrangement de l'appariement de la tige-boucle A conduit à l'exposition d'une séquence palindromique GGCC dans la boucle, nommé DIS-1, permettant la formation d'un complexe boucle-boucle (283) susceptible d'évoluer vers un duplex étendu. L'inhibition de l'homodimérisation entre le DIS-1 et le DIS-2 des motifs A et B, par mutagenèse ou par l'ajout d'oligonucléotides compétiteurs a permis de confirmer le rôle des deux tiges-boucles A et B dans la dimérisation et leur passage par un complexe boucle-boucle (283).

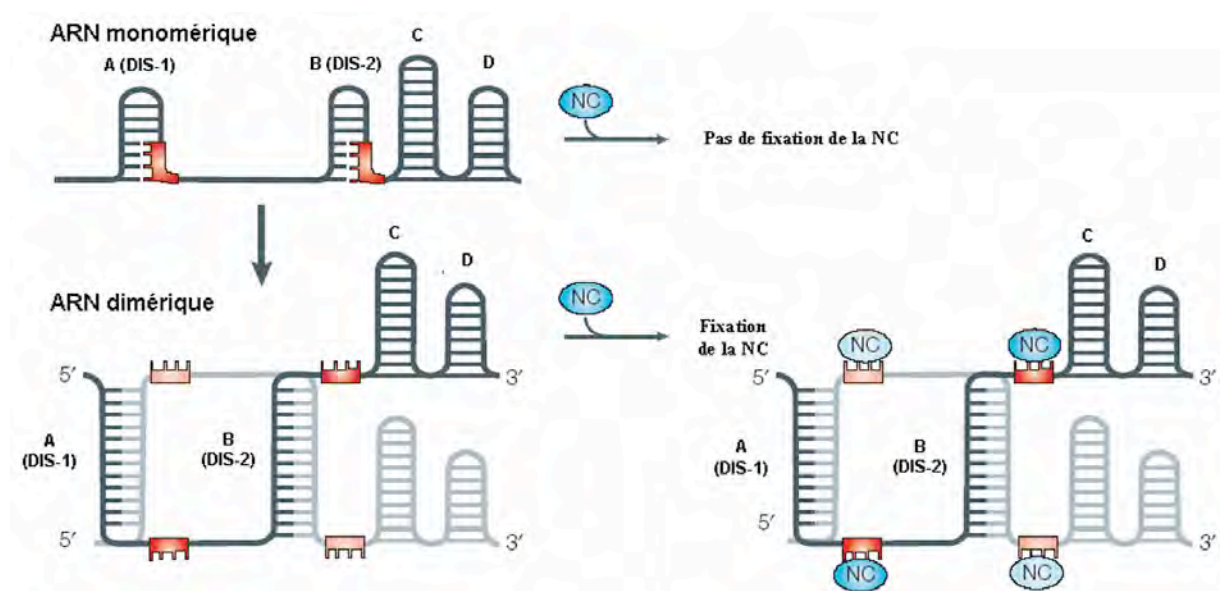


Figure 30 : Modèle de régulation, par la dimérisation, de l'interaction entre l'ARNg de MLV et la NC (93). L'homodimérisation des motifs A et B va induire un réarrangement de l'appariement exposant les séquences de fixation de la NC représenté par des rectangles rouges. Les protéines de NC (ovale bleu) se fixent sur ces séquences stabilisant la liaison entre les deux ARN et permettant le ciblage du site d'assemblage.

Par ailleurs, le changement conformationnel à l'origine de la formation des complexes boucle-boucle au niveau des motifs A et B (33, 413) entraîne l'exposition de domaines de liaisons à la NC, dont l'interaction à forte affinité (111) est requise pour l'encapsulation de l'ARN (19, 92, 93) (Figure 30). Cette hypothèse du réarrangement structural induit par la dimérisation a par ailleurs été récemment soutenue par des études RMN (306).

Ainsi, les motifs C et D constituent les déterminants majeurs de la dimérisation (20). Les motifs A et B ne contribuent pas significativement à la stabilisation du dimère (163). Cependant, en formant des duplexes intermoléculaires à l'état dimérique final (19), ils favorisent l'encapsulation. Le modèle de dimérisation en plusieurs étapes (Figure 29) a également été soutenu par des approches de cartographie quantitative réalisées sur le MSV, homologue à 97% au MLV, montrant en plus que la région 251-290 du motif B comporte un domaine flexible qui faciliterait la formation des complexes (21).

3.3. Chez le HIV-2

La dimérisation de l'ARNg du HIV-2 implique plusieurs éléments de dimérisation localisés dans la région leader (112, 208) (Figure 24) :

- le premier est situé à l'extrémité 5' terminale du PBS et possède la capacité de former des dimères peu stables *in vitro* (208, 239) ;

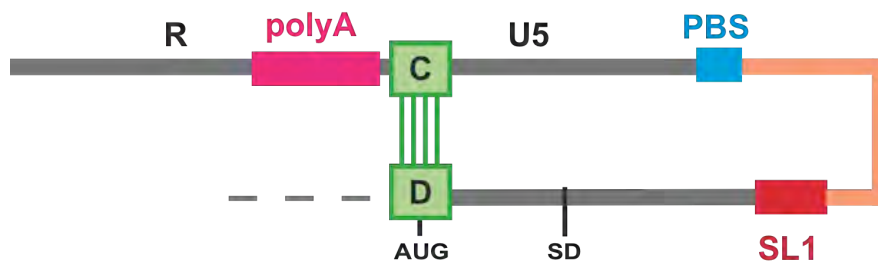


Figure 31 : Schéma de la conformation proposée pour la région leader de l'ARNg du HIV-2, inhibant la formation de dimères par l'intermédiaire de SL1. L'interaction à longue distance entre les domaine C et D est représentée en vert, adapté de (24).

- le second, homologue au motif SL1 du HIV-1, permet la formation de dimères stables entre des fragments d'ARNg contenant la totalité de la région 5'UTR, par l'intermédiaire d'un motif palindromique localisé dans la boucle (113, 208). Il a été montré, grâce à l'utilisation de fragments d'ARN contenant en plus la région entourant le codon d'initiation de la traduction, que la formation de dimères stables est alors rendue impossible. On observe l'établissement

d'une interaction à longue distance entre un domaine présent à l'extrémité 5' terminale du poly A (domaine C) et la région entourant l'AUG (domaine D) (113, 240) (Figure 31). Dans cette conformation, le motif SL1 est inaccessible et la formation de dimères stables est impossible (238, 240), suggérant que des conformations alternatives permettent soit de présenter le palindrome SL1, soit de le séquestrer ;

- enfin, le palindrome pal de 10 nts, localisé en amont de SL1, pourrait également être impliqué dans la régulation de la dimérisation (238). Afin de déterminer le rôle exact de pal, l'équipe de Stephen Lodmell a généré une banque de séquences aléatoires de ce motif. Cette banque a été utilisée pour synthétiser différents fragments d'ARNg du HIV-2, testés par la suite dans des expériences de dimérisation *in vitro*. Ces expériences, ainsi que des études de prédiction de structure, montrent que SL1 peut adopter plusieurs conformations ne présentant pas la même efficacité de dimérisation (22). Lorsque le domaine pal est non-apparié, la présentation de la séquence autoccomplémentaire de SL1 est favorisée (79, 246). En revanche, lorsque pal est impliqué dans des interactions à courte distance avec l'extrémité 3' terminale de SL1, le palindrome de SL1 est séquestré et il n'y a plus formation de dimères stables (22), suggérant une régulation locale de la dimérisation grâce à la stabilisation du motif pal et plus particulièrement la moitié 3' de ce motif, nommée tige B (24, 237) (Figure 32).

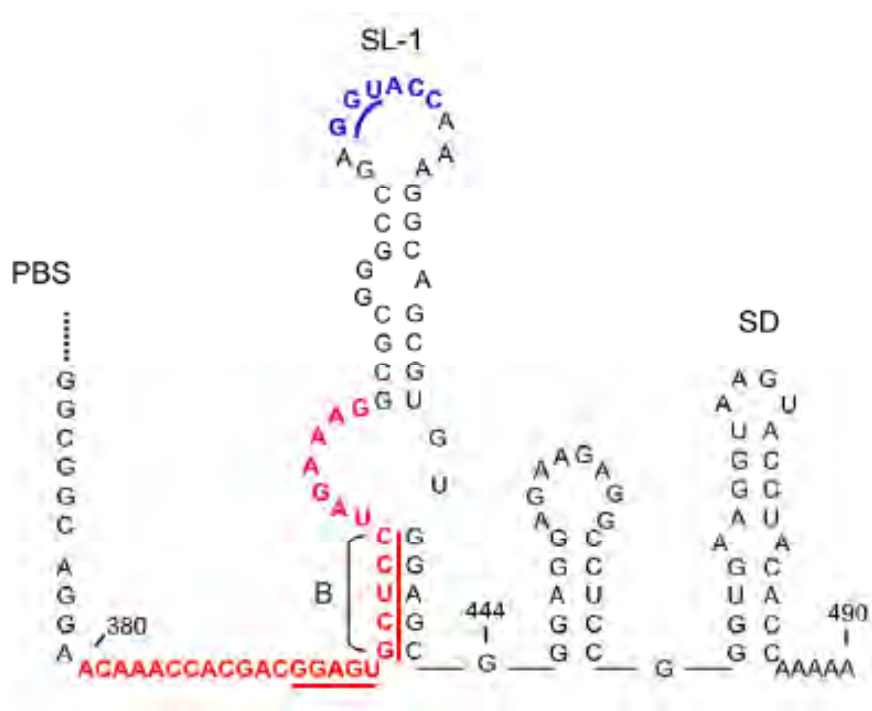


Figure 32 : Structure de la région leader de l'ARNg du HIV-2 défavorisant la formation de dimères stables (237). La séquence autoccomplémentaire de SL1 est représentée en bleu, la région simple brin dans la conformation favorisant la dimérisation est indiquée en rouge. Le motif pal est souligné en rouge et son motif B est indiqué.

4. Lieu de formation du dimère d'ARN génomique

4.1. Cellules ou virions ?

Le mécanisme qui gouverne l'encapsidation de deux copies d'ARNg au sein des virions reste mal caractérisé à l'heure actuelle. Lors de l'assemblage, les protéines virales peuvent permettre l'encapsidation d'un dimère d'ARN viral ou de deux molécules monomériques. Dans le cas des rétrovirus aviaires RSV et ALV, l'ARNg est présent sous forme dimérique dans les particules matures (332, 345, 423). En revanche, au sein de particules immatures ou possédant une protéase non fonctionnelle, la nature de l'ARNg est ambiguë. Alors qu'un groupe a identifié des conformations monomériques et dimériques de l'ARNg (421), d'autres équipes ont détecté exclusivement des ARN sous forme monomérique (253, 324, 332). Ces résultats controversés pourraient provenir de la technique d'extraction des ARN et plus particulièrement de l'utilisation d'agents chélateurs de cations divalents. En effet, il a été montré par des études *in vitro* que la stabilité du dimère d'ARN est dépendante de la présence d'ions Mg^{2+} (351).

Les mêmes expériences ont été réalisées avec MLV et HIV-1. Elles montrent pour MLV que l'ARNg est présent sous forme d'un complexe instable au sein des particules immatures, suggérant la sélection d'un dimère d'ARN pour l'encapsidation (147, 260). En revanche, dans le cas du HIV-1, des molécules monomériques ont majoritairement été mises en évidence (415). Cette observation est également vraie lorsque certaines protéines virales sont altérées (120, 401). Mais comme pour les rétrovirus aviaires, il est possible que la technique de purification soit à l'origine d'une dissociation des dimères d'ARN viraux liés par des interactions faibles (complexe boucle-boucle). Dans le cas du HIV-1, notre équipe a montré que la fixation d'ions Mg^{2+} est indispensable à la dimérisation d'ARNg présentant une séquence autoccomplémentaire de type GUGCAC (209). Cette dépendance en ions Mg^{2+} est nécessaire à la dimérisation de tous les sous-types du HIV-1 à l'exception du sous-type B. Cependant, il a été montré, après détermination de la structure cristallographique des complexes boucle-boucle de fragment d'ARN de divers sous-types, que le magnésium est toujours présent dans la boucle (129). Ainsi, bien qu'il ne soit pas nécessaire à l'initiation de la dimérisation de tous les sous-types du HIV-1, le magnésium doit participer à la structuration du dimère.

4.2. Évidences d'une formation cellulaire

L'hypothèse selon laquelle l'initiation de la dimérisation aurait lieu au sein de la cellule hôte a été soutenue par plusieurs études. Des expériences de cartographie *ex vivo* ont permis de déterminer la structure secondaire de la région 5' terminale de l'ARNg directement dans les cellules et les virions. Les conformations établies *in vitro* et en cellule sont très similaires, montrant que la représentation sous forme de tiges-boucles de l'ARNg est la plus représentée au sein de la cellule. En outre, en comparant la structure secondaire de cette région dans la cellule et dans les virions, aucune différence structurale n'a été observée au niveau de la boucle du DIS (celle-ci étant protégée des modifications chimiques), suggérant que l'ARN serait déjà sous forme d'un complexe boucle-boucle dans la cellule (337).

La possibilité d'une dimérisation au sein de la cellule a également été proposée suite à différentes études génétiques. L'équipe de Wei-Shau Hu a déterminé le taux de recombinaison durant un cycle de réplication entre les sous-types B et C du HIV-1 qui ne présentent pas la même séquence autoccomplémentaire du DIS (GCGCGC pour le sous-type B et GUGCAC pour le sous-type C). Lorsque différentes souches d'un même sous-type sont utilisées, le taux de recombinaison est élevé. À l'inverse, ce taux chute de manière importante entre les sous-types B et C. Leurs séquences palindromiques, qui ne diffèrent que de 3 nts, sont en majorité responsables de cette réduction. En effet, après mutations des séquences du DIS sur les deux sous-types pour les rendre identiques, le taux de recombinaison augmente. De manière analogue, l'introduction de mésappariements au sein du DIS de souches d'un même sous-type réduit ce taux. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que des interactions au niveau du DIS sont à l'origine de la sélection des deux molécules d'ARNg avant leur encapsidation dans les particules virales et qu'elles seraient alors associées en dimère (71). Ainsi le taux de recombinaison entre deux molécules d'ARN permet de déterminer leur capacité à former des dimères (69, 70). De la même façon, une étude de la formation de virions hétérozygotes à partir d'ARN possédant des mutations compensatoires au sein du DIS a montré que la formation d'interactions parfaites n'est rendue possible qu'entre les ARN dérivés de virus différents mais possédant des DIS autoccomplémentaires. Ainsi, la formation d'interactions Watson-Crick au niveau du DIS est un déterminant majeur dans la sélection de deux molécules d'ARNg (310).

L'ensemble de ces résultats suggère que le dimère d'ARN est formé dans la cellule hôte préalablement à son encapsidation.

4.3. Détermination du lieu cellulaire de formation des dimères

Une étude récente s'est intéressée au lieu proprement dit de formation des dimères d'ARN et à l'influence de la voie de transport de l'ARNg du HIV-1 (311). Deux lignées cellulaires ont été infectées par des virus différents. Après fusion cellulaire, le taux de recombinaison est déterminé. Dans cette technique, deux cas de figures se présentent : si la dimérisation a lieu au sein du noyau, aucune forme recombinante ne devrait être observée. Au contraire, une dimérisation cytoplasmique rend possible la formation de virions hétérozygotes (Figure 33). Il a ainsi été montré que deux ARN différents peuvent être co-encapsidés, suggérant que la dimérisation s'initie dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cependant, ceci n'exclut pas la formation dans le noyau de dimères dynamiques.

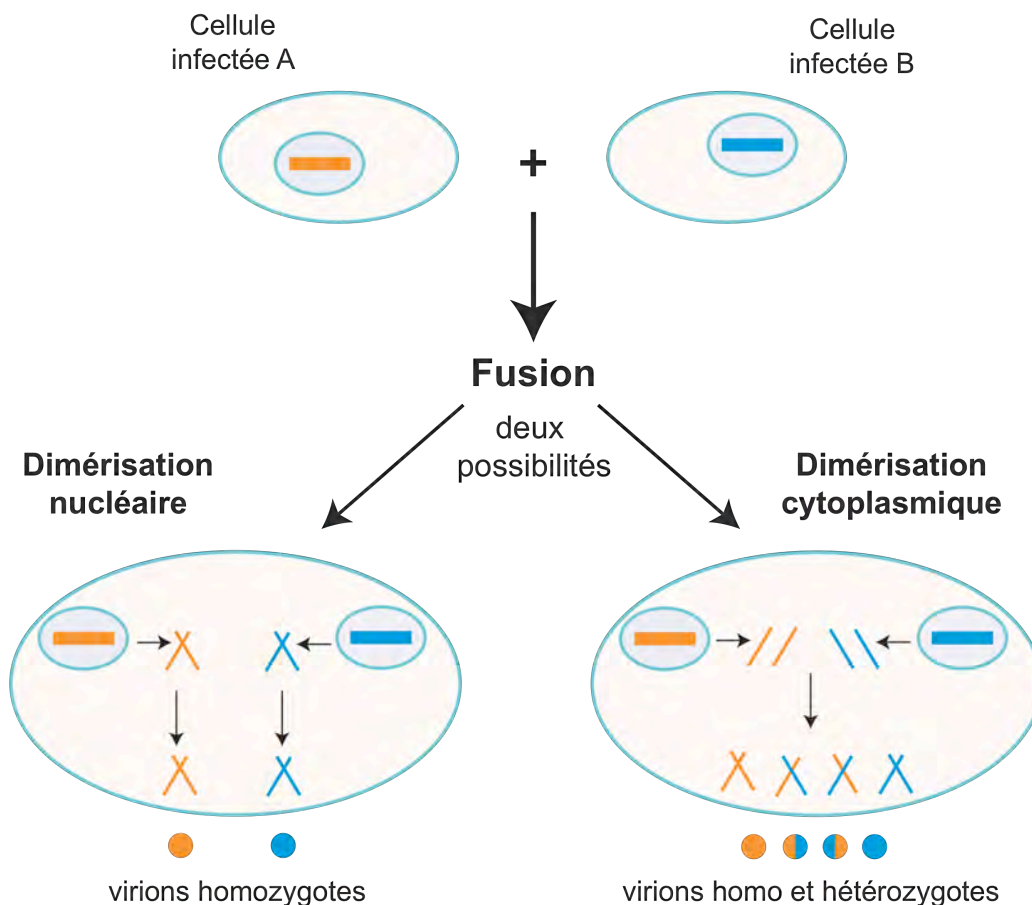


Figure 33 : Exemple d'expérience de fusion entre des cellules infectées par deux virus différents. Le génome du premier virus (ADN et ARN) est représenté en orange, celui du deuxième en bleu.

Le lieu de dimérisation de l'ARN du MLV a quant à lui été étudié par Alice Telesnitsky, grâce au développement d'une technique de capture d'ARN, nommée RCA (« RNA Capture Assay ») (Figure 34). Cette méthode permet de quantifier les homodimères et les hétérodimères présents dans des virions produits à partir de cellules co-exprimant deux ARN distincts de MLV (141, 142). Il a été montré que, lors de la co-expression de ces deux ARN, la formation d'homodimère était favorisée, suggérant que la dimérisation est initiée dans le noyau. La même équipe a confirmé ce résultat en appliquant la technique de RCA sur deux ARN distincts produit à partir de la même matrice ADN ou de deux matrices ADN différentes. La formation d'hétérodimères est favorisée lorsque la transcription s'effectue à partir d'une même matrice, alors qu'à partir de deux matrices différentes, les deux ARN forment préférentiellement des homodimères (142). Ainsi, cette étude suggère une dimérisation nucléaire concomitante à l'étape de transcription, tout du moins pour les virus de type MLV.

D'autres études ont également montré que des ARN différents peuvent être encapsidés sous forme d'hétérodimères lorsqu'ils sont transcrits sur des loci chromosomiques proches (222). Les auteurs ont utilisés deux méthodes de transfection stable afin d'introduire deux vecteurs rétroviraux différents dans la cellule : la co-transfection et la transfection séquentielle. La co-transfection va permettre l'intégration en tandem dans le chromosome (68, 169, 171, 457) alors que la transfection séquentielle permet de dissocier les deux événements de transfection (établissement d'une lignée stable avec le premier vecteur puis transfection stable de cette lignée avec le deuxième vecteur). L'intégration se fait alors aléatoirement diminuant les chances d'insertion des deux vecteurs sur des loci chromosomiques proches. Ainsi, la formation d'hétérodimères est 4 fois plus importante lors de la co-transfection par rapport à la transfection séquentielle (222). Ce résultat a été confirmé par l'équipe de SV. Rasmussen (362). Dans son cas, la formation d'hétérodimères augmente de 15 à 80 fois lorsque l'intégration est réalisée dans des loci chromosomiques proches. La différence d'effet observée par ces deux équipes peut s'expliquer par l'utilisation de méthodes de transfection, de lignées cellulaires et d'agents de sélection qui ne sont pas strictement identiques.

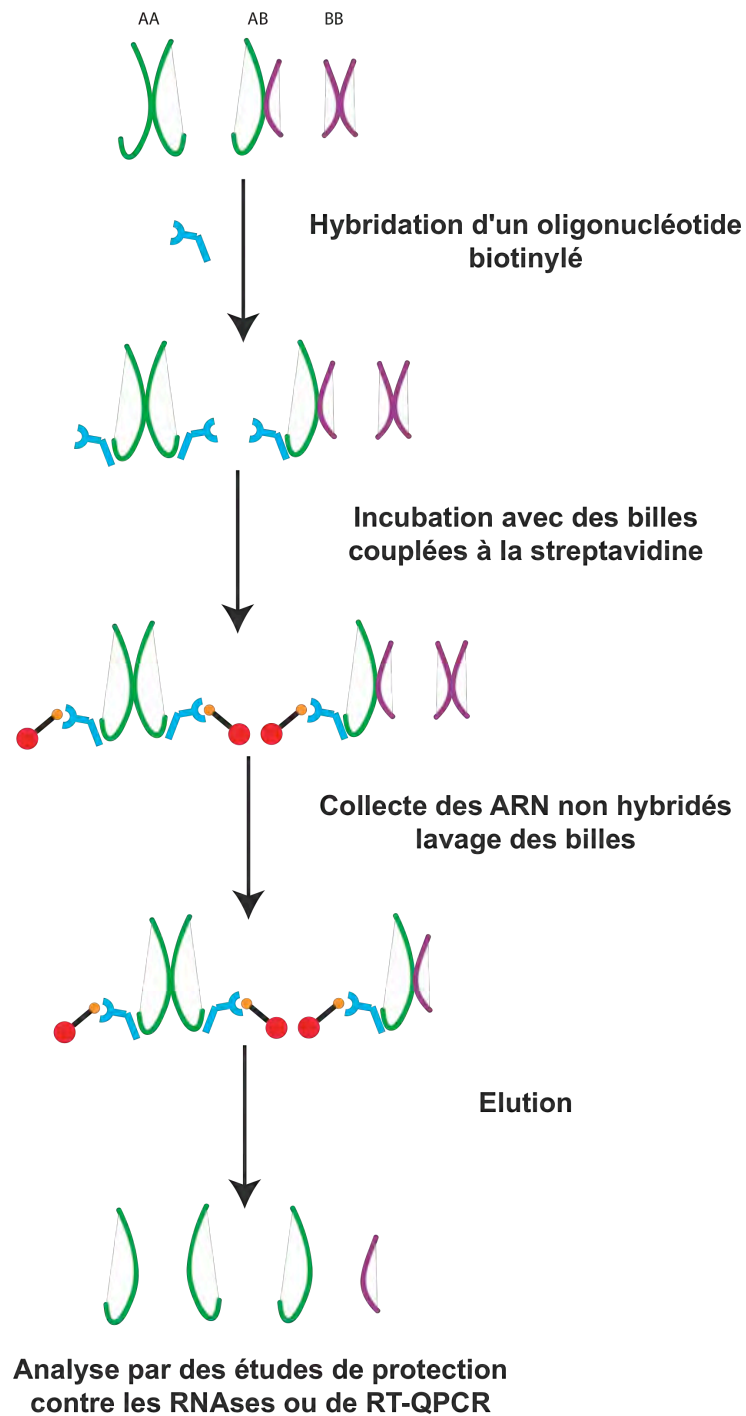


Figure 34 : Technique de capture des ARN par RCA (« RNA Capture Assay ») ((141)). Les différents dimères obtenus après extraction des ARN A et B issus de virions sont représentés sous leurs différentes formes : homodimère AA, hétérodimère AB et homodimère BB. L'hybridation de l'oligonucléotide biotinyllé et complémentaire de A se fait dans des conditions permettant le maintien des liaisons entre dimères. Les complexes oligonucléotide biotinyllé/ARN sont isolés sur billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Après lavages, les ARN sont élués par chauffage à 85°C. Les ARN des différentes fractions sont ensuite quantifiés par RPA (« RNase protection assay ») ou RT-QPCR.

5. Rôles de la dimérisation

Les rétrovirus sont la seule famille de virus qui encapsident deux copies d'ARNg sous forme dimérique. Ce phénomène présente de nombreux avantages sélectifs et plusieurs fonctions liées à la dimérisation ont été proposées dans l'assemblage et la maturation de la particule virale, dans la rétrotranscription et la recombinaison de l'ARNg, ainsi que dans la traduction et l'encapsidation du génome.

5.1. Assemblage et maturation des particules virales

La stabilisation du dimère d'ARN a lieu au cours de l'assemblage et de la maturation de la particule virale. Comme nous l'avons vu précédemment, la morphogénèse de la particule virale permet de réguler l'étape de maturation du dimère. Plusieurs études proposent une réciprocity de ce processus. En premier lieu, des analyses *in vitro* de l'assemblage du RSV ont montré que l'efficacité d'assemblage est fortement augmentée en présence d'ARN (62, 63, 64). Celui-ci joue un rôle structural important dans les virions et pourrait initier et organiser le processus d'assemblage. L'importance de l'ARN viral dans l'assemblage a par la suite été testée *ex vivo* par l'analyse de particules virales du MLV dépourvues d'ARNg. Il a été montré que ce type de particules contient alors des ARN cellulaires à la place de l'ARNg (317) et qu'un traitement avec des RNases provoque des interruptions dans la capsid virale. De plus, l'ARNg du HIV-1 est impliqué dans la multimérisation du précurseur Gag (116). Ainsi, l'ARNg peut être considéré comme un échafaudage à partir duquel les protéines vont s'assembler (317), permettant ainsi la maturation de la particule virale (458). Dans le cas du HIV-1, ce rôle pourrait être accompli par l'ARNg sous forme dimérique, puisque le génome semble être encapsidé en dimère dans les particules virales.

Il a été observé de façon récurrente (pour RSV, HFV et HTLV-1) que des mutations ou des délétions du site de liaison du dimère diminuent l'infectivité des particules virales (58, 248, 345) en empêchant la formation de particules virales matures et infectieuses. De manière intéressante, il a été montré que l'ARN active le clivage *in vitro* des protéines virales (405). Un mutant du HIV-1 présentant des délétions du DIS est incapable de compléter le processus de maturation des protéines (265, 266). Lorsque ce mutant est cultivé pendant plusieurs semaines, des mutations compensatoires du précurseur Gag apparaissent dans les domaines MA, CA, NC ainsi que dans le peptide p2. Les particules virales sont de nouveau maturées, mettant en avant l'étroite relation entre le DIS et/ou la dimérisation et la maturation virale. Ce

rôle reste pourtant sujet à controverse puisque *ex vivo* des clones moléculaires mutants du DIS n'ont pas d'effet sur la maturation des précurseurs (42, 246, 336).

5.2. Rétrotranscription et recombinaison

L'étude du RSV, a permis la mise en évidence de l'implication de la dimérisation dans l'étape de rétrotranscription. En effet, un mutant du RSV à l'origine de la formation de particules virales contenant un génome exclusivement monomérique produit cent fois moins d'ADN que le virus sauvage (345). Dans le cas du HIV-1, il a été montré que la dissociation thermique des dimères d'ARN inhibe la synthèse d'ADN et que la présence d'un dimère dans la particule virale pourrait faciliter le transfert de brin lors de l'étape de rétrotranscription (40, 336, 404).

La proximité des deux molécules d'ARNg présente également une autre fonction dans la rétrotranscription. L'ARN viral peut subir des dommages avant cette étape. Une hypothèse indéniable soutient que la présence d'un génome dimérique est à l'origine de sauts du complexe de rétrotranscription d'une matrice à l'autre lorsque des cassures dans l'ARN se présentent, permettant ainsi la poursuite de la synthèse d'ADN. Ce mécanisme est à l'origine du maintien de l'information génétique malgré les dommages présents et représente la base du modèle de choix de copie (« copy-choice ») lors de la recombinaison (82). Il a été proposé que l'encapsidation de deux molécules d'ARN et la possibilité d'un passage de l'une à l'autre lors de la rétrotranscription permettraient une recombinaison fréquente à l'origine d'un accroissement de la diversité génétique. Lorsque des virions hétérozygotes sont produits, le potentiel de recombinaison entre les deux molécules résulte en un mélange du matériel génétique et en la création de nouveaux génomes hybrides (443).

Différents groupes se sont intéressés au rôle du DIS dans la recombinaison. L'équipe de Jacob Giehm Mikkelsen a réalisé des études sur le MLV et montré que le saut de matrice a fréquemment lieu dans des zones d'interactions des deux molécules d'ARN au niveau de séquences autoccomplémentaires. D'autres équipes ont comparé la fréquence et la distribution des sauts de matrice en conditions dimériques et monomériques sur le HIV-1. Des matrices contenant le DIS ont une efficacité de transfert quatre fois plus élevée qu'en son absence mettant en avant la capacité intrinsèque de SL1 à promouvoir la recombinaison (25). Ces résultats indiquent que la recombinaison pourrait avoir lieu préférentiellement en des sites d'étroite proximité entre les molécules d'ARN. Bien que l'homologie de séquence facilite le

saut de matrices dans le cas du HIV-1 (13), la recombinaison peut avoir lieu entre des virus de sous-types différents ne possédant pas le même DIS (420). Ainsi, bien que le DIS soit un déterminant important pour la recombinaison (69, 71, 310), il n'est pas le seul à promouvoir une recombinaison efficace (385). De surcroît, il existe différentes régions à fort taux de recombinaison, notamment dans le gène *env* (149). Dans ces régions, la recombinaison peut être favorisée par des pauses de la RT ou par la présence de sites d'interactions le long de l'ARNg, autre que le DIS (191, 253).

5.3. Traduction et encapsidation

Après son export du noyau, l'ARN viral non-épissé fonctionne comme ARNm pour la synthèse des précurseurs protéiques et de génome. Il a été montré qu'une fois le précurseur Gag produit en quantité suffisante, celui-ci va interagir avec l'ARN, induire l'arrêt de la traduction et permettre le transport du génome au site d'assemblage, suggérant une compétition entre traduction et encapsidation (15). Les mécanismes de régulation des étapes de traduction et d'encapsidation du HIV-1 sont donc difficiles à expliciter séparément. En outre, il a longtemps été supposé que la dimérisation de l'ARNg du HIV-1 agit comme régulateur négatif de la synthèse protéique et positif de l'encapsidation (35, 294).

5.3.1. La traduction

Des études de traduction *in vitro* de transcrits synthétiques contenant la région 5' terminale de l'ARNg du HIV-1 ont montré que l'efficacité de traduction du précurseur Gag est réduite lorsque l'ARN est sous forme dimérique (35). Les mêmes observations ont également été faites chez RSV et MLV (46, 313). Il a alors été suggéré que la région 5' terminale de l'ARNg puisse adopter différentes conformations et que la dimérisation serait à l'origine d'un réarrangement structural. Comme la structure secondaire des ARN cellulaires influence la traduction des gènes eucaryotes et procaryotes (105, 232), il a été proposé que ce mécanisme s'appliquerait également au HIV-1 et que le changement structural régulerait la traduction (302) rendant inaccessible le codon d'initiation de la traduction.

Un modèle *in vitro* a été proposé et permet d'expliquer le passage de l'étape de synthèse protéique à celle d'encapsidation par un changement de conformation de l'extrémité 5' terminale de l'ARNg (197) (Figure 35). Dans ce modèle, le conformère nommé LDI (« long distance interaction ») correspond à l'établissement d'interactions à longue distance à

l'origine de l'occlusion de la séquence autoccomplémentaire du DIS dans une tige stable. Cette structure empêcherait la dimérisation en inhibant la formation du complexe boucle-boucle. Dans le second conformère, nommé BMH (« branched multiple hairpins »), la région 5'UTR adopte un arrangement métastable en tiges-boucles séparées. La tige-boucle SL1 présente la séquence palindromique du DIS et permet l'interaction avec une seconde molécule pour former le dimère d'ARNg. La tige boucle SL3 est accessible et permet la liaison de Gag et l'acheminement de l'ARN jusqu'au site d'assemblage (1). Cette seconde conformation ressemble beaucoup à la structure secondaire consensuelle en sept tiges-boucles décrite dans le chapitre III.2.1, à la différence que la région contenant le codon AUG de *gag* est inaccessible. Elle interagit avec la séquence de jonction entre le polyA et le PBS (1, 95). Les conformations LDI et BMH pourraient ainsi réguler temporellement les fonctions associées à la région 5' terminale. La conformation LDI permettrait dans un premier temps la synthèse des précurseurs Gag et Gag-Pol. Une fois Gag présent en concentration suffisante, il pourrait se lier à l'ARN viral et induire le passage à la seconde conformation, inapte à la traduction, et dirigerait alors l'ARNg vers la dimérisation et l'encapsidation (197, 329). Dans ce modèle, les auteurs soutiennent plus particulièrement le rôle du domaine NC de Gag dans l'initiation de la dimérisation.

Ce modèle de changement conformationnel n'a jamais fait l'objet de démonstration *ex vivo* et a même été remis en cause *in vitro* par l'équipe qui l'a mis en évidence puisque la conformation BMH n'inhibe pas la synthèse protéique (2). De plus, des études de cartographie *ex vivo* ont déterminé que dans les cellules, l'ARNg adopte une structure secondaire similaire à la conformation BMH (337, 465), sans adopter la conformation LDI. Il a également été montré que la délétion du DIS dans un clone moléculaire du HIV-1 n'altère pas significativement l'efficacité traductionnelle *ex vivo* (336). Ces derniers résultats remettent en cause l'idée d'un changement conformationnel à l'origine d'une structure secondaire inadaptée à la traduction mais permettant l'encapsidation, ainsi que le rôle de la dimérisation dans la régulation négative de la traduction. Ainsi, bien que le modèle de changement conformationnel de l'ARN se soit révélé très attractif par sa simplicité, il ne peut finalement pas à lui seul expliquer le mécanisme de régulation des étapes de traduction et d'encapsidation de l'ARNg du HIV-1, ainsi que le mécanisme de dimérisation lui-même (les mécanismes impliqués dans le couplage entre traduction et encapsidation seront détaillés au chapitre IV).

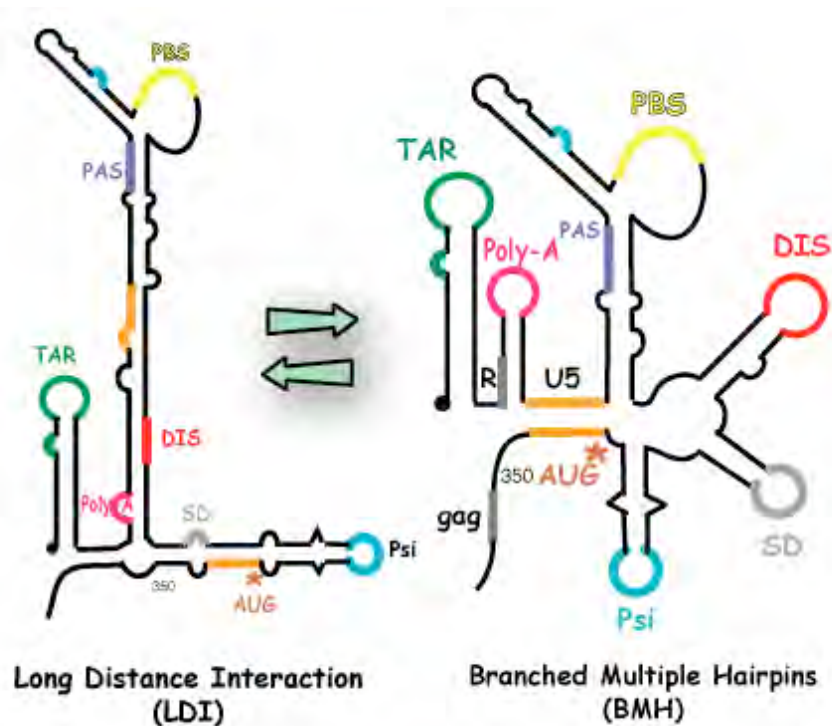


Figure 35 : Modèle du changement conformationnel proposé par (197).

5.3.2. L'encapsidation

De nombreuses études ont abordé le rôle de la dimérisation dans le mécanisme d'encapsidation de l'ARNg des rétrovirus. En effet, dans la majorité des cas, le domaine de dimérisation des ARNg chevauche le domaine d'encapsidation présent à l'extrémité 5' terminale de ces ARN (Figure 24), suggérant un lien étroit entre dimérisation et encapsidation.

Dans le cas du MLV, un changement conformationnel du domaine nécessaire à la dimérisation/encapsidation de l'ARNg lors de la dimérisation (33, 413) entraîne l'encapsidation de l'ARN (19, 92, 93) (Figure 30). Ainsi la dimérisation de l'ARN, phénomène exclusivement induit par l'acide nucléique, est une étape préalable et nécessaire à l'encapsidation de l'ARNg du MLV. Ce processus va à l'encontre de plusieurs travaux, notamment sur le HIV-1, suggérant que la dimérisation est initiée par la NC (197, 329).

A l'inverse des effets sur la traduction, des mutations du motif de dimérisation affectent profondément l'encapsidation de l'ARNg dans les particules virales. En effet, la délétion du DIS du HIV-1 est à l'origine d'une forte baisse d'infectivité due notamment à la diminution du taux d'ARNg encapsidé (245, 336). Cette réduction du taux d'encapsidation des ARNg par mutations du site de dimérisation se retrouve chez la plupart des rétrovirus (345, 384, 404).

Ainsi, le DIS et la dimérisation favorisent l'encapsidation de l'ARNg. Dans le cas du HIV-1, et comme décrit précédemment, la dimérisation de l'ARNg, qui a lieu dans la cellule, conduirait à l'encapsidation d'un dimère d'ARN (311). L'ensemble de ces observations suggère que la formation d'un complexe boucle-boucle et, par conséquent la dimérisation, précède l'encapsidation.

IV. La sélection de l'ARN génomique du HIV-1

L'encapsidation est un processus qui dépend du transport de l'ARNg *via* la machinerie de transport cellulaire depuis son site de production jusqu'au site d'assemblage des particules virales où il servira de génome. Dans le cas du HIV-1, l'ARNg est préférentiellement sélectionné parmi une multitude d'ARN cellulaires et viraux par le précurseur Gag, l'ARNg ne représentant que 0,1 à 1% de l'ensemble des ARN présents dans la cellule infectée (80). Ce mécanisme hautement spécifique implique la reconnaissance d'éléments structuraux présents sur l'ARNg et la formation d'un complexe ARN-ARN, pré-requis à l'encapsidation d'un génome dimérique.

1. Mécanisme d'encapsidation de l'ARN génomique

L'encapsidation de l'ARNg dépend de motifs structuraux présents à l'extrémité 5' terminale de l'ARN. Sa sélection est initiée par des interactions entre cette région et le précurseur Gag.

1.1. Le précurseur Gag

Le domaine NC du précurseur Gag permet le recrutement cytoplasmique de l'ARNg et semble diriger l'encapsidation. En effet, des virions du HIV-1 qui permettent l'expression de précurseurs Gag chimériques contenant le domaine NC du MoMLV encapsident préférentiellement l'ARNg de ce même virus (44). La fonction du domaine NC dans la capture de l'ARN a également été mise en évidence par des expériences de retard sur gel et d'empreinte, montrant une liaison à forte affinité avec le signal d'encapsidation localisé dans la région 5' terminale de l'ARNg (96).

La NC possède deux domaines en doigts de zinc de type CCHC requis pour l'établissement des interactions avec l'ARNg. L'analyse de mutants de la NC a permis de déterminer le rôle essentiel de ces motifs dans l'encapsidation. *Ex vivo*, des mutations qui inhibent la liaison du zinc sont à l'origine de la production de particules virales non infectieuses présentant un taux d'ARNg fortement réduit (174), alors que le taux d'ARN viraux épissés augmente, suggérant que les doigts de zinc de la NC discriminent l'ARNg des ARN viraux épissés (173).

Les deux doigts de zinc de la NC du HIV-1 diffèrent par leurs caractéristiques biophysiques et électrostatiques et n'interviennent pas de manière équivalente dans la capture de l'ARN (221). Le premier motif a un potentiel électrostatique bien plus important et possède une fonction prépondérante (172). Des mutations des résidus CCHC en motifs de type CCCC ou CCHH permettent toujours la fixation du zinc et l'interaction avec l'ARNg. Cependant, l'infectivité est sévèrement affectée, suggérant un rôle structural de ce motif dans l'encapsidation (449).

Des délétions du domaine NC n'abolissent pas complètement l'incorporation de l'ARNg dans les particules virales, suggérant que d'autres motifs présents au sein du précurseur Gag peuvent intervenir dans la liaison à l'ARN et sa sélection. Quelques études ont mis en évidence le rôle de la MA dans cette fonction. Lorsque le domaine NC et le domaine MA sont tous les deux délétés, il n'y a plus aucune production de virions (333). De même, de nombreuses études ont montré que les peptides p1 et p2 influencent l'encapsidation (189, 402). HIV-2 est quant à lui incapable d'encapsidation en *trans*. Lorsque des virions chimériques sont construits en remplaçant le domaine NC et le peptide p2 du HIV-2 par ceux du HIV-1, le virus est alors capable d'encapsider l'ARNg du HIV-1. Sans le peptide p2, l'encapsidation croisée est beaucoup moins efficace (218). Par ailleurs, il a été montré que le peptide p2, en interaction avec les domaines CA et NC au sein du précurseur Gag, intervient dans l'encapsidation en augmentant l'affinité et la spécificité de la capture de l'ARN (372, 378).

1.2. Motifs ARN impliqués dans l'encapsidation de l'ARNg

Jusqu'à peu, l'élément d'encapsidation Ψ , qui correspond à la tige-boucle SL3 présente à l'extrémité 5' non traduite de l'ARNg, était considéré comme le déterminant majeur dans l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1. Ce signal localisé en aval du SD, n'est présent que sur l'ARNg. Sa délétion a pour conséquence une production de virions contenant un taux fortement réduit d'ARNg, mettant en évidence son importance dans l'encapsidation (74, 257). Différentes régions de SL3 sont impliquées dans la liaison à l'ARN :

- la première, localisée à l'extrémité 3' de SL3, contient une séquence riche en purine extrêmement conservée dans les différentes souches du HIV-1 (382);
- la seconde se situe à l'intérieur de la tige. Des mutations qui déstabilisent la structure hélicoïdale de la tige affectent profondément l'encapsidation. Lorsque des mutations

compensatoires recréant la structure secondaire de l'hélice sont introduites, l'efficacité d'encapsulation est restaurée (78). En revanche, une augmentation de stabilité de l'hélice, défavorise l'interaction ARN/protéine (344), suggérant un rôle prépondérant de la structure secondaire du motif et la possibilité de changements structuraux dus à l'interaction.

L'encapsulation de l'ARNg ne dépend pas uniquement du signal Ψ . Son efficacité est due à une plus large portion de la région 5' de l'ARNg. En effet, les régions en amont du SD (TAR, polyA, U5, DIS et SD) et en aval du codon AUG (environ 50 nts) contribuent à une encapsulation optimale (92, 279, 336, 339). Ainsi, le domaine d'encapsulation de l'ARNg du HIV-1 est multipartite et comprend l'ensemble de la région 5'UTR ainsi que les premiers nucléotides de *gag*. De surcroît, des mutations à l'origine de la déstabilisation de la structure secondaire du TAR et du polyA diminuent le taux d'encapsulation (101), suggérant que la conformation, plus que la séquence de l'ARN, joue un rôle prépondérant dans l'encapsulation (76).

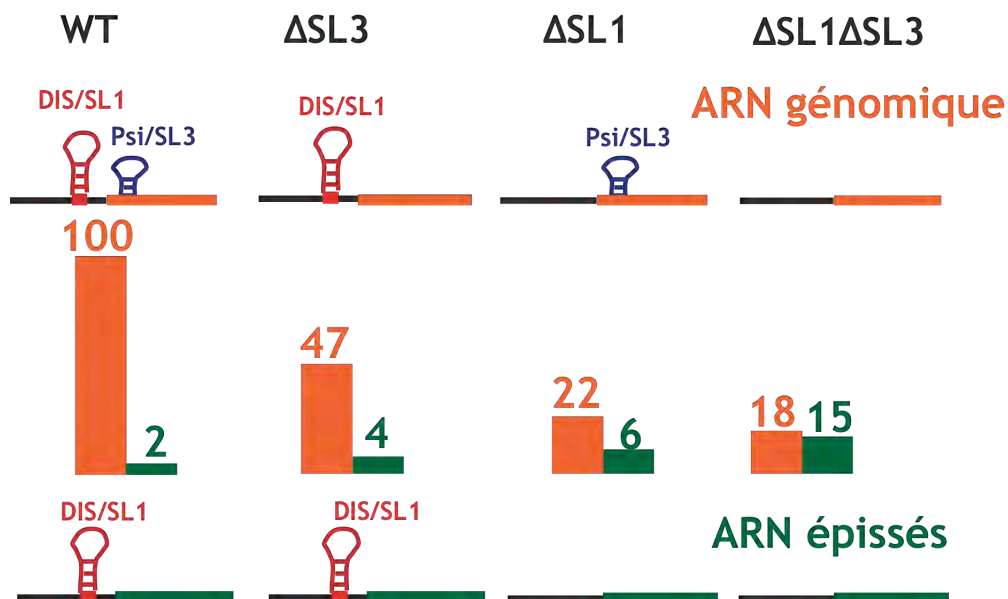


Figure 36 : Modèle d'encapsulation compétitive et sélective des ARN viraux du HIV-1, adapté de (193). La structure de l'ARNg et des ARN épissés est schématisée. L'efficacité d'encapsulation de l'ARNg (en orange) et des ARN épissés (en vert) est représentée en pourcentage normalisé au taux d'ARNg dans les virus sauvages. Les tiges-boucles SL1 et SL3 sont indiquées en rouge et en bleu respectivement.

Ainsi la présence du signal Ψ restreinte à l'ARNg ne suffit pas à expliquer le mécanisme de sélection spécifique de l'ARNg et l'exclusion des particules virales des ARN épissés

viraux qui possèdent une large portion du domaine d'encapsidation. En outre, il a récemment été mis en évidence que bien que le Ψ tienne un rôle important dans la capture de l'ARN par le précurseur Gag, il ne serait pas l'élément principal de l'encapsidation et que le DIS présenterait un rôle majeur dans ce mécanisme (193). En effet, la délétion de SL3 conduit à une réduction d'encapsidation de deux fois, alors qu'elle est de cinq fois après délétion de SL1 (Figure 36), suggérant que SL1 (et donc le DIS) est l'élément principal d'encapsidation de l'ARNg du HIV-1.

1.3. Interaction ARN/Protéine

Il a été proposé que le domaine NC de Gag se fixe préférentiellement à la région leader de l'ARNg qui contient les tiges-boucles SL1 à SL4 et que le recouvrement de cette région induit le ciblage membranaire (15). Selon la tige-boucle étudiée, l'interaction de la NC avec la région leader de l'ARNg se fait avec plus ou moins d'affinité *in vitro* :

- à faible affinité avec la tige boucle SL1 (247) ($K_d = 130 \pm 30$ nM) ainsi qu'avec la boucle SL4 qui contient le codon d'initiation de la synthèse protéique (9) ($K_d = 320 \pm 30$ nM) ;
- à forte affinité avec la tige-boucle SL2 qui contient le SD majeur (8) ($K_d = 23 \pm 2$ nM) et la tige-boucle SL3 qui correspond à l'élément Ψ (75) ($K_d = 28 \pm 3$ nM) et semble initier l'interaction ARN/Gag.

Ces observations ont été confirmées par des études de cartographie *ex vivo*, mettant en évidence que la liaison de la NC se fait plus fortement avec les motifs SL2 et SL3, qui constitueraient des sites de liaison primaires de la protéine (465). Cependant, cette étude montre également que la NC interagit spécifiquement avec la région 224-334 de l'ARNg qui contient les motifs SL1, SL2 et SL3. Ainsi, il existe des contradictions concernant la fixation de SL1 à la NC.

La structure des complexes contenant la NC et SL2 ou SL3 a été déterminée par RMN (Figure 37). Ces deux tiges-boucles possèdent une boucle de quatre nucléotides riches en purines. Le doigt de zinc de la NC établit dans les deux cas des liaisons avec les guanosines exposées au sein des boucles de la même manière que dans un complexe doigt de zinc/ADN (378, 417). Les guanosines interagissent plus particulièrement avec des acides aminés hydrophobes du doigt de zinc qui participent eux-mêmes à la structuration de la protéine. De plus, l'extrémité N-terminale de la NC se lie également avec une séquence riche en purines localisée dans la tige de SL3 (102, 474).

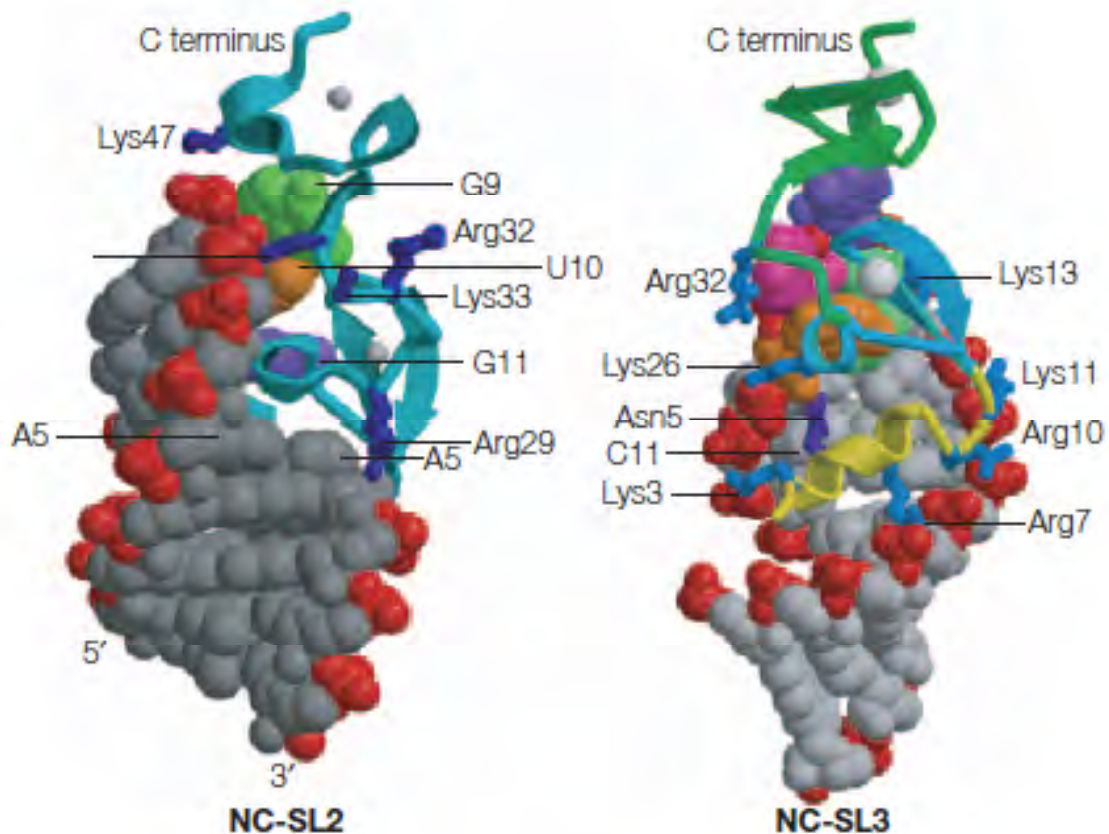


Figure 37 : Structure des complexes formés entre la NC du HIV-1 et les tiges-boucles SL2 (à gauche) et SL3 (à droite) déterminée par RMN (92).

Les tiges-boucles SL2 et SL3 ne sont présentes que sur l'ARNg indiquant un possible mécanisme de discrimination entre cet ARN et les ARN épissés viraux. Cependant, cette hypothèse est en désaccord avec plusieurs études montrant une implication prépondérante de SL1, présent sur tous les ARN viraux, dans le mécanisme d'encapsidation (193, 336).

1.4. Structure dynamique du complexe

L'interaction entre l'ARNg et Gag requiert une grande flexibilité, suggérant que le processus de reconnaissance dépend de la structure du domaine d'encapsidation et entraînerait des changements conformationnels de l'ARNg. Ces réarrangements structuraux, reflétant l'utilisation d'éléments *cis* dans les différentes étapes du trafic intracellulaire, conduiraient à l'acheminement de l'ARN au site d'assemblage. Il apparaît ainsi de plus en plus probable que la structure dynamique de la région 5'UTR puisse réguler le devenir de l'ARNg du HIV-1, à la fois pour la traduction, la dimérisation, l'encapsidation et l'assemblage. Cependant cette

hypothèse manque cruellement de données de structure secondaire et tertiaire *ex vivo*. Par ailleurs, les techniques de cartographie *ex vivo*, utilisées pour déterminer la structure secondaire de l'ARNg dans les cellules et dans les virions, n'ont montré aucun remaniement important de l'ARN (337, 459, 465) et ne permettent pas de différencier les interactions intra- et intermoléculaires.

Chez le HIV-1, le signal Ψ , permettant la capture des protéines Gag au niveau du centrosome, peut être considéré comme un échafaudage à partir duquel les protéines vont s'assembler en induisant une restructuration de la région leader (353, 474). Par ailleurs, il a été proposé que la liaison du précurseur Gag puisse induire un changement de conformation de l'ARNg à l'origine d'une plus grande flexibilité de la tige du Ψ ayant pour conséquence son oligomérisation sur l'ARN. Les interactions ARN-protéines permettraient alors la condensation de l'ARNg, étape nécessaire à son empaquetage dans la particule virale (189, 212). De plus, il a été montré que l'ARNg est encapsidé sous la forme d'un dimère instable qui se formerait au sein de la cellule hôte (311, 415). L'ensemble de ces observations suppose une variation de l'état conformationnel des ARN viraux dans les différents compartiments cellulaires et a permis de dégager le modèle actuellement admis : l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1 dépend de la reconnaissance d'un dimère d'ARN par le domaine NC de Gag.

2. La voie d'encapsidation de l'ARN génomique

Bien que le précurseur Gag semble être le déterminant principal de la sélection de l'ARN et que l'interaction entre Gag et l'ARNg se fasse à forte affinité, la sélection spécifique de l'ARNg pour la constitution d'une particule virale pourrait également mettre en jeu un grand nombre de points de contrôle tout au long du cheminement à travers la cellule, de son site de transcription jusqu'au site d'assemblage (Figure 38).

La difficulté de l'étude du mécanisme d'encapsidation de l'ARNg provient en partie du fait que ses partenaires d'interaction varient tout au long de son parcours intracellulaire. En effet, de nombreuses protéines cellulaires et virales se complexent à l'ARNg, influençant à la fois son devenir au sein de la cellule hôte ainsi que son interaction avec les machineries cellulaires. La composition du complexe RNP contenant l'ARNg est dynamique et varie à chaque étape du métabolisme de l'ARNg, régulant ainsi sa traduction, sa stabilité et sa

localisation. Dans le cas des rétrovirus, la localisation dépend de la voie d'export nucléaire ainsi que de voies spécifiques de translocation à la membrane plasmique où à lieu l'encapsidation et le bourgeonnement des nouvelles particules virales.

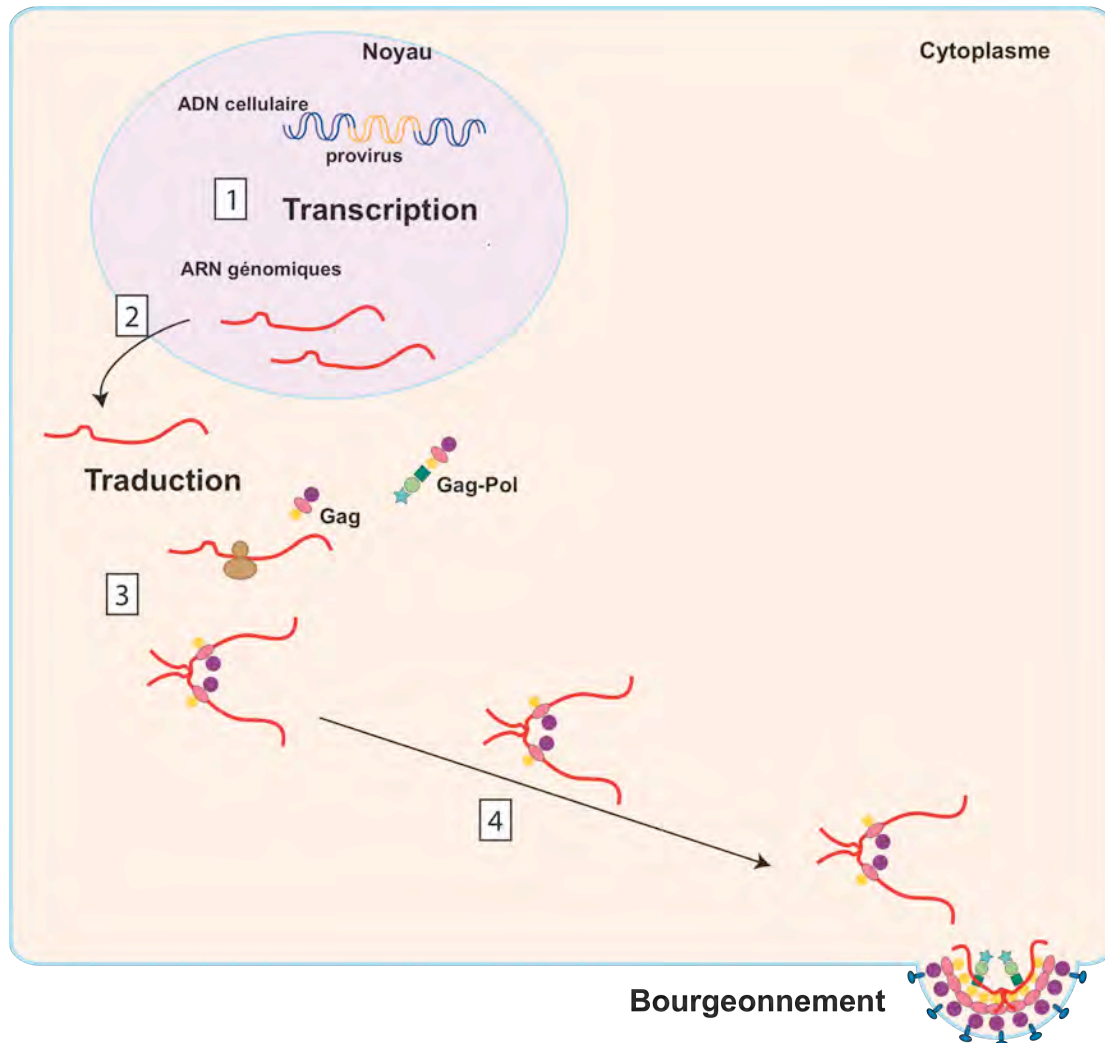


Figure 38 : La voie d'encapsidation de l'ARNg du HIV-1, adapté de (258). Aspects de l'encapsidation de l'ARN : (1) la proximité du lieu de transcription pourrait favoriser l'encapsidation de génomes hétérologues ; (2) l'export nucléaire influence la localisation cytoplasmique ; (3) l'interaction de Gag à l'ARNg sous forme monomérique ou dimérique à lieu dans une région périnucléaire et régule l'encapsidation co-traductionnelle ; (4) l'ARNg peut utiliser plusieurs voies de transport jusqu'au site d'encapsidation.

2.1. Trafic nucléaire

2.1.1. Transcription et encapsidation

Après rétrotranscription et transport nucléaire, l'ADN viral s'intègre préférentiellement dans les régions transcritionnellement actives. Dans le cas des rétrovirus murins (222) et

aviaires (362), il a été montré que les transcrits synthétisés à partir de provirus intégrés en étroite proximité dans le génome cellulaire peuvent être encapsidés sous forme d'hétérodimères (voir chapitre III.4). La proximité des sites d'intégration et par conséquent du lieu de transcription, pourrait avoir un effet sur la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg. Ainsi, les phases précoces du transport nucléaire influenceraient déjà le devenir de l'ARN.

Aucune étude n'a à ce jour testé les effets de l'intégration de provirus en des sites proches sur la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1. Ainsi, rien n'indique que le même phénomène puisse influencer son encapsidation et sous quelle forme (monomérique ou dimérique). Mais l'existence d'une grande diversité de séquences chez le HIV-1 suggèrent que l'encapsidation d'hétérodimères formés de deux ARNg originaires de provirus différents est possible (71) (Figure 33). De surcroît, rien n'exclut qu'un mouvement concomitant des ARN puisse influencer leur localisation cellulaire et favoriser l'encapsidation d'hétérodimères d'ARN.

2.1.2. Transport nucléo-cytoplasmique

2.1.2.1. Export nucléaire et ciblage cytoplasmique

A l'heure actuelle il y a encore peu d'information sur le trafic nucléaire de l'ARNg nouvellement synthétisé et sur les protéines impliquées dans ce processus. Néanmoins, il semble que le trafic nucléo-cytoplasmique, qui dépend d'éléments en *cis* sur l'ARN permettant le recrutement de complexes d'export, influence le devenir cytoplasmique de l'ARNg.

Dans le cas du RSV, deux séquences répétées directes DR1 et DR2 sont impliquées dans l'export nucléaire de l'ARNg. La voie d'export qu'il recrute n'a pas encore été mise en évidence, mais il a été montré que le blocage du complexe CRM1 n'a pas d'effet sur l'export nucléaire de l'ARNg du RSV dans des cellules aviaires, mettant en évidence que ces motifs recrutent une voie d'export différente de celle de l'ARNg du HIV-1 (469). Une délétion des signaux DR1 et DR2 permet toujours la production du précurseur Gag mais inhibe l'assemblage des particules virales (325). Ces mêmes observations ont été faites sur ALV qui présente, tout comme RSV, des séquences DR1 et DR2 impliquées dans son export cytoplasmique. Ainsi, les éléments DR1 et DR2 ne sont pas indispensables à l'export mais permettraient de délivrer l'ARNg dans un compartiment cytoplasmique nécessaire à la production de précurseurs Gag efficaces dans l'assemblage. Cette idée est soutenue par des

expériences montrant que des particules virales se forment dans des cellules de mammifères lorsque les séquences DR1 et DR2 sont remplacées par un site RRE. Dans ce cas, l'apport en *trans* de la protéine Rev du HIV-1 est à l'origine du recrutement du complexe d'export CRM1 (319). Ainsi les signaux *cis* et la voie d'export qu'ils recrutent seraient à l'origine d'un ciblage cytoplasmique précis de l'ARNg, dictant ainsi son devenir dans la cellule.

Le MPMV possède quant à lui une tige-boucle CTE (« Constitutive Transport Element ») localisée dans la région 3' terminale de l'ARN qui permet le recrutement de la voie cellulaire d'export nucléaire dépendante du complexe NFX1 (90).

Dans le cas du HIV-1, l'export nucléaire des ARN non-épissés et mono-épissés requiert l'intervention de la séquence RRE présente au sein de l'ARN (région *env*) et de la protéine Rev qui permet le recrutement du complexe d'export CRM1 (89). De manière intéressante, tous les rétrovirus qui utilisent la voie d'export dépendante du complexe CRM1 possèdent une protéine analogue à la protéine Rev. Il a été montré, grâce à des études comparées des voies d'export nucléaire, que l'export dépendant du complexe Rev/CRM1 favorise l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1. Bien que des systèmes d'export alternatifs permettent de délivrer l'ARNg au cytoplasme tout aussi efficacement que le système Rev, ils ne permettent pas son encapsidation à un taux optimal (16, 280). L'un des meilleurs exemples est la comparaison des systèmes CRM1 et NFX1, grâce au remplacement dans l'ARNg du HIV-1 du motif RRE par le motif CTE du rétrovirus murin MPMV. Dans ce cas, bien que les ARN soient toujours exportés efficacement du noyau, la traduction de l'ARNg contenant le CTE est inefficace car il ne semble pas être transporté aux polysomes (85). Dans des cellules murines infectées par le HIV-1, Gag est synthétisé mais il n'y a pas production de particules virales. Lorsque le signal RRE est remplacé par un CTE, la production de virions est rétablie et il a été observé que la distribution de Gag est modifiée (433). Alors que Gag est réparti de manière diffuse dans le cytoplasme dans le système RRE, elle se localise à la membrane plasmique en présence du CTE. Ces études soutiennent l'hypothèse selon laquelle la voie d'export de l'ARNg du HIV-1 est reliée à une localisation cytoplasmique particulière de celui-ci afin de permettre sa traduction et la localisation adéquate de Gag, favorisant ainsi l'assemblage viral. Par ailleurs, par l'étude de plusieurs types cellulaires, l'équipe de Johnson Mak a proposé l'existence de facteurs de restriction cellulaires, encapsidés dans les particules virales, pouvant influencer le devenir de l'ARNg (207). Ces facteurs pourraient empêcher la localisation correcte de l'ARNg et ainsi réguler la traduction, la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg.

2.1.2.2. Recrutement nucléaire de l'ARNg par le précurseur Gag

L'équipe de Leslie Parent a identifié un signal de ciblage nucléaire dans le domaine N-terminal du précurseur Gag du RSV. Ce précurseur peut ensuite être exporté du noyau grâce au complexe CRM1. Des mutants du domaine MA qui ciblent directement le précurseur à la membrane plasmique, sans possibilité de retour dans le noyau, présentent des défauts d'encapsidation de l'ARNg, suggérant que l'import nucléaire de Gag pourrait permettre la capture de l'ARN viral (391). De plus, l'ARNg présent dans les particules virales est sous forme monomérique. Ces résultats particuliers au RSV suggèrent un lien étroit entre le trafic nucléaire de l'ARNg et son encapsidation sous forme de dimère.

L'extrémité N-terminale de la MA du HIV-1 présente une séquence de localisation nucléaire impliquée notamment dans la phase précoce du cycle répliatif. Ce domaine pourrait également intervenir en phase post-transcriptionnelle puisque le précurseur Gag a été retrouvé dans le noyau (55). La protéine de matrice possède également un NES utilisant la voie CRM1, suggérant que Gag peut réaliser un va et vient entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Par ailleurs, une étude a montré que des mutants du NES de la MA présentent des défauts de transport de Gag et les virions produits renferment un génome monomérique (120). Ainsi, l'entrée de Gag dans le noyau permettrait le recrutement de l'ARNg ou la régulation de facteurs impliqués dans la dimérisation de cet ARN. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés, et il a été proposé que Gag entre passivement dans le noyau et soit impliquée dans la régulation de l'épissage des ARN viraux (37).

2.1.2.3. Protéines impliquées dans le ciblage cytoplasmique

Le ciblage cytoplasmique de l'ARNg du HIV-1 peut être influencé par différentes protéines chaperonnes spécifiques des transcrits viraux.

La protéine Staufen, qui interagit avec les régions en hélices dans des duplexes ARN sans spécificité de séquence, intervient dans la localisation cellulaire des ARN cellulaires, plus particulièrement dans l'acheminement au site de traduction (138, 227). Il a été montré que la protéine Staufen humaine (hStau) possède des sites de liaison à la tubuline dans son domaine C terminal (463) et qu'elle s'associe aux polysomes (293). Dans le cas du HIV-1, hStau est sélectivement encapsidée dans les virions par l'intermédiaire d'interactions avec l'ARNg et son taux d'expression influence l'efficacité d'encapsidation (314). Elle pourrait ainsi être impliquée dans la sélection de l'ARNg en facilitant son transport jusqu'aux polysomes. Par

ailleurs, il a récemment été montré que hStau, l'ARNg et Gag sont retrouvés au sein des mêmes complexes ribonucléoprotéiques. Lorsque la cellule hôte est déplétée des protéines Staufen l'assemblage viral est affecté, soutenant l'implication de hStau dans la localisation, l'assemblage et l'encapsidation de l'ARNg (3).

Des études par microscopie confocale ont également montré que le complexe hnRNPA2 dirige le transport de l'ARNg dans une région péricentriolaire proche de la membrane nucléaire (314). Ces résultats ont été étayés par des expériences de FRET montrant que l'ARNg et Gag du HIV-1 co-localisent à proximité du centrosome (353). De plus, la localisation centrosomique dépend de la présence d'un signal d'encapsidation intacte sur l'ARN servant ainsi non seulement de signal de localisation subcellulaire mais aussi de site de fixation à Gag (voir chapitre IV.1.3). Cette fixation permettrait par la suite le transport du génome à la membrane plasmique. Pour le MPMV, l'assemblage aurait déjà lieu au niveau du centrosome (397).

2.2. Trafic cytoplasmique

2.2.1. Traduction et encapsidation

Une fois acheminé au sein d'une région péricentriolaire, l'ARNg bifonctionnel peut être traduit au niveau des polysomes libres afin de donner naissance aux précurseurs Gag et Gag-Pol et/ou être dirigé au site d'assemblage où il sera encapsidé (57). La régulation de ces deux événements implique deux cas de figure : soit le même transcrit réalise ces deux fonctions de façon indépendante et/ou concomitantes, soit il existe deux populations distinctes d'ARNg.

Le devenir de l'ARN non-épissé au cours de la production des particules virales a été étudié grâce à une approche expérimentale consistant à inhiber la synthèse d'ARN dans des cellules infectées grâce à l'ajout d'actinomycine D, puis à quantifier l'ARN viral non-épissé présent dans les cellules et dans les virions (117). Il en résulte les observations suivantes :

- dans les cultures cellulaires infectées par MoMLV, le taux d'ARN viral non-épissé diminue de 30% dans les cellules et de 90% dans les virions. Ceci suggère que les ARN déjà présents ne servent pas à l'assemblage de nouvelles particules virales et que l'encapsidation requiert une synthèse d'ARN *de novo*. Dans ce modèle, l'ARNg est présent en deux populations distinctes, l'une nécessaire à la traduction et l'autre destinée à l'encapsidation ;
- dans le cas du HIV-2, le taux d'ARN non-épissé est équivalent dans les cellules et les virions, signifiant que l'ARN non-épissé doit obligatoirement être traduit afin d'être

encapsidé. Dans ce cas de figure, le précurseur Gag nouvellement synthétisé va interagir préférentiellement avec l'ARNg qui lui a donné naissance et le diriger au site d'assemblage (354). L'encapsidation exclusivement co-traductionnelle, très controversée chez le HIV-1, permettrait le maintien de la spécificité d'encapsidation dans le cas du HIV-2 (217). Par ailleurs, lorsque le domaine C (Figure 31) de l'ARNg du HIV-2 est délété, la synthèse de Gag augmente *in vitro* et *ex vivo*, suggérant son rôle négatif dans la traduction (427). Ce motif est également impliqué dans la régulation négative de la dimérisation de l'ARNg (24), suggérant une régulation commune des deux mécanismes. Ainsi lorsque la traduction est favorisée, la dimérisation de l'ARNg, pré-requis à l'encapsidation, l'est également. Cependant, en générant des génomes mutants du HIV-2 ne codant plus pour un précurseur Gag fonctionnel, l'équipe de WS. Hu a montré que ces ARN sont efficacement encapsidés dans les particules virales, suggérant que l'encapsidation de l'ARNg du HIV-2 ne requiert pas de traduction préalable de Gag (Ni, Retroviruses Meeting, CSH 2010, USA, résultats non publiés) ;

- enfin, dans des cultures cellulaires infectées par le HIV-1, le taux d'ARN viral non-épissé diminue de 70% dans les cellules et de 40% dans les virions, suggérant que l'ARNg est toujours incorporé dans les virions et qu'une synthèse *de novo* n'est pas indispensable à son encapsidation. Qui plus est, lorsque la synthèse protéique est bloquée, l'efficacité d'encapsidation augmente, suggérant que les ARN destinés à la traduction sont redirigés vers l'encapsidation (57). Dans ce mécanisme, l'ARN non-épissé fait partie d'une seule population et est utilisé indifféremment comme ARNm ou ARNg. À l'inverse du HIV-2, le précurseur Gag est capable de se lier au domaine d'encapsidation d'un ARNg non apparenté et de le diriger vers l'encapsidation (425). De plus, il a été montré qu'il peut diriger l'encapsidation *trans* d'ARNg du HIV-2 (217) et du SIV (370) *via* leurs domaines d'encapsidation. Ce mécanisme implique une reconnaissance croisée des signaux d'encapsidation malgré une divergence de séquence et met en avant l'importance de la structure tridimensionnelle du domaine.

2.2.2. Régulation de la traduction

2.2.2.1. Compétition entre le ribosome et le précurseur Gag

L'encapsidation co-traductionnelle implique un passage de l'étape de synthèse protéique à celle d'acheminement du génome au site d'assemblage. La régulation de ce mécanisme est initiée par une compétition entre le précurseur Gag et le ribosome pour la fixation à l'ARNg (162, 346, 395, 431). Cette compétition est d'autant plus importante que le domaine

d'encapsidation nécessaire à l'interaction de Gag et le codon AUG où s'assemblent les sous-unités du ribosome sont à proximité (337, 459, 465). En outre, le mécanisme d'initiation de la synthèse protéique du HIV-1 fait débat à l'heure actuelle. Il a été proposé, en plus du mécanisme classique d'initiation de la traduction coiffe-dépendant (26, 54, 307), que la traduction puisse se faire par entrée interne au niveau de séquences IRES présentes dans le 5'-UTR et *gag* (28, 29) (Figure 39).

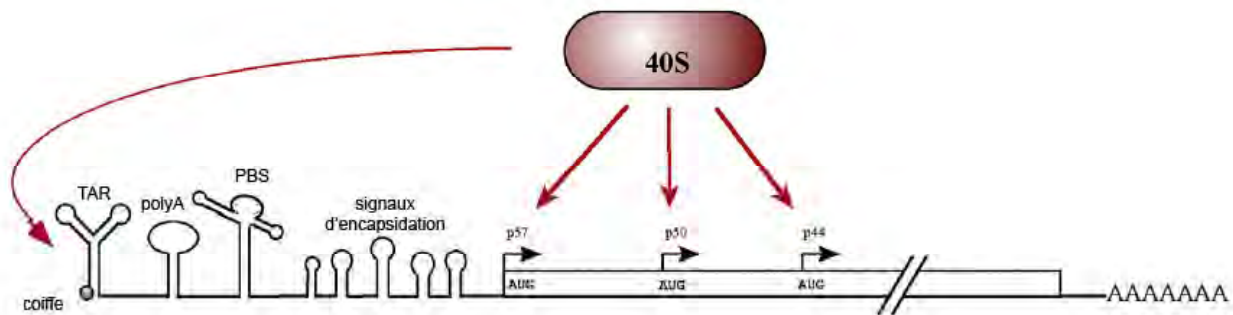


Figure 39 : Structure secondaire de l'extrémité 5'UTR de l'ARNg du HIV-2, adapté de (29). Le complexe d'initiation de la traduction peut être recruté au niveau de la coiffe ou à des IRES distincts présents dans la région codante du gène *gag*.

Le mécanisme d'initiation interne a été mis en évidence chez de nombreux rétrovirus (18, 107, 108, 275). Par la suite, des IRES ont été caractérisées chez plusieurs lentivirus, à la fois dans la région 5'UTR de l'ARNg et dans sa région codante :

- chez le SIV, il a été montré que la région 5'UTR contient des IRES capables de recruter le ribosome de manière directe (327). Cette observation a par la suite été étendue à d'autres membres de la famille des lentivirus, comme le HIV-1 et le FIV (51, 60). Cependant, seule l'IRES du SIV est active en culture cellulaire (327), alors que les IRES du HIV-1 et du FIV ne fonctionnent qu'en phase de transition G2/M du cycle cellulaire pour HIV-1 (51) et sous des conditions de stress pour FIV (60). Dans le cas du HIV-1, la protéine Vpr conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (14). Durant cette phase, la traduction coiffe-dépendante est réprimée (359), sans diminution de la synthèse de Gag (170), suggérant une utilisation exclusive d'IRES dans ce cas ;
- des IRES ont également été caractérisées dans la séquence codante du gène *gag* du HIV-1 (54), HIV-2 (186, 460) (Figure 39), SIV (321) et FIV (60). L'entrée interne de ribosomes au niveau de codons AUG alternatifs dans la séquence codante est à l'origine de la production de

protéine Gag tronquées en N-terminal. Chez le HIV-2, ces isoformes peuvent se retrouver dans les particules virales (186).

Il a été montré que le ribosome doit scanner l'extrémité 5' terminale de l'ARNg, puisque l'introduction d'un codon AUG en amont du site d'initiation canonique de Gag permet la production d'une polyprotéine présentant une extension amino-terminale (302). Cependant, il faut garder à l'esprit que certaines IRES de lentivirus requièrent des conditions particulières afin d'être actives (51, 60). Par ailleurs, il est difficile d'apprécier les contributions respectives des IRES et de la coiffe car elles fonctionnent en parallèle. Bien qu'il existe différents types d'IRES qui recrutent des facteurs d'initiation différents à des moments différents du cycle répliatif, ces facteurs sont tous impliqués dans la traduction classique et ne peuvent constituer des marqueurs de la traduction IRES-dépendante (454). La capacité d'utiliser les deux mécanismes pour la traduction semble être une stratégie sophistiquée permettant d'assurer la synthèse protéique à tout moment du cycle cellulaire.

Dans les deux cas, la compétition entre l'arrivée de la sous-unité 40S du ribosome et la liaison du précurseur Gag subsiste. Il a été montré, après transfection de vecteurs contenant une petite séquence codante en aval du domaine d'encapsidation du RSV, que Gag est à l'origine d'une inhibition de la synthèse protéique par compétition avec le ribosome au niveau de la région leader de l'ARN (416). Ces résultats supposent que bien que le génome du RSV semble être capturé dans le noyau par le précurseur Gag, comme évoqué précédemment, tous les précurseurs ne sont pas importés au noyau et se fixent alors à l'ARNg au sein du cytoplasme. Concernant le HIV-1, l'équipe d'Andrew Lever a mis en évidence une compétition entre traduction et encapsidation aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo*. Lorsque la concentration de Gag augmente, l'efficacité de synthèse commence tout d'abord par s'accroître, par des mécanismes indéterminés, pour ensuite décliner. Cet événement serait corrélé à l'exclusion du ribosome par compétition d'interaction entre Gag et l'ARNg (15).

2.2.2.2. Rôle de l'oligomérisation du précurseur Gag

Chez le HIV-1, l'inhibition de la liaison du ribosome en présence de Gag semble dépendre du nombre de précurseurs en interaction avec l'ARN. La stœchiométrie de la réaction va dans le sens d'un recouvrement total de la région leader de l'ARNg par Gag conduisant à sa translocation vers la membrane plasmique. Le nombre exact de précurseurs Gag en interaction avec l'ARNg avant son transport cytoplasmique n'a pas encore été déterminé. Il

semblerait que le complexe RNP ne contienne qu'un nombre restreint de précurseurs à ce stade et que le recouvrement complet de l'ARNg ait lieu plus tardivement, lors de l'assemblage viral (15). Ainsi l'interaction entre l'ARN et Gag peut entraîner une oligomérisation de la polyprotéine à l'origine d'intermédiaires cytosoliques d'assemblage (116).

Dans le cas du MPMV, la MA est à l'origine du transport de l'ARNg et du précurseur Gag dans une région péricentriolaire *via* les moteurs dynéine/dynactine. Ce processus permet l'arrêt de la synthèse protéique et la formation d'une capsid immature contenant l'ARNg qui est alors retenue à proximité du centrosome (397). Il a été montré que la migration de la capsid immature est provoquée par Gag qui contient un domaine de ciblage à la membrane plasmique dans le domaine MA. Lorsque celui-ci est muté, le complexe ne parvient plus au site de bourgeonnement, l'ajout de Gag en *trans* permet de restaurer la migration du complexe à la membrane. Les mêmes observations ont été faites pour les virus HIV-1 et ALV (50, 233), soutenant l'hypothèse d'une première étape d'oligomérisation de Gag au sein du cytoplasme. A l'inverse, dans le cas du MLV, l'oligomérisation de Gag a lieu au niveau de la membrane plasmique et ne peut donc pas intervenir dans l'inhibition de la synthèse protéique.

2.2.2.3. Rôle des « processing bodies » et des granules de stress

La régulation de la traduction peut impliquer les processing bodies (« P-Bodies ») et les granules de stress où s'agrègent les ARNm cellulaires dont la traduction a été réprimée (451). Leur ciblage par l'ARN viral entraînerait un arrêt de la synthèse protéique et pourrait permettre le passage à l'étape d'encapsidation. Il n'y aurait alors pas de compétition entre le précurseur Gag et le ribosome pour la liaison à l'ARN. Par ailleurs, l'ARNg entre en interaction avec la protéine hStau qui dirige les ARNm cellulaires aux P-Bodies et pourrait ainsi être impliquée dans ce mécanisme (406). Les P-Bodies renferment également les protéines APOBEC3G et 3F qui sont encapsidées dans les virions par des interactions avec l'ARNg et le domaine NC de Gag (462), soutenant l'hypothèse d'une interaction entre les P-Bodies et l'ARN viral.

2.2.3. Translocation à la membrane plasmique

Le trafic cytoplasmique correspond à la dernière phase du transport de l'ARNg. Dans la majeure partie des cas, le précurseur Gag et l'ARN interagissent déjà dans le cytoplasme afin

d'être conduit en complexe au site d'assemblage. Le précurseur Gag présente en effet un rôle central dans le ciblage de la membrane plasmique grâce à la présence de motifs de localisation subcellulaire. De surcroît, des études d'imagerie cellulaire ont récemment permis de confirmer l'importance de Gag et du motif myristylé présent au sein de son domaine de matrice dans l'acheminement de l'ARNg à la membrane plasmique où a lieu l'assemblage des nouvelles particules virales (210).

Le mouvement de l'ARNg dans le cytoplasme est également relié à des interactions avec de nombreuses protéines cellulaires et virales, comme la protéine Env (34). La capacité d'interaction de l'ARNg du MLV avec la protéine Env a été mise en évidence dans des cellules de fibrosarcomes humains et murins infectées chroniquement. Il a été montré par microscopie à fluorescence en temps réel que l'ARNg peut transiter jusqu'au site d'assemblage *via* les vésicules endosomales. Ce transport qui nécessite l'intégrité des signaux d'encapsidation et du domaine NC de Gag est induit par la protéine Env qui recrute le complexe ARNg/Gag par l'intermédiaire d'interactions avec Gag (34). Ainsi, les protéines Gag et Env serviraient d'adaptateurs facilitant l'arrimage de l'ARNg aux endosomes et le ciblage de sites spécifiques de la membrane plasmique, mais ceci reste à démontrer dans les cellules cibles du MLV. L'acheminement de l'ARNg du MPMV au site d'assemblage est également réalisé par l'intermédiaire des endosomes et dépend d'une interaction directe avec la protéine Env (396). Dans le cas du HIV-1, l'altération de l'expression de la protéine Env affecte de façon importante la distribution de l'ARNg dans des cellules HeLa (259), mais le recrutement aux vésicules d'endosome par l'intermédiaire de Env n'a pas encore été mis en évidence.

Il a été proposé que les complexes Gag/ARNg puissent transiter dans la cellule par l'intermédiaire des endosomes tardifs (ou corps multi-vesiculaires) grâce au domaine MA de Gag du HIV-1 et du MLV, capable d'interagir avec le complexe AP1 associé aux corps multi-vesiculaires. De surcroît, AP1 permet le recrutement de la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I, à l'origine du relargage des virions. Ainsi, le transport intracellulaire de l'ARNg pourrait être dirigé par l'interaction entre Gag et AP1, et par conséquent par les corps multi-vesiculaires (65).

Enfin, il a également été montré que le précurseur Gag du HIV-1 interagit avec la kinésine et permet le trafic le long des microtubules (33). Ainsi, bien que la migration cytoplasmique des ARN rétroviraux soit encore mal caractérisée, il semblerait que l'ARNg puisse transiter

via plusieurs voies de transport incluant les vésicules intracellulaires, les microtubules et/ou les filaments d'actine (Figure 40).

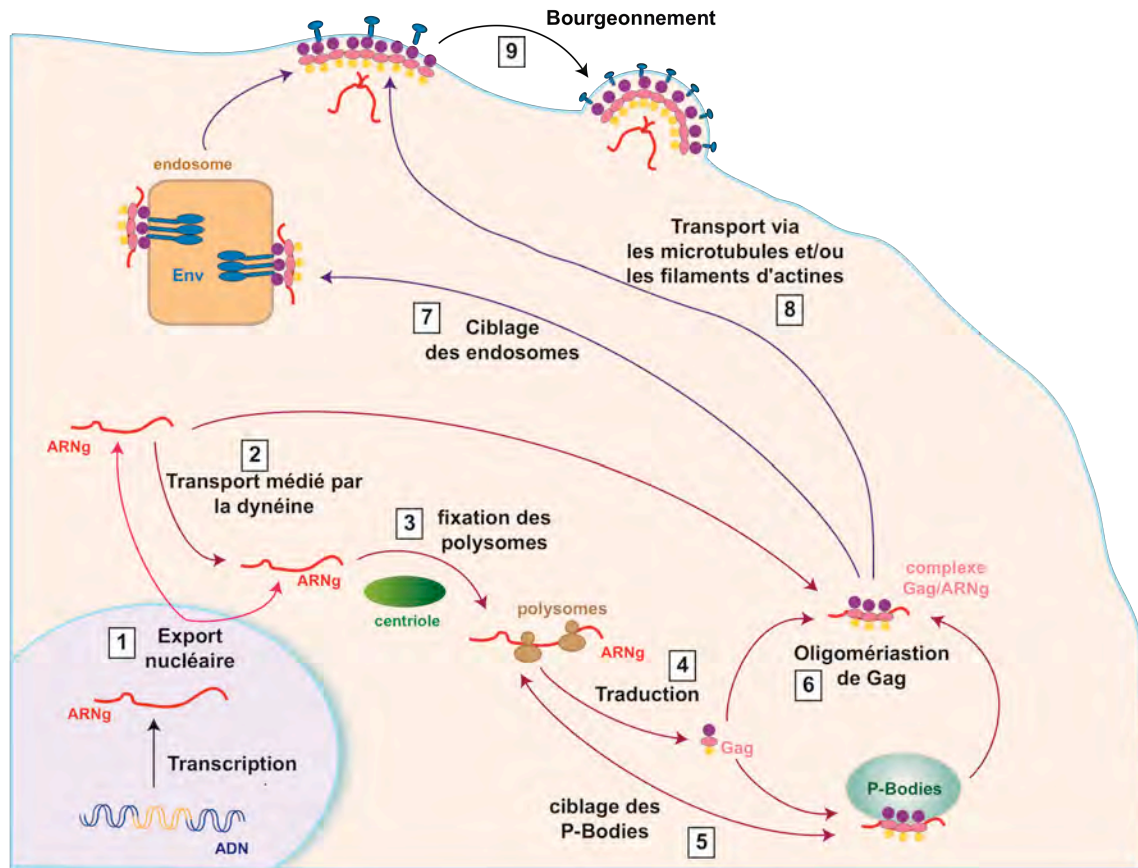


Figure 40 : Modèle de trafic de l'ARN génomique des rétrovirus MPMV, ALV et HIV, adapté de (432). Après transcription, le premier événement de transport de l'ARNg correspond à son export nucléaire (1). Ensuite, l'ARNg se localise à proximité du noyau dans une région péri-centriolaire où aura lieu la synthèse protéique. Ce mouvement pourrait être induit par les moteurs de dynéine des microtubules (2). À ce niveau, l'ARNg est pris en charge par les polysomes (3) et le précurseur Gag est synthétisé (4). Gag interagit avec l'ARNg dans le cytosol en association (5) ou non (6) avec les P-Bodies. Le transport final de l'ARNg à la membrane plasmique fait intervenir les vésicules d'endosome (7), les microtubules et/ou les filaments d'actine (8). Une fois à la membrane, l'ARNg est encapsidé en dimère et les virions bourgeonnent (9).

3. Encapsidation d'ARN non génomiques

L'ARNg ne représente que 50% des ARN totaux présents dans les virions. Une grande variété d'ARN cellulaires et viraux est également présente dans la particule virale (166).

3.1. ARN cellulaires

Lors de l'assemblage des particules virales, de nombreux ARNt sont encapsidés. Certains sont spécifiques à l'initiation de la rétrotranscription, comme l'ARN_{t₃^{lys}}, d'autres sont incorporés de façon aléatoire (285). Des petits ARN ont également été identifiés comme l'ARN nucléaire U6 (ARNsn « small nuclear RNA ») du complexe d'épissage (166), l'ARNr 5S, et l'ARN 7SL qui est un composant du complexe SRP (« Signal Recognition Particles »). L'ARN 7SL est très abondant dans les particules du HIV-1 (193). Il possède une boucle similaire à la boucle de SL3 de l'ARNg, mais n'est pas capturé *via* une interaction entre ce motif et le précurseur Gag (328). Le virus est également capable d'encapsider des ARNm plus longs mais l'efficacité d'encapsidation de ces ARN semble être dépendante de leur taille (234). L'encapsidation de ces ARN pourrait également dépendre de leur voie d'export nucléaire et de leur ciblage cytoplasmique. En effet, le complexe CRM1 induit l'export nucléaire de diverses classes d'ARN, comme l'ARN 5S, les ARNsn et certains ARNm fixant des protéines possédant une NES, comme la protéine Rev (90).

L'influence de l'encapsidation d'ARN cellulaires sur le virus reste inconnue, cependant ces ARN pourraient jouer un rôle structural. En effet, il a été montré que la quantité d'ARN total dans des VLP est la même que dans des virions contenant l'ARNg (434). De surcroît, un traitement par des ribonucléases déstabilise la structure des VLP et des particules virales (317). Cette hypothèse est en accord avec une étude récente qui met en évidence une encapsidation non sélective d'ARNm cellulaires à la place de l'ARNg dans les VLP du HIV-1 et du MLV (376).

3.2. ARN viraux

Les ARN viraux épissés du HIV-1, qui possèdent une grande partie du domaine d'encapsidation incluant le DIS, sont incorporés en faible quantité dans les virions. Plusieurs études ont montré une corrélation inverse de l'encapsidation des ARN épissés viraux lorsque des mutations sont introduites dans Gag ou sur les motifs SL1 et Ψ /SL3 de l'ARNg (78, 378), mais le mécanisme sous-jacent reste indéterminé.

La quantification précise des ARNg et épissés dans les particules du HIV-1 par RT-QPCR, après mutation des motifs SL1 et SL3, montre une spécificité d'encapsidation des ARN épissés (193). En effet, la diminution de l'efficacité d'incorporation de l'ARNg est corrélée à

une augmentation du taux d'ARN épissés viraux encapsidés (Figure 36). Cette observation suggère une compétition entre ces ARN pour un même mécanisme d'incorporation au sein des particules virales et l'utilisation de signaux *cis et trans* communs pour l'encapsidation. De manière surprenante lorsque SL1 et SL3 sont délétés, les ARNg et épissés sont encapsidés avec la même efficacité, suggérant que le DIS est le principal déterminant d'encapsidation des ARNg, mais qu'il n'est pas impliqué dans celle des ARN épissés. Ainsi, le DIS pourrait intervenir dans la discrimination des ARNg et épissés de plusieurs manières :

- *via* un rôle structural, par l'établissement d'interactions à longue distance ou la formation de dimères d'ARNg exclusivement ;
- par l'intermédiaire d'interactions spécifiques avec des facteurs protéiques stimulant l'incorporation de l'ARNg ou inhibant l'incorporation des ARN épissés.

Cependant, bien que les ARN épissés soit majoritairement exclus des particules virales, rien ne prouve que leur DIS n'est pas fonctionnel. Les ARN épissés pourraient alors former des homodimères et des hétérodimères avec l'ARNg. En effet, l'équipe de Wei Shau Hu a montré que la formation d'hétérodimères entre deux molécules différentes d'ARNg est possible lorsque ces ARN possèdent la même séquence autoccomplémentaire au niveau du DIS (310). Ainsi, la présence du DIS sur les ARN épissés rend possible l'hétérodimérisation de ces ARN avec l'ARNg, suggérant que le faible taux d'encapsidation des ARN épissés proviendrait d'un défaut de reconnaissance de cette molécule par la machinerie d'encapsidation et notamment par le précurseur Gag. En effet, une étude récente en culture prolongée a montré que l'efficacité d'encapsidation des ARNg et épissés présentant une délétion de SL1 peut être restaurée grâce à l'apparition de révertants. Les mutations compensatoires générées sont retrouvées au sein du précurseur Gag, plus particulièrement dans la partie N terminale de la MA et dans le peptide p1, suggérant que ces domaines sont impliqués dans l'interaction et l'encapsidation des ARN épissés (369).

V. Stratégies inhibitrices visant le DIS et/ou la dimérisation

Le DIS et la dimérisation sont impliqués dans de nombreuses étapes du cycle rétroviral, en phase précoce (transcription inverse et recombinaison) et tardive (traduction, encapsidation, assemblage et maturation). C'est pourquoi plusieurs stratégies ciblant le DIS ont été testées dans le but d'inhiber la réplication virale. Ces stratégies pourraient être utilisées afin de générer de nouveaux traitements antirétroviraux et limiter l'émergence de variants résistants du HIV-1.

1. Stratégies antisens

La première stratégie étudiée pour inhiber la dimérisation a consisté à cibler le DIS par des oligonucléotides sens et antisens, de type ARN et ADN, de diverses tailles (9 à 35 nucléotides) et à tester leur capacité à interférer avec la dimérisation *in vitro* d'un ARN de 615 nts (sous-type A, isolat MAL). Il a été montré d'une part, que les oligonucléotides ARN inhibent plus efficacement la dimérisation que leurs homologues ADN, qu'ils soient sens ou antisens (411). En revanche, un oligonucléotide sens constitué d'une tige ADN et d'une boucle ARN possède la même capacité d'inhibition que son homologue ARN, démontrant l'importance de la structure secondaire de la boucle du DIS. D'autre part, les oligonucléotides antisens sont beaucoup plus efficaces que les sens. Cette différence a deux origines : les tiges-boucles sens, capables de former des homodimères par des interactions de type boucle-boucle réversibles, agissent par un mécanisme d'inhibition compétitive. Au contraire, les tiges-boucles antisens (dont l'homodimérisation est inefficace) forment avec l'ARN viral un complexe très stable, probablement un duplex étendu irréversible.

Ces résultats sur l'isolat MAL ont par la suite été comparés à un isolat de sous-type B (Lai) (274). Des différences significatives sont apparues. Alors que seuls les oligonucléotides ARN inhibent la dimérisation de l'ARN MAL, les oligonucléotides ARN et ADN inhibent la dimérisation de l'ARN Lai avec la même efficacité. De plus, seuls les oligonucléotides antisens sont de bons inhibiteurs. Ces résultats confirment que les purines situées de part et d'autre de la séquence autoccomplémentaire sont cruciales pour la structuration de la boucle et que la formation d'un duplex étendu irréversible nécessite une stricte complémentarité entre les deux boucles.

Bien que les oligonucléotides antisens inhibent efficacement la dimérisation *in vitro* et qu'ils affectent la traduction de Gag *ex vivo*, ces molécules n'ont que des effets limités sur la capacité de réplication du HIV-1 (123). Cependant, des stratégies nouvelles basées sur ces oligonucléotides ont par la suite vu le jour :

- les peptides-acides nucléiques (PNA), sont des oligonucléotides modifiés dans lesquels les liaisons phosphodiesteres sont remplacées par des liaisons peptidiques. Ces molécules non métabolisables dans la cellule pourraient interagir de manière stable avec SL1, bloquant ainsi le DIS et la formation du complexe boucle-boucle ;
- les ribozymes, molécules ARN antisens chimériques, permettent de cliver l'ARN auquel il se fixe. Il a été montré que des ribozymes ciblant le DIS inhibent complètement le processus de dimérisation *in vitro* (386) ;
- les ARN interférents permettent la régulation de l'expression des gènes. Dans ce mécanisme, une petite molécule d'ARN dirige la dégradation de sa cible de manière séquence spécifique (255). Il a été montré que la dégradation spécifique de l'ARN du HIV-1 est possible dans les cellules infectées (255). Une réduction du taux de CAp24 et par conséquent du nombre de particules virales produites a été observé lorsque des ARNi ciblent les gènes *tat* et *rev* du HIV-1 (254). Le DIS semble également être un bon candidat à la technique d'interférence puisqu'il est extrêmement conservé au sein des différents isolats du HIV-1 et qu'il permettrait de cibler tous les ARN du HIV-1 de par sa présence en amont du SD.

La stratégie antisens et ces dérivés permettraient, après liaison à une cible ARN de manière séquence spécifique : d'inhiber la formation de complexes ARN/ARN ou ARN/protéines ; d'empêcher la traduction en altérant la lecture du ribosome ; de générer des clivages dans l'ARN ; ou d'induire sa dégradation. Le succès de cette stratégie dépend de l'accessibilité de la cible, de l'efficacité de liaison et de l'abondance des oligonucléotides. Bien qu'à l'heure actuelle, les molécules testées ne montrent qu'un effet modeste sur la réplication du HIV-1 et que le développement d'oligonucléotides antisens et de PNA n'ait pas donné de suite *in vivo*, de nombreux efforts se concentrent sur l'étude des ribozymes et des siRNA ciblant le HIV-1 et montrent des résultats prometteurs (269, 386).

2. Fixation d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides

La résolution des structures cristallographiques des formes "duplex étendu" (130) et du complexe boucle-boucle (124, 129) du DIS a permis de mettre en évidence une ressemblance

structurale entre le DIS et le site A de l'ARNr 16S présent dans la petite sous-unité (30S) du ribosome *E. coli* (127) (Figure 41). Par ailleurs, le site A du ribosome est ciblé par certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides, comme la néomycine et la paromomycine, dont la liaison affecte la traduction. En utilisant des ARN synthétiques correspondant au DIS des sous-types A et F du HIV-1 et des fragments d'ARN de plus grande taille contenant le DIS (ARN 1-615), il a été montré que ces aminoglycosides (néomycine, paromomycine et lividomycine) peuvent interagir spécifiquement avec la boucle du DIS, selon une géométrie similaire à celle observée dans le site A (127, 128).

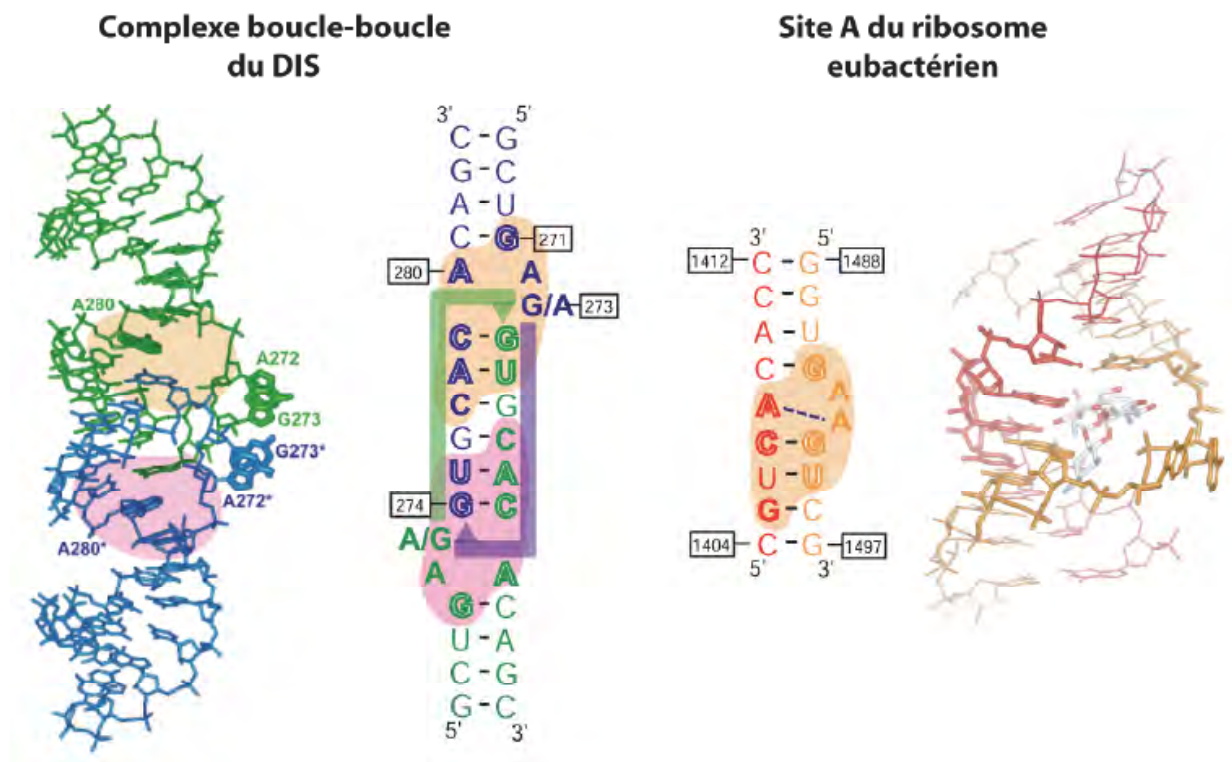


Figure 41 : Similitude entre le complexe boucle-boucle du DIS et le site A du ribosome bactérien, adapté de (127). Les nucléotides identiques dans les 2 ARN sont en gras ; ceux qui sont nécessaires pour la fixation des aminoglycosides sont en gras et ouvert. De part et d'autre sont représentées les structures cristallographiques du complexe boucle-boucle du DIS (isolat MAL) et du site A complexé à la paromomycine. Les deux sites potentiels de fixation d'antibiotiques sont indiqués en rose et en orange.

La liaison des aminoglycosides stabilise le complexe boucle-boucle du DIS. En effet, il a été observé que la liaison d'aminoglycosides 4,5 disubstitués (aminoglycosides 2-desoxystreptamine 4,5-disubstitués) à un complexe boucle-boucle préformé empêche la formation du duplex étendu *in vitro* (45, 126). De plus, plusieurs structures cristallographiques du DIS complexé à divers aminoglycosides ont été résolues et il a été montré que le DIS est accessible vis-à-vis de ces petites molécules au sein du génome viral

dans des cellules infectées et les particules virales (125, 126). Ces observations sont très intéressantes et ouvrent la voie au « drug design » autrement dit, à la synthèse d'aminoglycosides modifiés pouvant se fixer avec une plus grande spécificité au DIS du HIV-1. Cependant, ces nouveaux composés, pour être efficace, devront cibler les différentes séquences retrouvées au niveau du DIS des isolats du HIV-1.

Bien que les aminoglycosides aient servi d'antibactériens depuis des décennies, leur utilisation a été stoppée en raison de leur toxicité et des résistances qu'ils engendrent. Cependant, de récentes avancées ont démontré que de nouveaux aminoglycosides (ciblant différentes étapes du cycle viral, comme l'entrée du virus, la transcription, la traduction...) ont le potentiel de limiter l'apparition de résistances et pourraient être utilisés afin de traiter l'infection du HIV-1 en limitant les effets secondaires (192). Cette stratégie nécessite la création de nouveaux dérivés d'aminoglycosides présentant de meilleurs effets inhibiteurs *ex vivo*, mais semble avoir de beaux jours devant elle. De surcroît, les dérivés d'aminoglycosides ciblant le DIS pourraient inhiber la réplication virale en altérant : (1) la maturation du dimère et la production de particules virales infectieuses ; (2) la reconnaissance du complexe par la machinerie d'encapsidation ; ou (3) les étapes tardives de la rétrotranscription au cours desquelles le dimère d'ARN doit se dissocier.

Malgré le succès initial limité de l'inhibition de la dimérisation *ex vivo*, le DIS du HIV-1 possède les caractéristiques d'une cible prometteuse du traitement antirétroviral, de par son implication dans de nombreuses étapes du cycle viral et sa forte conservation au sein des divers sous-types du HIV-1. Par ailleurs, en plus d'inhiber la dimérisation et l'encapsidation, des molécules ciblant le DIS pourraient altérer la recombinaison durant la phase de rétrotranscription et ainsi limiter l'apparition de formes résistantes du HIV-1.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Depuis de nombreuses années, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse étudie les aspects moléculaires des étapes de dimérisation, d'encapsidation et de maturation de l'ARNg du HIV-1. Bien que le mécanisme de dimérisation et son rôle dans l'encapsidation soient aujourd'hui assez bien caractérisés, plusieurs points restent à élucider concernant le mécanisme de sélection de l'ARN dimérique. La présence de la majeure partie du domaine d'encapsidation et des signaux d'initiation de la dimérisation sur les ARN viraux épissés suggère que le virus a dû développer des mécanismes précis pour encapsider spécifiquement son ARNg aux dépens de ses ARNm épissés. De plus, le rôle prépondérant du DIS dans l'encapsidation de l'ARNg (193) suggère son implication dans le mécanisme de sélection.

L'objectif de mon travail de thèse consiste à déterminer plus particulièrement le rôle de la dimérisation dans la sélection de l'ARNg du HIV-1. Ce travail, articulé autour des ARN viraux génomiques et épissés dans les phases tardives du cycle viral, s'est divisé en quatre parties :

1. Alors que le mécanisme de dimérisation de l'ARNg a été largement décrit, aucune étude ne s'est intéressée à la capacité de dimérisation des ARN épissés du HIV-1. La dimérisation est un pré-requis à l'encapsidation et le DIS en est le déterminant principal. Bien que ce motif soit présent sur les ARN viraux épissés, il n'est pas requis pour leur encapsidation (193) et ceux-ci sont majoritairement exclus des particules virales. Il nous a donc paru essentiel de déterminer la fonctionnalité du DIS des ARN viraux épissés et leur capacité à former des dimères. Dans cette perspective, j'ai tout d'abord réalisé une étude comparative de la dimérisation de différents fragments d'ARNg et épissés du HIV-1 *in vitro*, puis analysé la possibilité d'hétérodimérisation des ARN épissés avec l'ARNg ;

2. Des travaux récents ont montré la capacité du MLV à former des hétérodimères entre ARN viraux génomique et épissés (141, 142). En effet, les ARN épissés du HIV-1, qui contiennent le DIS, pourraient former des hétérodimères avec l'ARNg, ce qui favoriserait leur encapsidation au détriment de celle de l'ARNg. Puisque les ARN épissés ne sont que faiblement encapsidés, j'ai cherché à savoir si le DIS des ARN viraux est fonctionnel *ex vivo* et si les ARNg et épissés sont capable d'homo- et d'hétérodimériser dans la cellule. Pour cela, j'ai tenté de mettre en place une technique de capture spécifique des ARN viraux dans la cellule afin de purifier les dimères d'ARN ;

3. Le faible taux d'incorporation des ARN viraux ayant subi l'épissage et la proximité du DIS du SD majeur d'épissage dans l'ARNg suggèrent un lien possible entre épissage, dimérisation et encapsidation. Afin de mettre en évidence ce lien et d'en déterminer les effets sur l'encapsidation des ARN viraux (génomiques et épissés), nous avons tout d'abord réalisé des tests *in vitro*, en collaboration avec C. Branlant (Nancy-UMR 7567), visant à déterminer l'effet de l'épissage sur la dimérisation et *vice-versa*. Puis, en collaboration avec M. Mougel (Montpellier-UMR5236), nous avons déterminé le rôle de la proximité du DIS et du SD sur l'épissage et l'encapsidation ;

4. Enfin, la protéine virale Vif est une petite protéine basique qui s'associe au complexe d'assemblage dans la cellule. Cette protéine est encapsidée à faible taux dans les particules virales par l'intermédiaire d'interactions avec toute la région 5'UTR de l'ARNg (185, 220). A côté de son rôle crucial dans la répression du facteur cellulaire antiviral APOBEC3G, Vif jouerait également un rôle dans la structuration de l'ARN (477) et les étapes précoces de la rétrotranscription (110). Ces diverses observations nous ont ainsi conduit, en collaboration avec Simon Henriet (chercheur doctorant au laboratoire), à étudier les effets de Vif *in vitro* sur la rétrotranscription et surtout sur la dimérisation de l'ARNg du HIV-1.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude de la dimérisation *in vitro* des ARN épissés du HIV-1

1. Introduction et objectifs

L'encapsidation de l'ARNg du HIV-1 est un processus spécifique au cours duquel un dimère d'ARN est sélectionné parmi une multitude d'ARNm viraux et cellulaires, qui sont pour la plupart exclus de la particule virale. Bien que les signaux nucléiques (Psi) et protéiques (NCp7) requis pour cette encapsidation soient maintenant bien connus, de nombreuses zones d'ombre subsistent quant au mécanisme de sélection de l'ARNg. En effet, les ARN épissés du HIV-1 contiennent une partie majeure du domaine étendu d'encapsidation localisé à l'extrémité 5' terminale de l'ARNg, comme le TAR, le PBS et surtout le DIS, déterminant principal de l'encapsidation de l'ARNg (193). Ainsi, les ARN épissés viraux pourraient non seulement former des homodimères, mais également des hétérodimères avec l'ARNg, facilitant ainsi leur encapsidation. Cependant, seul l'ARNg est spécifiquement encapsidé et les ARN viraux épissés sont largement exclus des particules virales (193), suggérant que ces derniers sont incapables de former des homo- et des hétérodimères ou que ces dimères ne sont pas encapsidés (264).

Afin de mieux comprendre le processus de sélection des ARN viraux, nous avons analysé pour la première fois les propriétés de dimérisation *in vitro* de différents fragments d'ARN épissés du HIV-1 de sous-type B (isolat NL4.3) correspondant aux 600 premiers nucléotides de la région 5' terminale des transcrits codant les protéines virales Env, Nef, Rev, Tat et Vpr et nous les avons comparées à celles de l'ARNg. D'autre part, la proximité du DIS et du SD (15-20 nts) suggère que les structures secondaires et/ou tertiaires de ces ARNm puissent être modifiées après la réaction d'épissage, les rendant incompétents pour la dimérisation. Dans le but de savoir si le DIS est structuralement fonctionnel et si les ARN viraux épissés sont capables de dimériser par l'intermédiaire d'interactions boucle-boucle, nous avons réalisé des expériences de cartographie en solution et d'inhibition de la dimérisation par un oligonucléotide antisens dirigé contre le DIS. Enfin, dans la perspective de tester d'éventuels effets conformationnels sur l'accessibilité du DIS et la dimérisation pendant l'étape de transcription, nous avons étudié la capacité de dimérisation de long fragments d'ARNg par des expériences de dimérisation couplée à la transcription *in vitro*.

2. Article : Dimérisation *in vitro* des ARN épissés du HIV-1

In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs

LUCILE SINCK,¹ DELPHINE RICHER,¹ JANE HOWARD,² MARINA ALEXANDER,² DAMIAN F.J. PURCELL,² ROLAND MARQUET,¹ and JEAN-CHRISTOPHE PAILLART¹

¹Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur, CNRS, IBMC, 67084, Strasbourg cedex, France

²Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) packages its genomic RNA as a dimer of homologous RNA molecules that has to be selected among a multitude of cellular and viral RNAs. Interestingly, spliced viral mRNAs are packaged into viral particles with a relatively low efficiency despite the fact that they contain most of the extended packaging signal found in the 5' untranslated region of the genomic RNA, including the dimerization initiation site (DIS). As a consequence, HIV-1 spliced viral RNAs can theoretically homodimerize and heterodimerize with the genomic RNA, and thus they should directly compete with genomic RNA for packaging. To shed light on this issue, we investigated for the first time the *in vitro* dimerization properties of spliced HIV-1 RNAs. We found that singly spliced (*env*, *vpr*) and multispliced (*tat*, *rev*, and *nef*) RNA fragments are able to dimerize *in vitro*, and to efficiently form heterodimers with genomic RNA. Chemical probing experiments and inhibition of RNA dimerization by an antisense oligonucleotide directed against the DIS indicated that the DIS is structurally functional in spliced HIV-1 RNA, and that RNA dimerization occurs through a loop-loop interaction. In addition, by combining *in vitro* transcription and dimerization assays, we show that heterodimers can be efficiently formed only when the two RNA fragments are synthesized simultaneously, in the same environment. Together, our results support a model in which RNA dimerization would occur during transcription in the nucleus and could thus play a major role in splicing, transport, and localization of HIV-1 RNA.

Keywords: HIV-1; RNA dimerization; mRNA; transcription; packaging selection

INTRODUCTION

The genome of retroviruses, including the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), is packaged as two homologous (+) strand RNA molecules noncovalently associated close to their 5'-end in a region called the dimer linkage structure (DLS) (Bender and Davidson 1976; Murti et al. 1981; Paillart et al. 2004b). Dimerization of retroviral genomic RNA is an ubiquitous process, and *in vitro* experiments with genomic RNA fragments have shown that HIV-1 RNA dimerization takes place in the 5'-untranslated region (5'-UTR), at the dimerization initiation site (DIS) (Fig. 1A; Laughrea and Jetté 1994; Skripkin et al. 1994; Muriaux et al. 1995). The DIS, a highly

conserved sequence located upstream of the major splice donor (SD) site, folds into a hairpin structure with a 9 nucleotide (nt) loop containing a 6 nt self-complementary sequence (Laughrea and Jetté 1994; Paillart et al. 1994; Skripkin et al. 1994; Muriaux et al. 1995). Dimerization of HIV-1 RNA is initiated at the self-complementary sequence of each RNA monomer via an intermolecular kissing-loop interaction (Laughrea and Jetté 1994; Paillart et al. 1994; Skripkin et al. 1994; Muriaux et al. 1995; Clever et al. 1996; Haddrick et al. 1996). *In vitro*, this kissing-loop complex can be converted into a more stable dimer (also called a tight dimer) by the viral nucleocapsid protein at 37°C or by incubation at high temperature (55°C) (Laughrea and Jetté 1996; Muriaux et al. 1996; Takahashi et al. 2000). Stabilization of the RNA dimer (mature dimer) in virions has been observed upon proteolytic cleavage of Gag for several retroviruses (Oertle and Spahr 1990; Stewart et al. 1990; Fu and Rein 1993; Fu et al. 1994) and retrotransposons (Feng et al. 2000). However, whether the stabilization of the RNA dimer observed *in vitro* and *ex vivo* corresponds to the same molecular mechanism remains unclear (for review, see Paillart et al. 2004b).

Reprint requests to: Jean-Christophe Paillart, Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur, CNRS, IBMC, 67084, Strasbourg cedex, France; e-mail: jc.paillart@ibmc.u-strasbg.fr; fax: (+33) (0)3 88 60 22 18; or Roland Marquet, Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur, CNRS, IBMC, 67084, Strasbourg cedex, France; e-mail: r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr; fax: (+33) (0)3 88 60 22 18.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.majournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.678307>.

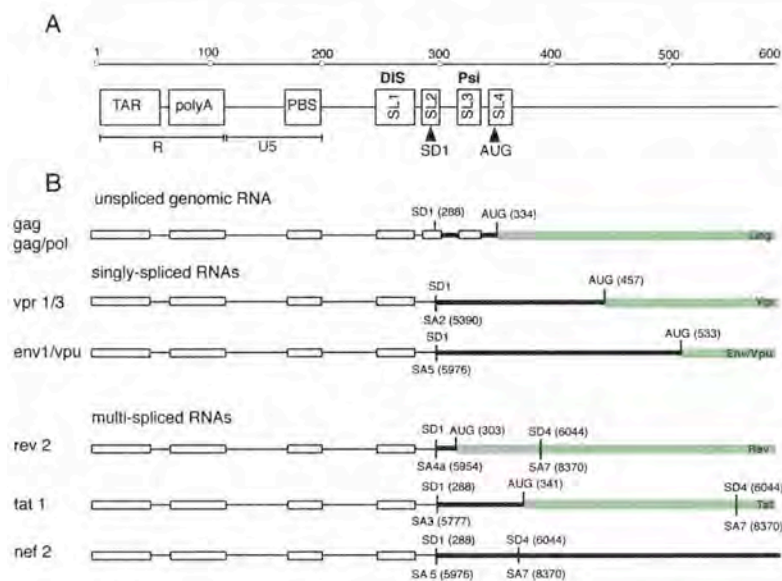


FIGURE 1. Genomic and spliced HIV-1 (NL4.3) RNAs. (A) Scheme of the first 600 nt of HIV-1 genomic RNA. (R) repeat sequence, (TAR) *trans*-acting responsive element, (polyA) 5' copy of the polyadenylation signal, (U5) unique sequence at the 5' end of the RNA genome, (PBS) primer-binding site, (DIS) dimerization initiation site, (SD) major splice-donor site, (Psi) major packaging signal, and (AUG) translation initiator codon of *gag* gene. (B) Spliced and genomic RNAs used in this study. (Open boxes) The different RNA elements, (black thick lines) untranslated regions, and (green thick lines) coding regions. The positions of splice donor (SD) and acceptor (SA) sites are indicated above and under the genomic RNA, respectively.

Genomic RNA dimerization is crucial for retroviral replication. Indeed, alterations of the DIS strongly affect viral replication by perturbing two essential steps of the viral cycle: packaging of the genomic RNA and reverse transcription (Berkhout and van Wamel 1996; Haddrick et al. 1996; Paillart et al. 1996a; Laughrea et al. 1997; Shen et al. 2000; Houzet et al. 2007). Studies using chimerical vectors or synthetic RNA fragments demonstrated that the DIS also plays a major role in HIV-1 recombination (Balakrishnan et al. 2001, 2003; Andersen et al. 2003; Chin et al. 2005). Overall, these results suggest that dimerization is a prerequisite for RNA packaging and a key process for virus evolution (Russell et al. 2004).

However, while the mechanism of *in vitro* RNA dimerization and its possible roles in the replication cycle have been extensively studied, the place where RNA dimerization takes place (nucleus versus cytoplasm or cellular membrane) is still a point of discussion (Russell et al. 2004). Indeed, after their synthesis in the nucleus of the host cell, HIV-1 RNAs have several fates. Contrary to the vast majority of cellular pre-messenger RNAs, which are completely spliced, approximately half of the HIV-1 RNA avoids the splicing reaction and is directly transported to the cytoplasm (Stoltzfus and Madsen 2006). The unspliced RNA is used as mRNA for the synthesis of the Gag and

Gag-Pol proteins and as genomic RNA (gRNA) that is encapsidated in the viral particle in its dimeric form (Swanson and Malim 2006). During the packaging process, gRNA must be preferentially selected among a multitude of cellular and viral mRNAs. The general RNA packaging mechanism developed by retroviruses involves *cis* elements present on the viral RNA and *trans*-acting factor(s) encoded by the viral genome (Lever 2000; D'Souza and Summers 2005). In HIV-1, a major packaging signal (Psi or Ψ) has been located in the 5' UTR, between the SD site and the AUG start codon of Gag (Fig. 1A). It folds into a stem-loop structure (SL3) whose deletion profoundly affected viral replication by reducing the yield of gRNA present in the viral particles (Lever et al. 1989; Aldovini and Young 1990; Clavel and Orenstein 1990). However, the packaging specificity is not restricted to this region, although Psi is uniquely present on gRNA (Fig. 1A). Several regions upstream of the SD site (including TAR, the polyA, the PBS, and the DIS) and downstream of the translation initiation codon of Gag have also been shown to contribute to optimal

encapsidation of HIV-1 gRNA (Luban and Goff 1994; McBride et al. 1997; Helga-Maria et al. 1999; Clever et al. 2002; Russell et al. 2002; for review, see D'Souza and Summers 2005), although conformational perturbations could be at the origin of these effects (Ooms et al. 2004). Indeed, deletion of the DIS (Clever and Parslow 1997; Russell et al. 2003) more profoundly affects genomic RNA packaging than deletion of SL3 (Houzet et al. 2007). Besides these *cis*-acting elements, gRNA packaging requires the nucleocapsid (NC) domain of Gag. NC proteins have been shown to bind to the 5' leader region of HIV-1 RNA (SL1-SL4, Fig. 1A) *in vitro* and to promote RNA dimerization via the DIS (Muriaux et al. 1996; Takahashi et al. 2001), and mutations in NC strongly affect viral infectivity by inhibiting gRNA packaging (Berkowitz et al. 1995; Zhang and Barklis 1995; D'Souza and Summers 2005).

More than 30 different mRNA species are produced by alternative splicing of the HIV-1 primary transcript due to the presence of 5 SD and 9 splice acceptor (SA) sites (Purcell and Martin 1993; Cochrane et al. 2006; Stoltzfus and Madsen 2006). Following transcription, the 9.2 kb RNA gives rise to multispliced 2 kb RNAs encoding the regulatory proteins Tat, Rev, and the auxiliary protein Nef (Fig. 1B). Once a threshold level of Rev is reached

(Pomerantz et al. 1992), splicing activity is reduced, and singly spliced 4 kb RNA species encoding Env, Vpu, Vif, and Vpr proteins are produced (Fig. 1B; Pomerantz et al. 1992). While singly and multispliced mRNAs are largely excluded from viral particles, significant amounts of cellular and viral mRNAs can be encapsidated when *cis* or *trans* packaging signals are disrupted (Clever and Parslow 1997; Muriaux et al. 2001; Russell et al. 2003; Onafuwa-Nuga et al. 2006; Roy et al. 2006). Noticeably, all HIV-1 spliced mRNAs contain most of the extended packaging signal found in the 5' UTR, including TAR, PBS, and DIS (Fig. 1). Moreover, considering that RNA dimerization is a prerequisite for RNA packaging, spliced viral RNAs containing the DIS may be able not only to homodimerize but also to form heterodimers with gRNA and compete with gRNA homodimers for packaging. However, the packaging efficiency of spliced HIV-1 RNAs is 50-fold lower than the packaging efficiency of gRNA (Houzet et al. 2007), suggesting that spliced RNAs are unable to form homo- and heterodimers or that these dimers are not packaged (Liang et al. 2004).

To shed light on this issue, we investigated the *in vitro* dimerization properties of spliced HIV-1 RNAs. We found that singly spliced (*env*, *vpr*) and multispliced (*tat*, *rev*, and *nef*) RNA fragments are able to homodimerize and to form heterodimers with genomic RNA *in vitro*. Chemical probing experiments and an antisense oligonucleotide directed against the DIS region indicated that the DIS is structurally functional and that dimerization of spliced HIV-1 RNA occurs through a loop-loop interaction. In addition, we showed by coupling *in vitro* transcription and dimerization assays of short (300 nt) and long (4000 nt) RNA fragments that RNA dimerization can take place during transcription and could affect the fate of HIV-1 RNAs by modulating splicing, transport, or/and localization.

RESULTS

Spliced HIV-1 RNA fragments efficiently dimerize *in vitro* through a loop-loop interaction

Many studies previously showed that fragments of HIV-1 gRNA are able to dimerize *in vitro* through an RNA-RNA interaction involving the self-complementary sequence in the DIS loop (Laughrea and Jetté 1994; Paillart et al. 1994; Skripkin et al. 1994). While the DIS sequence is localized upstream of the SD site and is therefore present in all spliced mRNAs of HIV-1 (Fig. 1), dimerization of HIV-1 mRNAs has never been specifically analyzed. The close proximity of the DIS and the 5' SD site (SD1, Fig. 1) could locally influence the secondary and tertiary RNA structures and make these mRNA noncompetent for dimerization; this would explain, at least partially, their exclusion from the viral particles. Representative RNA fragments corre-

sponding to the first 615 nt of singly spliced (*vpr* and *env*) and multispliced (*rev*, *tat*, and *nef*) HIV-1 mRNAs (Fig. 1B, isolate NL4.3) have been synthesized and tested for their ability to dimerize *in vitro* in conditions previously described to favor either monomer or dimer formation (Fig. 2A; Marquet et al. 1991; Paillart et al. 1994). As expected from the presence of the DIS sequence, all mRNA fragments were able to dimerize, as indicated by the appearance of a retarded band on agarose gel when the samples were incubated in "dimer buffer." For most mRNA fragments, the dimer yields were similar to that of the 1-615 gRNA fragment (between 51% and 68% of dimer) (Fig. 2A). The only exception was RNA *vpr1/3*, which was almost exclusively dimeric (dimer yield of 92%).

To test whether dimerization of the HIV-1 spliced mRNAs involved formation of a kissing-loop complex via the DIS, as previously demonstrated for HIV-1 gRNA (Laughrea and Jetté 1994; Paillart et al. 1994; Skripkin et al. 1994; Muriaux et al. 1995), we co-incubated each mRNA fragment with a fivefold excess of an antisense oligodeoxyribonucleotide (dAS35) directed against the DIS stem-loop (Fig. 2B; Skripkin et al. 1996; Lodmell et al. 1998). The dimerization of all mRNA fragments, including RNA *vpr1/3*, was inhibited by the presence of dAS35 (Fig. 2B, lanes marked +). Similar results were obtained when dAS35 was added after dimer formation (data not shown). Taken together, these results indicate that (1) spliced HIV-1 mRNAs, like gRNA, are able to dimerize *in vitro* via the loop of the DIS; (2) this RNA-RNA interaction is dynamic; and (3) sequences downstream the SD do not contain redundant dimerization signals.

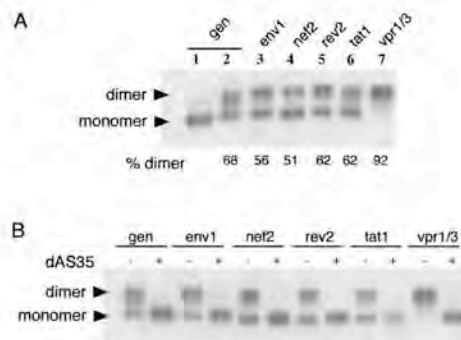


FIGURE 2. *In vitro* dimerization of spliced HIV-1 RNAs. (A) RNA fragments were incubated in dimer buffer (high-salt conditions) and run on a native 0.8% agarose gel (TB 0.5×, 0.1 mM MgCl₂). Control monomeric RNA (low-salt conditions) is shown only for the genomic RNA fragment (lane 1). Monomers and dimers are indicated, as well as the percentage of dimer formed for each RNA. (B) Inhibition of RNA dimerization. RNAs were incubated in high-salt conditions in the absence (-) or presence (+) of an antisense oligodeoxynucleotide (dAS35) complementary to the DIS stem-loop.

Sinck et al.

Regions downstream of the DIS are important for the dimer stability

In HIV-1 genomic RNA, sequences located in the first 300 nt downstream from SD1 have been shown to be involved in stabilization of the RNA dimer (Marquet et al. 1994; Paillart et al. 1994; Laughrea and Jette 1996). The molecular mechanism of this stabilization is still unknown, and the sequences involved remain to be precisely mapped. To test whether the different sequences located 3' of SD1 of the different HIV-1 spliced mRNAs modulate the stability of the RNA dimers, we determined the thermal stability of the dimers by incubating these RNAs at 37°C, then gradually increasing the temperature up to 62°C. Samples were analyzed by agarose gel electrophoresis, and conversion of the dimer band into monomer with increasing temperature was quantified and compared with gRNA (see Materials and Methods; Fig. 3). We observed that spliced RNA fragments could be classified into two categories, according to the thermal stability (T_m) of their dimers: the first one contains RNAs *tat*, *rev*, *nef*, and *env*, which had a T_m (47°C–52°C) slightly lower than the one determined for the gRNA fragment (55°C); the second one corresponds to RNA *vpr*, which formed an extremely thermostable dimer ($T_m > 65^\circ\text{C}$) (Fig. 3B). Thus, sequences downstream of the SD1 site of spliced mRNA fragments influenced the stability of RNA dimers either negatively, for *tat*, *rev*, *nef*, and *env* RNA species, or positively, for the *vpr* RNA, suggesting that, as for gRNA, stability of the mRNA dimers is not only due to Watson–Crick base-pairing of the self-complementary sequence of the DIS.

The RNA structure upstream of SD1 is similar in HIV-1 spliced and genomic RNAs

While all spliced RNAs dimerized through the DIS motif, their different dimer yield and thermal stability suggested that conformational differences could affect the presentation of the DIS sequence. In order to determine structural changes between HIV-1 spliced and gRNA fragments, we probed the region upstream of SD1, including the DIS, with dimethyl sulfate (DMS), a chemical probe that selectively methylates Watson–Crick positions of unpaired adenines (A-N1) and cytosines (C-N3) and N-7 positions of guanines (G-N7) (Brunel and Romby 2000). We monitored the reactivity profile of adenines and cytosines in the spliced RNAs and compared it with the one obtained for gRNA (Fig. 4). In general, the global reactivity pattern of the DIS sequence was similar for all RNAs: (1) the three purines, A255, A256, and A263, surrounding the self-complementary sequence in the loop were reactive, and thus unpaired, with A263 showing a hyper-reactivity toward DMS, as previously observed for HIV-1 gRNA (Fig. 4A; Paillart et al. 1997); (2) cytidines of the self-complementary loop sequence (257GCGCGC262) were

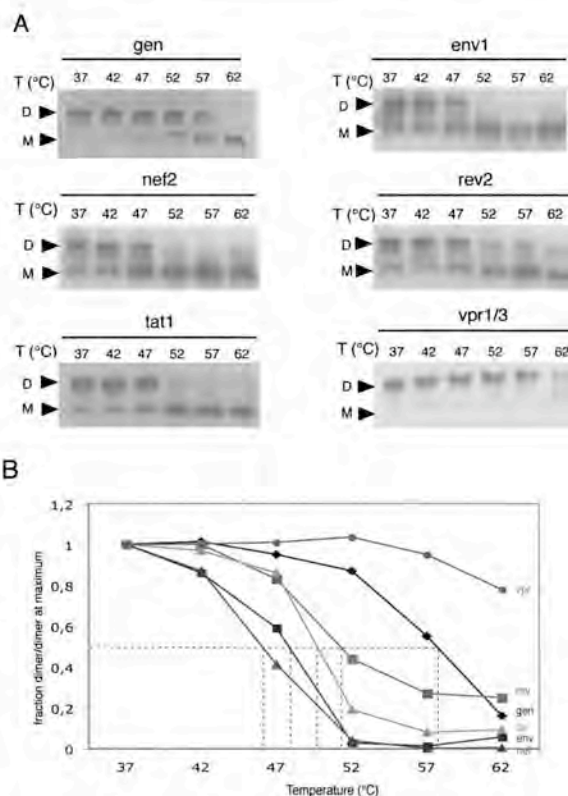


FIGURE 3. Thermal stability of genomic and spliced 1–615 RNA dimers. (A) After RNA dimerization in high-salt buffer at 37°C, samples were incubated at different temperatures ranging from 37°C to 62°C and loaded on 0.8% native agarose gels. Gels were fixed, dried, and autoradiographed. (B) Thermal stability curves. Dimer yields were normalized relative to the dimer yield at 37°C and plotted as a function of temperature.

protected from methylation, as expected from the implication of the DIS in RNA dimerization; and (3) adenine A271 in the internal loop of the DIS stem was also modified by the probe (Fig. 4A,B). Moreover, we observed that the conformation of the region upstream of the DIS was similar in all mRNAs and that binding of oligodeoxynucleotide dAS35 did not affect this region, whereas the DIS loop was completely protected by dAS35 binding (data not shown). However, as previously observed (Paillart et al. 2004a), nucleotides A268 and A269 were slightly reactive toward DMS in gRNA as well as in *vpr* mRNA (Fig. 4). Surprisingly, these nucleotides appeared more reactive in all other spliced mRNAs (*env*, *nef*, *rev*, and *tat*), suggesting that the DIS upper stem is weaker in these mRNAs. Altogether, these results support the presence of the DIS stem–loop in all spliced RNAs and in the gRNA, with the loop sequence of one RNA interacting with the loop of another RNA molecule, in agreement with our *in vitro* RNA dimerization assays. In addition, our probing data suggest that all RNAs

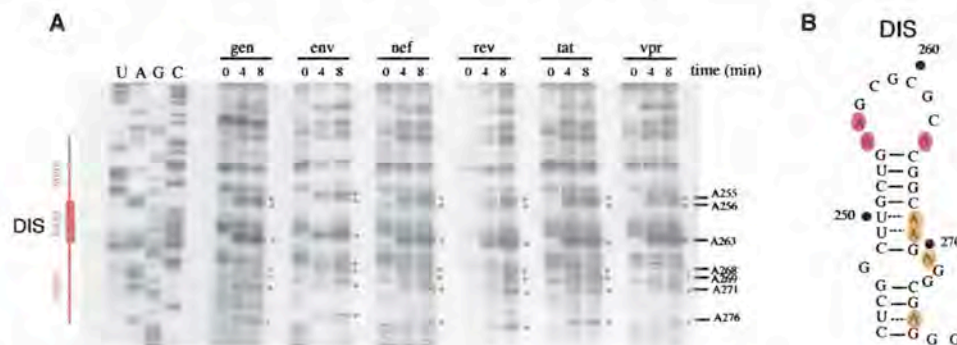


FIGURE 4. Dimethylsulfate (DMS) probing of the Dimerization Initiation Site (DIS) region of spliced and genomic HIV-1 RNAs. (A) RNAs were modified with DMS, and positions of methylated bases were revealed by primer extension before loading on an 8% polyacrylamide denaturing gel. Lanes U,A,C,G correspond to the sequence of gRNA. DIS and SD positions are indicated. Red dots represent the three purines flanking the self-complementary sequence of the DIS self-complementary sequence. (B) Secondary structure of the DIS. Nucleotides modified by DMS are indicated in red (highly reactive) or in orange (moderately reactive).

were structurally homogenous, in agreement with the electrophoresis analysis, which revealed that all monomeric species migrated as a single band (Fig. 2). Thus, our data strongly suggest that the dimerization yield and the thermal stability of the RNA dimers were not affected by an “RNA switch,” such as the LDI-BMH equilibrium proposed for HIV-1 gRNA (Huthoff and Berkhout 2001; Berkhout et al. 2002).

Heterodimer formation between spliced and unspliced RNA fragments is structurally constrained

The self-complementary loop sequence of the DIS is required for dimerization of HIV-1 spliced and unspliced RNAs, and both classes of RNAs form the well-studied kissing-loop complex (Paillart et al. 2004b; Russell et al. 2004; D’Souza and Summers 2005). Thus, it is theoretically possible to form heterodimers between spliced and unspliced (genomic) RNAs by interaction of their DIS. Such heterodimers might favor packaging of spliced viral RNAs. To address this hypothesis, we first repeated the *in vitro* dimerization procedure by co-incubating each 615 nt long spliced RNA fragment with an RNA fragment corresponding to the first 1402 nt of HIV-1 gRNA (see Materials and Methods) and loading samples on a native agarose gel (Fig. 5A). Using RNA fragments of different lengths allowed us to distinguish homodimers from heterodimers. As seen in Figure 5A, a third retarded band was readily detected when unlabeled RNA 1–1402 was added to radio-labeled spliced or unspliced 615 nt long RNA (Fig. 5A, lanes marked “+”). This band migrated between the positions of the dimeric forms of 1–615 RNA and 1–1402 RNA (Fig. 5A, lanes 1,2) and corresponded to a RNA heterodimer.

This experiment showed that it is possible to form heterodimers between spliced and unspliced HIV-1 RNA

in vitro when these RNAs are heat-denatured together in water, then co-incubated in dimerization buffer (see Materials and Methods). In order to avoid any possible artifact linked to the RNA denaturation/renaturation process, we next performed homo- and heterodimerization assays during *in vitro* run-off transcription from two templates generating the appropriate RNA fragments (Fig. 5B). As previously observed for MLV genomic RNA fragments (Kharytonchik et al. 2005; Flynn and Telesnitsky 2006; Rasmussen and Pedersen 2006), spliced and unspliced HIV-1 RNAs were able to homodimerize during *in vitro* transcription (Fig. 5B, lanes 1,2,5,8,11,14,17) with a yield similar to what was observed after RNA denaturation (Fig. 5A). In the same way, heterodimers between 615 nt long spliced or unspliced RNA fragments and the 1–1402 gRNA fragment could easily be formed when templates were mixed together before starting *in vitro* transcription (Fig. 5B, lanes 3,6,9,12,15,18, red asterisks). In sharp contrast, when each RNA was generated in separate *in vitro* transcription reactions and subsequently incubated together for another 30 min at 37°C, heterodimers could hardly be visualized on an agarose gel (Fig. 5B, lanes 4,7,10,13,16,19). The only exception was RNA rev2, which heterodimerized somewhat more efficiently (Fig. 5B, cf. lanes 12 and 13, gray asterisks). These results indicate that dimerization is more efficient during transcription than once RNA synthesis is completed, suggesting that accessibility of the DIS sequence is crucial for heterodimer formation, and for RNA dimerization in general. Alternatively, we cannot discard the possibility that the homodimers that are formed when the RNAs are incubated separately prevent subsequent formation of heterodimers when the RNAs are mixed together. However, this would imply that the RNA dimers are less dynamic than previously suggested (Paillart et al. 1996b).

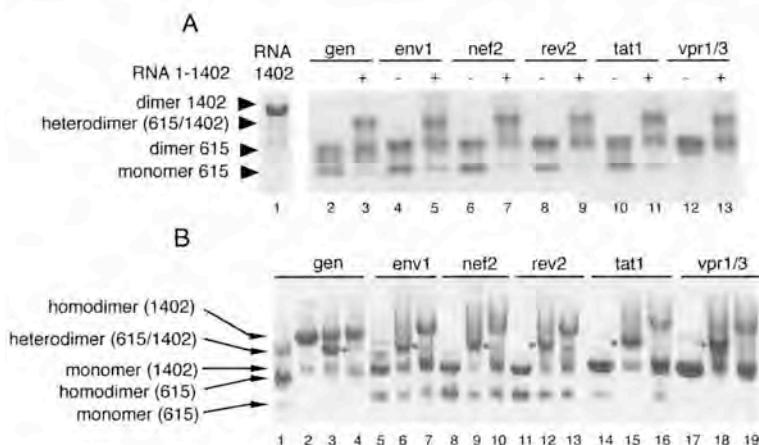


FIGURE 5. Heterodimerization of genomic and spliced HIV-1 RNAs. (A) Heterodimerization with purified RNA fragments. Radiolabeled 1–615 RNAs were incubated in high-salt buffer in the absence (–) or in presence (+) of genomic RNA fragment 1–1402. (Lane 1) The 1–1402 RNA dimer visualized by UV. Positions of monomer, homodimer, and heterodimer species are indicated. (B) Heterodimer formation during *in vitro* transcription. DNA templates generating 1–615 spliced or genomic RNA fragments were submitted to transcription either alone (lanes 1,2,5,8,11,14,17) or with template generating genomic RNA fragment 1–1402 (lanes 3,6,9,12,15,18). RNAs 1–615 and 1–1402 were also transcribed separately before being mixed together for another 30-min incubation at 37°C (lanes 4,7,10,13,16,19). Samples were analyzed on a native ethidium-bromide-containing agarose gel. (Gray star) The 1–615/1–1402 heterodimer, (lane 1) genomic RNA 1–615, (lane 2) genomic RNA 1–1402. The names of each RNA are indicated at the top of the gel. (gen) gRNA.

Dimerization of long RNA fragments is favored during *in vitro* transcription

In vitro dimerization of retroviral RNA was usually restricted to RNA fragments of <1500 nt, and the dimerization yield was usually found to sharply decrease as the size of the RNA fragments increased (Marquet et al. 1991, 1994; Flynn and Telesnitsky 2006). Inhibition of *in vitro* RNA dimerization with increasing RNA size might be due either to increasing electrostatic repulsion between the two RNA molecules or/and to reduced accessibility of the DIS in larger RNA fragments. In order to distinguish between these two possibilities, we analyzed dimerization of very long fragments of subtype A and subtype B HIV-1 gRNA during *in vitro* transcription (Fig. 6). RNA fragments up to >4500 nt efficiently dimerized during *in vitro* transcription (Fig. 6), whereas the longer RNA fragments only marginally dimerized when dimer formation was initiated after heat denaturation of fully synthesized RNAs (data not shown; Flynn and Telesnitsky 2006).

DISCUSSION

HIV-1 RNA packaging is a highly specific process that leads to the selection of a dimeric genomic RNA amongst a multitude of cellular and viral mRNAs. However, it is paradoxical that HIV-1 spliced RNAs, which contain most

of the signals required for gRNA packaging (TAR, polyA, DIS), are not abundantly encapsidated into viral particles. Several hypotheses can be raised to explain this paradox: (1) HIV-1 spliced RNA could be compartmentalized in the cytoplasm, away from the assembly complex; (2) the conformation of the packaging motifs may not be suitable to direct efficient encapsidation of spliced mRNAs; or (3) mRNAs are not competent for dimerization, a prerequisite for RNA packaging (Paillart et al. 2004; Moore et al. 2007). In this report, we analyzed for the first time the *in vitro* dimerization of several HIV-1 RNA fragments corresponding to the 5' end of spliced mRNAs encoding the viral proteins Env, Nef, Vpu, Tat, Rev, and Nef.

Our results show that the structure of the DIS domain is conserved in all spliced RNAs and that these RNAs are able to dimerize *in vitro* through a kissing-loop mechanism involving the DIS loop (Fig. 2). Indeed, an oligonucleotide complementary to the DIS stem-loop completely abolished dimerization of spliced RNAs (Fig. 2B), sug-

gesting that, as for gRNA (Skripkin et al. 1996), dimerization of spliced RNA is in dynamic equilibrium and governed by reversible loop–loop interactions. Moreover, this inhibition indicates that no sequence downstream of the SD site (region 288–615 in our study) can complement the loss of the DIS function, reinforcing the idea that the main dimerization signal is not redundant. In addition, we observed a rather good correlation between the dimerization yield (Fig. 2) and the *in vitro* thermal stability of spliced mRNA (Fig. 4). Spliced RNAs can be divided into two categories: (1) nef, env, tat, and rev with a dimerization yield (51%–62%) and a thermal stability (T_m , ranging from 46°C to 52°C) lower than that of the gRNA (68% and T_m ~57°C); and (2) vpr, which formed >90% of dimer with a surprisingly high thermal stability (>70°C) (Fig. 4). These results suggest that the sequence or the conformation of spliced RNAs must be important for the stability of RNA dimers. However, our chemical probing indicates that the structure of the DIS stem-loop and of the 5' region is not significantly different in all HIV-1 RNAs, suggesting that the deletion of the intronic sequence during splicing does not significantly alter the conformation of neighboring sequences. Thus, the mechanism by which the vpr sequences stabilize the RNA dimer is unclear. It is, however, important to notice that the downstream sequence that is removed upon splicing has either a negative influence in the wild-type RNA stability or a positive influence imposed by the unique

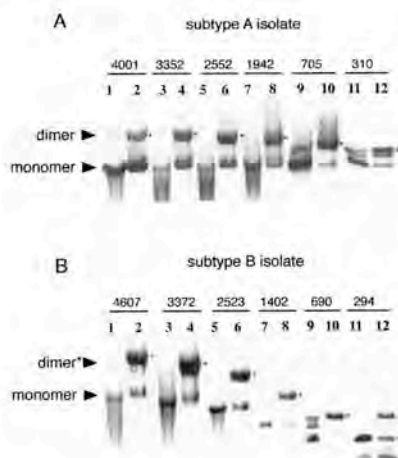


FIGURE 6. In vitro dimerization of long subtype A (A) and subtype B (B) RNA fragments during transcription. Samples were analyzed on native agarose ethidium-bromide-containing gels directly after in vitro run-off transcription. (Black stars) Dimers. The size of each RNA fragment is indicated at the top of the gels. (Odd lanes) RNA fragments that have been denatured 2 min at 80°C before loading, (even lanes) not heat-treated. RNA fragments are staggered in panel B (compared with panel A) due to direct loading of samples after transcription. In this case, RNAs migrated according to their length. In panel A, RNA samples have been loaded at different time points to place the RNA bands at the same position in the gel.

downstream sequence in the vpr mRNA. Structure prediction using the Mfold program did not allow us to pinpoint a specific region involved in the stabilization capacity of this mRNA (data not shown). However, the weaker DIS stem observed for env, nef, rev, and tat RNA fragments can potentially be involved in the reduced thermal stability determined for these RNAs (Fig. 3). Similarly, in vitro studies showed that sequences in gag stabilize the dimer of gRNA (Paillart et al. 1994; Laughrea and Jette 1997), whereas analysis of mutant viruses indicated that regions in pol have a destabilizing effect (Shehu-Xhilaga et al. 2001, 2002). The precise identification of the sequences and mechanisms involved in the modulation of the RNA dimer stability remain to be determined. The loss or the formation of long distance intra- or intermolecular interactions between regions on both sides of the SD site or with the DIS stem-loop by itself could thus explain the thermal stability differences between spliced RNAs. Nevertheless, whatever these undefined sequences or their conformations, they do not affect the dimerization process, as all HIV-1 spliced RNA fragments dimerized efficiently. This study has to be compared with the one by Lanchy et al. (2004), which showed that removing intronic sequence from HIV-2 RNA (as in tat, rev, and nef mRNAs) only locally affected the RNA conformation of RNAs. As the main packaging signal is located upstream of the SD site in HIV-2, these investigators suggested that the interaction between elements

upstream and downstream of the SD site may help to select gRNA preferentially over spliced RNAs during packaging.

If we extrapolate these results to the in vivo context, they indicate that spliced RNA could dimerize in the cells and thus that spliced and gRNAs could compete for dimer formation and packaging, as recently proposed (Houzet et al. 2007). These results prompted us to analyze the capacity of spliced RNA to form heterodimers with gRNA. Indeed, we observed that all spliced RNAs efficiently form heterodimers in vitro. As one molecule of these heterodimers possesses the complete packaging signal, one could expect efficient packaging of these heterodimers. However, experiments showed that spliced RNAs are packaged with low efficiency (Liang et al. 2004; Houzet et al. 2007). In addition, we recently showed that while deletion of SL1 strongly affects packaging of gRNA, it has no direct effect on the packaging of spliced HIV-1 RNA (Houzet et al. 2007). Thus, either heterodimers are not formed in cells, and the mechanism preventing heterodimerization remains to be elucidated, or they are not recognized by the packaging machinery, and understanding how this machinery can discriminate between heterodimers and dimers of gRNA would certainly shed a new light on the role of RNA dimerization in RNA packaging.

Finally, we showed that heterodimerization and dimerization of long gRNA fragments is more efficient during in vitro transcription than after complete synthesis of these RNAs (Figs. 5, 6). Thus, in infected cells, RNA dimerization could occur during transcription of the integrated provirus, in agreement with previous in vitro and ex vivo studies on Moloney murine leukemia viruses (Kharytonchyk et al. 2005; Flynn and Telesnitsky 2006; Rasmussen and Pedersen 2006) showing that gRNAs synthesized from separated locations do not randomly associate. As splicing of HIV-1 RNA is inefficient, as compared with cellular mRNA, RNA dimerization might precede and modulate splicing. For instance, splicing of the two RNA molecules within a dimer may be coupled, even though deletion of the DIS motif in gRNA does not globally affect the amount of spliced HIV-1 RNA (Houzet et al. 2007).

Whether RNA dimerization or/and heterodimerization can occur in the nucleus during transcription is still unclear. Work is in progress in our laboratory to test this possibility. Indeed, nuclear dimerization of HIV-1 RNAs could have important functional consequences for HIV-1 RNA metabolism, such as nuclear export, trafficking, and packaging (Basyuk et al. 2005; Poole et al. 2005; Smagulova et al. 2005; Levesque et al. 2006; Swanson and Malim 2006).

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction and RNA synthesis

Plasmid pNL4.3-615 expresses the first 615 nt of the HIV-1 NL4.3 isolate under the control of the T7 RNA polymerase promoter

(Lodmell et al. 1998). Plasmids pSP5 containing the complete cDNAs expressing the Env/Vpu, Nef, Rev, Tat, and Vpr mRNAs of HIV-1 NL4.3 (Purcell and Martin 1993) were PCR amplified (4 min at 94°C; and 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 52°C, and 1 min at 72°C) and inserted into PCR 2.1-TOPO vectors (Invitrogen). The resulting plasmids pT-env/vpu, pT-nef, pT-rev, pT-tat, and pT-vpr1/3 contain the first 615 nt of HIV-1 mRNAs downstream from the T7 promoter.

Plasmids pNL4.3-615 and pTs were linearized with PvuII and EcoRI, respectively, prior to in vitro transcription to generate RNAs encompassing nucleotides 1-615 of HIV-1 gRNA and mRNAs (Fig. 1). After run-off transcription, RNAs were purified by FPLC as previously described (Henriet et al. 2005). Internal labeling of RNA was achieved by addition of [α -³²P] ATP (Amersham) during transcription (Paillart et al. 1996b).

Plasmids pmCG67 (Marquet et al. 1991) and pDR4607 contain the 5' half of the MAL and NL4.3 HIV-1 genome, respectively, under the control of the T7 promoter. Plasmid pmCG67 was digested with RsaI, PvuII, AvaII, BstXI, EcoRV, BamHI, or SalI to produce RNA 1-311 (containing the first 311 nt of RNA genome), RNA 1-705, RNA 1-1333, RNA 1-1942, RNA 1-2552, RNA 1-3352, and RNA 1-4001, respectively. Likewise, pDR4607 was digested with RsaI, PvuII, MspI, EcoRV, KpnI, or SmaI to produce RNA 1-294, RNA 1-690, RNA 1-1402, RNA 1-2523, RNA 1-3372, and RNA 1-4607, respectively.

In vitro dimerization of HIV-1 RNAs

In a typical experiment, 400 nM of unlabeled RNA fragments were diluted in 8 μ L of Milli Q (Millipore) water with the corresponding labeled RNA (5000 cpm, 3-5 nM). Samples were denatured for 2 min at 90°C and snap-cooled for 2 min on ice. Dimerization was initiated by addition of fivefold concentrated dimer buffer (final concentration: 50 mM sodium cacodylate, pH 7.5, 300 mM KCl, and 5 mM MgCl₂), and the samples were incubated for 30 min at 37°C. In parallel, samples were incubated with fivefold monomer buffer (final concentration: 50 mM sodium cacodylate, pH 7.5, 40 mM KCl, and 0.1 mM MgCl₂) to induce folding of monomeric RNA. Samples were loaded on a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide in TBM buffer (0.5 \times Tris Borate, 0.1 mM MgCl₂) and run at 4°C. Gels were fixed in 10% trichloroacetic acid for 10 min and dried for 1 h under vacuum at room temperature. Radioactive bands corresponding to monomeric and dimeric species were visualized and quantified using a FLA 5000 (Fuji).

To determine the thermal stability of the dimer species, samples were incubated for 30 min at 37°C as described above, and the temperature was gradually increased by 5°C steps up to 62°C. After a 10-min incubation at the appropriate temperature, an aliquot was loaded on a 0.8% agarose gel after addition of loading buffer. The melting temperature (T_m) was defined as the temperature at which the amount of dimeric RNA was reduced by 50%, as compared with its value at 37°C.

For heterodimerization experiments, 400 nM of RNA corresponding to the first 1402 nt of HIV-1 NL4.3 gRNA were added to an equimolar concentration of 1-615 RNA containing 5000 cpm of the corresponding labeled RNA. Heterodimerization assays were performed as described above for homodimerization.

Inhibition of RNA dimerization by an antisense oligonucleotide

RNA dimerization was performed as described above, then 50 pmol of unlabeled antisense oligodeoxynucleotide (dAS35) complementary to positions 243-277 (DIS stem-loop) of the HIV-1 NL4.3 gRNA were added, and incubation was continued for 15 min. Alternatively, the antisense oligodeoxynucleotide was added prior to the thermal denaturation step. Inhibition of RNA dimerization was visualized on agarose gel as above.

Dimerization of HIV-1 RNAs during in vitro transcription

One microgram of DNA templates digested by PvuII (pNL4.3-615) or EcoRI (pTs) was transcribed in vitro as described above in a final volume of 20 μ L. After incubation for 2 h at 37°C, samples were phenol/chloroform extracted and directly loaded onto a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide. Gels were run in TBM buffer at 4°C. Heterodimer formation during in vitro transcription was performed similarly by mixing two different restricted DNA templates. Monomer, dimer, and heterodimer species were visualized by UV and analyzed with a Chemidoc (Bio-Rad) and the QuantityOne software. Alternatively, both templates were in vitro transcribed separately, then mixed together and incubated for 20 min at 37°C to allow heterodimer formation.

Chemical probing of the DIS region of genomic and spliced RNAs

Chemical probing with dimethylsulfate (DMS) was used for mapping the secondary structure of genomic or spliced RNA fragments. RNAs 1-615 (400 nM) were submitted to the dimerization procedure as described above, followed by a 10 min incubation at room temperature. Samples supplemented with 2 μ g of total *Escherichia coli* tRNA were subsequently modified for 0, 4, or 8 min at 37°C with 0.8 μ L of DMS diluted 20-fold with ethanol. Modification reactions were stopped by ethanol precipitation, and pellets were washed twice with 75% ethanol, vacuum-dried, and resuspended in 7 μ L of water. DMS modifications were detected by primer extension with avian myeloblastosis reverse transcriptase as previously described (Paillart et al. 1997). Sequencing reactions were performed in parallel to identify positions of DMS modifications. After reverse transcription, samples were ethanol precipitated, resuspended in 8 μ L of formamide loading buffer, and loaded onto an 8% denaturing polyacrylamide gel. After migration, gels were dried and autoradiographed at -80°C.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). L.S. is supported by a fellowship from the French Ministry of Research and Technology (MENRT).

Received June 8, 2007; accepted August 28, 2007.

REFERENCES

Aldovini, A. and Young, R.A. 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1

- packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**: 1920–1926.
- Andersen, E.S., Jeeninga, R.E., Damgaard, C.K., Berkhout, B., and Kjems, J. 2003. Dimerization and template switching in the 5' untranslated region between various subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **77**: 3020–3030.
- Balakrishnan, M., Fay, P.J., and Bambara, R.A. 2001. The kissing hairpin sequence promotes recombination within the HIV-1 5' leader region. *J. Biol. Chem.* **276**: 36482–36492.
- Balakrishnan, M., Roques, B.P., Fay, P.J., and Bambara, R.A. 2003. Template dimerization promotes an acceptor invasion-induced transfer mechanism during human immunodeficiency virus type 1 minus-strand synthesis. *J. Virol.* **77**: 4710–4721.
- Basyuk, E., Boulon, S., Skou Pedersen, F., Bertrand, E., and Vestergaard Rasmussen, S. 2005. The packaging signal of MLV is an integrated module that mediates intracellular transport of genomic RNAs. *J. Mol. Biol.* **354**: 330–339.
- Bender, W. and Davidson, N. 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* **7**: 595–607.
- Berkhout, B. and van Wamel, J.L. 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **70**: 6723–6732.
- Berkhout, B., Ooms, M., Beerens, N., Huthoff, H., Southern, E., and Verhoef, K. 2002. In vitro evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes. *J. Biol. Chem.* **277**: 19967–19975.
- Berkowitz, R.D., Ohagen, A., Hoglund, S., and Goff, S.P. 1995. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J. Virol.* **69**: 6445–6456.
- Brunel, C. and Romby, P. 2000. Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol.* **318**: 3–21.
- Chin, M.P., Rhodes, T.D., Chen, J., Fu, W., and Hu, W.S. 2005. Identification of a major restriction in HIV-1 intersubtype recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 9002–9007.
- Clavel, F. and Orenstein, J.M. 1990. A mutant of HIV-1 with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J. Virol.* **64**: 5230–5234.
- Clever, J.L. and Parslow, T.G. 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J. Virol.* **71**: 3407–3414.
- Clever, J.L., Wong, M.L., and Parslow, T.G. 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J. Virol.* **70**: 5902–5908.
- Clever, J.L., Miranar Jr., D., and Parslow, T.G. 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* **76**: 12381–12387.
- Codrane, A.W., McNally, M.T., and Moulard, A.J. 2006. The retrovirus RNA trafficking granule: From birth to maturity. *Retrovirology* **3**: 18. doi: 10.1186/1742-4690-3-18.
- D'Souza, V. and Summers, M.F. 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 643–655.
- Feng, Y.X., Moore, S.P., Garfinkel, D.J., and Rein, A. 2000. The genomic RNA in Ty1 virus-like particles is dimeric. *J. Virol.* **74**: 10819–10821.
- Hynn, J.A. and Telesnitsky, A. 2006. Two distinct Moloney murine leukemia virus RNAs produced from a single locus dimerize at random. *Virology* **344**: 391–400.
- Fu, W. and Rein, A. 1993. Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **67**: 5443–5449.
- Fu, W., Gorelick, R.J., and Rein, A. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild type and protease defective virions. *J. Virol.* **68**: 5013–5018.
- Huddrick, M., Lear, A.L., Cann, A.J., and Heaphy, S. 1996. Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *J. Mol. Biol.* **259**: 58–68.
- Helga-Maria, C., Hammarskjöld, M.L., and Rekosh, D. 1999. An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J. Virol.* **73**: 4127–4135.
- Henriet, 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.
- Houzet, L., Paillart, J.-C., Smagulova, G., Maurel, S., Morichaud, Z., Marquet, R., and Mougel, M. 2007. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **35**: 2695–2704. doi: 10.1093/nar/gkm153.
- Huthoff, H. and Berkhout, B. 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **7**: 143–157.
- Kharytonchyk, S.A., Kireyeva, A.I., Osipovich, A.B., and Fomin, I.K. 2005. Evidence for preferential copackaging of Moloney murine leukemia virus genomic RNAs transcribed in the same chromosomal site. *Retrovirology* **2**: 3.
- Lanchy, J.M., Szafran, Q.N., and Lodmell, J.S. 2004. Splicing affects presentation of RNA dimerization signals in HIV-2 in vitro. *Nucleic Acids Res.* **32**: 4585–4595. doi: 10.1093/nar/gkh800.
- Laughrea, M. and Jetté, L. 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor site is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* **33**: 13464–13474.
- Laughrea, M. and Jette, L. 1996. HIV-1 genome dimerization: Formation kinetics and thermal stability of dimeric HIV-1 RNA are not improved by the 1-232 and 296-790 regions flanking the kissing-loop domain. *Biochemistry* **35**: 9366–9374.
- Laughrea, M. and Jette, L. 1997. HIV-1 genome dimerization: Kissing-loop hairpin dictates whether nucleotides downstream of the 5' splice junction contribute to loose and tight dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *Biochemistry* **36**: 9501–9508.
- Laughrea, M., Jette, L., Mak, J., Kleitman, L., Liang, C., and Wainberg, M. 1997. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J. Virol.* **71**: 3397–3406.
- Lever, A.M. 2000. HIV RNA packaging and lentivirus-based vectors. *Adv. Pharmacol.* **48**: 1–28.
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of HIV-1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**: 4085–4087.
- Ievesque, K., Halvorsen, M., Abrahamyan, L., Chatel-Chaix, L., Poupon, V., Gordon, H., DesGroseillers, L., Gagnon, A., and Moulard, A.J. 2006. Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. *Traffic* **7**: 1177–1193.
- Liang, C., Hu, J., Russell, R.S., Kameoka, M., and Wainberg, M.A. 2004. Spliced human immunodeficiency virus type 1 RNA is reverse transcribed into cDNA within infected cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**: 203–211.
- Lodmell, J.S., Paillart, J.C., Mignot, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. 1998. Oligonucleotide mediated inhibition of genomic RNA dimerization of HIV-1 strains MAL and LAI: A comparative analysis. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**: 517–529.
- Luban, J. and Goff, S.P. 1994. Mutational analysis of cis acting packaging signal in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Virol.* **68**: 3784–3793.
- Marquet, R., Baudin, F., Gabus, C., Darlix, J.L., Mougel, M., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. 1991. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: Stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2349–2357.
- Marquet, R., Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. 1994. Dimerization of human immunodeficiency

- virus type 1 RNA involves sequences located upstream of the splice donor site. *Nucleic Acids Res.* **22**: 145–151.
- McBride, M.S., Schwartz, M.D., and Panganiban, A.T. 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of *cis* elements required for encapsidation. *J. Virol.* **71**: 4544–4554.
- Moore, M.D., Fu, W., Nikolaitchik, O., Chen, J., Ptak, R.G., and Hu, W.S. 2007. Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: Its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J. Virol.* **81**: 4002–4011.
- Muriaux, D., Girard, P.M., Bonnet, M.B., and Paoletti, J. 1995. Dimerization of HIV-1 RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *J. Biol. Chem.* **270**: 8209–8216.
- Muriaux, D., De, R.H., Roques, B.P., and Paoletti, J. 1996. NCp7 activates HIV-1 RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J. Biol. Chem.* **271**: 33686–33692.
- Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., and Rein, A. 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 5246–5251.
- Murti, K.G., Bondurant, M., and Tereba, A. 1981. Secondary structural features in the 70S RNAs of Moloney murine leukemia and Rous sarcoma viruses as observed by electron microscopy. *J. Virol.* **37**: 411–419.
- Oertle, S. and Spahr, P.F. 1990. Role of the *gag* polyprotein precursor in packaging and maturation of Rous sarcoma virus genomic RNA. *J. Virol.* **64**: 5757–5763.
- Onafuwa-Nuga, A.A., Telesnitsky, A., and King, S.R. 2006. 75L RNA, but not the 54-kD signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. *RNA* **12**: 542–546.
- Ooms, M., Huthoff, H., Russell, R., Liang, C., and Berkhout, B. 2004. A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **78**: 10814–10819.
- Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J. Biol. Chem.* **269**: 27486–27493.
- Paillart, J.-C., Berthoux, L., Ottmann, M., Darlix, J.-L., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. 1996a. A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J. Virol.* **70**: 8348–8354.
- Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. 1996b. A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 5572–5577.
- Paillart, J.-C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. 1997. Non canonical interactions in a kissing loop complex: The dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* **270**: 36–49.
- Paillart, J.-C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. 2004a. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J. Biol. Chem.* **279**: 48397–48403.
- Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., and Mak, J. 2004b. Dimerization of retroviral RNA genomes: An inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 461–472.
- Pomerantz, R.J., Seshamma, T., and Trono, D. 1992. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: Potential implications for latency. *J. Virol.* **66**: 1809–1813.
- Poole, E., Strappe, P., Mok, H.P., Hicks, R., and Lever, A.M. 2005. HIV-1 Gag RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* **6**: 741–755.
- Purcell, D.F. and Martin, M.A. 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**: 6365–6378.
- Rasmussen, S.V. and Pedersen, F.S. 2006. Co-localization of gammaretroviral RNAs at their transcription site favors co-packaging. *J. Gen. Virol.* **87**: 2279–2289.
- Roy, B.B., Russell, R.S., Turner, D., and Liang, C. 2006. The T121 mutation within the SP1 region of Gag restricts packaging of spliced viral RNA into human immunodeficiency virus type 1 with mutated RNA packaging signals and mutated nucleocapsid sequence. *Virology* **344**: 304–314.
- Russell, R.S., Hu, J., Laughrea, M., Wainberg, M.A., and Liang, C. 2002. Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA caused by mutations of the u5 RNA sequences. *Virology* **303**: 152–163.
- Russell, R.S., Roldan, A., Detório, M., Hu, J., Wainberg, M.A., and Liang, C. 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J. Virol.* **77**: 12986–12995.
- Russell, R.S., Liang, C., and Wainberg, M.A. 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* **1**: 23. doi: 10.1186/1742-4690-1-23.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S.M., and Mak, J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J. Virol.* **75**: 1834–1841.
- Shehu-Xhilaga, M., Hill, M., Marshall, J.A., Kappes, J., Crowe, S.M., and Mak, J. 2002. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J. Virol.* **76**: 4331–4340.
- Shen, N., Jette, L., Liang, C., Wainberg, M.A., and Laughrea, M. 2000. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *J. Virol.* **74**: 5729–5735.
- Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 4945–4949.
- Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Blumenfeld, M., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. 1996. Mechanisms of inhibition of in vitro dimerization of HIV type 1 RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **271**: 28812–28817.
- Smagulova, E., Maurel, S., Morichaud, Z., Devaux, C., Mougel, M., and Houzet, I. 2005. The highly structured encapsidation signal of MuLV RNA is involved in the nuclear export of its unspliced RNA. *J. Mol. Biol.* **354**: 1118–1128.
- Stewart, L., Schatz, G., and Vogt, V.M. 1990. Properties of avian retrovirus particles defective in viral protease. *J. Virol.* **64**: 5076–5092.
- Stoltzfus, C.M. and Madsen, J.M. 2006. Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr. HIV Res.* **4**: 43–55.
- Swanson, C.M. and Malim, M.H. 2006. Retrovirus RNA trafficking: From chromatin to invasive genomes. *Traffic* **7**: 1440–1450.
- Takahashi, K.I., Baba, S., Chattopadhyay, P., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., and Kawai, G. 2000. Structural requirement for the two step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *RNA* **6**: 96–102.
- Takahashi, K., Baba, S., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., and Kawai, G. 2001. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J. Biol. Chem.* **276**: 31274–31278.
- Zhang, Y. and Barklis, E. 1995. Nucleocapsid protein effects on the specificity of retrovirus RNA encapsidation. *J. Virol.* **69**: 5716–5722.

3. Discussion

3.1. Les ARN épissés du HIV-1 dimérisent *in vitro* par l'intermédiaire d'interactions boucle-boucle au niveau du DIS

Nos résultats montrent que tous les ARN épissés sont capables de dimériser *in vitro*, comme l'ARNg par formation d'un complexe boucle-boucle réversible au niveau du DIS (412). D'autre part, les séquences non codantes en aval du SD de ces ARNm ne contiennent pas de signaux redondants de dimérisation. Notre étude de cartographie en solution indique que la structure secondaire de la tige-boucle SL1 et de la région située en 5' de ce motif n'est pas significativement différente de l'ARNg, suggérant que la délétion des séquences introniques durant l'épissage n'altère pas la conformation de la région 5'UTR. Ainsi, la région 5' terminale des différents ARNm épissés semble adopter la même structure secondaire en domaines (TAR, polyA, PBS, DIS) que celle préalablement déterminée pour l'ARNg du HIV-1.

3.2. Les régions en aval du DIS sont importantes pour la stabilité des dimères

La corrélation observée entre le taux de dimérisation et la stabilité thermique des dimères d'ARN épissés *in vitro* nous a permis de classer ces ARN en deux catégories : (1) les ARN *env*, *nef*, *rev* et *tat* dont le taux de dimérisation (51%-62%) et la stabilité thermique (T_m comprise entre 47-50°C) sont inférieurs à ceux déterminés pour l'ARNg (68% et $T_m \sim 55^\circ\text{C}$) ; et (2) l'ARNm *vpr*, qui forme plus de 90% de dimères avec une stabilité thermique particulièrement élevée ($T_m > 65^\circ\text{C}$). Ainsi, les séquences localisées en aval du SD permettent soit de déstabiliser, soit de stabiliser les dimères d'ARN viraux, suggérant que la séquence ou la conformation des ARNm doit être importante pour la stabilité des dimères. De surcroît, l'étude de la structure secondaire des ARN viraux a montré que les séquences en aval du SD, suite à la réaction d'épissage, adoptent diverses conformations dues à la variabilité de séquence des différents ARNm. Cette différence de conformation en aval du SD est peut être à l'origine des différences de stabilité thermique observées pour les ARNm. Cependant, nos études d'alignement des séquences non codantes (Figure 42), de cartographie en solution et de prédiction de structure secondaire Mfold (Figures 43 et 44), en aval du SD, ne nous ont pas permis de mettre en évidence de séquences conservées ou de motifs structuraux communs entre ces différents ARNm.

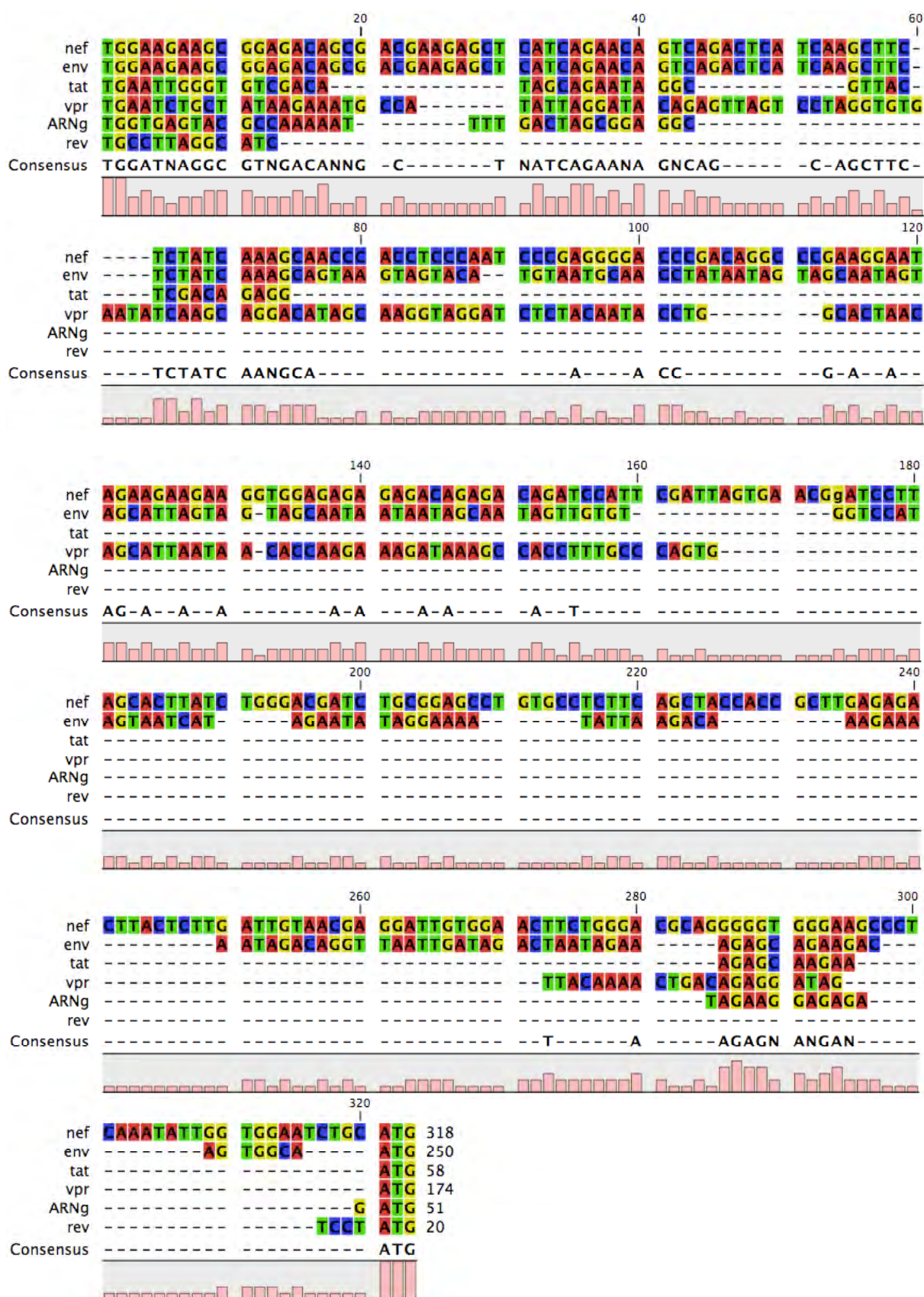


Figure 42 : Alignement des séquences non-codantes localisées entre le SD et l’AUG initiateur de la traduction des ARNg, *env*, *nef*, *rev*, *tat* et *vpr*. La taille des séquences non-codantes de chaque ARN est indiquée à la fin de l’alignement.

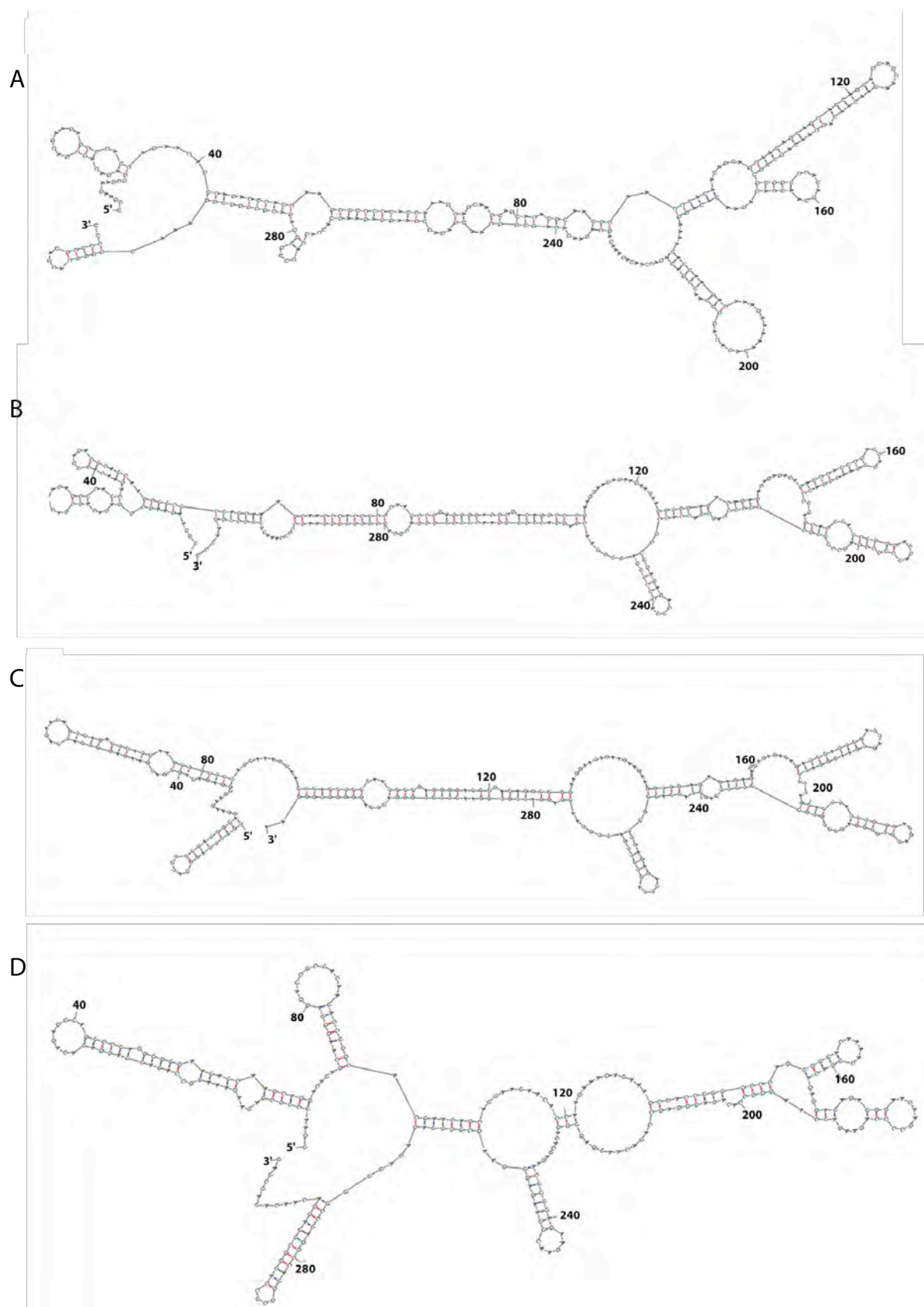


Figure 43 : Prédiction de structure secondaire en aval du SD pour les ARN testés : (A) *env* ; (B) *nef* ; (C) *rev* et (D) *vpr*. Nous avons utilisé les mêmes séquences non-codantes, localisées entre le SD et l'AUG des ARN *env*, *nef*, *rev* et *vpr*, que pour l'étude par alignement de séquence. Ici sont représentées les structures possédant la plus faible valeur de ΔG (logiciel Mfold).

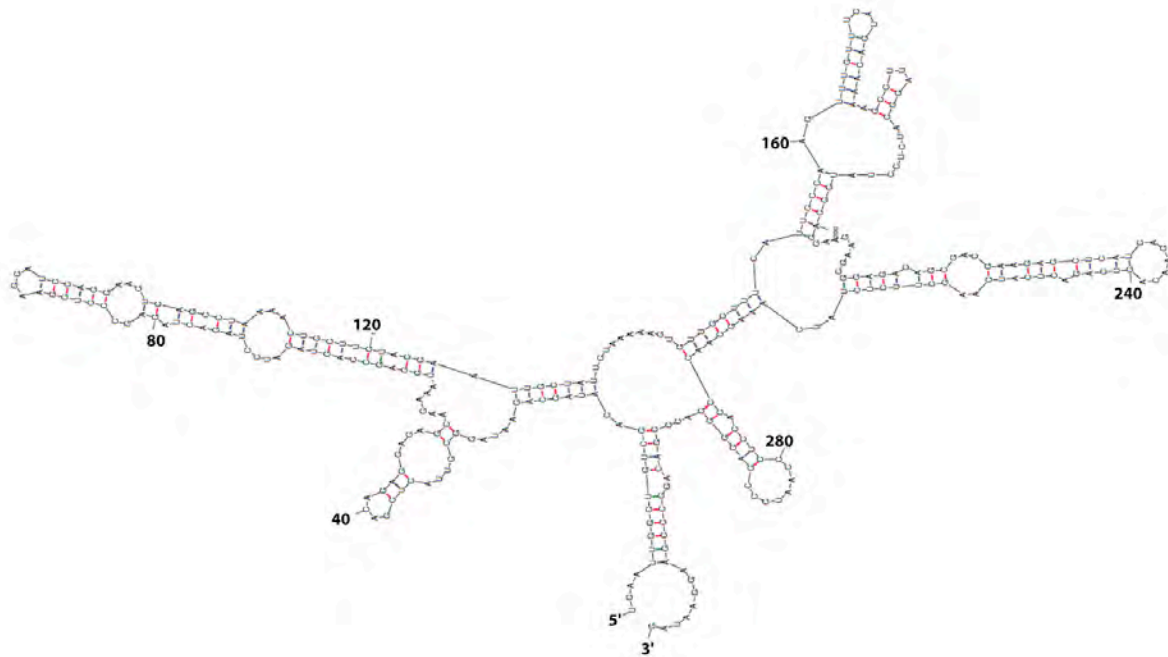


Figure 44 : Prédiction de structure secondaire en aval du SD pour l'ARN *tat*. Nous avons utilisé les mêmes séquences non-codantes, localisées entre le SD et l'AUG de l'ARN *tat*, que pour l'étude par alignement de séquence. La structure représentée est celle possédant la plus faible valeur de ΔG .

Par ailleurs, notre étude de cartographie en solution montre que la tige de SL1 des ARN *env*, *nef*, *rev* et *tat* présente une stabilité moindre en comparaison avec celle des ARNg et *vpr*. Ceci pourrait être à l'origine de la réduction de la stabilité thermique déterminée pour leurs dimères. Il a été montré pour l'ARNg du HIV-2 qu'un changement conformationnel de sa région 5' terminale est à l'origine d'interactions intramoléculaires à courte distance entre la séquence palindromique pal située en amont de SL1 (23) et une région localisée en aval de SL1 (22). Ces interactions entraînent la formation d'une tige étendue dans le motif SL1 (22) modulant la présentation de la séquence palindromique contenue dans SL1 et par conséquent la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg (24). Par ailleurs, la formation ou la dissociation de la tige de SL1 régule également la dimérisation de l'ARNg du SIV et du HIV-1 (24), suggérant que la faible stabilité de la tige de SL1 des ARN épissés *env*, *nef*, *rev* et *tat* pourrait réguler négativement leur dimérisation et par conséquent leur efficacité d'encapsidation. Cependant cette hypothèse n'explique pas pourquoi les ARN *vpr*, qui dimérisent à un fort taux et présentent une forte stabilité thermique, sont exclus des particules virales. Nous n'avons testé que des fragments d'ARNm, ainsi les ARNm épissés viraux complets pourraient adopter une conformation particulière à l'origine de cette exclusion. En outre, il a été montré que les séquences localisées dans le gène *gag* stabilisent le dimère d'ARNg *in vitro* (244,

338), alors que la région *pol* semble avoir des effets déstabilisants (400, 401). Ainsi, les séquences et les mécanismes impliqués dans la stabilité des dimères d'ARN viraux restent à déterminer. La perte ou la formation d'interactions intra- ou intermoléculaires à plus ou moins longue distance entre les régions situées de part et d'autre du SD, pouvant impliquer la tige-boucle SL1 elle-même, pourraient expliquer les différences de stabilité thermique observées pour les ARN viraux et leur capacité à être encapsidés.

Ainsi, bien que les séquences et/ou les conformations impliquées dans la stabilisation des dimères ne semblent pas affecter le processus de dimérisation, puisque tous les ARN du HIV-1 sont capables de dimériser efficacement *in vitro*, elles pourraient expliquer en partie le processus de discrimination entre l'ARNg et les ARN épissés viraux pour l'encapsidation. En effet, il a été montré que l'élimination des séquences introniques dans des fragments d'ARN épissés du HIV-2 modifie localement leur conformation, sans pour autant diminuer leur capacité de dimérisation (241). Comme le signal d'encapsidation de l'ARNg est localisé en amont du SD chez le HIV-2, il a été suggéré que les interactions entre éléments localisés en aval et en amont du SD pourraient faciliter la sélection de l'ARNg au détriment des ARN épissés lors de l'encapsidation (241). En effet, des interactions à longue distance ont été proposées chez HIV-2, HIV-1 et SIV impliquant les séquences entourant l'AUG initiateur de la traduction du gène *gag* (24). Ces séquences étant absentes des ARN épissés, ces résultats suggèrent que la conformation des ARN viraux pourrait fournir un mécanisme structural permettant de différencier la région 5' non traduite de l'ARNg de celle des ARN épissés (340) et de réguler la sélection d'encapsidation spécifique de l'ARNg.

3.3. Les ARN épissés forment des hétérodimères avec l'ARNg

Comme les ARN épissés du HIV-1 sont capables de dimériser *in vitro* via le DIS, ils sont théoriquement capables de former des hétérodimères avec l'ARNg, ce qui pourrait faciliter leur encapsidation et expliquer leur faible taux dans les particules virales (193, 264). Ces observations nous ont conduits à étudier l'efficacité d'hétérodimérisation *in vitro* des fragments d'ARN épissés du HIV-1 avec l'ARNg. Comme attendu, nous avons montré que tous les ARN épissés sont capables de former des hétérodimères avec l'ARNg. Ceci va tout à fait dans le sens des observations de l'équipe de M. Mougel (Montpellier) qui a montré que les ARN épissés du HIV-1 entrent en compétition avec l'ARNg pour un même mécanisme d'encapsidation (193). Il faut cependant noter que dans ce cas, le DIS ne joue pas le même rôle au sein des ARNg et des ARN épissés viraux pour leur encapsidation. Ces conclusions

sont quelque peu surprenantes mais la discrimination des ARNg et épissés pourraient s'expliquer par : l'établissement d'interactions à longue distance ou la formation exclusive de dimères d'ARNg ; par la formation d'interactions spécifiques entre le DIS et des facteurs protéiques stimulant l'incorporation de l'ARNg ou inhibant l'incorporation des ARN épissés dans la particule virale. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère plusieurs hypothèses concernant l'existence des hétérodimères entre ARNg et épissés dans la cellule : soit il n'y a pas formation d'hétérodimères *ex vivo*, soit les hétérodimères ne sont pas reconnus par la machinerie d'encapsidation. Dans tous les cas, ces deux hypothèses nécessitent une confirmation *ex vivo*.

3.4. La formation de dimères est contrainte par la structure

Nos résultats ont également montré que l'accessibilité du DIS est primordiale pour la formation d'hétéro- et d'homodimères puisque la dimérisation de long fragments d'ARN (jusqu'à 4000 nts) est favorisée durant la transcription *in vitro*. Les données bibliographiques dont nous disposons lors de la réalisation de ce travail en 2007 nous ont suggéré que les ARNg et épissés du HIV-1 étaient capables de former des homodimères et/ou des hétérodimères de façon précoce dans le noyau, pendant les étapes de transcription/épissage. Ce mécanisme avait déjà été proposé *in vitro* et *ex vivo* pour le MLV, par des expériences montrant que des ARNg s'associent préférentiellement en hétérodimères lorsqu'ils sont synthétisés à partir de provirus dont les sites d'intégration sont proches (142, 222, 362). Cette hypothèse va aujourd'hui à l'encontre d'une étude récente de WS. Hu (Fredericks, MD-USA) qui a mis en évidence que la formation des dimères d'ARNg du HIV-1 se faisait dans le cytoplasme (311). Ainsi, l'accessibilité du DIS, essentielle à la dimérisation, pourrait être modulée au sein du cytoplasme par des protéines chaperonnes cellulaires ou virale indéterminées. Cependant, il ne faut pas exclure le fait que des dimères peu stables puissent être formés dans le noyau, pendant la transcription, et que des réactions de stabilisation (protéines chaperonnes) aient lieu plus tardivement dans le cytoplasme.

Le MLV code pour un ARN épissé appelé SD', encapsidé sous forme d'hétérodimères avec l'ARNg. Lors de l'infection par le MLV, l'ARN SD' est généré soit par épissage de l'ARN pré-messager, soit par transcription directe d'un rétroélément épissé associé au virus. Ces deux voies de synthèse ont été étudiées par des approches génétiques permettant la production de l'ARN SD' par épissage du provirus, par transcription du rétroélément ou par synthèse à partir du provirus et du rétroélément insérés à proximité l'un de l'autre. Cette étude

a permis de montrer que l'hétérodimérisation de l'ARN SD' avec l'ARNg est couplée à la fois à la transcription et à l'épissage (298). Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la dimérisation peut avoir lieu dans le noyau au niveau de sites de transcription et d'épissage proches où l'ARN est en cours de structuration. Une dimérisation nucléaire des ARN du HIV-1 pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur l'épissage, l'export nucléaire, le transport, la localisation cellulaire, ou encore sur l'encapsidation (33, 259, 353, 413, 432). Cependant, bien que le MLV représente un autre modèle rétroviral pour la compréhension des mécanismes répliatifs du HIV-1, rien ne prouve que ces mécanismes s'appliquent aussi au HIV-1. Les derniers travaux de l'équipe de W.S. Hu mettant en évidence la formation de dimère au sein du cytoplasme de la cellule hôte (311) sont convaincants mais ils nécessitent néanmoins leur validation par une technique de visualisation directe des dimères d'ARN viraux dans les compartiments cellulaires.

II. Etude de la dimérisation *ex vivo* des ARN du HIV-1

1. Introduction et objectifs

Les rétrovirus encapsident deux copies d'ARNg associées en dimère au sein de leurs virions. L'une des conséquences de l'encapsidation de deux molécules d'ARN est de favoriser la recombinaison pendant la rétrotranscription (82, 194). Puisque la recombinaison est un événement fréquent chez le HIV-1, l'émergence de recombinants génétiquement différents ne peut être due qu'à l'encapsidation de deux molécules d'ARNg provenant de deux provirus différents (194). De plus, la dimérisation étant un pré-requis à l'encapsidation, l'émergence de recombinants suppose que les deux molécules d'ARN sont encapsidées sous forme d'hétérodimères (310). En effet, plusieurs tests de recombinaison ont montré que la formation d'hétérodimères entre deux molécules d'ARNg a bien lieu au sein de la cellule (310, 311, 366, 367). Par ailleurs, l'hétérodimérisation est dépendante de la séquence du DIS (71, 311).

Les ARN épissés du HIV-1 contiennent tous le DIS. Par ailleurs, nous avons précédemment montré que le DIS des ARN épissés est fonctionnel *in vitro* et permet la formation d'homo- et d'hétérodimères entre ARNg et ARN épissés (410). Chez le MLV, des hétérodimères entre ARNg et ARN épissés peuvent se former et être encapsidés efficacement dans les particules virales (297). Cependant, bien que les ARN épissés du HIV-1 soient capables de former des homo- et des hétérodimères *in vitro*, ces ARN ne sont encapsidés qu'à un faible taux dans les particules virales, suggérant que les ARN épissés du HIV-1 sont exclus de la machinerie d'encapsidation par des mécanismes encore inconnus : incapacité des ARN épissés du HIV-1 à former des dimères ou des hétérodimères dans la cellule, non reconnaissance de ces ARN épissés, délocalisation des ces ARN par rapport à l'ARNg, etc...

Afin de déterminer si les ARN épissés du HIV-1 ont la capacité de former des hétérodimères avec l'ARNg au sein de la cellule, nous avons développé une approche de capture de dimère d'ARN, dérivée d'une technique mise au point dans le laboratoire d'A. Telesnitsky (Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université du Michigan, Ann Arbor, USA) (141, 142) et récemment utilisée par M. Mougel pour l'étude de l'hétérodimérisation chez MLV (297). Contrairement à la technique précédente, qui nécessite une étape assez limitante d'hybridation d'une sonde oligonucléotidique à l'ARN viral en condition native, notre technique a l'avantage de permettre la capture directe de dimères grâce

à l'introduction dans l'ARN d'un motif aptamère capable de se lier à la streptavidine (419) (Figure 47).

Nous avons tout d'abord réalisé de nombreuses mises au point *in vitro* à partir de fragments d'ARN de 600 nucléotides, contenant un motif aptamère situé à différentes positions dans les régions 5' et 3' terminales de l'ARNg du HIV-1, afin de déterminer si l'introduction du motif permet toujours la dimérisation des ARN et leur purification en présence de billes de streptavidine. Puis nous avons tenté de purifier des dimères d'ARN dans un système cellulaire à partir de vecteurs exprimant l'ARNg du HIV-1 dépourvu du gène *env* dans lesquels les aptamères ont été également insérés à différentes positions dans les régions 5' et 3' non traduites. Après transfection de ces différentes constructions, les complexes purifiés ont été analysés par RT-PCR et Northern blot grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des ARN viraux.

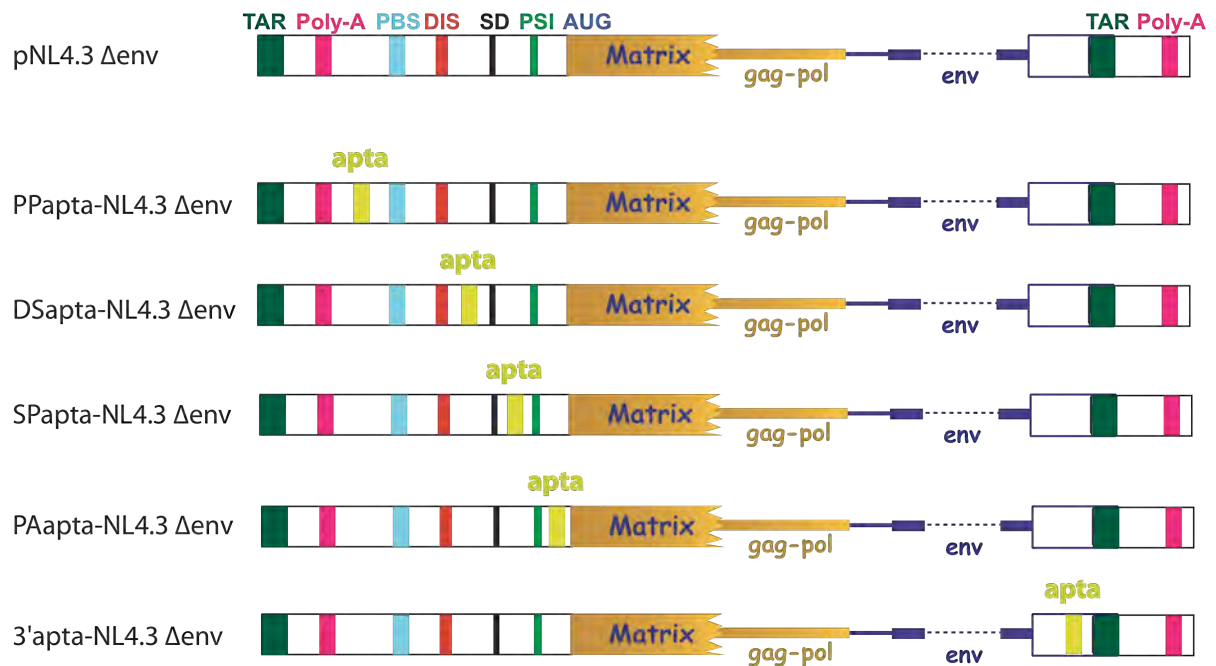
2. Matériels et méthodes

2.1. Constructions plasmidiques et synthèse d'ARN

Le plasmide pNL4.3 Δenv du HIV-1, correspondant au clone moléculaire pNL4.3 dépourvu du gène d'enveloppe, a été utilisé pour générer des constructions contenant l'insertion d'un motif aptamère capable d'interagir avec la streptavidine à différents endroits dans la région 5' non traduite (entre le polyA et le PBS : PPapta-NL4.3 Δenv , entre le DIS et le SD : DSapta-NL4.3 Δenv , entre le SD et le PSI : SPapta-NL4.3 Δenv , entre le PSI et l'AUG : PAapta-NL4.3 Δenv) et dans la région 3' non traduite (en amont de R : 3'apta-NL4.3 Δenv) (Figure 45).

Ces constructions mutantes ont été obtenues par mutagénèse dirigée (kit QuickChange Mutagenesis - Stratagene) à partir des plasmides pLTR5'-NL4.3 et pLTR3'-NL4.3, contenant respectivement les fragments AatII-SphI et AatII-BamHI du clone moléculaire pNL4.3 (336), en présence de différents couples d'oligonucléotides comportant les séquences à insérer (Annexe 1). Après confirmation de la présence de l'insertion par restriction et séquençage, les plasmides LTR5' et LTR3' ont été digérés respectivement par AatII-SphI et AatII-BamHI et les inserts ont ensuite été substitués à leur région homologue dans le plasmide pNL4.3 Δenv .

A



B

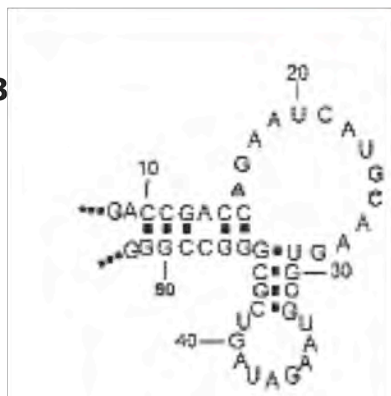


Figure 45 : Constructions plasmidiques utilisées dans cette étude. (A) Sites d'insertion du motif aptamère dans les plasmides apta-NL4.3 Δenv (PPapta-NL4.3 Δenv : insertion entre le polyA et le PBS, DSapta-NL4.3 Δenv : entre le DIS et le SD, SPapta-NL4.3 Δenv : entre le SD et le PSI, PAapta-NL4.3 Δenv : entre le PSI et l'AUG et 3'apta-NL4.3 Δenv : en amont de R). (B) Structure secondaire du motif aptamère.

D'autre part, les fragments correspondant aux 600 premiers nts des LTR5' et 3' contenant les insertions aptamères ont été amplifiés par PCR (4 min à 94°C ; puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 52°C, 1 min à 72°C) puis clonés en aval d'un promoteur T7 dans le plasmide pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Les plasmides ainsi obtenus (pCR-TOPO-PPapta, pCR-TOPO-DSapta, pCR-TOPO-SPapta, pCR-TOPO-PAapta et pCR-TOPO-3'apta) ont été linéarisés par EcoRI, avant d'être transcrits *in vitro* par la polymérase du bactériophage T7 afin de générer des fragments d'ARN de 600 nts contenant l'aptamère. Après 2 h à 37°C, le mélange

réactionnel a été incubé 1 h à 37°C en présence de DNaseI (MP Biomedicals), extrait au phénol et précipité à l'éthanol. Les ARN ont ensuite été purifiés sur colonne d'exclusion TSK G-2000SW (Biorad) et repris dans l'eau MilliQ. Ces mêmes ARN ont également été marqués co-transcriptionnellement par le radio-isotope $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ ATP (Amersham).

2.2. Mises au point *in vitro*

2.2.1. Capacité de dimérisation des fragments d'ARN viraux

La dimérisation des fragments d'ARN obtenus par transcription *in vitro* des plasmides contenant le DIS (série pCR-TOPO) est réalisée comme suit : 400 nM d'ARN froid sont dilués dans 8 μl d'eau Milli-Q (Millipore). Les échantillons sont dénaturés pendant 2 min à 90°C, puis refroidis 2 min dans la glace. La dimérisation est initiée par ajout de 2 μl de tampon dimère 5X concentré (concentration finale : 50 mM cacodylate de sodium, pH 7,5, 300 mM KCl, et 5 mM MgCl_2), puis les échantillons sont incubés pendant 30 min à 37°C. Après refroidissement dans la glace, 2 μl de solution de dépôt (bleu glycérol) sont ajoutés et les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose natif 0,8% contenant 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est réalisée à 4°C dans un tampon TBM (0,5 X Tris-Borate, 0,1 mM MgCl_2) à 7 V/cm. Après électrophorèse, les formes monomériques et homodimériques sont visualisées sous UV.

La capacité de dimérisation des fragments d'ARN contenant l'aptamère a également été vérifiée lors de la transcription *in vitro*. Dans ce cas, 1 μg de matrice ADN (pCR-TOPO-apta) est digéré par EcoRI puis transcrit *in vitro* dans un volume final de 20 μl . Après 2 h d'incubation à 37°C, les échantillons sont extraits au phénol/chloroforme et déposés directement sur un gel d'agarose natif à 0,8% contenant du bromure d'éthidium. La migration s'effectue à 4°C dans du tampon TBM. Les espèces monomériques et dimériques sont visualisées sous UV.

2.2.2. Cartographie en solution

2.2.2.1. Modification au sulfate de diméthyle

La cartographie en solution permet, à l'aide de sondes chimiques ou enzymatiques, de déterminer la structure secondaire des ARN. Dans notre étude, la structure secondaire des fragments d'ARN, correspondant aux 600 premiers nts de l'ARN contenant l'aptamère, a été

analysée grâce à l'utilisation de sulfate de diméthyle (DMS). Le DMS (Fluka) est une sonde chimique qui permet de modifier spécifiquement des bases non appariées aux positions N3 des cytosines, N1 des adénines et N7 des guanines. La modification des bases permet alors de déterminer leur accessibilité sur l'ARN. Seules les positions Watson-Crick (N1-A et N3-C) seront analysées dans notre étude.

La réaction doit être réalisée dans des conditions statistiques de manière à modifier au plus une position par molécule d'ARN. Après formation des dimères d'ARN au cours de la transcription *in vitro* et purification des bandes correspondant aux dimères par électro-élution, les échantillons sont repris dans un volume final de 20 µl d'eau Milli-Q, puis incubés pendant 30 min à 37°C après ajout de 4 µl de tampon dimère 5X concentré. Après 10 min d'incubation à température ambiante en présence de 2 µg d'ARNt total (*E.coli*) et addition de 0,8 µl de DMS (dilué au 1/20 dans l'éthanol 100%), les échantillons sont incubés pendant 0, 4 ou 8 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 2,3 µl d'acétate de sodium 3 M, puis les ARN sont précipités par ajout de trois volumes d'éthanol 100%. Après deux lavages à l'éthanol 80%, les ARN sont repris dans 7 µl d'eau Milli-Q.

2.2.2.2. Détection des modifications

La position des modifications sur l'ARN est révélée par extension à la transcriptase inverse d'une amorce radioactive s'hybridant dans la partie 3' du fragment d'ARN. La transcriptase inverse marquera un arrêt avant chaque position Watson-Crick modifiée. Ainsi, les ARN modifiés (7 µl), additionnés de l'amorce radioactive (100000 cpm), sont dénaturés pendant 2 min à 90°C/2 min à 0°C et renaturés pendant 10 min à température ambiante après ajout de 2 µl de tampon RTB 5X (concentration finale : 50 mM Tris HCl, pH 8,3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂). L'élongation est réalisée en présence de 2 U de transcriptase inverse aviaire (AMV, QBiogen) et de 100 µM de chacun des dNTP. Après 40 min à 42°C, les acides nucléiques sont précipités à -80°C en présence de 500 µl d'éthanol 100% et de 200 µl d'AcNa 0,3 M pH 5, puis lavés à l'éthanol 75% et repris dans 8 µl de bleu formamide. Après 2 min de dénaturation à 90°C, 4 µl d'échantillon sont déposés sur un gel PAGE 8%/urée 8M, TBE 1X et la migration s'effectue à 75 W pendant 3 h. Le gel est ensuite fixé pendant 10 min dans une solution d'acide acétique 5%/éthanol 10% et séché sous vide pendant 1 h à 80°C. Le gel est autoradiographié à -80 °C durant la nuit (Figure 46).

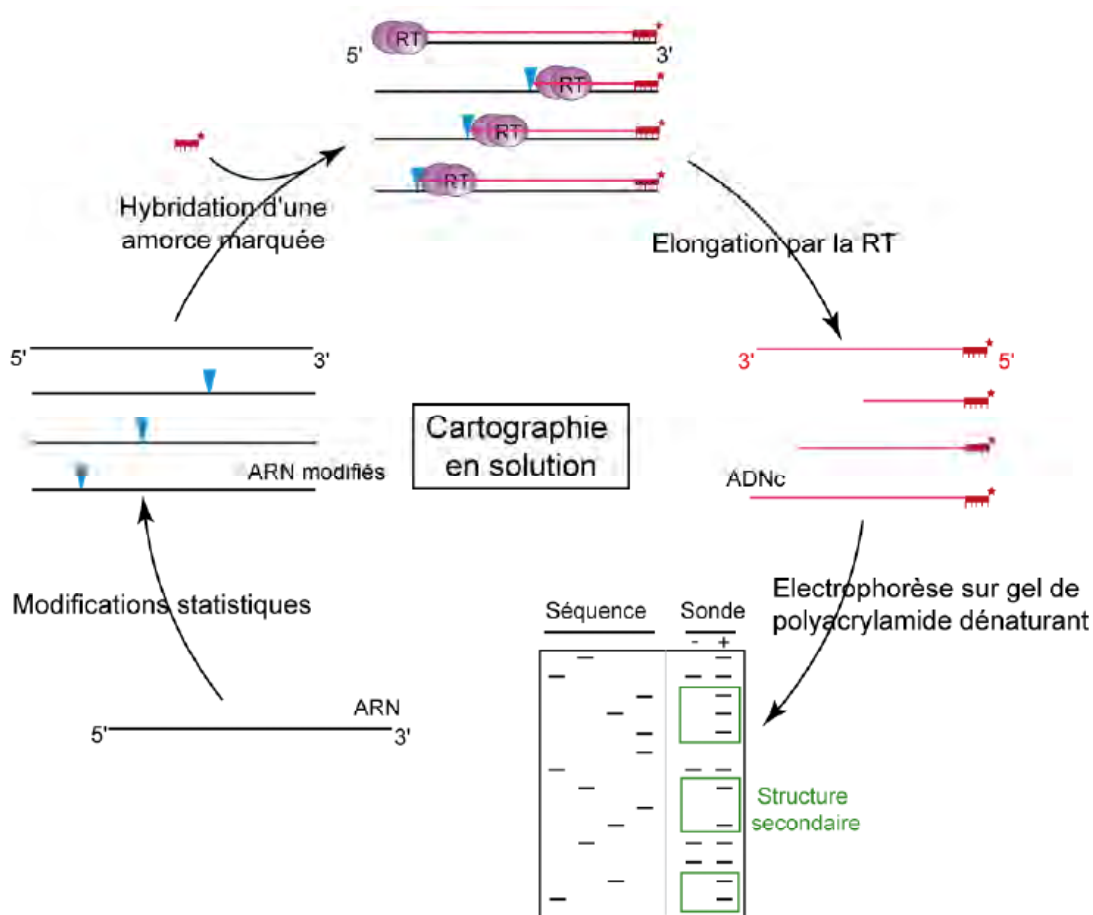


Figure 46 : Principe de la cartographie en solution. L'étoile rouge représente l'extrémité 5' de l'amorce marquée radioactivement et les flèches bleues, les modifications ou coupures sur l'ARN.

2.2.3. Capture des dimères d'ARN contenant l'aptamère

La capture des dimères d'ARN radioactifs contenant les aptamères est réalisée comme suit : 100 µl de billes de sépharose couplées à la streptavidine (GE Healthcare) sont saturés pendant 2 h en rotation à 4°C dans 500 µl de tampon NHED (0,1 % NP40, 50 mM HEPES, pH 7,5, 0,2 mM EDTA, et 0,5 mM DTT) additionné de 0,2 mg/ml de BSA, 0,2 mg/ml de SSD et 40 U de RNasine (Promega). Parallèlement, 1 000 000 cpm d'ARN sont dilués dans 50 µl d'eau Milli-Q, puis dénaturés 2 min à 90°C/2 min à 0°C. La renaturation des échantillons est initiée par ajout de 50 µl de tampon de renaturation 2X (concentration finale : 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) additionnés de 40 U de RNasine, puis les échantillons sont incubés pendant 15 min à 37°C. Après renaturation, les ARN sont liés aux billes de streptavidine, préalablement saturées pendant 5 h à température ambiante en rotation dans le tampon de liaison (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycérol) additionné de 40 U de RNasine, dans un volume final de 600 µl. Après 3

lavages dans le tampon de liaison, les ARN retenus sur les billes sont élués en condition native pendant 2 h à température ambiante en rotation dans 500 µl de tampon de liaison contenant 5 mM de biotine (Sigma-Aldrich). La quantité d'ARN élue est déterminée par comptage des fractions en mode Cerenkov (Beckman Coulter LS 6000). Les fractions récoltées sont ensuite précipitées et diluées dans 20 µl d'eau Milli-Q. Enfin, 10 000 cpm d'échantillons additionnés de 2 µl de solution de dépôt (bleu glycérol) sont déposés sur un gel d'agarose natif 0,8%. L'électrophorèse est réalisée à 4°C dans un tampon TBM 0,5X à 7 V/cm et les formes monomériques et dimériques sont visualisées après autoradiographie.

2.3. Mises au point *ex vivo*

2.3.1. Transfection et extraction des ARN et des protéines dans les cellules et dans les virions

La lignée de cellules adhérentes HEK-293T dérive de cellules embryonnaires rénales humaines. Ces cellules 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% CO₂.

Un jour avant la transfection, 3.10⁶ cellules 293T sont réparties dans des boîtes 10 cm afin d'obtenir une confluence de 60-70 % le lendemain. Les cellules sont transfectées transitoirement par précipitation au phosphate de calcium comme suit : 10 µg d'ADN (plasmides pUC, pNL4.3 Δenv ou papta-NL4.3 Δenv) sont incubés à une concentration finale de 20 µg/ml dans une solution d'HBS pH 7,05 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 5,6 mM dextrose, 20 mM HEPES) et de CaCl₂ (125 mM final), pendant 15 min à température ambiante. Les complexes ADN/CaCl₂ sont ensuite répartis sur les boîtes qui sont alors 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 NaH₂PO₄ et 2 mM Na₂HPO₄), lavées puis lysées. Afin d'extraire les ARN totaux, les cellules sont lysées dans 1 ml de TriReagent (Sigma) selon les recommandations du fournisseur. Les protéines totales sont récupérées après incubation des cellules pendant 20 min dans la glace dans 500 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), puis centrifugation à 12000g pendant 1 h à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré.

Les virions sont récoltés par centrifugation des surnageants de culture des cellules 293T à 1800g pendant 10 min pour enlever les cellules et débris cellulaires, puis filtrés sur une membrane de 0,22 μm . Les virions sont sédimentés par ultracentrifugation sur un coussin de sucrose de 2 ml (20%, PBS 1X) à 131 000g pendant 2 h à 4°C, dans un rotor SW28. Les virions sont soit repris dans 1 ml de TriReagent pour récupérer les ARN totaux ou dans 80 μl de RIPA 1X pour collecter les protéines totales.

2.3.2. Test d'activité de la rétrotranscriptase (RT)

Afin de déterminer l'activité RT contenue dans les virions produits après transfection, 100 μl de surnageant de culture, renfermant les particules virales, sont incubés pendant 10 min à 4°C dans un tampon de lyse (0,5% Triton X-100, 75 mM KCl, 50 mM DTT) afin de perméabiliser les virions (volume final 115 μl). Soixante quinze μl de ce mélange sont ensuite incubés pendant 1 h à 37°C dans un volume réactionnel de 100 μl contenant le tampon d'activité RT (0,5% Triton X-100, 75 mM KCl, 50 mM DTT, 40 mM Tris-HCl pH 8,3, 4 mM MgCl_2) en présence de 0,7 μM de poly-rA/dT et de 1,3 μCi de $\{^3\text{H}\}$ dTTP, utilisés respectivement comme matrice et substrat de la réaction de rétrotranscription. Les échantillons sont ensuite déposés sur papier Wattman et plongés dans des bains de SSC 2X (NaCl 300 mM, citrate de sodium 30 mM) successifs, puis dans un bain d'éthanol 100% afin d'arrêter la réaction. Après ajout du liquide de scintillation, la radioactivité incorporée est comptée dans un compteur Beckman Coulter LS 6000.

2.3.3. Western blot

Vingt μl des extraits protéiques viraux, ainsi que 30 μg de protéines cellulaires, quantifiées par la technique de Bradford, sont repris dans du tampon NuPAGE LDS sample buffer 4X, dénaturés 10 min à 70°C, puis déposés sur un gel de polyacrylamide de gradient 4-12% (NuPAGE-Invitrogen). La migration électrophorétique s'effectue dans un tampon MOPS à 200 V pendant environ 45 min à température ambiante.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nylon (Hybond P, Amersham). Après l'activation de la membrane au méthanol pendant 10 s et son équilibration dans le tampon de transfert (25 mM bicine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA et 10% méthanol) pendant 15 min, le gel est déposé sur celle-ci et les protéines sont transférées en condition liquide pendant 1 h 30 à 30 V.

Après transfert, les sites de fixation non spécifiques de la membrane sont bloqués pendant 1 h à température ambiante sous agitation dans du TNT 1X (0,1% triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) additionné de lait en poudre (20 g/l final). La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire (sérum immun d'un patient séropositif fourni par Johnson Mak, Melbourne-Australie) dilué au 1/3000^e dans du TNT 1X. Après deux lavages de 5 min dans du TNT 1X à 4°C sous agitation, la membrane est incubée pendant 1 h à 4°C dans du TNT 1X contenant un anticorps secondaire anti-humain (Healthcare) couplé à la peroxydase et dilué au 1/3000^e. La membrane est ensuite lavée deux fois dans le TNT 1X pendant 5 min et une fois dans la solution TN 1X (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) pendant 5 min sous agitation à 4°C. Les protéines sont ensuite révélées par chémiluminescence après incubation de la membrane dans un milieu ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce Western Blotting Substrate) pendant 1 min.

2.3.4. Capture des dimères et vérification par RT-PCR et Northern blot

Après transfection de cellules 293T par les différentes constructions et extraction des ARN cellulaires, 50 µg d'ARN totaux sont utilisés afin de capturer les formes homo- et hétérodimériques par liaison à des billes de sépharose couplées à la streptavidine (§ II.2.2.3.). Les ARN récupérés seront ensuite analysés par RT-qPCR ou Northern blot en condition native, permettant ainsi la visualisation directe des homo- et des hétérodimères récoltés grâce à un jeu de sondes spécifiques des ARNg ou épissés (Figure 47).

2.3.4.1. RT-PCR

Afin de vérifier que l'insertion du motif aptamère permet la capture des ARN viraux, nous avons réalisé des expériences de RT-PCR avant et après capture sur billes de streptavidine. Les ARN récoltés dans les deux cas sont d'abord rétrotranscrits (Superscript III Platinum Two-Step qRT-PCR-Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite soumis à une PCR (4 min à 94°C ; 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 50°C, 2 min 30 à 72°C) en présence de la polymérase DreamTaq (Fermentas). Les amorces utilisées ont été choisies de manière à amplifier spécifiquement des fragments d'ADN correspondant au gène *gag* de l'ARNg du HIV-1 (oligonucléotides pS 1-15 : 5'-ATGGGTGCGAGAGCG-3' et pAS 2240-2255 : 5'-GTCATGCTACTGG-3'). Après amplification, 2 µl de solution de dépôt sont ajoutés et les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose TBE 1X (90 mM Tris-Borate, 2,5 mM EDTA) à 0,8% contenant 0,5 µg/ml de

bromure d'éthidium. L'électrophorèse est réalisée à 4°C dans un tampon TBE 1X à 7 V/cm. Après électrophorèse, les fragments amplifiés sont visualisés sous UV.

2.3.4.2. Northern blot

Les ARN récoltés ont également été contrôlés par Northern blot dénaturant. Les échantillons d'ARN récoltés avant et après capture ont été repris dans du bleu formamide, dénaturés 5 min à 90°C, puis déposés sur un gel d'agarose dénaturant (10 mM MOPS, 4 mM AcNA, 0,5 mM EDTA, 7% formaldéhyde) à 0,9%. La migration électrophorétique s'effectue dans du tampon MOPS additionné de 6,7% de formaldéhyde, à 90 V pendant environ 2 h à température ambiante.

Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane de nylon (Hybond N+, Amersham). Après équilibration de la membrane dans le tampon de transfert NaPi (25 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ à pH 6,5) pendant 5 min, celle-ci est déposée sur le gel et l'ensemble est placé entre deux feuilles de papier Whatman imprégnées de tampon de transfert. Le transfert des ARN sur la membrane est effectué en condition liquide à 4°C dans le tampon NaPi pendant 2 h à 250 mA.

Après transfert, les acides nucléiques sont fixés aux UV (Stratalinker, Stratagene) et les sites de fixation aspécifiques de la membrane sont bloqués pendant 20 min à 60°C dans 15 ml de solution d'hybridation Perfecthyb plus (Sigma). La sonde spécifique du gène *gag*, obtenue par PCR du plasmide pNL4.3 avec les oligonucléotides pS 1-15 et pAS 2240-2255 préalablement décrit, est marquée à l'α-³²P dATP grâce au kit DECAprime II (Ambion), puis dénaturée 5 min à 90°C, avant d'être ajoutée à la solution d'hybridation. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 60°C. Le lendemain, après 2 lavages de 5 min dans une solution SSC 2X (NaCl 300 mM, citrate de sodium 30 mM), SDS 0,1% à 42°C, puis de 15 min dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1% à 42°C, la membrane est séchée puis analysée au Bio-Imager (logiciel ImageGauge) avant d'être autoradiographiée.

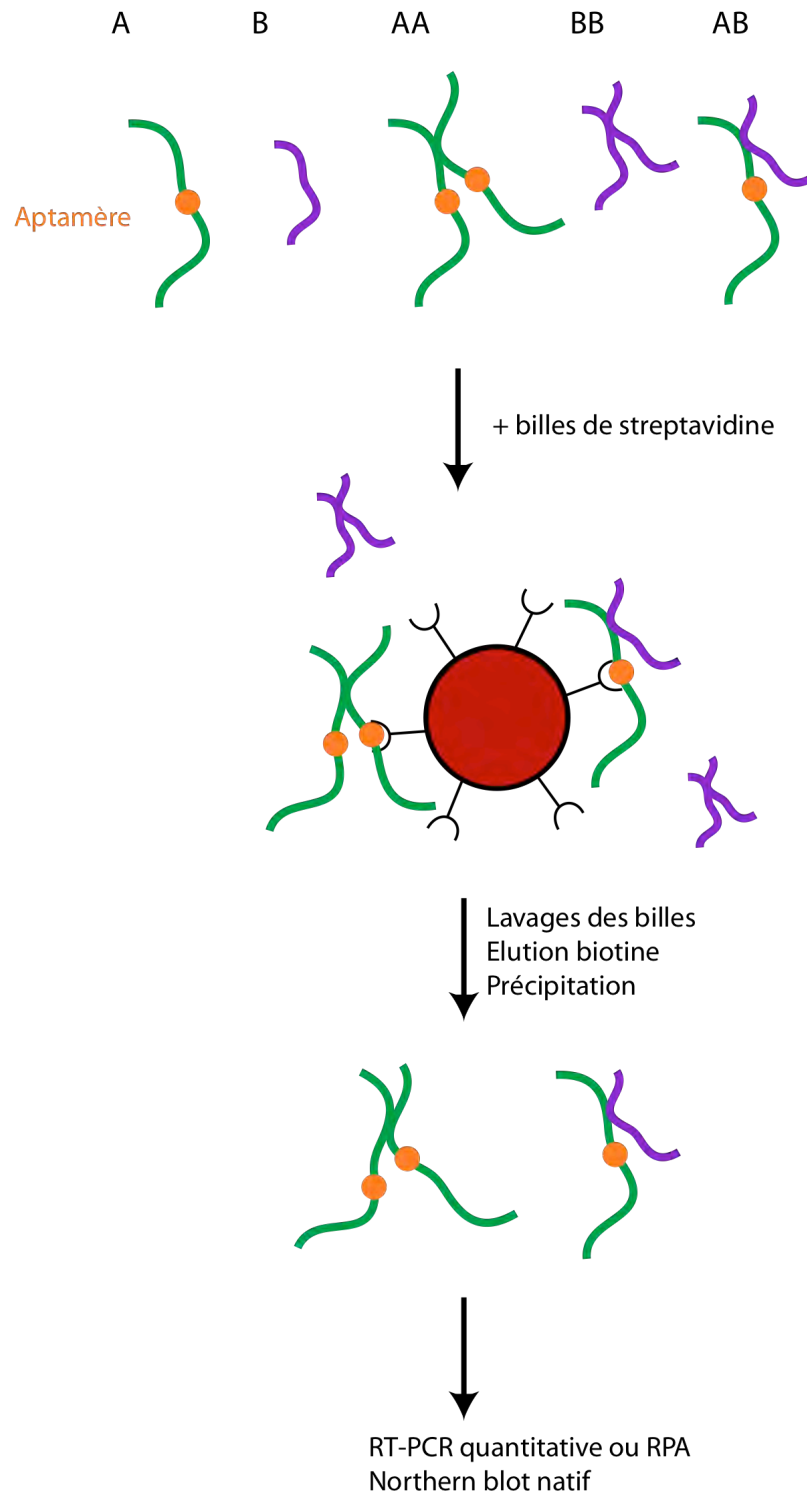


Figure 47 : Technique de capture des dimères d'ARN contenant un motif aptamère. Les différents dimères obtenus après extraction des ARN A et B issus de cellules ou de virions sont représentés sous leurs différentes formes : homodimère AA, hétérodimère AB et homodimère BB. Le motif aptamère présent dans l'ARN permet d'isoler les dimères sur billes de sépharose recouvertes de streptavidine. Après lavages, les ARN sont élués en condition native en présence de biotine. Les ARN des différentes fractions sont ensuite quantifiés par RT-qPCR et les formes homo- et hétérodimériques sont visualisés par Northern blot natif grâce à des sondes spécifiques des ARNg et épissés.

3. Résultats

3.1. Mises au point *in vitro*

3.1.1. Le choix du site d'insertion du motif aptamère influence la dimérisation des fragments d'ARN *in vitro*

La présence d'un motif aptamère dans le génome du HIV-1 capable d'interagir spécifiquement avec la streptavidine doit nous permettre de purifier spécifiquement les ARN viraux en condition native. Comme l'insertion d'un motif peut déstabiliser la structure secondaire de l'ARN et/ou affecter sa dimérisation, nous avons étudié dans un premier temps la capacité de dimérisation *in vitro* de plusieurs fragments d'ARN synthétiques du HIV-1 contenant ce motif à différentes positions (ARN de 600 nts). Après incubation des ARN à 37°C dans des tampons de faible et haute force ionique, favorisant respectivement les formes mono- et dimériques, et analyse sur gel d'agarose natif, nous observons des taux de dimères différents pour les ARN testés (Figure 48A). Les ARN DS, SP et PA migrent préférentiellement comme des monomères en condition dite "dimérique" et présentent un taux de dimère compris entre 8 et 24%. Seul l'ARN PP dimérise à un taux similaire à celui de l'ARNg WT ne contenant pas l'insertion (64% contre 67%).

Pour éviter tout artefact dû à l'étape de dénaturation/renaturation, nous avons réalisé ces mêmes expériences de dimérisation mais cette fois-ci au cours de la transcription *in vitro*, à partir des matrices pCR-TOPO-apta. Comme observé dans notre étude de dimérisation *in vitro* des ARN épissés du HIV-1 (Chapitre I), les ARN contenant l'aptamère dimérisent plus efficacement pendant cette étape de transcription (Figure 48B). Néanmoins, une fois de plus, les ARN DS, SP et PA dimérisent à un taux plus faible que l'ARNg wild-type (Figure 48B). L'ARN PP dimérise quant à lui à un taux similaire à celui de l'ARNg (environ 82%).

L'ensemble de ces résultats montre que le motif aptamère n'affecte pas la dimérisation lorsqu'il est inséré entre le polyA et le PBS. À l'inverse, lorsqu'il est inséré dans la région leader, ce motif réduit le taux de dimérisation des fragments d'ARN du HIV-1. Cela suggère que l'insertion de ce motif, bien que constituant, a priori, un domaine indépendant, à proximité du DIS agit négativement sur l'efficacité de dimérisation, soit par encombrement stérique, soit en affectant la structure secondaire et/ou tertiaire de l'ARNg. Cependant, nos résultats indiquent que la dimérisation de chaque construction est efficace lors de la

transcription *in vitro*, mettant de nouveau en évidence l'importance de la structuration de l'ARN et de l'accessibilité du DIS pendant la synthèse de l'ARN.

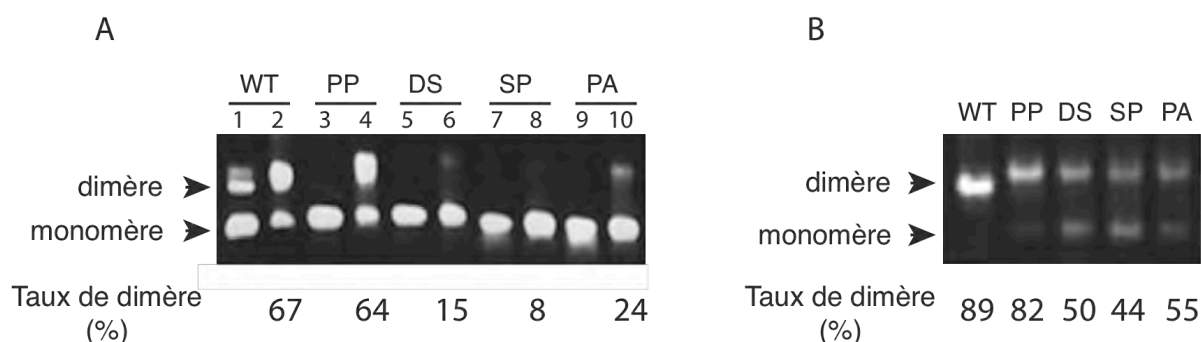


Figure 48 : Dimérisation *in vitro* des ARN du HIV-1 contenant le motif aptamère. (A) Formation de dimères. Les fragments d'ARN sont incubés en présence de tampons favorisant la formation de monomères (faible force ionique, pistes impaires), ou de dimères (haute force ionique, pistes paires), puis sont déposés sur gel agarose natif à 0,8% (TB 0,5X, 0,1 mM MgCl₂) contenant du bromure d'éthidium. (B) Formation de dimères pendant la transcription *in vitro*. Les ARN ont été transcrits *in vitro* puis analysés sur gel d'agarose natif comme précédemment. La localisation des monomères et des dimères est indiquée. Le nom de chaque ARN est indiqué au dessus du gel (WT : wild-type).

3.1.2. La structure secondaire du DIS est conservée au sein des dimères d'ARN

Les différences de taux de dimérisation observées précédemment peuvent être due à des modifications de la structure secondaire des ARN, plus particulièrement au niveau du DIS. Afin de déterminer si l'insertion du motif aptamère déstabilise la structure secondaire du DIS et par conséquent la dimérisation, nous avons cartographié au DMS la région entourant le DIS (région 250-350), après purification sur gel des dimères formés au cours de la transcription *in vitro* (Figure 49A et B).

Nous avons ensuite comparé le profil de réactivité des adénines et des cytosines dans les ARN renfermant l'aptamère à celui de l'ARN wild-type. De façon surprenante, le profil de réactivité global de la tige-boucle SL1 des différents ARN testés est similaire à celui de l'ARN wild-type (Figure 49) : (1) les 3 nts puriniques A255, A256 et A263 de part et d'autre de la séquence auto-complémentaire du DIS sont réactifs et par conséquent accessibles. De même, le nt A263 présente une hyper-réactivité vis-à-vis du DMS, comme cela a été constaté pour l'ARN wild-type du HIV-1 (343) ; (2) les cytidines de la séquence auto-complémentaire (C258, C260 et C262) restent quant à elles protégées de l'attaque du DMS, suggérant l'implication de ces bases dans l'interaction boucle-boucle. Nous avons également observé que la conformation de la région située en amont du DIS (nts 100-250) est similaire dans tous

les ARN testés, suggérant que l'insertion du motif aptamère n'affecte pas significativement la région 5'-terminale des ARN et qu'ils adoptent la même structure secondaire en domaines (TAR, polyA, PBS, DIS) que celle préalablement déterminée.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que le DIS des ARN-Aptamère se structure en tige-boucle et que sa boucle interagit avec son complémentaire sur l'autre molécule d'ARN, comme dans les complexes boucle-boucle formés entre deux molécules d'ARNg wild-type.

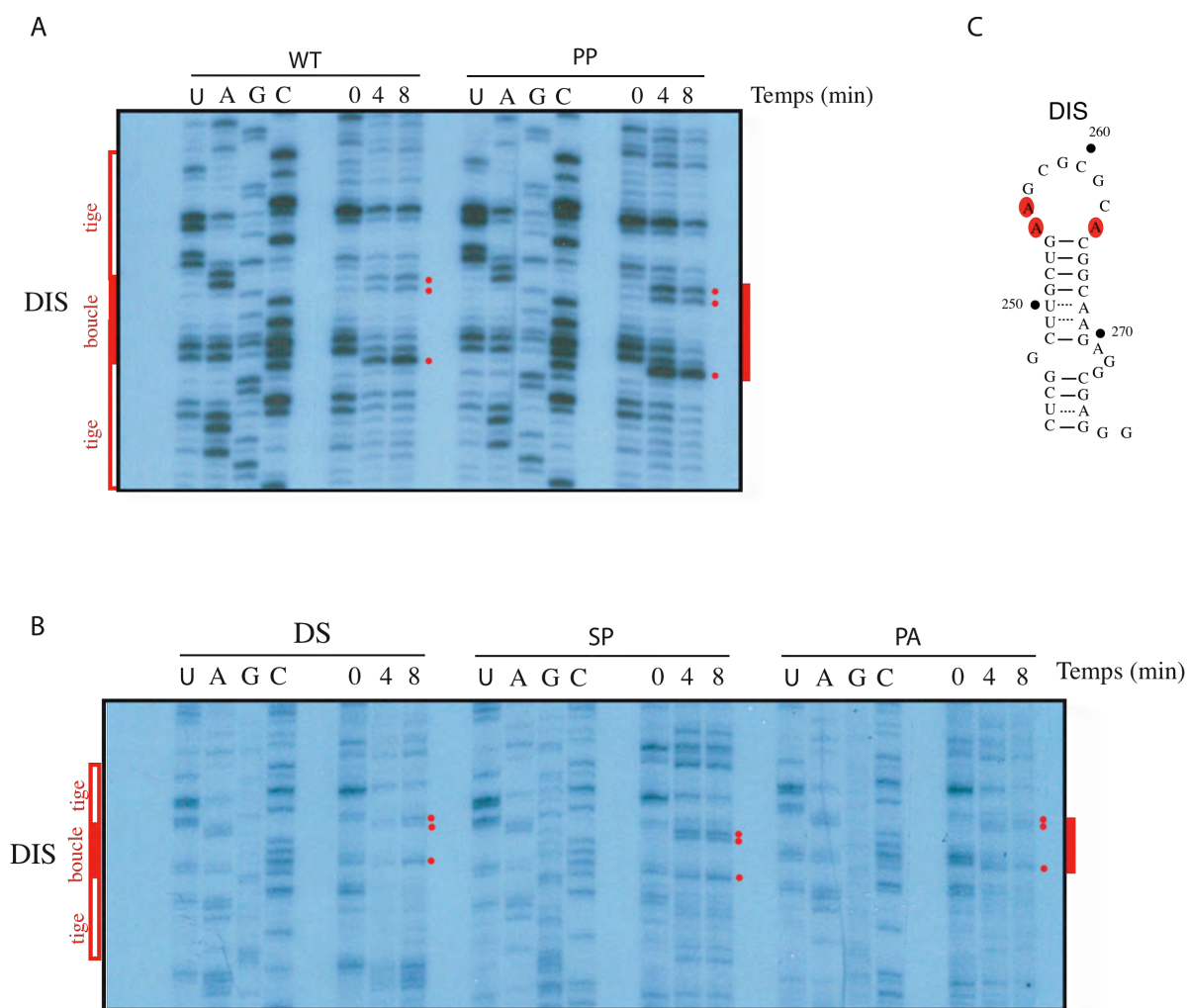


Figure 49 : Structure secondaire du DIS des ARN contenant l'aptamère. (A) (B) Les ARN ont été modifiés au DMS puis la position des bases modifiées a été révélée par extension d'amorce avant dépôt sur un gel de polyacrylamide 8% dénaturant. Les pistes U, A, G et C correspondent à la séquence de l'ARN. La position du DIS est indiquée. Les 3 points rouges représentent les trois purines qui entourent la séquence auto-complémentaire du DIS (nts A255, A256 et A263). (C) Structure secondaire du DIS de l'ARNg. Les nts réactifs au DMS sont entourés en rouge.

3.1.3. La renaturation des ARN viraux défavorise la liaison de l'aptamère à la streptavidine

Afin de déterminer si le motif aptamère permet la capture spécifique des ARN viraux en condition native, nous avons réalisé de multiples mises au point *in vitro* afin de déterminer les conditions optimales de capture d'ARN sur des billes de sépharose couplées à la streptavidine. Avant d'induire la liaison des différents fragments d'ARN radio-marqués synthétiques contenant le motif aptamère, les billes de sépharose sont préalablement saturées pendant 2 h en présence de SSD et de BSA et les ARN sont incubés 15 min à 37°C dans un tampon favorisant leur renaturation. Les ARN sont ensuite incubés en présence des billes pendant 5 h dans un tampon de liaison. Enfin, le taux de rétention des ARN sur les billes est quantifié (Tableau 2) et les ARN retenus sont élués en présence de biotine libre. Nous observons que tous les fragments d'ARN testés sont retenus à un faible taux sur les billes de streptavidine. En effet, malgré de nombreuses mises au point concernant la composition des tampons de saturation des billes, de renaturation des ARN et de liaison, le taux de rétention des fragments d'ARN contenant l'aptamère reste faible, et toujours compris entre 0,3 et 6%, alors qu'il est de 0,1% pour l'ARN WT ne contenant pas ce motif et de 60% pour un fragment d'ARN biotinylé (contrôle positif). En revanche, l'étape d'éluion par la biotine est efficace puisque nous récupérons plus de 80% des ARN retenus.

	Taux de rétention après renaturation	Taux de rétention sans renaturation
ARNg WT	0,1 %	1 %
ARNg biotinylé	60 %	90 %
ARN PP-apta	1,5 %	ND
ARN DS-apta	0,5 %	ND
ARN SP-apta	0,3 %	ND
ARN PA-apta	6 %	50 %
ARN 3'-apta	2,2 %	ND

Tableau 2 : Taux de rétention des ARN synthétiques sur billes de sépharose couplées à la streptavidine avec ou sans renaturation préalable (déterminé par comptage des fractions en mode Cerenkov). ND : non déterminé.

Afin de déterminer si la conformation de l'ARN affecte la liaison de l'aptamère à la streptavidine, nous avons réalisés la même expérience mais sans renaturation préalable de l'ARN. Ici, seul l'ARN PA-apta, dont le taux de rétention sur bille est le plus élevé (6%), a été analysé (Tableau 2). Dans ce cas, nous observons que le taux de rétention de l'ARN PA-apta passe de 6 à 50%, alors que l'ARN biotinylé est retenu à 90% (Tableau 2). La phase d'élution reste dans ce cas aussi efficace (élution > 85%).

Enfin, après ces différentes étapes d'hybridation et d'élution (+/- renaturation), l'ARN PA-Apta est précipité et analysé sur un gel d'agarose natif, afin de déterminer la nature de l'ARN élué (Figure 50). Comme attendu, l'ARN n'ayant pas subi de renaturation préalable est purifié sous forme monomérique (Figure 50, piste 2). En revanche, l'ARN PA-apta purifié après renaturation est lui aussi sous forme monomérique (Figure 50, piste 3). Ce résultat, quelque peu décevant, suggère que cette technique ne permet pas, dans ces conditions, de visualiser directement les dimères d'ARN après élution des billes de sépharose ou que les dimères formés pendant leur incubation sont détruits au cours de la purification.

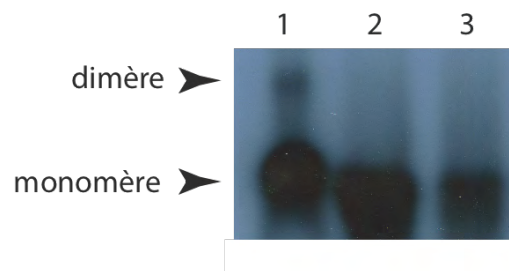


Figure 50 : Nature de l'ARN PA-apta élué des billes de sépharose. Les échantillons sont élués à la biotine, précipités, et déposés sur gel agarose natif à 0,8% (TB 0,5X, 0,1 mM MgCl₂). Un contrôle de dimérisation de l'ARN PA-apta dans le tampon de renaturation est déposé en piste 1. Les piste 2 et 3 correspondent respectivement à l'ARN PA-Apta préalablement renaturé ou non. Les monomères et les dimères sont indiqués (autoradiographie).

L'ensemble de ces résultats suggère que la structure secondaire et/ou tertiaire des ARN affecte la présentation du motif aptamère, défavorisant ainsi la liaison à la streptavidine. Cependant, la technique appliquée aux ARN non renaturés montre que les conditions mises en place pour la capture des ARN contenant l'aptamère sont optimales, le faible taux de rétention de l'ARN contrôle sans motif étant probablement dû à des phénomènes structuraux. Néanmoins, l'analyse après élution d'ARN exclusivement sous forme monomérique suggère que la formation préalable de dimères empêche la rétention des ARN contenant l'aptamère, probablement par des effets stériques. Une insertion du motif aptamère à plus longue distance du DIS serait peut être souhaitable (sites à définir).

3.2. Mises au point *ex vivo*

Parallèlement aux études *in vitro*, nous avons réalisé des tests *ex vivo* afin de déterminer si l'insertion du motif aptamère permet la production de particules virales et s'il permet la purification spécifique d'ARN viraux.

3.2.1. Les constructions contenant l'aptamère permettent la production de particules virales

* Test d'activité RT

Les virions obtenus 48 h après transfection de cellule HEK-293T avec les différentes constructions NL4.3 Apta- Δenv ont été analysés quant à leur activité RT (Tableau 3). Quel que soit le site d'insertion du motif aptamère, l'activité RT des constructions contenant ce motif est réduite d'au moins 5 fois, suggérant que l'insertion interfère de façon significative avec la quantité de virions produite et affecterait l'assemblage.

	Activité RT dans les surnageants
NL4.3 Δenv	100 %
NL4.3 DS-apta Δenv	17 %
NL4.3 PA-apta Δenv	23 %
NL4.3 3'-apta Δenv	17 %

Tableau 3 : Activité RT des différentes constructions. Les valeurs ont été normalisées à celle de la construction NL4.3 WT.

* Western blot

La synthèse protéique virale, ainsi que la production de virion ont été analysées par Western blot 48 h après transfection de cellule HEK-293T avec les constructions NL4.3 Δenv , NL4.3 DS-apta Δenv , NL4.3 PA-apta Δenv et NL4.3 3'-apta Δenv . Après quantification des protéines cellulaires par la technique de Bradford, une quantité équivalente d'extrait cellulaire et un volume constant de virions a été déposée sur gel SDS-PAGE puis analysée par western blot (Figure 51). De façon intéressante, les précurseurs Pr55^{Gag} et la protéine de capsid sont détectés aussi bien dans les cellules transfectées que dans les particules virales. De même, la

maturation du précurseur Pr55^{gag} est comparable à celle de la construction wild-type puisque la capsid (CAp24) est visible dans tous les cas (Figure 51). Ainsi, l'insertion du motif aptamère n'affecte ni la synthèse protéique, ni la maturation des particules virales.

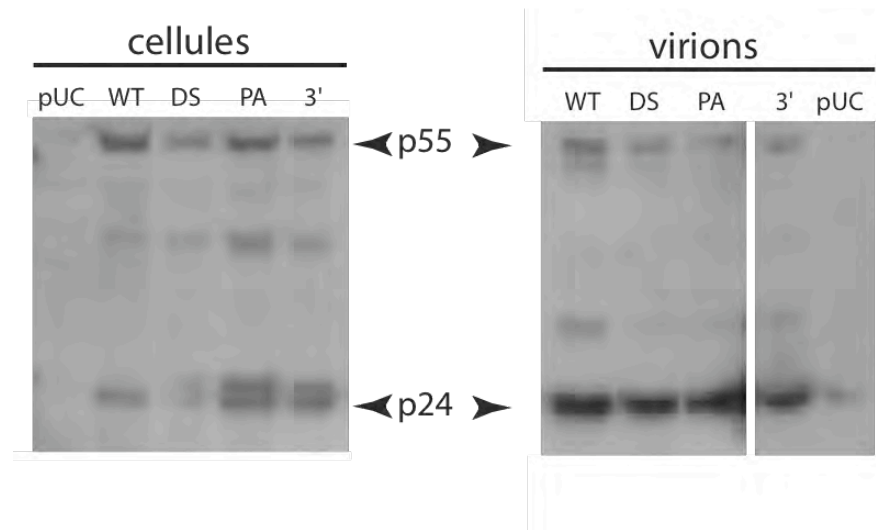


Figure 51 : Analyse par western blot des cellules et des virions après transfection des différentes constructions permettant la production d'ARN viraux contenant un motif aptamère. Le nom de chaque construction est indiqué (WT : construction NL4.3 Δenv , DS : NL4.3 DS- $apta\Delta env$, PA : NL4.3 PA- $apta\Delta env$, 3' : NL4.3 3'- $apta\Delta env$, pUC, contrôle négatif). Les protéines virales Pr55^{gag} et CAp24 sont détectées grâce à un sérum de patients séropositif.

3.2.2. Les constructions ne permettent pas la capture d'ARN *ex vivo*

Après transfection de cellules HEK-293T par les différentes constructions NL4.3 $Apta\Delta env$ et purification des ARN totaux, ces derniers sont soumis à une expérience de capture en présence de billes de sépharose couplées à la streptavidine (paragraphe II.2.2.3.). Ensuite, les échantillons récoltés sont analysés par RT-PCR et Northern blot afin de déterminer la quantité et la nature des ARN viraux purifiés.

* RT-PCR

Nous avons tout d'abord réalisé des expériences de RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux ou après capture des ARN viraux. L'utilisation d'amorces spécifiques au gène *gag* permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 2 kb qui est ensuite analysé sur gel agarose 0,8%. Alors que les produits d'amplification sont toujours détectés après extraction cellulaire (Figure 52, pistes 1, 3 et 5), ces fragments ne sont plus observés après capture sur bille de streptavidine (Figure 52, pistes 2, 4 et 6), suggérant que l'ARN contenant l'aptamère n'est pas retenu sur les billes ou que les quantités sont trop faibles pour être détectées.

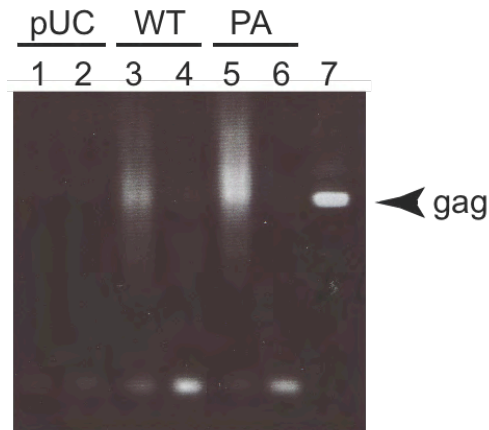


Figure 52 : Amplification d'un fragment d'ADN spécifique à l'ARNg par RT-PCR avant (pistes 1, 3 et 5) et après capture d'ARN (pistes 2, 4 et 6). Le fragment *gag* de 2 kb amplifié à partir du plasmide pNL4.3 Δenv a été déposé en piste 7 comme contrôle. Le nom des constructions utilisées pour la transfection des cellules 293T est indiqué en haut du gel (WT : construction NL4.3 Δenv , PA : NL4.3 PA-*apta* Δenv).

* *Northern blot*

Les ARN récoltés ont également été analysés par Northern blot dénaturant avant et après capture, grâce à une sonde de 2 kb spécifique au gène *gag*. Une fois de plus, nous observons que les ARN viraux ne sont détectés qu'avant l'étape de capture (Figure 53).

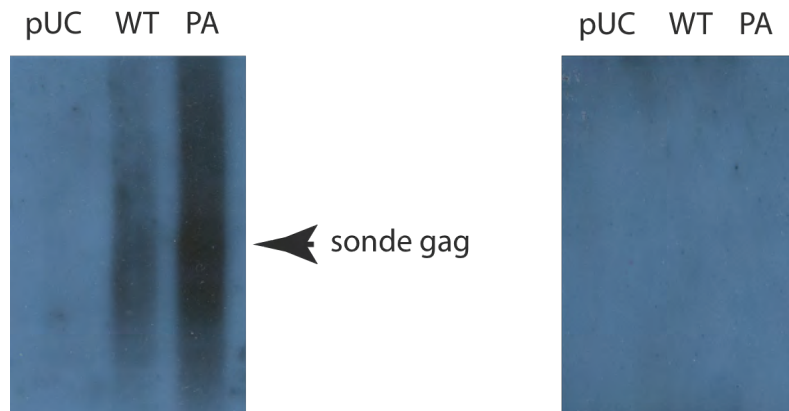


Figure 53 : Northern blot des ARN cellulaires totaux : à gauche avant capture d'ARN ; à droite après capture. Le fragment détecté par la sonde *gag* est indiqué.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'insertion du motif aptamère dans la région 5' terminale de l'ARNg du HIV-1 ne permet pas la purification des ces ARN par la technique de capture. En revanche, l'insertion du motif dans la région 5' de l'ARNg permet toujours la production et la maturation de Gag, ainsi que la formation de particules virales, suggérant que la structuration globale de la région 5' terminale de l'ARNg ne doit pas être perturbée par cette mutation.

4. Discussion

Au cours du processus d'encapsidation, l'ARNg du HIV-1 est préférentiellement sélectionné en dimère parmi une multitude d'ARN cellulaires et viraux. Récemment, il a été montré que le DIS est l'élément majeur d'encapsidation de l'ARNg (193). Cependant, bien que ce motif soit également présent sur tous les ARN épissés viraux du HIV-1, il ne favorise pas leur encapsidation et ces ARN sont largement exclus des particules virales. Par ailleurs, nous avons préalablement observé que le DIS des ARN épissés est fonctionnel *in vitro* (410), nous conduisant à nous interroger sur la capacité de ces ARN à former des homo- et surtout des hétérodimères avec l'ARNg dans la cellule hôte, ce qui faciliterait leur encapsidation. Afin de déterminer si la formation d'hétérodimères entre ARNg et épissés est possible, le laboratoire d'A. Telesnitsky a développé une technique de capture spécifique de l'ARNg du MLV, permettant la purification de formes homo- et hétérodimériques (141, 142). Cette technique repose sur la capture de l'ARNg par l'intermédiaire de l'hybridation d'un oligonucléotide couplé à la biotine. Le complexe formé est ensuite purifié sur des billes de streptavidine, élué en condition dénaturante (afin de dissocier l'oligonucléotide couplé à la biotine) et enfin analysé par RPA et RT-QPCR (Figure 34). L'emploi de cette technique chez MLV a permis de mettre en évidence la formation d'hétérodimères entre ARNg et ARN épissés dans la cellule (142, 297). Cependant, l'obtention d'une sonde spécifique à l'ARNg de MLV, capable d'induire sa capture en condition native, a nécessité de nombreux tests et seule une sonde s'hybridant à la région de la matrice du gène *gag* s'est avérée efficace. De plus, cette technique n'a pas fait l'objet de publications dans le cas du HIV-1 et présente une limitation importante : la purification des ARN viraux en condition dénaturante, ne permettant pas une visualisation directe des formes dimériques.

Afin de palier aux limitations de l'hybridation d'une sonde et de purifier les complexes ARN-ARN sous forme native, nous avons adapté la technique d'A. Telesnitsky en introduisant dans le génome du HIV-1 un motif aptamère de type ARN capable d'interagir directement avec la streptavidine (419). Après capture des formes monomériques et dimériques par liaison à des billes de sépharose couplées à la streptavidine, les complexes sont purifiés en présence de biotine libre et peuvent alors être analysés (en plus des techniques de RPA et de RT-QPCR) par Northern blot en conditions natives permettant une visualisation directe des formes homo- et hétérodimériques (ARNg-ARN épissés) présentes dans la cellule (Figure 47). L'autre avantage de cette technique est qu'elle pourrait nous permettre de purifier

des complexes ARN/protéines (453) qui une fois transposés au HIV-1, pourraient faciliter la détermination des facteurs cellulaires et viraux en interaction avec l'ARNg.

Nous avons inséré le motif aptamère dans les régions 5' et 3' non-codantes de l'ARNg, entre les domaines structuraux, afin de ne modifier ni la conformation globale de cette région ni la séquence codante et espérer ne pas perturber la réplication virale. Les ARN wild-type et mutants produits ont alors été soumis à divers tests *in vitro* afin de mettre en place la technique de capture. Dans un premier temps, nos résultats montrent que la structure secondaire de la tige-boucle du DIS et de la région 5'UTR des ARN contenant l'aptamère est similaire à celle de l'ARNg wild-type, suggérant que l'insertion du motif n'altère pas la conformation en domaines (TAR, polyA, PBS, DIS, SD, PSI) de la région 5'UTR. De plus, ces ARN sont capables de dimériser *in vitro* par formation d'un complexe boucle-boucle au niveau du DIS. Nous observons également que la dimérisation des ARN est plus efficace pendant la transcription *in vitro*, comme préalablement observé (410). Ces résultats nous avaient conduits à émettre l'hypothèse d'une formation nucléaire des dimères d'ARN viraux. Cependant, les récentes études de W.S. Hu mettent en évidence la formation de dimères d'ARNg au sein du cytoplasme (311), suggérant que l'efficacité de dimérisation *in vivo* pourrait impliquer des protéines chaperonnes facilitant la structuration de l'ARNg dans le cytoplasme et la formation de dimères d'ARN. De telles chaperonnes pourraient alors également faciliter la structuration de l'ARNg lorsque le motif aptamère y est inséré et suppose que des dimères d'ARNg mutants se forment également *in vivo*.

Nos résultats montrent également que le taux de dimérisation est réduit du lorsque le motif est inséré dans la région leader, suggérant qu'il peut être à l'origine de modifications de la structure tertiaire de l'ARN ou d'encombrement stérique limitant l'efficacité de formation des complexes boucle-boucle *in vitro*. Cette observation est corrélée à notre étude de capture *in vitro* montrant qu'une fois l'ARN renaturé, donc structuré, le taux de rétention de l'ARN aptamère sur les billes de streptavidine est faible. Alors qu'au contraire, lorsque l'ARN n'est pas renaturé, il est efficacement retenu sur les billes, suggérant que la conformation de l'ARN, probablement sous forme dimérique, masque le motif aptamère et empêche sa liaison à la streptavidine. Ces résultats sont malheureusement en parfaite corrélation avec notre étude *ex vivo* par RT-PCR et Northern blot.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que la conformation de l'ARNg muté défavorise la liaison du motif aptamère à la streptavidine et ne permet pas sa purification spécifique. En revanche, l'insertion du motif aptamère dans la région 5' non traduite de

l'ARNg du HIV-1 permet la formation et la maturation des particules virales, ce qui suggère que les ARN viraux mutés adoptent une conformation proche de celle de l'ARNg wild-type qui leur permet d'être encapsidés. De plus, il devrait être possible de déterminer d'autres sites d'insertion en dehors des régions non-codantes n'affectant ni la production de virions, ni la capacité de l'ARNg à dimériser *in vivo* et qui permettrait de limiter les effets d'encombrement stérique afin de rendre accessible le motif aptamère. Cette recherche des nouveaux sites d'insertion nous sera facilitée par la détermination récente par l'équipe de Kevin Weeks de la structure secondaire de l'ARNg complet du HIV-1 de sous-type B (NL4.3) (459) (Figure 54).

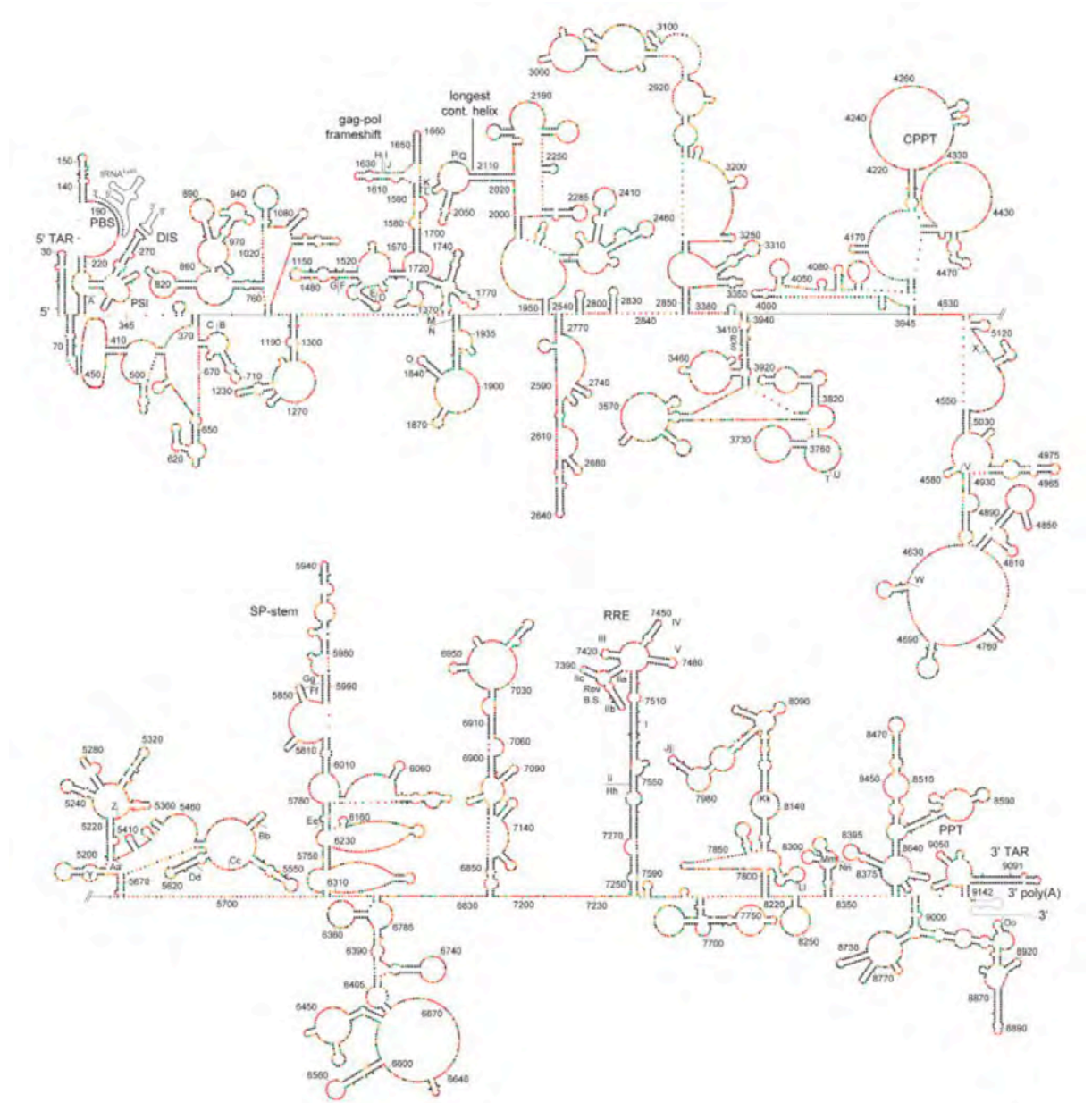


Figure 54 : Structure secondaire de l'ARNg du HIV-1 (NL4.3) obtenue par SHAPE (« Selective 2' Hydroxyl Acetylation analysed by Primer Extension) (459).

Les nombreuses mises au point de notre technique de capture, *in vitro* et *ex vivo*, afin de purifier spécifiquement les ARN viraux du HIV-1, nous ont demandé un temps précieux sans pour autant déboucher sur un protocole exploitable pour le moment. Cependant, bien qu'inefficace à l'heure actuelle, la détermination de sites d'insertion accessibles à la streptavidine reste un de nos objectifs. En effet, cette technique présente de nombreux avantages car elle pourrait permettre d'analyser non seulement la nature (monomère, dimère, hétérodimère) des ARN viraux dans la cellule et les particules virales, mais aussi d'analyser des complexes ribonucléoprotéique par capture de la partie ARN du complexe.

D'autres techniques pourraient nous permettre de purifier et de visualiser des complexes ARN-ARN :

- une étude par Northern blot en condition native directement sur des extraits cellulaires d'ARN totaux pourrait permettre la visualisation des formes dimériques grâce à l'emploi de sondes spécifiques des ARNg et épissés. Cependant, après avoir testé cette technique, nous n'avons pas pu visualiser correctement les ARN viraux à cause de la sur-abondance d'ARN cellulaires (ARN ribosomiques). Une étape de purification des ARNm polyadénylés paraît indispensable. Cette méthode, qui nécessite également l'hybridation d'oligonucléotide poly-d(T), est limitante car la liaison n'est efficace qu'en condition dénaturante et n'est donc pas exploitable pour visualiser des ARN sous forme native ;
- l'utilisation de motifs aptamères différents pourrait également permettre la purification spécifiques des ARN viraux. Il existe un vaste panel d'aptamères. Ces motifs oligonucléotidiques ADN ou ARN présentent tous une forte affinité pour leur ligand. Afin de purifier spécifiquement les ARN viraux, il nous faudrait utiliser un motif ARN qui soit bien accessible, qui ne déstabilise pas la structure de l'ARN et qui soit capable d'être élué en condition native. Un exemple d'aptamère naturel bien caractérisé et utilisable est le motif en tige-boucle du phage MS2 qui permet une interaction directe avec la protéine de capsid de ce phage. En insérant plusieurs tiges-boucles, nous pourrions purifier spécifiquement ces ARN. Cependant, cette insertion devrait présenter les mêmes défauts que le motif utilisé dans notre étude. Un autre motif bien caractérisé est l'aptamère ARN qui interagit spécifiquement avec la streptomycine. Ce motif permet la purification de complexes ARN-ARN et ARN protéines en conditions natives après immobilisation sur une matrice d'affinité pour la streptomycine et par élution en présence de streptomycine libre. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès

pour purifier des complexes ribonucléoprotéiques phagiques, bactériens et de levures ainsi que des complexes ARN-ARN bactériens (pour revue (98, 272, 466)) ;

- il existe également de nombreux motifs aptamères au sein même des ARN viraux, comme le TAR (qui interagit spécifiquement avec Tat), SL2 et SL3 (qui interagissent à forte affinité avec la NC et Gag, bien que ces protéines interagissent aussi avec tout l'ARN viral), ou le RRE (interagissant avec Rev). Il serait ainsi possible de purifier directement les ARN viraux en condition native avec ces différentes protéines virales. La réalisation de cette technique nécessiterait la production de protéines virales couplées à différentes étiquettes permettant la purification des complexes sur billes ou sur colonne, l'élution pourrait alors se faire en condition native par une simple incubation en présence de protéases. Cette technique est en revanche fastidieuse car elle nécessite la production de protéines virales ;
- enfin, la visualisation des formes dimériques pourrait se faire directement dans la cellule grâce à des techniques de microscopie. Cependant, les techniques de microscopie électronique et à fluorescence (FISH ou FRET) présentent des limitations car elles nécessitent également l'hybridation de sondes (couplée à des billes d'or ou à des fluorophores, respectivement) ou l'insertion dans le génome de motifs capables d'interagir avec des billes d'or ou de produire des molécules fluorescentes. De plus, elles permettront de mettre en évidence une proximité entre ces deux molécules, mais ne permettront pas de visualiser leur interaction.

III. Rôle du DIS dans l'épissage et l'encapsidation de l'ARNg du HIV-1

1. Introduction et objectifs

Au cours du processus d'encapsidation de l'ARNg du HIV-1, celui-ci est préférentiellement sélectionné en dimère parmi une multitude d'ARNm cellulaires et viraux. Pourtant, l'étape d'épissage de l'ARN pré-messager viral conduit à la production de plus de 40 ARNm différents avec des taux d'expression plus ou moins importants (289). Ces ARN, qui possèdent tous un DIS fonctionnel *in vitro* (410), sont néanmoins largement exclus des particules virales, suggérant que les ARN épissés viraux ne sont pas capables de dimériser *in vivo*, ou que ces dimères ne sont pas reconnus par la machinerie d'encapsidation. De plus, la localisation particulière du DIS à proximité du SD suggère que les mécanismes de dimérisation et d'épissage pourraient être reliés. L'histoire nucléaire des ARN viraux pourrait alors affecter leur devenir et favoriser la discrimination des ARNg et épissés pour leur encapsidation.

Afin d'évaluer la relation potentielle entre dimérisation et épissage, nous avons réalisé différentes constructions dans lesquelles le DIS a été muté (délétion complète ou substitution de la boucle) et/ou éloigné du SD (par insertion d'une courte séquence). En collaboration avec l'équipe de C. Branlant (Nancy-UMR 7567), nous avons tout d'abord cherché à déterminer *in vitro* l'effet de l'épissage sur la dimérisation de l'ARN. Pour cela, nous avons initié à Strasbourg une analyse sur la nature monomérique et/ou dimérique des transcrits viraux produits après épissage *in vitro* avec Maryline Santerre (doctorante de l'équipe de C. Branlant). Cette étude a par la suite été poursuivie à Nancy.

Dans un second temps, en collaboration avec l'équipe de M. Mougel (Montpellier-UMR 5236) chez qui j'ai travaillé pendant 6 mois, et avec l'assistance de Ludovic Didierlaurent (Doctorant de l'équipe de M. Mougel), nous avons étudié le rôle de la proximité du DIS et du SD sur l'épissage et l'encapsidation de l'ARN en analysant par RT-qPCR le taux d'ARN viraux dans les cellules et dans les virions produits après transfection de cellules HEK-293T. La nature dimérique des différents ARN extraits des virions a enfin été analysée par Northern blot en condition native.

2. Approche *in vitro*

2.1. Stratégie expérimentale

2.1.1. Construction plasmidique et synthèse d'ARN

Les constructions plasmidiques pLD-C1, pLD-C2 et pLD-C3, utilisées pour la production des transcrits C1, C2 et C3, ont été décrits précédemment et proviennent du laboratoire de C. Branlant (97, 202, 373). Le plasmide mutant pLD-C1 Δ D1-A1, dépourvu de l'intron D1-A2, a été obtenu par mutagenèse dirigée (kit QuickChange Mutagenesis - Stratagene) du plasmide pLD-C1 (Figure 55).

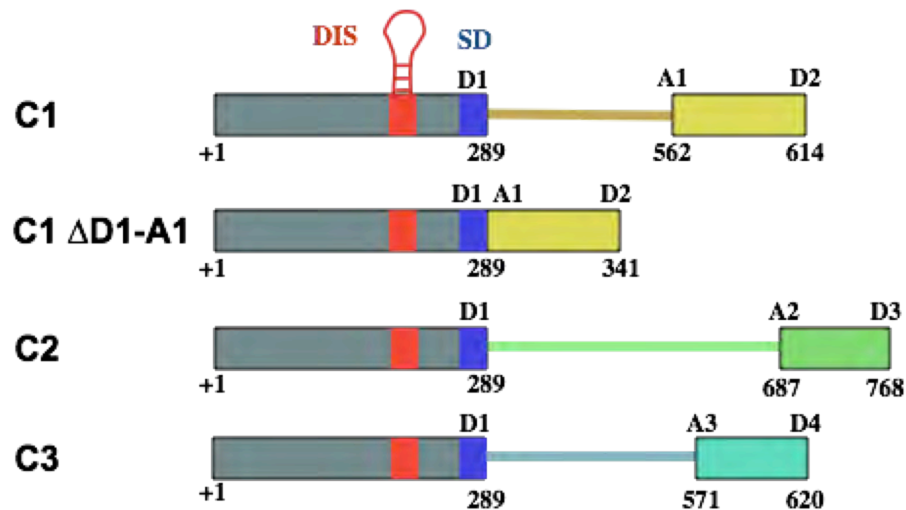


Figure 55 : Constructions plasmidiques utilisées. Le DIS est représenté en rouge, le SD en bleu. Les séquences 5' non codantes sont représentées par des boîtes grises, les introns par des traits et les séquences codantes par des boîtes jaunes, vertes et turquoise.

Les plasmides pLD-C1, pLD-C2 et pLD-C1 Δ D1-A1 linéarisés par EcoRI et le plasmide pLD-C3 linéarisé par PstI ont été utilisés comme matrice pour produire les ARN *in vitro*. Ces ARN ont été coiffés et uniformément marqués pendant leur transcription en présence d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ suivant le protocole déjà décrit (97).

2.1.2. Épissage *in vitro* et analyse électrophorétique

La réaction d'épissage *in vitro* des fragments d'ARN obtenus par transcription *in vitro* des différents plasmides est réalisée comme suit : 200 000 cpm de transcrits radiomarqués sont

incubés à 30°C pendant 0, 15, 30 ou 120 min dans 22 µl de tampon d'épissage (concentration finale : 53 mM KCl, 2,8 mM MgCl₂, 20 µM EDTA, 1 mM ATP, 28 mM créatine phosphate, 0,3 mM DTT, 3,5% (w/v) alcool polyvinylique, 10,5% (v/v) glycérol, 79 mM Hepes pH 7,9) en présence de 10 U de RNAsine et d'extraits nucléaires de cellules HeLa (Computer Cell Culture Center S.A., Belgium). Les produits d'épissage sont déprotéinisés par un traitement de 30 min à 30°C dans 200 µl de tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 100 mM NaCl, SDS 1%, en présence de protéinase K (à 0,1 mg/ml), puis extraits au phénol-chloroforme. Après précipitation, les échantillons sont analysés en conditions dénaturantes par électrophorèse PAGE 5%/urée/TBE 1X afin de visualiser les produits d'épissage et en conditions natives sur gel d'agarose TBM 0,8% pour différencier les formes monomérique et dimérique des produits d'épissage. Après électrophorèse, les gels sont autoradiographiés à -80 °C durant la nuit.

2.2. Résultats

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de l'épissage sur la dimérisation de l'ARN. Notre stratégie a consisté en l'étude de constructions simplifiées (pLD-C1, pLD-C2 et pLD-C3) qui ne possèdent qu'un site donneur (SD1) et qu'un site accepteur (A1, A2 ou A3 respectivement) d'épissage, ce qui nous permet après transcription et épissage *in vitro* de ne produire que deux types d'ARN : un ARN pré-messager non épissé et un ARN épissé. Après 2 h d'incubation en présence d'extrait nucléaire de cellules HeLa, les transcrits C1, C2 et C3 radiomarqués ont été analysés sur gel dénaturant (Figure 56A) et natif (Figure 56B).

L'analyse électrophorétique en condition dénaturante nous montre, comme attendu, que la réaction d'épissage *in vitro* est efficace. Pour chaque transcrit testé (C1, C2 et C3), deux produits de réaction sont observés : l'ARN pré-messager (615, 829 et 684 nts respectivement) et l'ARN épissé (341, 425 et 396 nts respectivement) (Figure 56A), dont la taille correspond approximativement à la moitié de celle de l'ARN non épissé. En conditions natives, nous observons que les ARN pré-messagers sont préférentiellement sous forme dimérique au début de la réaction d'épissage *in vitro* (Figure 56B pistes 3, 7 et 11). En revanche, après 2 h d'incubation en présence d'extraits nucléaires, ces ARN sont majoritairement sous forme monomérique (Figure 56B pistes 4, 8 et 12, point bleu), suggérant que la réaction d'épissage, ou l'incubation dans le tampon d'épissage, inhibe la dimérisation des ARN pré-messagers *in vitro*. Cependant, au vu de la taille des ARN épissés obtenus (moitié de l'ARN pré-messager), nous ne pouvons pas conclure définitivement quant à l'effet de l'épissage sur la dimérisation des ARN épissés. En effet, si ces ARN dimérisent, leur forme dimérique coïnciderait

exactement avec la forme monomérique de leur ARN pré-messager respectif (Figure 56B, points bleus).

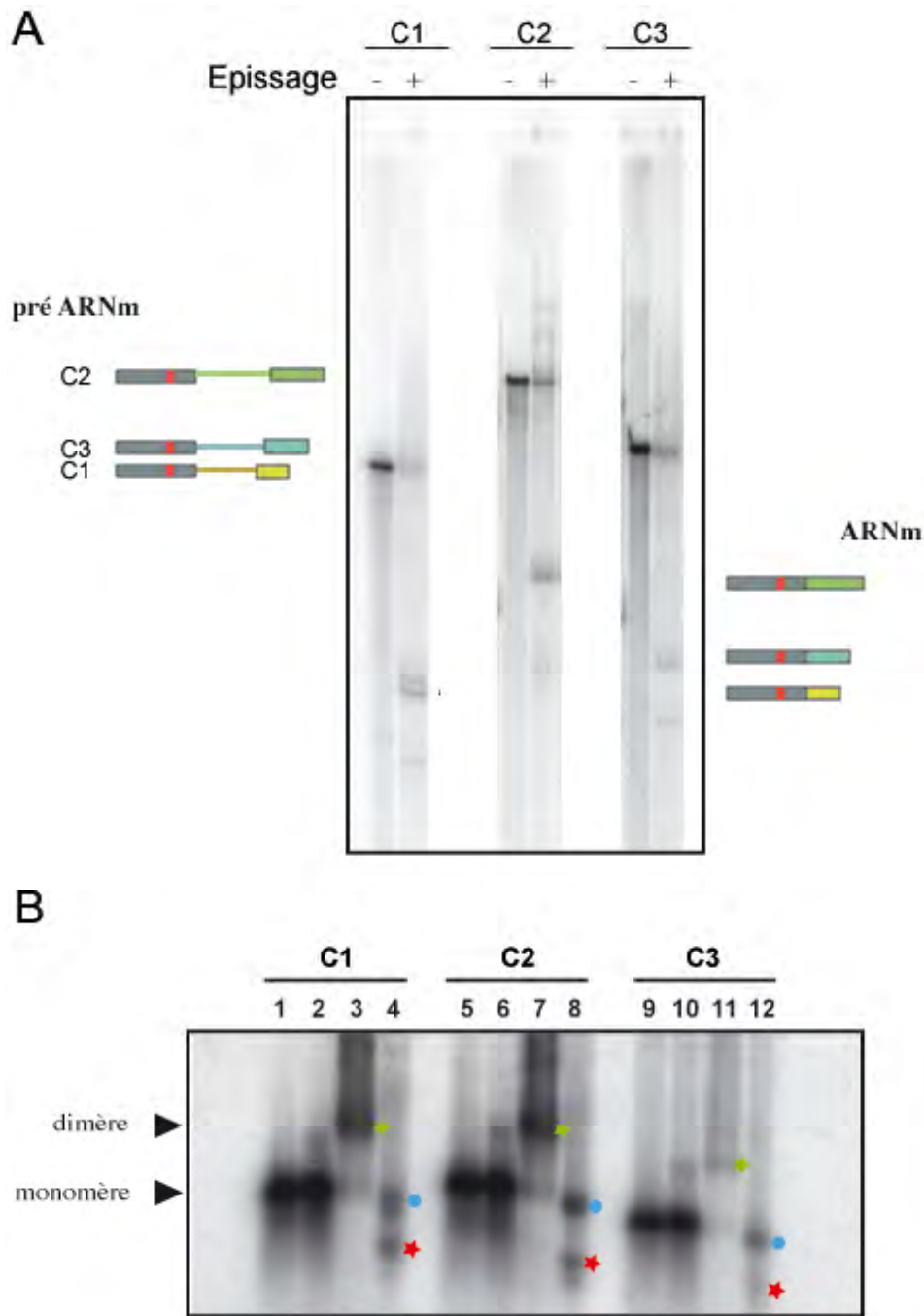


Figure 56 : Nature des produits d'épissage *in vitro* des transcrits C1, C2 et C3. (A) Analyse des produits d'épissage sur gel de polyacrylamide dénaturant 5%. Le nom des transcrits est indiqué en haut du gel et les ARN (pré-messagers et épissés) sont schématisés sur le côté. (B) Analyse des produits d'épissage sur gel d'agarose natif. Les produits d'épissage ont été déposés après 0 (pistes 3, 7 et 11, les formes dimériques sont indiquées par des étoiles vertes) ou 2 h (pistes 4, 8 et 12) d'incubation dans le tampon d'épissage avec l'extrait nucléaire. Les transcrits C1, C2 et C3 ont également été incubés dans des conditions favorisant la formation de monomères (pistes 1, 5 et 9) ou de dimères (pistes 2, 6 et 10). Ces formes sont indiquées sur la gauche du gel. Les ARN épissés monomériques sont indiqués par des étoiles rouges. Les ARN non épissés monomériques ou épissés dimériques sont indiqués par des ronds bleus.

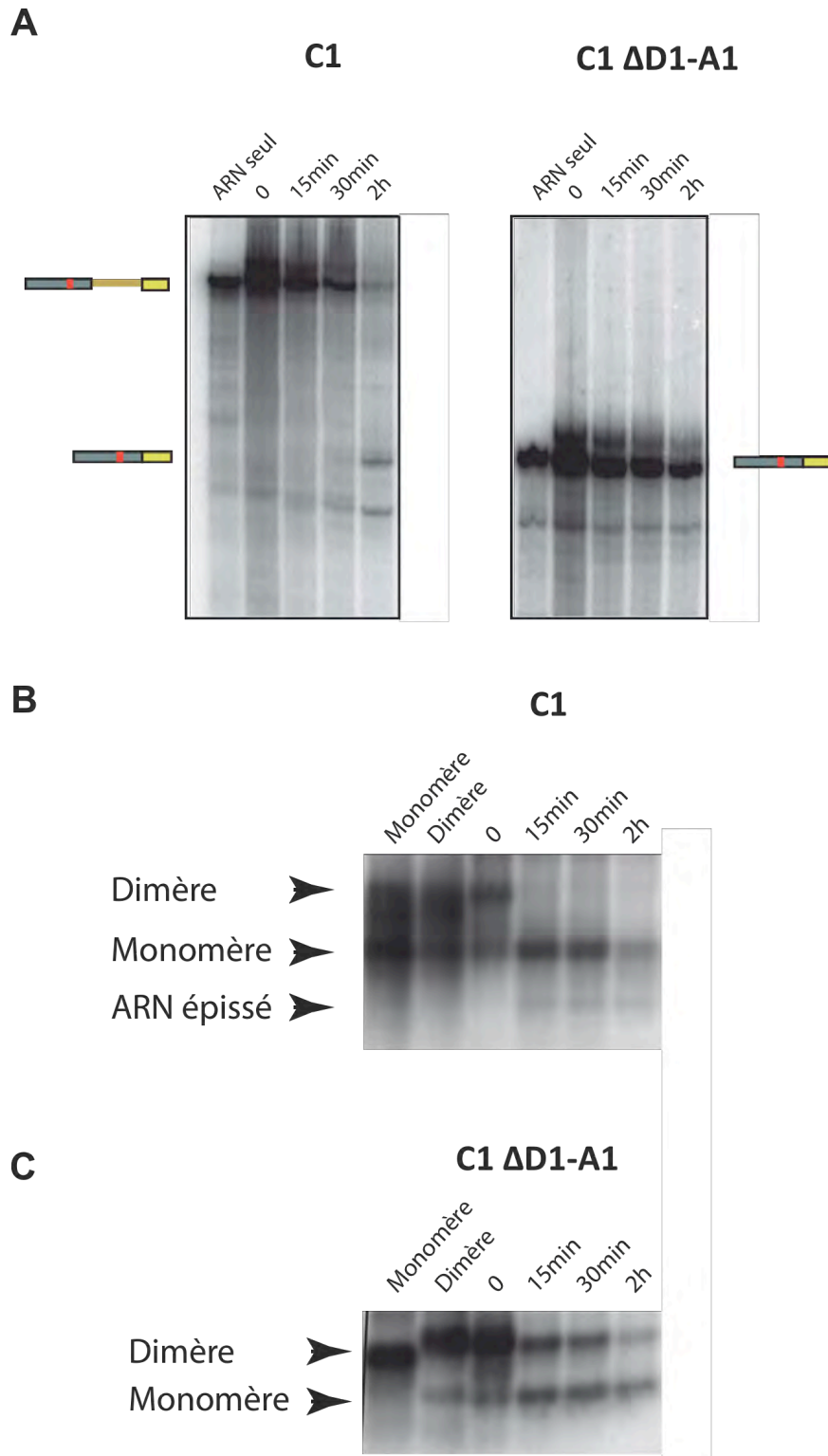


Figure 57 : Effets de l'épissage sur la dimérisation des ARN C1 et C1 Δ D1-A1. (A) Analyse des produits d'épissage sur gel dénaturant. Les ARN pré-messagers et épissés sont schématisés sur le côté du gel. Analyse des produits d'épissage C1 (B) et C1 Δ D1-D2 (C) en conditions natives. Chaque ARN a également été incubé dans des tampons favorisant la formation de monomères ou de dimères. Les différentes formes ainsi que les ARN épissés sont indiqués par des flèches. Le nom des transcrits est indiqué en haut des gels.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des expériences d'épissage *in vitro* à partir d'une construction dépourvue d'intron (pLD-C1 Δ D1-A1). L'avantage d'utiliser cette construction est qu'elle nous permet de différencier l'effet de l'épissage de la qualité intrinsèque de l'ARN épissé à dimériser. Les transcrits C1 et C1 Δ D1-A1 ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa et les produits d'épissage ont été analysés comme précédemment (Figure 57A, 57B). Comme attendu, la réaction d'épissage *in vitro* du transcrit C1 permet la production d'un ARN maturé alors que le transcrit C1 Δ D1-A1, qui ne renferme pas d'intron, n'est pas affecté par cette réaction (Figure 57A). Cette réaction d'épissage est lente (présence majoritaire d'ARN pré-messager à 30 min) mais le transcrit C1 semble épissé à plus de 50% après 2 h d'incubation. L'analyse en condition native révèle que le dimère d'ARN pré-messager C1, présent en début de réaction, se dissocie rapidement pendant la réaction d'épissage en présence d'extrait nucléaire de cellules HeLa (Figure 57B, temps 15 min). Pour les mêmes raisons que précédemment (taille et faible production d'ARN épissés), il nous est difficile de conclure définitivement sur les effets de l'épissage sur la dimérisation de l'ARN épissé C1. En revanche, le dimère d'ARN C1 Δ D1-A1, incubé dans les mêmes conditions, mais qui n'est pas soumis à la réaction d'épissage, semble beaucoup plus stable (tout du moins pendant les 30 premières min) (Figure 57C).

2.3. Discussion

Cette analyse, bien que préliminaire, apporte une nouvelle vision de l'épissage sur la dimérisation de l'ARN viral. En effet, nos résultats suggèrent tout d'abord que l'épissage possède une action inhibitrice sur la dimérisation des fragments d'ARN pré-messager (non-épissés) tout du moins *in vitro*. Ces résultats peuvent être dus : (i) à la nature du tampon d'épissage, à l'origine de la dissociation des dimères, ou (ii) à la réaction d'épissage elle-même et plus particulièrement à la reconnaissance de l'ARN pré-messager et à la fixation de facteurs d'épissage. En effet, l'analyse d'un ARN ne possédant pas d'intron révèle que la dimérisation est moins affectée. Ceci peut s'expliquer soit par la formation de dimères plus stables que les dimères d'ARN C1, qui ne se dissocieraient pas en présence du tampon d'épissage, soit parce que cet ARN n'est pas reconnu par la machinerie d'épissage. Ainsi, il est possible que l'épissage soit un moyen de réguler la dimérisation des ARN viraux dans la cellule, en empêchant la formation prématurée de dimères d'ARN pré-messagers dans le noyau. Cette hypothèse est tout à fait corrélée avec les travaux récents de W.S. Hu qui a mis en évidence la formation de dimère d'ARNg du HIV-1 dans le cytoplasme (311). Cependant,

tous les ARN pré-messagers ne sont pas soumis à la réaction d'épissage, comme les ARNg par exemple. Ceci peut être régulé par la fixation de diverses protéines qui vont stimuler ou inhiber l'épissage ou par la localisation des ARN à un endroit particulier du noyau où ils ne subiront pas l'épissage et seront exportés. Ainsi, ces ARN pourraient déjà se structurer en dimères dans le noyau. Cette régulation nucléaire de la dimérisation de l'ARNg pourrait impliquer d'autres mécanismes tels que le ciblage et l'export nucléaire des ARN viraux, ainsi que diverses protéines chaperonnes d'ARN, ce qui permettrait d'expliquer pourquoi la formation de dimères n'a été mise en évidence que dans le cytoplasme.

Par ailleurs, la taille des produits de réaction ne permettant pas de différencier les formes monomériques d'ARN pré-messagers des formes dimériques d'ARN épissés, nous ne pouvons conclure quant à la nature des ARN épissés en fin de réaction d'épissage. Pour cela, il serait nécessaire de purifier la bande correspondant à ces deux formes et de l'analyser par RT-PCR ou d'utiliser des sondes spécifiques de chaque ARN. Nous pourrions également étudier des constructions permettant une meilleure différenciation de chacune de ces formes. De plus, bien que des hétérodimères entre ARNg et épissés aient été observés pour MLV (142), aucune étude n'a pour le moment mis en évidence, *ex vivo*, la formation d'homodimères d'ARN épissés ou d'hétérodimères avec l'ARNg d'HIV-1. Une telle étude permettrait ainsi de valider l'existence de ces formes *in vitro* (si elles sont observées) et de déterminer l'effet de l'épissage sur la dimérisation des ARN épissés viraux. De surcroît, l'épissage pourrait être à l'origine de la discrimination entre ARNg et épissés, soit en inhibant la capacité de dimérisation des ARN épissés, soit en masquant le site d'initiation de la dimérisation, signal majeur d'encapsidation de l'ARNg (193). En effet, l'histoire nucléaire d'un ARNm peut influencer son devenir dans le cytoplasme et de nombreuses protéines s'assemblent sur les ARN viraux au cours de l'épissage, comme l'EJC (« Exon-Junction Complex »), qui se fixe 20 à 24 nts en amont du SD (250), ce qui chez HIV-1 correspond exactement au DIS. Ce complexe est impliqué dans le transport nucléocytoplasmique des ARN épissés, dans la traduction et dans le système de reconnaissance des codons non-sens (NMD, « Nonsense-mediated mRNA Decay ») (440). La proximité entre le DIS et le SD pourrait ainsi être à l'origine d'une compétition entre la dépose du complexe EJC et plus généralement la réaction d'épissage et la dimérisation des ARN viraux régulant alors l'export nucléaire et l'efficacité d'encapsidation de ces ARN. Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse et plus particulièrement les effets de la dimérisation sur l'épissage des ARN viraux

en éloignant le DIS du SD ce qui abolirait cette compétition si elle existe et devrait par conséquent favoriser l'épissage.

3. Article : Le DIS du HIV-1 est impliqué dans la régulation de l'épissage et dans l'encapsidation de l'ARN viral

Manuscrit en préparation

The dimerization initiation site (DIS) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) regulates viral RNA splicing and packaging

Lucile Sinck¹, Ludovic Didierlaurent², Roland Marquet¹, Marylène Mougel² & Jean-Christophe Paillart^{1*}

¹Architecture & Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France; ²UMR 5236 du CNRS, Université de Montpellier 1, CPBS, 4 Boulevard Henri IV, 34965 Montpellier, France

*Corresponding author:

Dr. Jean-Christophe Paillart

Phone: (+33) (0)3 88 41 70 35 ; fax: (+33) (0)3 88 60 22 18;

E-mail: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr

Running title: The HIV-1 DIS regulates viral RNA splicing and packaging

Keywords: HIV-1, DIS, RNA dimerization, splicing, packaging

ABSTRACT

During the packaging process, HIV-1 genomic RNA (gRNA) is preferentially selected amongst a multitude of cellular and viral spliced mRNAs and incorporated into viral particles as a dimer of two homologous molecules. Packaging of HIV-1 gRNA involves specific interactions between a *trans*-acting factor, the Gag precursor, and *cis* elements present in the 5'-terminal region of the gRNA and mainly regrouped into four stem-loop structures, SL1 to SL4, and named the packaging domain. The location of the HIV-1 Dimerization Initiation Site (DIS or SL1), upstream of the splice donor (SD) site, results in its presence in all viral mRNA species. However, although the DIS is fully functional in all viral RNAs *in vitro*, it does not promote the packaging of spliced viral mRNAs, while it is a major determinant for gRNA encapsidation. The proximity between the DIS and the SD site suggest that RNA dimerization could affect the fate of HIV-1 RNAs by modulating splicing and packaging of HIV-1 RNAs. In order to evaluate the relationship between the position of the DIS and viral RNA splicing and packaging, we mutated the DIS or/and moved it away from the SD site and analyzed the yield of viral RNAs in transfected 293T cells and in viral particles by RT-qPCR. We found that mutations affecting either the DIS or the distance between the DIS and the SD site decreased gRNA packaging efficiency, while they had no significant effect on spliced viral RNAs. Moreover, gRNA was still packaged as a dimer with no effect on its stability. Interestingly, we observed a 2-4 fold increase in splicing efficiency when the DIS was disrupted or displaced away from the SD site, suggesting that the position of the DIS and/or RNA dimerization itself could limit splicing efficiency, thus favoring the production of gRNA prone to be packaged. Altogether, our results show that the DIS or RNA dimerization could influence the fate of HIV-1 gRNA by regulating viral RNA splicing and its selection to allow optimal production of infectious virions.

Abbreviation used: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; gRNA, genomic RNA; DIS, dimerization initiation site; SD, splicing donor site.

INTRODUCTION

All retroviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), specifically packaged two copies of their genomic RNA (gRNA), non-covalently associated close to their 5'-ends in a region called the Dimer Linkage Structure (DLS) (6, 47, 50) (Fig. 1A). The dimerization initiation site (DIS) of HIV-1 gRNA is located upstream of the major splice donor (SD) site (29, 45, 57). The DIS is a highly conserved sequence, and folds into a stem-loop structure (SL1) composed of a 9 nucleotide loop containing a self-complementary sequence of 6 nucleotides (15, 29, 45, 49, 57). Dimerization of HIV-1 gRNA is initiated at this particular self-complementary sequence through Watson-Crick base-pairing, giving rise to an intermolecular kissing loop complex (29, 45, 49, 57).

The conservation of the genome dimeric nature among retroviruses underlies the importance of RNA dimerization for virus replication. In fact, alterations of the DIS strongly affect viral replication by perturbing essential steps of the viral cycle such as reverse transcription and recombination, required for genetic diversity of viral genomes (9-11, 43). Moreover, dimerization may play additional roles in the gRNA fate, including splicing, trafficking/localization and gRNA packaging (7, 25, 31, 48, 50, 52, 54).

The general RNA packaging mechanism developed by retroviruses is well documented and involves specific interactions between a *trans*-acting factor encoded by the viral genome, the nucleocapsid (NC) domain of the Gag precursor and *cis* elements present in the 5' region of the gRNA (the so-called packaging signals) (19). It has been shown that deletion of HIV-1 stem-loop 3 (SL3), often considered as the major packaging signal (Ψ or Psi), profoundly affect viral replication by reducing the yield of gRNA present into viral particles (1, 12, 34). However, specificity of gRNA packaging is not restricted to this region. The whole 5'-untranslated region (UTR) (including TAR, the polyA, the PBS and the DIS) and a part of the *gag* gene have been shown to contribute to optimal encapsidation of HIV-1 gRNA (13, 19, 48, 50) and folding of the leader domain into four stem-loops (SL1 to SL4) is required to recruit viral gRNA (Fig. 1A). A recent study showed that deletion of the DIS more profoundly affects gRNA packaging than deletion of the historical packaging signal (SL3) and thus seems to be the most important domain required for specific packaging of gRNA (25).

In order to produce infectious viral particles, a balanced expression of all viral genes is required. The HIV-1 primary transcript can avoid the splicing reaction and be directly transported to the cytoplasm. This unspliced RNA is used both as gRNA and as mRNA for

the synthesis of the Pr55^{Gag} and Pr160^{Gag-Pol} proteins. In addition, the primary transcript serves as precursor for all spliced retroviral mRNAs encoding envelope and auxiliary proteins required for viral pathogenesis. About half of viral RNA undergoes a complex alternative splicing that generates more than 40 different mRNA species (40, 61, 67). Viral RNAs have been regrouped into three different classes: (1) the unspliced primary transcript (~9 kb), (2) singly spliced RNAs (~4 kb) encoding Vpu, Vpr, Vif and Env and (3) fully spliced RNAs (~2 kb) encoding Tat, Rev and Nef. In the early phase of HIV-1 gene expression, only completely spliced mRNAs are exported to the cytoplasm using the classical route of host mRNAs nuclear export and giving rise to Tat, Rev and Nef proteins. Subsequently, Rev binds to its target sequence, the Rev-responsive element (RRE), present in unspliced and singly spliced HIV-1 RNAs and mediates their nuclear export by delivering them to the CRM-1 (Chromosome Region Maintenance) dependent export pathway (16, 18, 39, 63). Thus, the export pathway might also contribute to the selective packaging of gRNA (4, 17, 27, 38, 64).

During the packaging process, the HIV-1 gRNA is preferentially selected amongst a multitude of cellular and viral spliced mRNAs. However, while singly- and multi-spliced mRNAs are largely excluded from viral particles, significant amounts of cellular and viral mRNAs can be encapsidated when *trans* or *cis* packaging signals are disrupted (14, 25, 46, 53). Noticeably, all HIV-1 spliced mRNAs contain most of the extended packaging signal found in the 5'-UTR, including TAR, PBS and DIS (Fig. 1A). Surprisingly, the DIS, which is present and functional (56) on all HIV-1 RNAs, is specifically required for gRNA packaging but dispensable for encapsidation of spliced viral mRNAs (25). A recent genetic study supports the notion that HIV-1 RNA dimerization occurs in the cell prior to RNA packaging (44), strongly suggesting that dimerization could participate in the selection of the RNA genome. Moreover, the fact that RNA dimerization is more efficient during *in vitro* transcription (56) and that the DIS is spatially close to the SD site suggest that RNA dimerization and/or the DIS could affect the fate of HIV-1 RNAs by modulating its splicing and packaging. Such a connection between dimerization, splicing and genome packaging provides an attractive model to understand how retroviruses could recruit their genomes.

Here we investigated the role of the DIS and SD site proximity to determine how dimerization could impact on RNA packaging and splicing efficiency. Our strategy has consisted in moving the DIS away from the SD site by inserting a short sequence between these sites (Fig. 1B) and to analyze the yield of viral RNAs in cells and in virions by RT-qPCR and dimeric nature of the packaged gRNA by northern blot. We found that all mutations affecting the DIS or the distance between the DIS and the SD site strongly reduced

gRNA packaging efficiency, while multi-spliced viral RNAs only slightly decreased. In all cases, HIV-1 gRNA was still packaged as a dimer with almost identical thermal stability. More interestingly, we observed a 2-4 fold increase in splicing efficiency when the DIS was disrupted or displaced away from the SD site. Altogether, these results propose a new role for the DIS and suggest that its position, relative to the SD site, and/or RNA dimerization itself could restrict splicing efficiency, thus allowing optimal gRNA packaging and production of infectious virions.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

HIV-1 pNL4.3 molecular constructs with a deletion (pNL4.3 Δ SL1) or a substitution (pNL4.3S257-259) in the DIS (SL1) have been described before (48). Mutant HIV-1 molecular clones with a heterologous insertion of 19 nucleotides between the DIS and the SD site (pNL4.3-I280) and the combined mutations (pNL4.3S257-259/I280) (Fig. 1B) have been obtained using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer instructions. Mutations have been first inserted in plasmid pLTR5'-NL4.3 and pLTR5'-NL4.3S257-259 containing the AatII-SphI fragment of pNL4.3 in a pUC18 vector (48). Overlapping mutant oligonucleotides for the insertion were: pS718-748 (5'-GGCAAGAGGCGAGGGGATCTGAAGAACTTAGATCGCGCGACTGGTGAG-3') and pAS718-748 (5'-CTCACCAGTCGCCGCGATCTAAGTTCTTCAGATCCCCTCGCCTCTT GCC-3') (position of the insertion is underlined). After confirmation of the presence of the mutations by restrictions and DNA sequencing, pLTR5' constructs were digested with AatII and SphI and the resulting fragments were substituted for the homologous region of pNL4.3 DNA.

Cell culture, transfections and infections

Human embryonic kidney 293T (HEK 293T) and MAGI-5B cells (a kind gift from M. Tatsumi, Tokyo, Japan) were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with glutamine (2 mM), penicillin, streptomycin and 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum. Transfection of 293T cells ($3 \cdot 10^6$) was performed using the calcium phosphate precipitation technique. For moderate or high-level expression, 2 μ g of HIV-1 plasmid DNA (pNL4.3 wild-type or mutants) along with 6 μ g of carrier DNA (plasmid pSP72) or 8 μ g of HIV-1 plasmid DNA, respectively, were transfected and samples collected

24 or 48 h after transfection. For all analysis, cells were splitted and washed with 1X concentrated phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na₂HPO₄) a few hours after transfection to eliminate the excess of plasmid. The amount of HIV particles in supernatants was determined using a HIV-1 CAp24 core antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Beckman Coulter™). Virus-containing supernatants used for infection of MAGI-5B cells were obtained after transfection with 8 µg HIV-1 plasmid DNA. To assess the viral infectivity of wild-type and mutant viruses, MAGI-5B cells were infected with a volume of cell-free medium harvested from transfected 293T culture equivalent to 50 ng or 20 ng of CAp24. Two days post-infection, cell extracts from MAGI-5B cells were analyzed for β-galactosidase (β-Gal) activity. Reporter activities were normalized to total protein contents determined by Bradford assay.

Protein and RNA extraction from cells and virions

Cells were harvested and washed twice with PBS 1X by centrifugation at 1,500 g for 5 min. In order to extract total proteins, cells were resuspended in 500 µl RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) with protease inhibitors (Complete, Roche), incubated on ice for 20 min and centrifuged at 12,000 g during 1 h at 4°C. Total RNAs were extracted from cells with 1 ml of TriReagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The supernatant generated by transfected 293T cells was first clarified by centrifugation at 1,800 g for 10 min at 4°C, filtrated through a 0.22 µm pore size filter and then pelleted through a 20% (w/v) sucrose cushion by ultracentrifugation at 131,000 g (SW28 rotor) for 2 h at 4°C. To extract total proteins, virus pellets were resuspended in 80 µl of RIPA 1X and processed as detailed above. Total RNAs from viral particles were extracted by two different methods. For quantitative analysis, viruses were first resuspended in 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS and 20 µg of yeast tRNA followed by phenol-extraction and ethanol-precipitation and then extracted in 1 ml of TriReagent (58). For qualitative analysis, viruses were resuspended in 300 µl of TN buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM NaCl) and treated with virus lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 1% SDS, 100 mM NaCl, 50 µg of yeast tRNA/ml, 100 µg of proteinase K/ml) for 20 min at 37°C (53). Samples were then extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), once with chloroform and viral RNA was ethanol precipitated, washed with 70% ethanol and dissolved in Milli-Q water (Millipore).

Western blotting

Forty eight hours post transfection, 30 and 20 μg of total protein extract from cells and viruses, respectively, were analyzed on a 4-12% NuPAGE gradient gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond P, Amersham) for 2 h at room temperature. Membranes were blocked in TNT 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % triton X-100) supplemented with 20 g/l milk for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with antibody against HIV-1 CAp24 (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, anti-p24 #6521). Following washing with TNT 1X, membranes were incubated for 1 h at 4°C with a goat anti-mouse secondary HRP-conjugated antibody (Biorad), washed again in TNT 1X and TN 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), and proteins were detected by chemiluminescence (Pierce), according to the manufacturer's protocol.

Quantitative analysis

For RT-qPCR analysis, 15 μg of total RNA extract from cells and virions were digested with RNase-free DNase (RQ1, Promega) for 25 min at 37°C and purified by phenol-extraction and ethanol precipitation. Subsequently, 2 μg of total RNA were used for reverse transcription using expand RT (Roche), according to the manufacturer's instructions. Oligo(dT) was used as RT-primer for all viral and GAPDH mRNAs. Quantitative PCR was achieved using specific oligonucleotides for gRNA, fully-spliced RNAs (fl-RNAs), mono-spliced *env* RNA and GAPDH mRNA as previously described (25) with SYBR Green Kit (Roche) using the LightCycler (Roche) and RotorGene (Labgene) systems. A standard curve was generated from 100 to 1,000,000 copies of pNL4.3 plasmid. Specificity was determined using melting curve analysis and electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose gels. Two negative controls of RT-PCR were systematically performed: (1) without reverse transcriptase to check for DNA contamination levels; (2) on mock-transfected cells to evaluate the background amplification level. Quantitative analysis was performed using LightCycler software version 3 (Roche Molecular Biochemicals). Packaging efficiency was determined by calculating the ratio of the total amount of each RNA present in the supernatant (V) and the total amount of the same RNA present in cells (C). Splicing efficiency was determined by calculating the ratio of the total amount of spliced RNA to the total amount of gRNA present in cell. Previously, the total amount of each RNA species in cells has been normalized by GAPDH quantification.

Northern blot analysis

Equal amount of RNA analyzed by qRT/PCR and corresponding to 2 μ g of wild-type gRNA was loaded on a 0.9% denaturing formaldehyde or native agarose gel in 1 \times Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and run at 100 V for 4 h at 4°C. RNAs were then transferred to nylon membrane (Hybond N+, Amersham) by capillary blotting during 16 h at room temperature (53). The blots were pre-hybridized for 30 min at 60°C in PerfectHyb plus hybridization buffer (Sigma) and hybridized overnight at 60°C with a specific gRNA probe corresponding the *gag* gene (region 1306-1541) and generated by random priming with [α -³²P]dATP (Amersham) using the DECAprime kit (Ambion). Finally, blots were washed twice at 42°C with SSC 2X (0.30 M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0), SDS 0.1% during 5 min and twice with SSC 0.1X, SDS 0.1% during 15 min, sealed, and either autoradiographed or quantified by a Bio-imager (FUJI FLA5000) with the ImageGauge software.

RESULTS

The DIS mutations affect viral infectivity without impairing protein synthesis and assembly

Besides specific packaging of two copies of full-length gRNA, HIV-1 also incorporates spliced cellular and viral RNAs, although to a lesser extent (8, 36). However, it seems that the mechanisms governing the packaging of spliced viral RNAs (or cellular RNAs) does not depend upon the same determinants needed for gRNA encapsidation (25). In order to get insight into these mechanisms, our observations of the 5' terminal region of HIV-1 genomic versus spliced viral RNA lead us to mutate the DIS (SL1), one of the main RNA packaging motif, and to displace it away from the SD site and analyze the packaging and splicing efficiency of the various viral RNAs.

To test the effect of these mutations on virus production, we first analyzed viral protein synthesis and maturation and viral infectivity. Forty-eight hours after transfection of 293T cells, total proteins were extract from cells and virions and analyzed by immunoblotting using antibodies directed against CAp24. As previously observed for DIS mutants (Δ SL1 and S257-259) and as showed here, similar amounts of Pr55^{gag} precursor were expressed in 293T cells transfected with wild-type and HIV-1 mutants (Fig. 2, left panel). To characterize potential effects on Gag maturation events, similar analyses were performed on virions pelleted from supernatant of transfected cells (Fig. 2, right panel). Again, with respect to the capsid protein,

no difference was detected between wild-type and mutant viruses, suggesting that Pr55^{gag} synthesis and processing was not affected by our mutations.

To assess the viral infectivity of wild-type and mutant viruses, MAGI cells were infected with similar amounts of virus (as determined by CAp24 ELISA assay). Two days post-infection, MAGI cells were collected and infectivity was determined by monitoring β -galactosidase activity after cells lysis. As previously observed, we showed that deletion of the DIS (Δ SL1) resulted in a 4-fold reduction in virus infectivity (48). However, substitution of the DIS loop (S257-259) did not seem to affect viral infectivity. Surprisingly, insertion of a 19-nucleotide sequence downstream of SL1 (I280) resulted in a 2-fold reduction in virus infectivity and in a 6-fold reduction when this insertion was associated with the DIS loop substitution (S257-259/I280) (Table 1). Taken together, these results indicate that the DIS itself and the proximity between this motif and the SD site are important for virus infectivity but that mutations do not significantly affect protein synthesis and virus maturation.

The DIS and its position relative to the SD site are important for genomic RNA packaging

The impaired infectivity of the mutants might reflect a defect in the viral RNA content. In order to determine viral RNA packaging efficiency of wild-type and mutant HIV-1 particles, spliced and full length RNA species were quantified in virions and virus-producing cells by RT-qPCR. Here, we used several primer pairs allowing specific quantification of (i) *env* mRNA, a major representative of singly-spliced HIV-1 mRNA (representing 74% of singly spliced viral RNAs), (ii) multi-spliced RNAs (MS), and full-length RNA (FL (Fig. 3). Since it was previously reported that levels of spliced HIV RNAs varied between different cell types (PBMC, macrophages or T-lymphocytes) and with the kinetics of infection (5), we transfected moderate level of plasmid DNA (2 μ g) in order to lower HIV-1 expression and prevent cell lysis, which could disturb intracellular RNA trafficking (35). Quantitative analysis of HIV-1 FL, *env*, and MS RNAs were performed from the same reaction of reverse transcription using oligo-d(T) as a primer, followed by specific quantitative PCR amplifications (see Materials and Methods).

First, the amplification products were analyzed on agarose gel to ensure that the expected products were amplified (Fig. 4). As expected, FL, MS and *env* viral RNAs were observed in transfected cells and in virions, without any background signal in mock-transfected cells (Fig. 4) (25). Next, the copy number of each viral RNA in assays and mock controls was measured in cells and virions as described in the Materials and Methods section. To determine packaging efficiencies, copy numbers measured in cells and in virions were reported to the

total input of cellular and virion RNA samples, and virus-to-cell RNA ratios $[(V/C) \times 100]$ were calculated and normalized to FL level (Fig. 5). As already observed, deletion of SL1 resulted in a 5-fold reduction of FL RNA packaging efficiency (25), while S257-259 and I280 mutations resulted in a 2.5 and 3-fold reduction of FL RNA packaging efficiency, respectively. Interestingly, the S257-259/I280 double mutant had cumulative effects, resulting in a 10-fold reduction of its FL RNA packaging efficiency (Fig. 5A). Thus, the presence of SL1, its position relative to the SD site and the auto-complementary sequence in the DIS loop are important for gRNA encapsidation.

Finally, we examined the consequences of reduced FL RNA incorporation on packaging of spliced viral RNAs in mutant particles. Levels of singly and fully-spliced viral RNAs were assessed in the same viral pellets as the one used for FL RNA analysis. Packaging efficiencies of each RNA species were determined for all mutants and normalized to those determined for wild-type viruses (Fig. 5B). Whereas mutant FL RNAs were less efficiently incorporated into virions than wild-type FL RNA, most mutant spliced RNAs were encapsidated with slightly reduced efficiency, compared to the one observed for wild-type spliced RNAs (Fig. 5B). Indeed, S257-259 and S257-259/I280 mutations resulted in a slight decrease of MS RNAs (1.5 and 2-fold, respectively) and no effect on *env* RNA packaging. The same held true when I280 mutant was assessed and resulted in a 2.5-fold and 2-fold decrease of MS and *env* RNA packaging efficiency, respectively. The only exception was observed for mutant Δ SL1 (Fig. 5B). The deletion of SL1 resulted in a 2.5 and 7.5-fold increase of MS and *env* RNA packaging efficiency, respectively. In conclusion, while these results confirm that viral spliced and genomic RNAs are incorporated into viral particles through different mechanisms, they strongly suggest that not only SL1, but also its position relative to the SD site, are important for the specific selection and packaging of gRNA.

Effects of mutations on genomic RNA dimerization

In order to determine the effect of mutations on gRNA dimerization in HIV-1 particles, gRNA was extracted from wild-type and mutant virions released from 293T cells 48 h post-transfection and analyzed by northern blotting. An equivalent amount of total RNA was loaded on denaturing and native agarose gels as indicated in Materials and Method and gRNA was specifically detected with a radioactive probe hybridizing to a portion of the *gag* gene. As expected by our RT-qPCR analysis, we were able to detect gRNA in virions from all constructs by denaturing northern blot (Fig. 6A). Moreover, and as previously observed in native northern blot conditions, mutation of the DIS did not completely prevent dimer

formation (Fig. 6B) (60). Indeed, while S257-259 and I280 mutations still allowed packaging of gRNA preferentially in a dimer form, complete deletion of SL1 induced a slight destabilization of gRNA dimers and the appearance of monomeric forms (Fig. 6B), suggesting that SL1 is essential for optimal dimer formation and stability. On the other hand, the double S257-259/I280 mutation allowed packaging of gRNA dimers that were slightly destabilized. Interestingly, these RNA dimers migrated slower than the ones formed by others constructions, suggesting that this mutant RNA adopts a different and less compact conformation.

The DIS motif down-regulates HIV-1 RNA splicing efficiency

Because modifications of RNA splicing could affect RNA packaging, we examined the splicing efficiency of wild-type and mutant viruses. RNA samples were extracted from transfected 293T cells and analyzed by RT-qPCR as described above to quantify FL, MS and *env* RNA species in cells. Spliced-to-FL RNA ratios were determined and normalized to wild-type levels (Fig. 7). Interestingly, our results indicated that all mutations increased RNA splicing efficiencies, but we did not observe any significant difference between *env* and MS RNAs in any case. Although Δ SL1 and S257-259 mutations slightly increased splicing efficiency (1.5 to 2-fold), the I280 mutation strongly affected splicing with a 4-fold increase of MS and *env* RNA splicing efficiency. The S257-259/I280 mutant showed an intermediate pattern with an increase of 2.5-fold. Taken together, these results suggest that the DIS integrity and more importantly its position upstream of the SD site negatively regulate the viral RNA splicing reaction.

DISCUSSION

HIV-1 RNA packaging is a highly regulated process that leads to specific selection of a dimeric gRNA amongst a multitude of cellular and viral mRNAs. Beside, RNA dimerization is a pre-requisite for RNA packaging (44, 50) and it has recently been shown that the DIS is one of the major determinants for gRNA packaging (25). Thus, it is paradoxical that HIV-1 spliced RNAs, which contain most of the signals required for RNA packaging in their first common exon, are largely excluded from viral particles. Interestingly, the close proximity between the DIS and the SD site raises the possibility that RNA dimerization and splicing could be related mechanisms and could thus play a role on the fate of viral RNAs and on gRNA selection during the packaging process. In this report, we tested the potential link between RNA dimerization and splicing by introducing mutations in the DIS and inserting a

short sequence between this motif and the SD site and we showed that the DIS and/or its position on gRNA negatively regulate HIV-1 RNA splicing and influence viral RNAs packaging.

Our results showed that deletion of the DIS (Δ SL1), its displacement upstream from the SD site (I280) or substitutions in its loop (S257-259) resulted in a reduction of the FL RNA packaging efficiency (22%, 40% and 31%, respectively) compared to wild-type, with a cumulative effect when both mutations (S257-259/I280) were present (10%) (Fig. 5A). While similar effects have been previously described for Δ SL1 (25, 31, 48) and S257-259 (48), suggesting and strengthening an intrinsic link between RNA dimerization and packaging (19, 50), our results show for the first time that the position of SL1 relative to the SD site and the integrity of the DIS loop are important for gRNA encapsidation. These observations also support the hypothesis that formation of a loop-loop complex is likely required for packaging (44). The fact that the DIS, one of the main packaging motif, is found on all viral mRNAs raises the possibility that of a competition for encapsidation exists between spliced and genomic HIV-1 RNAs. Indeed, we confirm such a competition when SL1 is removed, in agreement with our previous study (25), and observed that singly (*env*) and fully-spliced viral RNAs are more efficiently packaged into viral particles than gRNA (Fig. 5B). However, whereas deletion of SL1 favored packaging of spliced viral RNAs, substitution of the DIS loop (S257-259), displacement of SL1 (I280) or the combination of these mutations showed a marginal decrease of spliced RNA packaging (Fig. 5B). Hence, it seems that removal of SL1 could: (i) prevent the formation of short (dimerization *via* the DIS) and long-range interactions required in gRNA packaging and selection. In particular, sequences in *gag* might directly interact with the SL1 since they are known to stabilize RNA dimers *in vitro* (30, 49). These sequences, which remain to be precisely identified, could cooperate with SL1 to direct specific packaging of gRNA (42). (ii) Change the folding of spliced RNAs thus allowing their packaging. A folding effect of Δ SL1 on spliced mRNA is unlikely since SL1 constitutes an independent domain by itself, and we previously showed by *in vitro* chemical probing experiments that the secondary structure of the 5' terminal region of spliced viral RNAs is similar to the one determined for wild-type gRNA (56). Or finally (iii) abolish an inhibitory effect of SL1 or/and RNA dimerization *via* the DIS on the splicing reaction.

In order to discriminate between an effect of the mutations on gRNA dimerization or on mRNA splicing (see above), we first extracted gRNA from wild-type and mutant virions and analyzed their dimeric status by native northern blot (Fig. 6). As expected and observed in

figure 5A, mutations do not totally abolish gRNA incorporation (Fig. 6A, denaturing Northern blot). None of the mutation has a major effect on gRNA dimerization (Fig. 6B). We only observed a slight increase in the proportion of monomeric RNA for Δ SL1, and a slower migration of the dimeric species for the double S257-259/I280 mutant, confirming the role of the DIS in dimer stabilization, either through direct remodeling of SL1 or through intermolecular long distance interactions and in the general conformation of mature genomic RNA (20-22, 23, 28, 37, 51, 54, 62). However, as previously observed, mutations of the DIS do not completely prevent RNA dimer formation (60) and HIV-1 can replicate without the entire SL1 in certain cell types (24). Thus, these observations and our results suggest that the DIS does not seem to be entirely required for viral replication but might induce a conformation that would be more prone to be recognized by Gag and the packaging machinery in general. Indeed, it has been observed that in the absence of the DIS, RNA dimerization can still occur, but with reduced kinetics and presumably through currently unidentified redundant mechanisms (43, 59).

Next, we wished to determine if the decreased gRNA packaging could be the consequence of a splicing defect. Thus, after transfection of 293T cells with wild-type and mutant constructions, we measured the yield of spliced viral RNAs in transfected cells by RT-qPCR (Fig. 7). Interestingly, we observed that SL1 mutations (Δ SL1 or S257-259) slightly increased splicing efficiency (1.5 to 2-fold). But more importantly, we observed a pronounced defect when SL1 was displaced from the SD site (4-fold increase). The double mutation (S257-259/I280) gave an intermediate 2.5 fold increase of splicing efficiency. Taken together, these results suggest that DIS integrity and its close proximity to the SD site negatively regulates viral RNA splicing, thus pointing out for the first time towards a relationship between RNA packaging, dimerization and splicing events. However, two crucial questions remain to be answered. What causes such an important defect in gRNA packaging? And such an increase in splicing efficiency? While RNA dimerization has been shown to be a pre-requisite for gRNA packaging, it does not seem to be the main factor regulating this process even if synergistical effects have been observed when substitution of the DIS loop was associated with its displacement from the SD site. Hence, the position of the DIS relative to the major SD site seems to be the main factor regulating RNA packaging.

Indeed, moving the DIS just 19 nucleotides further upstream from the SD site is sufficient to up-regulate the yield of all spliced viral mRNAs, suggesting that the DIS acts negatively on splicing efficiency. Splicing event is an important and highly regulated process in cells (2, 3, 16, 26, 40, 41, 55, 65, 67), and many host factors interact with RNAs during this step. For

instance, the exon-junction complex (EJC), a multi-protein complex, is loaded 20 to 24 nucleotides upstream of the exon-exon junction (32). This complex is of importance for mRNAs metabolism as it is involved in their nucleo-cytoplasmic transport, helps in translation and in nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway (33, 66). But more importantly, for HIV-1 mRNAs, the deposit of the EJC correlates exactly with the upper stem of SL1. This fact raises the possibility that the proximity between the DIS and the SD site could favor competition between RNA dimerization and EJC binding, thus potentially promoting packaging or splicing of unspliced viral RNA, respectively. Indeed, when we moved SL1 away from the SD site (Fig. 7), we observed a strong enhancement of splicing efficiency (4-fold) for all HIV-1 mRNA species, suggesting that this stem-loop inhibits splicing in its wild-type context. Moreover, when the DIS loop was substituted to prevent the kissing loop interaction between the two RNA molecules, the splicing efficiency was also increased (2.5-fold) but more importantly, virus infectivity was reduced by more than 80% compared to wild-type virus (Table 1). When we compared the absolute copy numbers of HIV-1 genomic and spliced RNAs in cells (normalized to GAPDH) for wild-type (2.7×10^8 and 8.4×10^8 , respectively) and I280 mutant (2.5×10^8 and 2.9×10^9 , respectively), we observed an almost similar amount of genomic RNA but a 3.4-fold increase of spliced RNAs. Moreover, although wild-type spliced mRNAs correspond to approximately 75% of total viral RNA in cell (3-fold increase compared to gRNA), I280 spliced mRNAs are over-represented and correspond to more than 90% of total viral RNA (11.6-fold increase compared to gRNA). Altogether, our observations allow us to propose a working model in which SL1 and/or RNA dimerization act as a dual effector on mRNA splicing and gRNA packaging (Fig. 8). In the wild-type context, the presence of SL1 in close proximity to the SD site induces a competition between RNA dimerization through the DIS and binding of the EJC to SL1 (Fig. 8, upper panel). In this natural context, and probably due to rapid RNA folding in a transcription-concomitant manner, RNA-RNA interactions seem to proceed first, thus promoting gRNA storage and its further Gag-mediated encapsidation. Of course, a large portion of these RNAs escapes this inhibition and is then submitted to splicing (75%). When SL1 is moved away from the SD site (Fig. 8, lower panel), competition between both steps is less stringent and splicing inhibition is largely relieved, thus explaining the 4-fold increase of splicing efficiency compared to wild-type. Moreover, the balance between viral spliced and genomic RNA seems to be more important than previously thought and sufficient to reduce gRNA packaging efficiency (2-3 fold) and virus infectivity (85%). The fact to introduce another mutation in the DIS loop (S257-259/I280) just adds a supplementary defect in

infectivity.

In conclusion, the present study strengthens the importance of the SL1 motif in gRNA packaging and we demonstrated for the first time that its position or/and RNA dimerization itself could limit splicing efficiency, thus preserving a favorable balance between viral genomic and spliced RNA to permit subsequent steps such as translation and RNA packaging.

ACKNOWLEDGEMENTS

The following reagent was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 CAp24 antibody (#6521). This work was supported by the CNRS, Strasbourg University and by a grant from SIDACTION (to J.-C.P.). L. S. was supported by a fellowship of the French Ministry of Higher Education and Research and of the French « Agence Nationale de Recherches contre le SIDA » (ANRS).

REFERENCES

1. **Aldovini, A., and R. A. Young.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**:1920-1926.
2. **Amendt, B. A., D. Hesslein, L. J. Chang, and C. M. Stoltzfus.** 1994. Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* **14**:3960-3970.
3. **Amendt, B. A., Z. H. Si, and C. M. Stoltzfus.** 1995. Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 and tat-rev exon 3: evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol Cell Biol* **15**:6480.
4. **Anson, D. S., and M. Fuller.** 2003. Rational development of a HIV-1 gene therapy vector. *J Gene Med* **5**:829-838.
5. **Bagnarelli, P., A. Valenza, S. Menzo, R. Sampaolesi, P. E. Varaldo, L. Butini, M. Montroni, C. F. Perno, S. Aquaro, D. Mathez, J. Leibowitch, C. Balotta, and M. Clementi.** 1996. Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo. *J Virol* **70**:7603-7613.
6. **Bender, W., and N. Davidson.** 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* **7**:595-607.
7. **Berkhout, B., and J. L. van Wamel.** 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**:6723-6732.
8. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.
9. **Chin, M. P., J. Chen, O. A. Nikolaitchik, and W. S. Hu.** 2007. Molecular determinants of HIV-1 intersubtype recombination potential. *Virology* **363**:437-446.
10. **Chin, M. P., S. K. Lee, J. Chen, O. A. Nikolaitchik, D. A. Powell, M. J. Fivash, Jr., and W. S. Hu.** 2008. Long-range recombination gradient between HIV-1 subtypes B and C variants caused by sequence differences in the dimerization initiation signal region. *J Mol Biol* **377**:1324-1333.
11. **Chin, M. P., T. D. Rhodes, J. Chen, W. Fu, and W. S. Hu.** 2005. Identification of a major restriction in HIV-1 intersubtype recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9002-9007.
12. **Clavel, F., and J. M. Orenstein.** 1990. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol* **64**:5230-5234.
13. **Clever, J. L., D. Miranda, Jr., and T. G. Parslow.** 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **76**:12381-12387.
14. **Clever, J. L., and T. G. Parslow.** 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* **71**:3407-3414.
15. **Clever, J. L., M. L. Wong, and T. G. Parslow.** 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**:5902-5908.
16. **Cochrane, A. W., M. T. McNally, and A. J. Mouland.** 2006. The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology* **3**:18.
17. **Coyle, J. H., B. W. Guzik, Y. C. Bor, L. Jin, L. Eisner-Smerage, S. J. Taylor, D. Rekosh, and M. L. Hammarskjold.** 2003. Sam68 enhances the cytoplasmic

- utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol Cell Biol* **23**:92-103.
18. **Cullen, B. R.** 2005. Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* **433**:26-27.
 19. **D'Souza, V., and M. F. Summers.** 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**:643-655.
 20. **Ennifar, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, P. Dumas, and P. Walter.** 2003. HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem* **278**:2723-2730.
 21. **Ennifar, E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and P. Dumas.** 2001. Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol* **8**:1064-1068.
 22. **Fu, W., R. J. Gorelick, and A. Rein.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**:5013-5018.
 23. **Greatorex, J., J. Gallego, G. Varani, and A. Lever.** 2002. 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**:543-557.
 24. **Hill, M. K., M. Shehu-Xhilaga, S. M. Campbell, P. Poubourios, S. M. Crowe, and J. Mak.** 2003. The dimer initiation sequence stem-loop of human immunodeficiency virus type 1 is dispensable for viral replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **77**:8329-8335.
 25. **Houzet, L., J. C. Paillart, F. Smagulova, S. Maurel, Z. Morichaud, R. Marquet, and M. Mougel.** 2007. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res* **35**:2695-2704.
 26. **Jacquet, S., A. Mereau, P. S. Bilodeau, L. Damier, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *J Biol Chem* **276**:40464-40475.
 27. **Jones, K. L., S. Sonza, and J. Mak.** 2008. Primary T-lymphocytes rescue the replication of HIV-1 DIS RNA mutants in part by facilitating reverse transcription. *Nucleic Acids Res* **36**:1578-1588.
 28. **Kieken, F., F. Paquet, F. Brule, J. Paoletti, and G. Lancelot.** 2006. A new NMR solution structure of the SL1 HIV-1Lai loop-loop dimer. *Nucleic Acids Res* **34**:343-352.
 29. **Laughrea, M., and L. Jette.** 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* **33**:13464-13474.
 30. **Laughrea, M., and L. Jette.** 1997. HIV-1 genome dimerization: kissing-loop hairpin dictates whether nucleotides downstream of the 5' splice junction contribute to loose and tight dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *Biochemistry* **36**:9501-9508.
 31. **Laughrea, M., L. Jette, J. Mak, L. Kleiman, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 1997. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J Virol* **71**:3397-3406.

32. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* **19**:6860-6869.
33. **Le Hir, H., and B. Seraphin.** 2008. EJC's at the heart of translational control. *Cell* **133**:213-216.
34. **Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**:4085-4087.
35. **Levesque, K., M. Halvorsen, L. Abrahamyan, L. Chatel-Chaix, V. Poupon, H. Gordon, L. DesGroseillers, A. Gatignol, and A. J. Mouland.** 2006. Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. *Traffic* **7**:1177-1193.
36. **Liang, C., J. Hu, R. S. Russell, M. Kameoka, and M. A. Wainberg.** 2004. Spliced human immunodeficiency virus type 1 RNA is reverse transcribed into cDNA within infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:203-211.
37. **Lorenz, C., N. Piganeau, and R. Schroeder.** 2006. Stabilities of HIV-1 DIS type RNA loop-loop interactions in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **34**:334-342.
38. **Lucke, S., T. Grunwald, and K. Uberla.** 2005. Reduced mobilization of Rev-responsive element-deficient lentiviral vectors. *J Virol* **79**:9359-9362.
39. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
40. **Mandal, D., C. M. Exline, Z. Feng, and C. M. Stoltzfus.** 2009. Regulation of Vif mRNA splicing by human immunodeficiency virus type 1 requires 5' splice site D2 and an exonic splicing enhancer to counteract cellular restriction factor APOBEC3G. *J Virol* **83**:6067-6078.
41. **Marchand, V., A. Mereau, S. Jacquenet, D. Thomas, A. Mouglin, R. Gattoni, J. Stevenin, and C. Branlant.** 2002. A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding. *J Mol Biol* **323**:629-652.
42. **McBride, M. S., M. D. Schwartz, and A. T. Panganiban.** 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. *J Virol* **71**:4544-4554.
43. **Moore, M. D., W. Fu, O. Nikolaitchik, J. Chen, R. G. Ptak, and W. S. Hu.** 2007. Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J Virol* **81**:4002-4011.
44. **Moore, M. D., O. A. Nikolaitchik, J. Chen, M. L. Hammarskjold, D. Rekosh, and W. S. Hu.** 2009. Probing the HIV-1 genomic RNA trafficking pathway and dimerization by genetic recombination and single virion analyses. *PLoS Pathog* **5**:e1000627.
45. **Muriaux, D., P. M. Girard, B. Bonnet-Mathoniere, and J. Paoletti.** 1995. Dimerization of HIV-1Lai RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *J Biol Chem* **270**:8209-8216.
46. **Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-5251.
47. **Murti, K. G., M. Bondurant, and A. Tereba.** 1981. Secondary structural features in the 70S RNAs of Moloney murine leukemia and Rous sarcoma viruses as observed by electron microscopy. *J Virol* **37**:411-419.

48. **Paillart, J. C., L. Berthoux, M. Ottmann, J. L. Darlix, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1996. A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J Virol* **70**:8348-8354.
49. **Paillart, J. C., R. Marquet, E. Skripkin, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Biol Chem* **269**:27486-27493.
50. **Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-472.
51. **Paillart, J. C., E. Westhof, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1997. Non-canonical interactions in a kissing loop complex: the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* **270**:36-49.
52. **Russell, R. S., C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* **1**:23.
53. **Russell, R. S., A. Roldan, M. Detorio, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* **77**:12986-12995.
54. **Shen, N., L. Jette, C. Liang, M. A. Wainberg, and M. Laughrea.** 2000. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *J Virol* **74**:5729-5735.
55. **Si, Z., B. A. Amendt, and C. M. Stoltzfus.** 1997. Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon 2. *Nucleic Acids Res* **25**:861-867.
56. **Sinck, L., D. Richer, J. Howard, M. Alexander, D. F. Purcell, R. Marquet, and J. C. Paillart.** 2007. In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs. *RNA* **13**:2141-2150.
57. **Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4945-4949.
58. **Smagulova, F., S. Maurel, Z. Morichaud, C. Devaux, M. Mougel, and L. Houzet.** 2005. The highly structured encapsidation signal of MuLV RNA is involved in the nuclear export of its unspliced RNA. *J Mol Biol* **354**:1118-1128.
59. **Song, R., J. Kafaie, L. Yang, and M. Laughrea.** 2007. HIV-1 viral RNA is selected in the form of monomers that dimerize in a three-step protease-dependent process; the DIS of stem-loop 1 initiates viral RNA dimerization. *J Mol Biol* **371**:1084-1098.
60. **St Louis, D. C., D. Gotte, E. Sanders-Buell, D. W. Ritchey, M. O. Salminen, J. K. Carr, and F. E. McCutchan.** 1998. Infectious molecular clones with the nonhomologous dimer initiation sequences found in different subtypes of human immunodeficiency virus type 1 can recombine and initiate a spreading infection in vitro. *J Virol* **72**:3991-3998.
61. **Stoltzfus, C. M., and J. M. Madsen.** 2006. Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res* **4**:43-55.
62. **Sun, X., Q. Zhang, and H. M. Al-Hashimi.** 2007. Resolving fast and slow motions in the internal loop containing stem-loop 1 of HIV-1 that are modulated by Mg²⁺ binding: role in the kissing-duplex structural transition. *Nucleic Acids Res* **35**:1698-1713.

63. **Swanson, C. M., and M. H. Malim.** 2006. Retrovirus RNA trafficking: from chromatin to invasive genomes. *Traffic* **7**:1440-1450.
64. **Swanson, C. M., B. A. Puffer, K. M. Ahmad, R. W. Doms, and M. H. Malim.** 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J* **23**:2632-2640.
65. **Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, and J. Kjems.** 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J* **20**:5748-5758.
66. **Tange, T. O., A. Nott, and M. J. Moore.** 2004. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**:279-284.
67. **Tazi, J., N. Bakkour, V. Marchand, L. Ayadi, A. Aboufirassi, and C. Branlant.** 2010. Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J* **277**:867-876.

TABLE LEGEND

Table 1: Effect of mutations on virus infectivity. Results represent mean \pm standard deviations of at least three independent experiments. For comparison purposes, averaged values were normalized to wild-type levels. Virions released in culture media of 293T cells transfected with wild-type and mutant constructs were used to infect MAGI cells and infectivity was determined by monitoring β -galactosidase after 48 hours.

	Wild-type	Δ SL1	S257-259	I280	S257-259/ I280
Infectivity	100	28 \pm 5	114 \pm 3	50 \pm 36	16 \pm 5

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Constructs used in this study. **(A)** Schematic representation of the HIV-1 genomic RNA. R, repeat sequence; TAR, *trans*-acting responsive element; U5, unique at the 5'-end of the RNA genome; poly-A, 5' copy of the polyadenylation signal; PBS, primer-binding site; DIS, dimerization initiation site; SD, major splice-donor site; Psi, RNA packaging signal; AUG, translation initiation codon of the gag gene; gag, 5'-end of the structural protein coding sequence. **(B)** Wild-type and mutant constructs. Substitutions in the DIS loop are highlighted by red stars. Purple boxes highlight the 19 nt motif inserted between the DIS and the SD site.

Figure 2: Analysis of viral proteins in transfected cells and in virions. Viral proteins were detected in samples extracted from wild-type, Δ SL1, S257-259, I280, S257-259/280, and mock transfected cells and in corresponding viral particles by western blot using a p24 antibody. Arrows indicate to the positions of Pr55^{gag} and CAp24.

Figure 3: Schematic representation of the major HIV-1RNAs species and primers used for their quantitation. Spliced RNAs are classified into two groups: singly and multi-spliced mRNAs. Thick lines correspond to exons and dotted lines to introns. Only the two splice donor sites (SD1 and SD4) and the two splice acceptor sites (SA5 and SA7) important for this study are indicated. Arrows represent PCR-primer pairs used to quantify full-length RNA (blue), *env* RNAs (green) and MS RNAs (red): p1 + p2, p3 + p4 and p5 + p6 PCR-primer pairs are used for quantification, respectively.

Figure 4: Analysis of unspliced (FL), singly (*env*) and multi-spliced mRNAs in transfected cells and in virions. Viral RNAs were detected in RNA samples extracted from wild-type, Δ SL1, S257-259, I280, S257-259/280; and mock transfected cells and in corresponding viral particles using standard RT-PCR. Bands corresponding to FL, multi- and singly-spliced mRNAs are indicated by arrows. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 5: Relative packaging efficiencies of full-length **(A)** and spliced RNAs **(B)** in wild-type, Δ SL1, S257-259, I280 and S257-259/280 virions. RNAs were quantified by RT-qPCR in both transfected cells and viruses. Relative packaging efficiencies were determined [(V/C)

× 100] and normalized to FL level. Results represent mean ± standard deviations of at least three independent experiments.

Figure 6: Northern blot analysis of gRNA extracted from wild-type, ΔSL1, S257-259, I280 and S257-259/280 virions released from 293T cells 48 h post-transfection. Denaturing (A) and native (B) northern blot. The name of each construction is indicated above the autoradiography (mock: negative control). Genomic RNA was detected with a probe specific to the *gag* gene. Monomer and dimer forms are indicated by arrows.

Figure 7: Relative splicing efficiencies of multi- and singly-spliced mRNAs in cells transfected with wild-type, ΔSL1, S257-259, I280 and S257-259/280 constructions. RNAs were quantified by RT-qPCR in transfected cell. Relative splicing efficiencies were determined [(spliced RNAs in cells/FL RNAs in cells) × 100] and normalized to wild-type level. Results represent mean ± standard deviations of at least three independent experiments.

Figure 8: Model of competition between dimerization and splicing. Top panel shows a potential competition between RNA-RNA interaction through the DIS (highlight in purple) and EJC (blue) binding on wild-type viral RNAs. Middle and lower panels show a loss of competition when a sequence (green) is inserted between the DIS and the SD site or when the DIS is deleted, respectively. The hairpins forming the DIS (yellow) and the SD site (pink) are schematically drawn, along with the three upstream structural motifs: TAR, polyA and U5-PBS hairpins.

Figure 1

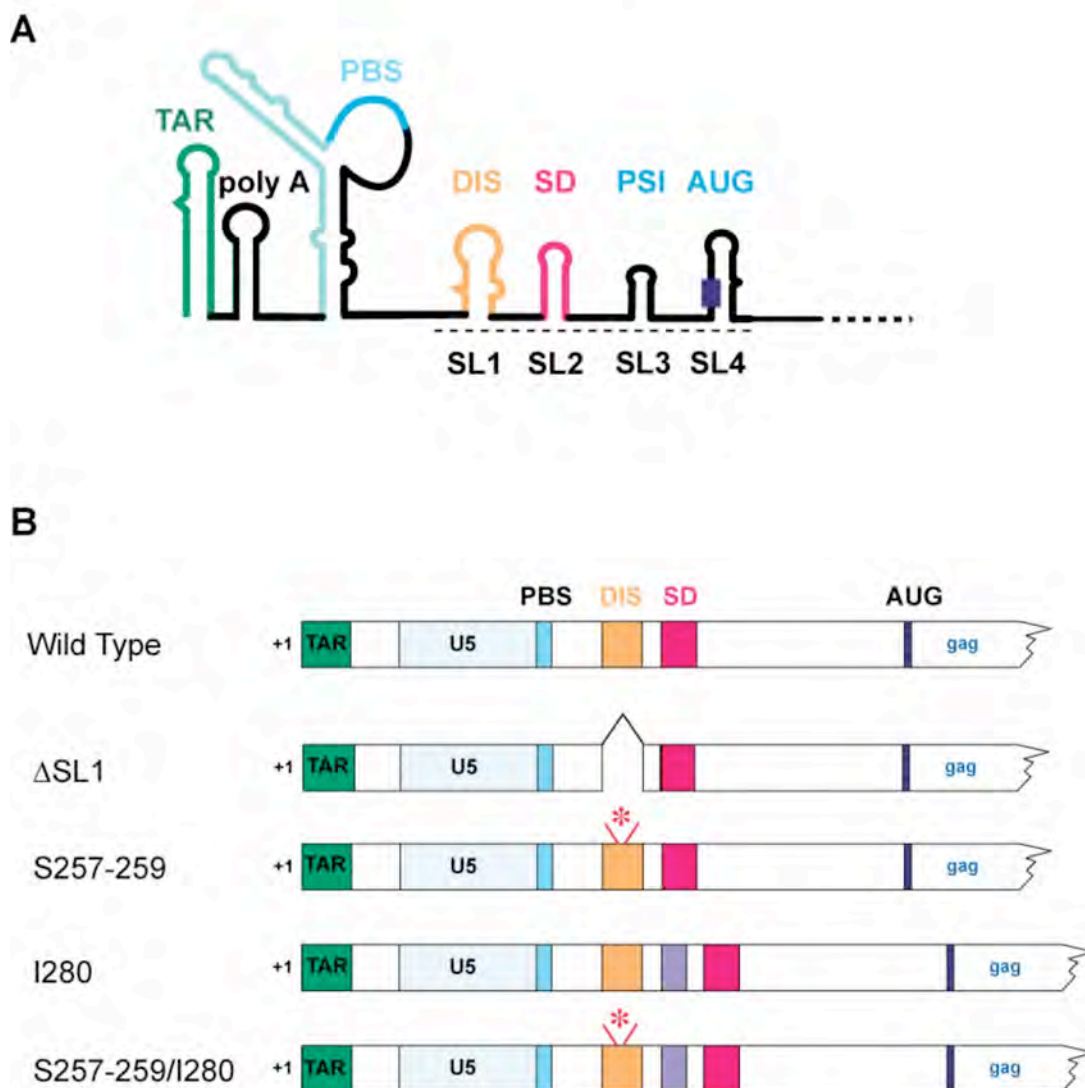


Figure 2

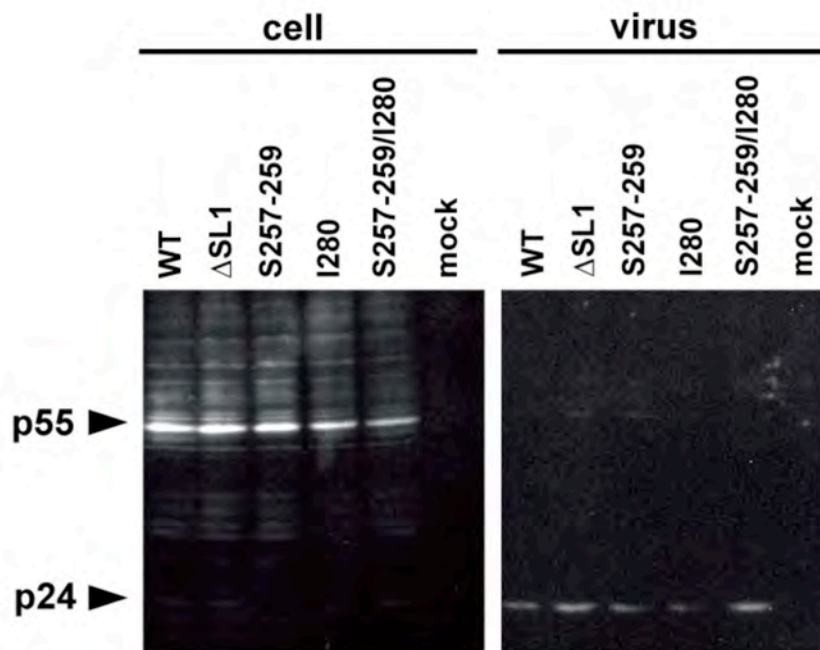


Figure 3



Figure 4

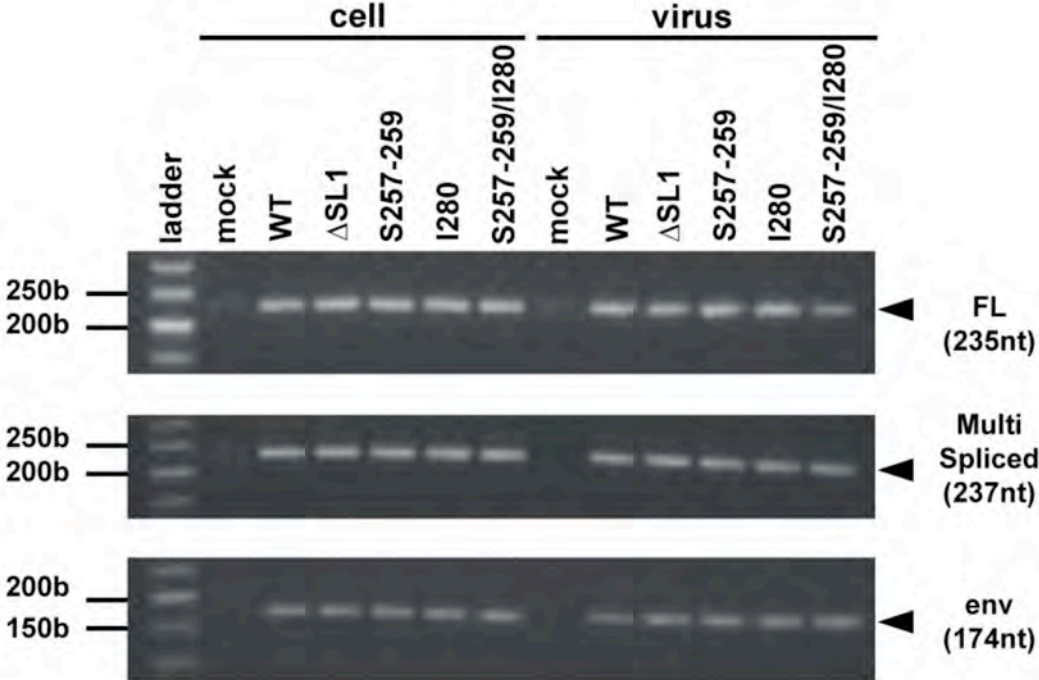


Figure 5

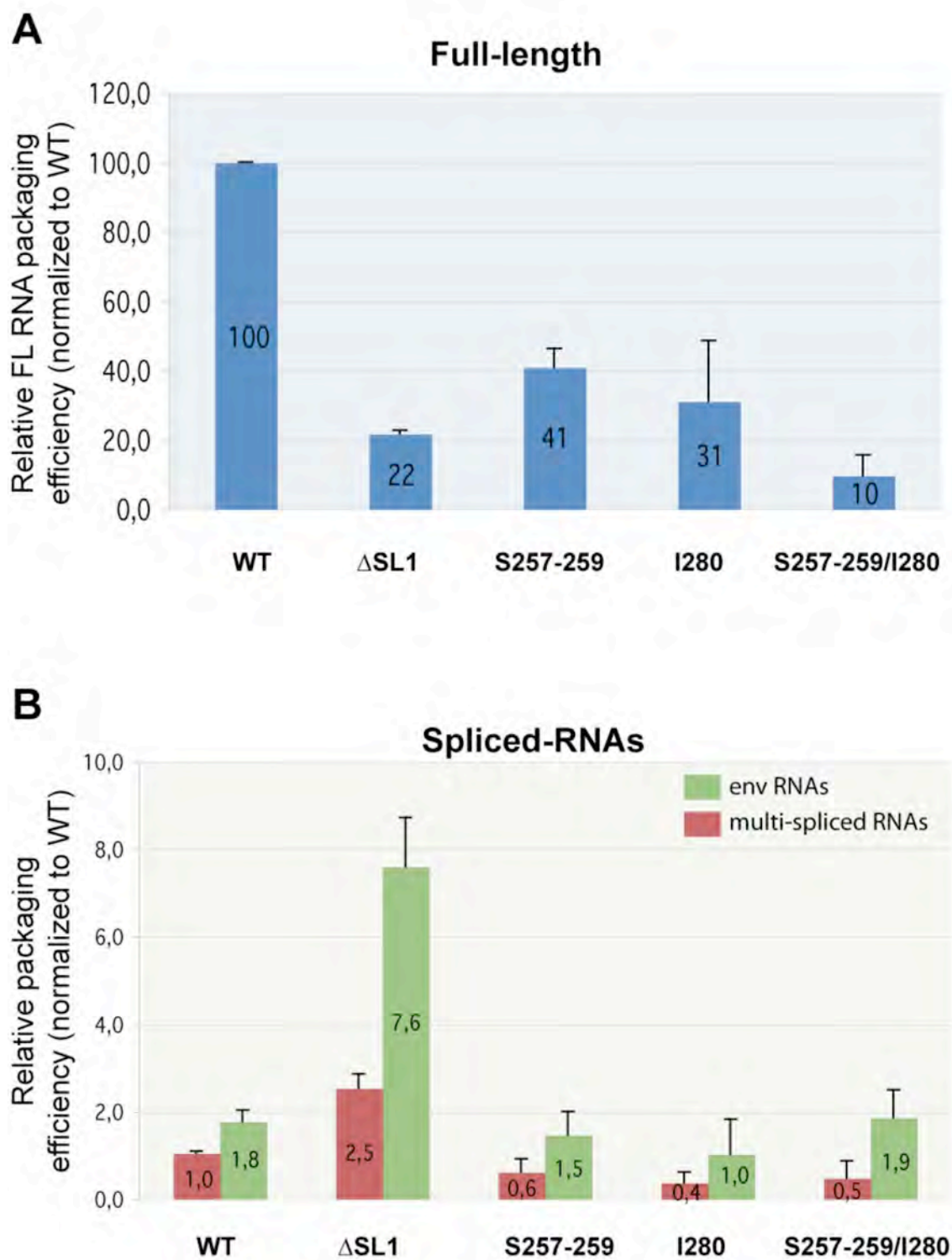


Figure 6

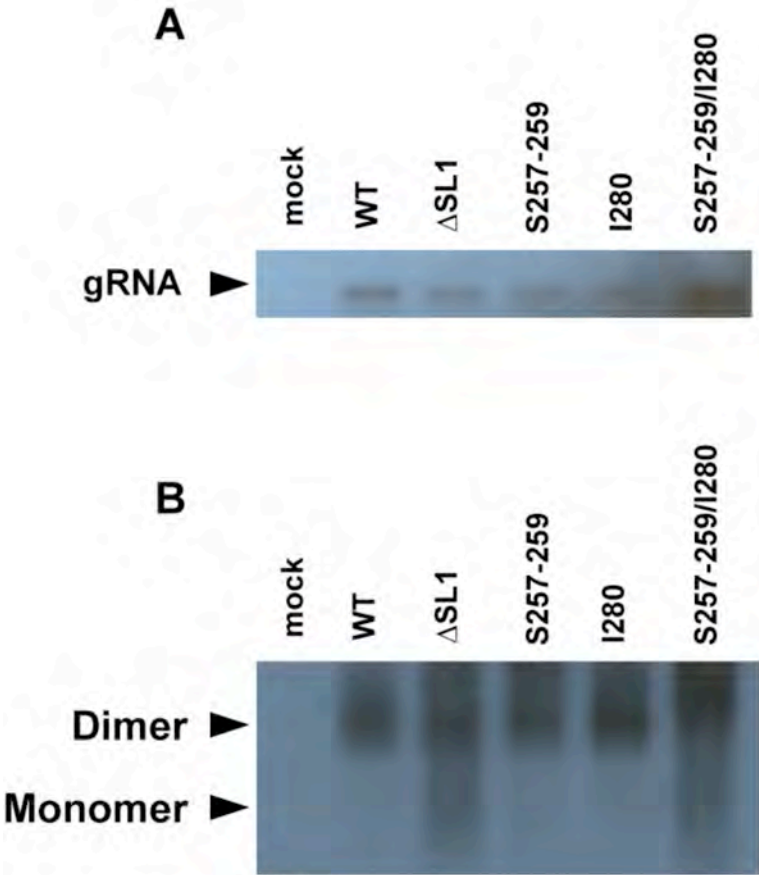


Figure 7

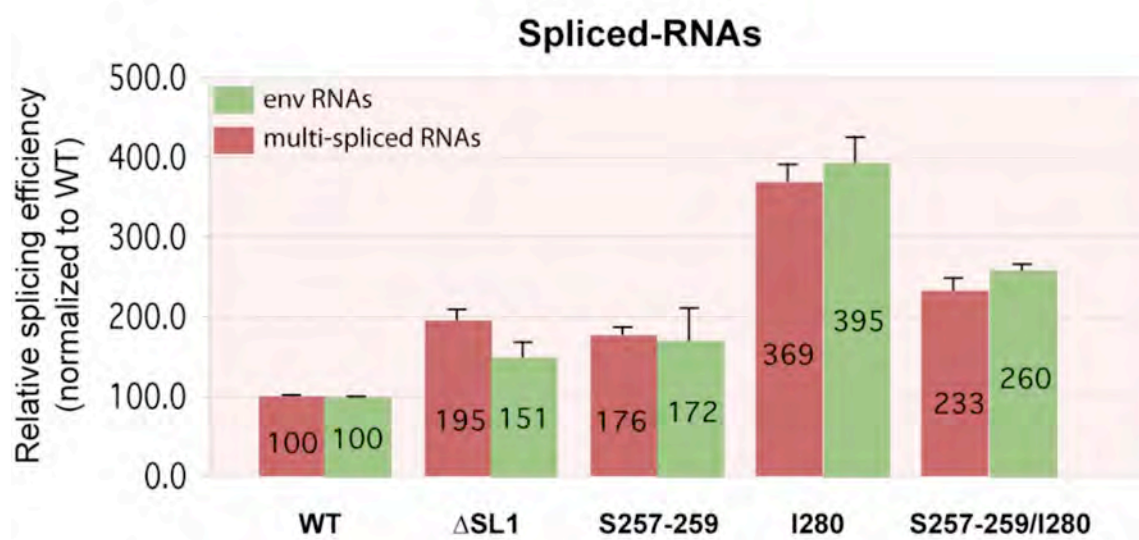
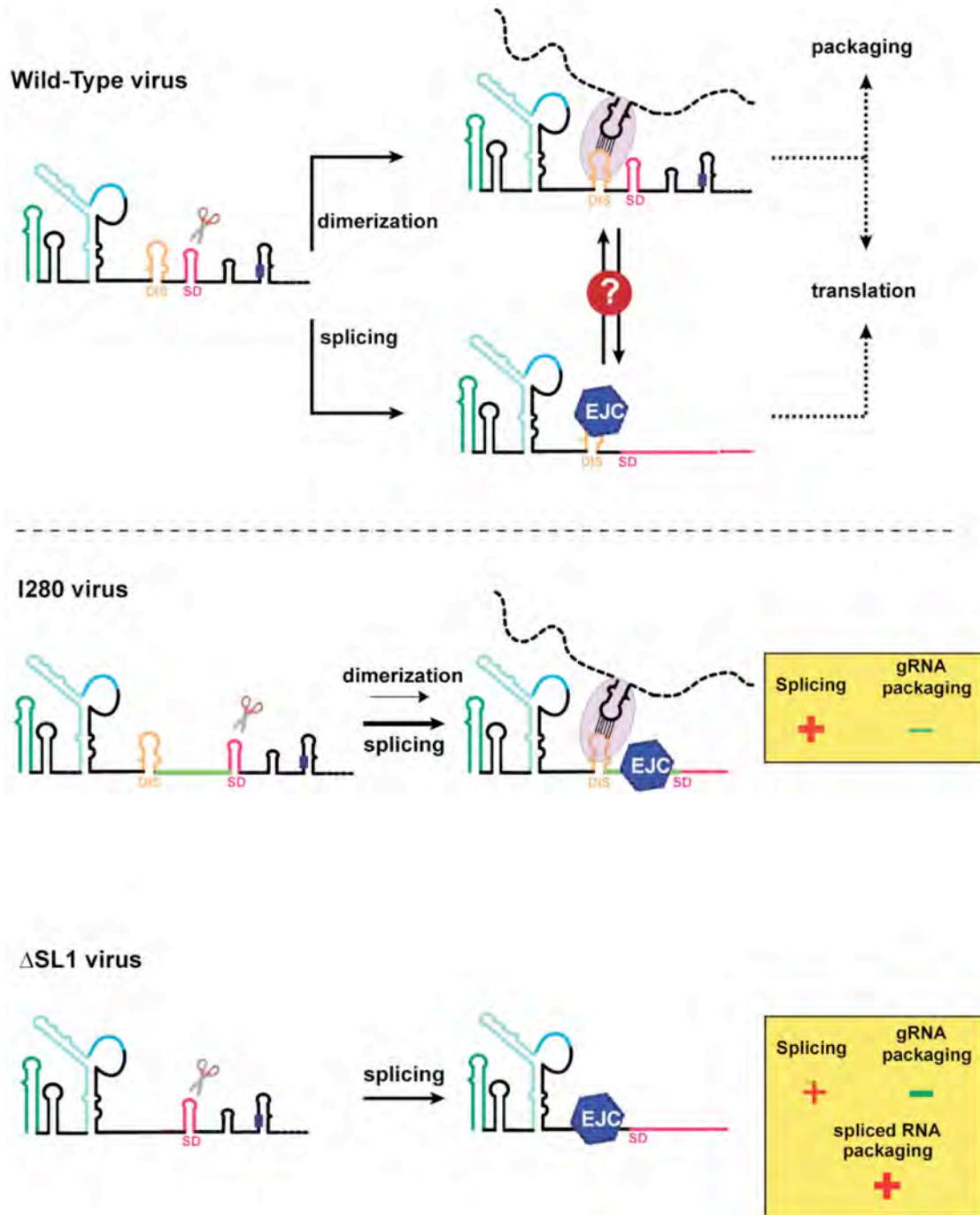


Figure 8



IV. Fonctions de la protéine virale Vif dans la dimérisation de l'ARNg du HIV-1

1. Introduction et objectifs

La protéine Vif (Viral Infectivity Factor) est une petite protéine auxiliaire du HIV-1 impliquée dans l'assemblage, la maturation et l'infectivité des particules virales. Elle fait partie du complexe ribonucléoprotéique cytoplasmique d'assemblage et est encapsidée à faible taux dans les particules virales par l'intermédiaire d'interactions avec le précurseur Gag et la région 5'UTR de l'ARNg (185, 220). Il a été montré qu'en absence de Vif, l'assemblage du HIV-1 dans les cellules non permissives aboutit à la production de particules virales non infectieuses présentant une morphologie aberrante (48) et une instabilité du core (326), ainsi qu'un défaut de rétrotranscription de l'ARNg lors des étapes précoces de ce mécanisme (110, 456). La présence du facteur APOBEC3G dans la cellule productrice est responsable de l'apparition de ces défauts et Vif est capable de neutraliser l'effet antirétroviral de ce facteur cellulaire (399). Par ailleurs, à côté de son rôle crucial dans la répression du facteur APOBEC3G, Vif jouerait également un rôle dans la structuration de l'ARN (477). Ces diverses observations ont ainsi conduit mon équipe d'accueil à étudier les effets de Vif *in vitro* sur la rétrotranscription et son activité chaperon d'ARN (travail de thèse de Simon Henriet, alors doctorant dans le laboratoire). J'ai pour ma part collaboré à cette étude en me focalisant sur l'effet chaperon d'ARN de Vif et plus spécifiquement sur la dimérisation de l'ARNg du HIV-1.

2. Article : Vif est une protéine chaperon d'ARN qui pourrait réguler temporellement la dimérisation de l'ARN et les phases précoces de la rétrotranscription du HIV-1

Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription

S. Henriët¹, L. Sinck¹, G. Bec¹, R. J. Gorelick², R. Marquet¹ and J.-C. Paillart^{1,*}¹Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg cedex, France and ²AIDS Vaccine Program, SAIC-Frederick Inc., NCI-Frederick, P.O. Box B, Frederick, MD, USA

Received June 7, 2007; Revised July 2, 2007; Accepted July 3, 2007

ABSTRACT

HIV-1 Vif (viral infectivity factor) is associated with the assembly complexes and packaged at low level into the viral particles, and is essential for viral replication in non-permissive cells. Viral particles produced in the absence of Vif exhibit structural defects and are defective in the early steps of reverse transcription. Here, we show that Vif is able to anneal primer tRNA^{Lys3} to the viral RNA, to decrease pausing of reverse transcriptase during (–) strand strong-stop DNA synthesis, and to promote the first strand transfer. Vif also stimulates formation of loose HIV-1 genomic RNA dimers. These results indicate that Vif is a *bona fide* RNA chaperone. We next studied the effects of Vif in the presence of HIV-1 NCp, which is a well-established RNA chaperone. Vif inhibits NCp-mediated formation of tight RNA dimers and hybridization of tRNA^{Lys3}, while it has little effects on NCp-mediated strand transfer and it collaborates with nucleocapsid (NC) to increase RT processivity. Thus, Vif might negatively regulate NC-assisted maturation of the RNA dimer and early steps of reverse transcription in the assembly complexes, but these inhibitory effects would be relieved after viral budding, thanks to the limited packaging of Vif in the virions.

INTRODUCTION

In addition to the structural *gag*, *pol* and *env* genes, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genome contains several regulatory genes: *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* and *vpu*. The HIV-1 Vif (viral infectivity factor) protein, first considered as an accessory factor, is a positive

modulator of viral infectivity in several cell types. In particular, Vif is required for efficient HIV-1 replication in so called 'non-permissive' cells such as primary CD4⁺ T lymphocytes and macrophages and some T-cell lines (H9, HUT78), whereas HIV-1 lacking *vif* (HIV-1Δ*vif*) can replicate in fibroblasts and most T-cell lines termed 'permissive' (1–6).

This cell type-dependent requirement for Vif can be explained by the expression of APOBEC3G and APOBEC3F, two cellular inhibitors of HIV-1 replication, in non-permissive cells (5,7). APOBEC3G/3F are members of a large family of cytidine deaminases (8). In the absence of Vif, APOBEC3G/3F associate with Gag and RNA during viral assembly and are packaged into virions (9–14). APOBEC3G/3F induce hypermutation of the HIV-1 genome by mediating deamination of cytidine to uracil on the newly synthesized (–) strand DNA during reverse transcription, thus leading to guanosine to adenosine transitions in the viral genome (9,15–17). Independently from their catalytic activity, APOBEC3G/3F factors also impair particle infectivity by affecting virion morphology and by destabilizing the reverse transcription complex (18–21). Vif counteracts the antiviral activity of APOBEC3G/3F by several mechanisms. Vif seems to directly impair packaging of APOBEC3G/3F by an unknown mechanism (10,22–24), induces degradation of APOBEC3G/3F through the ubiquitination-proteasome pathway (22,25–27), and negatively regulates APOBEC3G/3F translation (10,22,23).

Vif is part of a large cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) complex and it is now usually accepted that Vif is packaged into viral particles through interactions with the viral genomic RNA, co-packaged cellular RNAs and the nucleocapsid (NC) domain of Gag (14,28–33). Vif defective viruses produced from non-permissive cells display defects not only at early assembly events but also at post-entry steps of infection, resulting in a failure

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 0 3 88 41 70 35; Fax: +33 0 3 88 60 22 18; Email: jc.paillart@ibmc.u-strasbg.fr

Correspondence may also be addressed to Roland Marquet. Tel: +33 0 3 88 41 70 51; Fax: +33 0 3 88 60 22 18; Email: r.marquet@ibmc.u-strasbg.fr

© 2007 The Author(s)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

to complete reverse transcription and integration (34–39). Moreover, viral particles produced in the absence of Vif show structural defects such as aberrant core morphology and reduced stability (37,40,41). In particular, NC and reverse transcriptase (RT) were found to be less stably associated with viral cores in the absence of Vif (40), explaining in part why Δvif virions are defective in the reverse transcription step (29,36,42,43). Initiation of reverse transcription is completely impaired in Δvif viruses, suggesting that Vif may serve as an auxiliary factor for HIV-1 RT (44) and allows formation of a functional RNP (30). It has also been shown that Vif is able to modulate viral protease (PR) activity and the proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/NC site, leading to the possibility that virion incorporation of Vif could stabilize NC intermediates (45–47).

Considering that NCp7 (48–50) and Vif (44) are both involved in the reverse transcription process and in structural rearrangements of HIV-1 RNA (29), we were interested to know whether Vif could modulate RNA dimerization, a prerequisite for RNA packaging (51,52), and the early steps of reverse transcription either alone or in presence of various intermediate processing products of Gag (NCp7, NCp9 and NCp15). In the absence of NC proteins, we found that Vif possesses RNA chaperone activity, resembling but distinct from the chaperone properties of NCp proteins with respect to RNA dimerization, hybridization of tRNA^{Lys3} to the PBS, initiation of reverse transcription by RT and the first strand transfer. Surprisingly, Vif inhibited the initiation phase of reverse transcription. At high Vif/NCp ratio (1/3), Vif also inhibited NCp-induced maturation of the RNA dimer and tRNA^{Lys3} annealing, whereas both NCp and Vif contributed to increase the processivity of RT. Vif had modest effects on the NCp-induced strand transfer reaction. At low Vif/NCp ratio (1/30), Vif had very limited effects on reverse transcription. Considering that Gag maturation is a highly ordered process that can be modulated by Vif (47), and that Vif is a RNA chaperone influencing RNA dimerization, tRNA annealing, RT processivity, and the first strand transfer, our results suggest that during the assembly steps, Vif might be a negative temporal regulator of RNA dimerization and packaging, preventing premature initiation of reverse transcription, while promoting tRNA annealing, a process that could be affected by APOBEC3F/3G.

MATERIALS AND METHODS

RNA template and primers

The donor and acceptor RNAs, corresponding respectively to nucleotides 1–311 and 8607–9229 of HIV-1 genomic RNA (Mal isolate) were synthesized by *in vitro* transcription of plasmids pJCB and pFB1 using T7 RNA polymerase and purified as previously described (53). Plasmid containing a 3-nt substitution in the self-complementary sequence of the RNA dimerization initiation site (DIS) loop (pDIS-AAA) (54) was digested by RsaI prior to *in vitro* transcription to generate mutated RNA 1–311. RNA 1–615 used in the dimerization assays

has been obtained after digestion of plasmid pHIV_615 by PvuII (55). Prior to 5'-end labeling, 10 μ g of tRNA^{Lys3} purified from beef liver (56) were denatured for 2 min at 90°C in 25 mM Tris HCl pH 8, 0.1% SDS (wt/vol), 15% (vol/vol) formamide, cooled on ice and incubated with 1000 U of BAP (Fermentas) at 70°C for 1 h. After phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, the dephosphorylated tRNA^{Lys3} was purified by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Dephosphorylated tRNA^{Lys3} (450 ng) was incubated 5 min at 70°C, cooled at room temperature and radiolabeled using 15 U of phage T4 polynucleotide kinase (PNK, New England Biolabs) and 100 μ Ci of [γ -³²P] ATP (Amersham), for 30 min at 37°C in the buffer supplied with the enzyme in a 30 μ l final volume. Labeled tRNA^{Lys3} was then purified by denaturing PAGE. ODN, an 18-mer oligodeoxyribonucleotide complementary to the PBS was chemically synthesized and 5'-end labeled for 45 min at 37°C using 100 μ Ci of [γ -³²P] ATP and 10 U of PNK (New England Biolabs). Internal labeling of RNA 1–615 was achieved by addition of [α -³²P] ATP (Amersham) during transcription (57).

Proteins

Wild-type HIV-1 Vif protein was expressed in *Escherichia coli* with an N-terminal 6-His fusion tag and purified as previously described (58). NCp7, NCp9 and NCp15 proteins from NL4.3 (55, 72 and 122 amino acids, respectively), expressed in *E. coli* and purified as described (59), were reconstituted with one equivalent of Zn²⁺ per zinc finger in milliQ H₂O (Millipore), aliquoted, layered with mineral oil and stored at –80°C (50). Wild-type and RNase H(–) E478Q HIV-1 RTs were expressed in *E. coli* with a N-terminal 6-His fusion tag and purified as previously described (60).

Heat annealing of tRNA^{Lys3} and ODN

All annealing reactions were performed using 1 pmol of RNA 1–311 and 0.3 pmol of 5'-end labeled ODN or tRNA^{Lys3}. Primer and template were denatured 2 min at 90°C then cooled on ice. After addition of 0.1 M NaCl and 6 μ M ZnCl₂, samples containing ODN or tRNA^{Lys3} were incubated 20 min at 50 or 70°C, respectively, and cooled on ice.

Protein-mediated tRNA^{Lys3} annealing

Primer and template were first denatured separately by incubation 2 min at 90°C, ice-cooled and renatured 10 min at 37°C in 50 mM Tris HCl pH 7.2, 50 mM NaCl, 6 μ M ZnCl₂ and 5 mM MgCl₂ (buffer H). RNAs were then mixed together, incubated 10 min at 37°C, 5 min at room temperature and put on ice while adding Vif and/or NC proteins. In parallel, heat-annealed complexes were formed as described above and adjusted to 50 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.2 and 5 mM MgCl₂. Heat- and protein-mediated annealing reactions (10 μ l) were incubated 20 min at 37°C, and split in two equal volumes, in order to monitor hybridization and to assay extension by wild-type HIV-1 RT. To monitor hybridization, samples were deproteinized with 1.3 mg/ml proteinase K

(Roche) in 8mM NTPs, 1 mM spermidine, 1.3% SDS and 33mM EDTA for 1 h at 37°C. Spermidine and NTPs help minimizing aggregation of nucleic acids by NC (61). Volume was then adjusted to 60µl with buffer H and following phenol/chloroform extraction, 50µl of RNA-containing aqueous phase supplemented with glycerol-containing loading buffer were analyzed by non-denaturing 6% PAGE. Electrophoresis was performed at 4°C in 0.5× Tris Borate buffer supplemented with 0.1 mM MgCl₂.

Protein-mediated RNA dimerization

In a typical experiment, 100 nM of unlabeled HIV-1 1 615 RNA fragment were diluted in 10µl of Milli-Q (Millipore) water with the corresponding labeled RNA (5000 c.p.m., 3 5nM). Samples were denatured for 2 min. at 90°C, and snap-cooled on ice for 2 min. Dimerization was initiated by addition of Vif and/or NCp7 proteins in conditions disfavoring salt-induced RNA dimerization (50mM sodium cacodylate pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1mM MgCl₂). RNA samples were incubated 30 min at 37°C and deproteinized as above, then re-suspended in glycerol-containing loading buffer, split in two equal volumes and analyzed on a 0.8% agarose gel in native (Tris Borate 0.5×, MgCl₂ 0.1mM, run at 4°C) or denaturing (Tris Borate-EDTA 1×, run at 20°C) electrophoresis conditions. Gels were fixed in 10% trichloroacetic acid for 10 min. and dried for 1 h under vacuum at room temperature. Radioactive bands corresponding to monomeric and dimeric species were visualized and quantified using a FLA 5000 (Fuji).

Synthesis of +6 extension products with wild-type HIV-1 RT

To assay extension by HIV-1 RT, heat- or protein-annealed tRNA^{Lys3}/RNA 1 311 complexes were first treated with 1.5 mg/ml proteinase K in 1.5% SDS for 1 h at 37°C. After addition of 0.3M sodium acetate, complexes were phenol/chloroform extracted and precipitated in ethanol. Following centrifugation and vacuum drying, nucleic acids pellets were mildly solubilized in buffer E1 (50mM Tris HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM DTT, 6mM MgCl₂ and 1mM spermidine). tRNA^{Lys3}/RNA 1 311 complexes were incubated 4 min at 37°C with 70 nM HIV-1 RT and reverse transcription was initiated by addition of dTTP, dGTP, dCTP (100µM each) and 15µM ddATP as a chain terminator. After 45 min at 37°C, polymerase activity was blocked by adding 20mM EDTA, samples were phenol/chloroform extracted and precipitated in ethanol. Purified nucleic acids were re-suspended in urea-containing loading buffer and analyzed by 8% PAGE. Radioactive bands were visualized and quantified using a BioImager BAS 2000 (Fuji).

Synthesis of +6 extension products in the presence of Vif

To test the influence of Vif on the initiation step of reverse transcription, heat-annealed tRNA^{Lys3}/RNA 1 311 complexes were incubated 20 min at 37°C in buffer H with increasing concentrations of Vif. Half of

the reaction medium was treated as described above to monitor hybridization, then 90 nM HIV-1 RT and 1mM spermidine were added on the remaining half and after 4 min incubation at 37°C, reverse transcription was initiated by addition of dTTP, dGTP, dCTP (50µM each) and 7.5µM ddATP as a chain terminator. After 20 min at 37°C, polymerase activity was blocked by adding 33mM EDTA, 1% SDS and 1 mg/ml proteinase K. After proteolysis for 1 h at 37°C, samples were phenol/chloroform extracted and precipitated with ethanol. Nucleic acids were re-suspended in urea-containing loading buffer and analyzed by 8% PAGE.

(-) Strong-stop DNA synthesis and strand transfer assays

For () strand strong-stop DNA (ssDNA) synthesis and strand transfer experiments, we used the 5'-end labeled ODN primer annealed to donor RNA 1 311. In both assays, NC and/or Vif proteins were incubated with 380 nM WT or E478Q HIV-1 RT for 4 min at 37°C in buffer E2 (0.1M NaCl, 60mM Tris HCl pH 8.0, 6mM MgCl₂, 50µM dNTPs, 1mM DTT). In strand transfer experiments, 2 pmol of acceptor RNA were denatured 2 min at 90°C, ice-cooled and re-natured at 37°C for 15 min in 0.1M NaCl, 60mM Tris HCl pH 8.0, 6mM MgCl₂. Acceptor RNA was then added to proteins and incubated 4 min at 37°C in buffer E2. Reverse transcription was initiated by addition of pre-incubated primer/template complexes and proceeded for 5 60 min at 37°C. Polymerization was blocked by addition of 10mM EDTA, 1% SDS and 2 mg/ml proteinase K. Samples were treated as described above and analyzed by 6% PAGE.

Verification and quantification of strand transfer products

To distinguish genuine strand transfer products from self-priming products, bands containing nucleic acids longer than ssDNA were cut out of the dried gels, eluted at room temperature in 0.5M ammonium acetate, 0.1mM EDTA and 0.1% SDS and PCR-amplified with sense (corresponding to nucleotides 9038 9055) and antisense (ODN) primers. Percentage of full-length transfer product (FL) was calculated according to:

$$FL(\%) = \left(\frac{I_{FL}}{I_{FL} + I_{SS-FL}} \right) \cdot 100$$

where I_{FL} is the intensity of the band corresponding to full-length transfer product and I_{SS-FL} is the sum of the intensities of incomplete transfer products and ssDNA.

RESULTS

Vif induces formation of a functional tRNA^{Lys3}/template RNA complex

ΔVif viruses exhibit defects in the early steps of reverse transcription (29,36,42,43) in cells expressing APOBEC3G/3F, and APOBEC3G has been recently

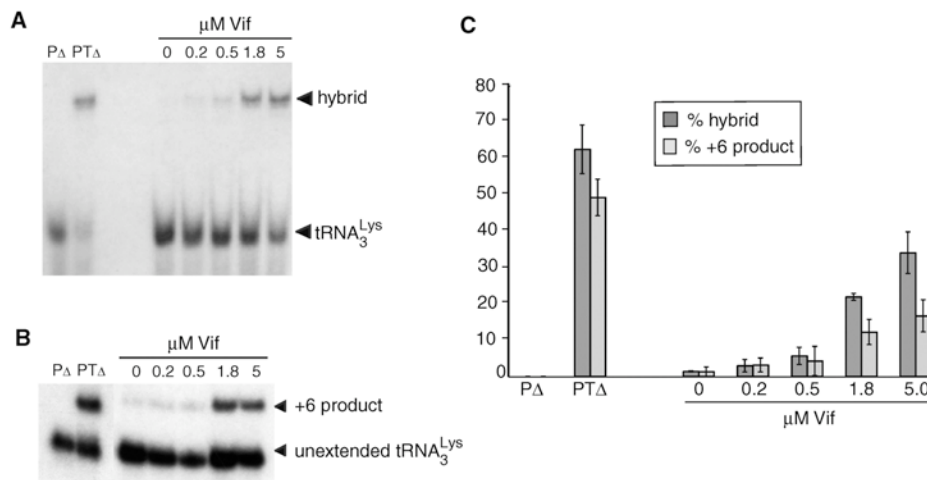


Figure 1. Vif-mediated annealing of tRNA^{Lys3}. (A) Bandshift assay showing heat- and Vif-mediated annealing of tRNA^{Lys3} to HIV-1 RNA 1–311. Free and annealed tRNA^{Lys3} are indicated by arrowheads. P_Δ and PT_Δ lanes correspond to heat-annealing reaction performed in the absence and presence of RNA 1–311, respectively. (B) After deproteinization of the complexes, tRNA^{Lys3} annealed in (A) was extended with HIV-1 RT using a mixture of dCTP, dGTP, dTTP and ddATP. (C) Quantification of the gels shown in (A) and (B). The errors bars correspond to the mean ± SD of three to six experiments.

shown to specifically inhibit tRNA^{Lys3}-primed DNA synthesis, possibly by inhibiting tRNA^{Lys3} annealing to the PBS, which occurs concomitantly to or immediately after budding (21). Gag precursor, mature NCp7, or maturation intermediates are thought to be the main players of this step thanks to their RNA chaperone activity (62). However, Vif is present in large amounts in the assembly complexes (Vif/Gag ratio ~0.5) (32) and in stoichiometric amount with RT in the viral particles (~100 molecules) (39) and could thus affect tRNA annealing. In favor of this hypothesis, Vif binds the 5'-end region of HIV-1 genomic RNA with high affinity ($K_d \sim 45$ nM) and recognizes many secondary structures in the 5'-UTR, including the PBS region (33).

To test the influence of Vif on tRNA^{Lys3} placement onto the PBS, we performed annealing experiments using purified recombinant Vif, post-transcriptionally modified tRNA^{Lys3} and a RNA template spanning the first 311 nt of HIV-1 genomic RNA. Hybridization was monitored by native gel electrophoresis, and to ascertain specific and functional placement of tRNA^{Lys3} to the PBS, hybrids were tested for their ability to initiate reverse transcription.

In keeping with previous studies, annealing of tRNA^{Lys3} at 70°C in the absence of proteins proceeded with >80% efficiency (Figure 1A, lanes P_Δ and PT_Δ) (61,63). Remarkably, we observed that Vif was able to significantly promote tRNA^{Lys3} annealing to the PBS at 37°C, in a dose-dependent manner. While no hybrid was observed at 37°C in the absence of Vif, ~10% of tRNA^{Lys3} was hybridized in the presence of 0.5 μM Vif, and a maximum of 30% of tRNA^{Lys3} was annealed at 5 μM Vif (Figure 1A and C).

To check the functionality of the Vif-annealed tRNA^{Lys3}/RNA 1–311 complexes, we monitored

reverse transcription of the viral RNA from the annealed tRNA^{Lys3} by HIV-1 RT, after removal of Vif. Primer extension was performed using a mixture of dCTP, dTTP, dGTP and ddATP, which allowed addition of 6 nt to tRNA^{Lys3} (Figure 1B). We observed a good correlation between the percentage of hybrid and the amount of +6 extension products with both heat- and Vif-annealed complexes (Figure 1B and C), indicating that RT can recognize these complexes and initiate DNA synthesis. However, for both types of complexes, the amount of +6 extension product was systematically 20% lower than the amount of hybrid, suggesting a systematic loss of tRNA^{Lys3}/RNA 1–311 complexes during protein extraction and purification procedures. Taken together, these results clearly show that Vif is able to promote formation of a functional tRNA^{Lys3}/RNA complex.

Vif has an inhibitory effect on the initiation of reverse transcription

A recent study showed that Vif stimulates HIV-1 RT activity by enhancing both the polymerization rate and RT binding to nucleic acids (44). Vif also stimulates DNA synthesis through abasic sites, a property that could play a role in counteracting APOBEC3G-mediated deamination of proviral DNA (16,64,65). These results suggest that Vif is a co-factor of HIV-1 RT, although these experiments were performed using an artificial primer–template complex (44). We previously showed that when using a RNA template corresponding to the 5'-end of the HIV-1 genomic RNA and tRNA^{Lys3} as primer, (–) strand ssDNA synthesis proceeds through two distinct steps. Initiation corresponds to the addition of the first 6 nt to tRNA^{Lys3}; during this step DNA synthesis is distributive, while the subsequent elongation is processive

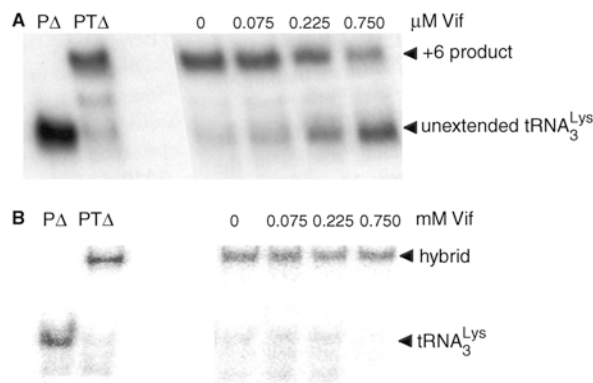


Figure 2. Effect of Vif on the initiation of reverse transcription. Heat-annealed tRNA^{Lys3}/RNA 1–311 complex (PT_Δ) was incubated with HIV-1 RT and increasing concentrations of Vif. (A) Reverse transcription was initiated by addition of dTTP, dGTP, dCTP and ddATP. Polymerization was blocked with EDTA after 20 min. Following deproteinization, samples were analyzed by denaturing PAGE to visualize the initiation product (tRNA^{Lys3} extended by 6 nt). (B) Native PAGE control showing that Vif did not destabilize the heat-annealed complex.

(66,67). Conversely, priming DNA synthesis with an 18-mer DNA complementary to the PBS (ODN) allows DNA synthesis to start in the elongation mode (63).

To test the effect of Vif on the initiation of reverse transcription, heat-annealed tRNA^{Lys3}/RNA 1–311 complex was incubated with increasing concentrations of Vif and reverse transcription was initiated by adding RT and a mixture of dCTP, dTTP, dGTP and ddATP that allowed to complete the initiation phase of reverse transcription (see Experimental Procedures section) (Figure 2). Note that contrary to the +6 extension assay described above, Vif was present during DNA synthesis. Whereas increasing concentrations of Vif had no effect on the stability of heat-annealed hybrid (Figure 2B), we observed a dose-dependent decrease in +6 extension product correlated with an increase in unextended tRNA^{Lys3} primer (Figure 2A). We did not observe any reverse transcription product between these two forms, indicating that inhibition of reverse transcription takes place before the addition of the first deoxynucleotide. These data suggest that Vif decreased initiation of reverse transcription either by inhibiting the addition of the incoming nucleotide or by preventing binding of RT to the tRNA^{Lys3}/RNA 1–311:RT complex.

Vif stimulates (–) strand ssDNA synthesis

In order to test the effect of Vif on the elongation phase of reverse transcription, we primed ssDNA synthesis with an ODN annealed to the PBS of RNA 1–311. Whereas a low (0.2 μM) concentration of Vif had no significant effect on ssDNA synthesis, a 2 μM concentration of Vif increased ssDNA synthesis by ~2-fold after a 60-min reaction time (Figure 3). Analysis of the reverse transcription products by denaturing PAGE showed that the increase in DNA synthesis correlated with a decrease in RT

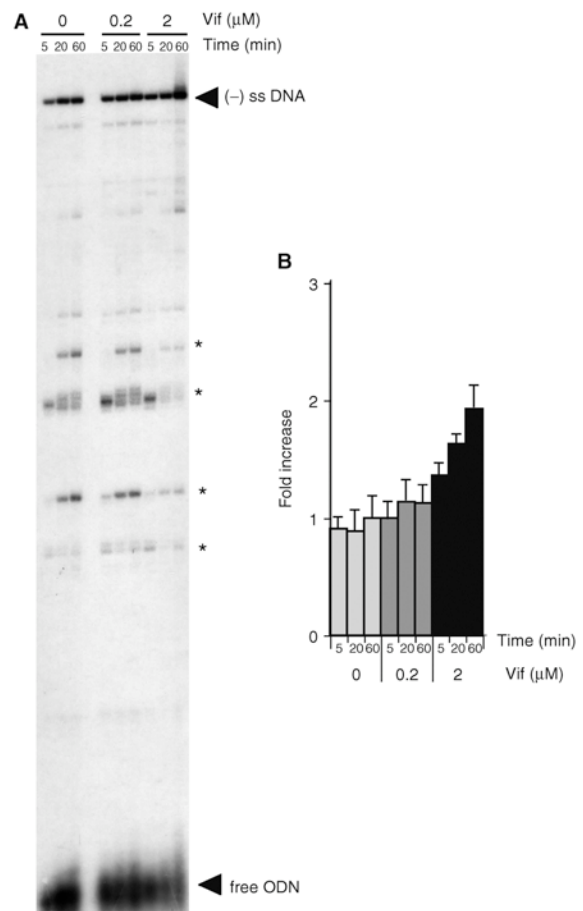


Figure 3. Effect of Vif on (–) strand strong-stop DNA synthesis. A DNA primer (ODN) heat-annealed to RNA 1–311 was extended by incubating with HIV-1 RT, Vif and dNTPs. Polymerization was for 5, 20 or 60 min and the samples were deproteinized before PAGE. (A) Denaturing gel showing the time course of labeled ODN extension in the presence of increasing concentrations of Vif. Minus strong-stop DNA and unextended ODN are indicated. Asterisks indicate RT pauses specifically reduced by the addition of Vif. (B) Quantification of (A), data is normalized to the ratio of ssDNA synthesized at 60 min in the absence of Vif. The errors bars correspond to the mean ± SD of three to six experiments.

pausing (Figure 3A, asterisks), suggesting that Vif-enhanced ssDNA synthesis by facilitating reverse transcription through stable secondary structures present in the RNA template. Indeed, secondary structures slow down RT, inducing dissociation of the enzyme and subsequently pauses (68,69). Thus, our data suggest that stimulation of ssDNA synthesis results from Vif–RNA interactions.

Effects of NC intermediates and Vif on viral RNA dimerization, tRNA^{Lys3} annealing and (–) ssDNA synthesis

Mature NCp7 is a well-characterized co-factor of HIV-1 RT (70), and at least some of the Vif-binding sites in the 5' region of viral RNA are also NCp-binding

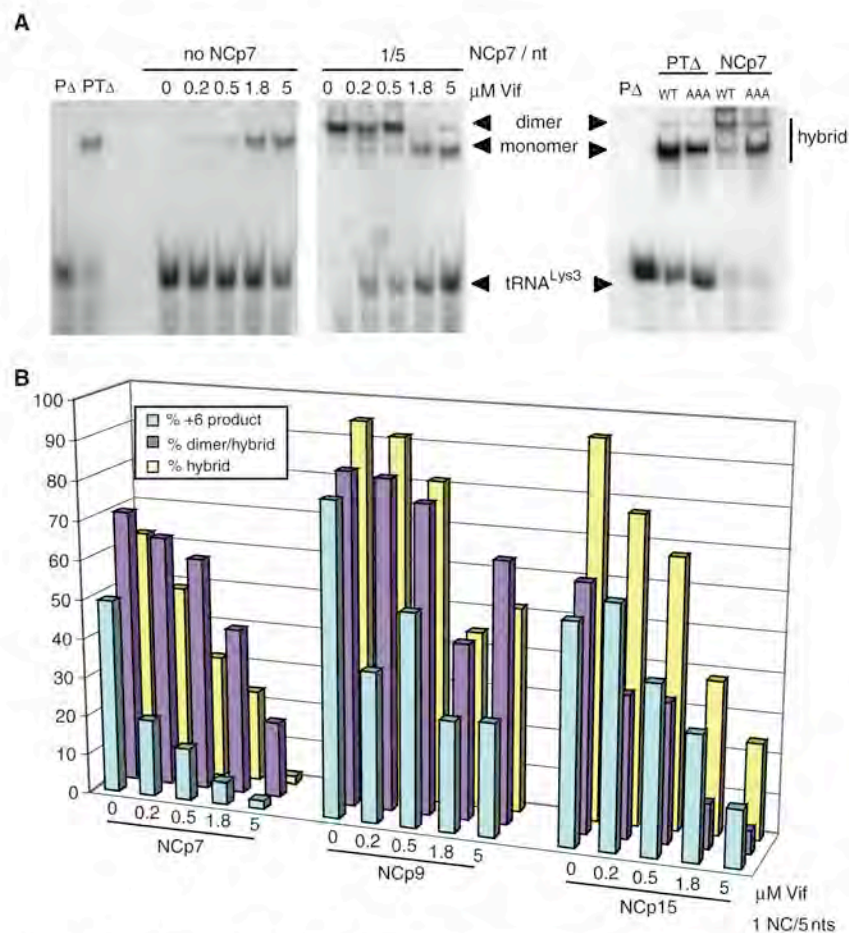


Figure 4. Effect of Vif on NCp-mediated tRNA^{Lys3} annealing and RNA dimerization. (A) Bandshift assay showing heat- (PT_Δ) and NCp-mediated annealing of tRNA^{Lys3} to HIV-1 RNA 1-311 in presence of increasing concentration of Vif. Free and annealed tRNA^{Lys3} on monomeric or dimeric 1-311 RNAs are indicated. P_Δ and PT_Δ lanes correspond to heat-annealing reaction performed in the absence and presence of RNA 1-311, respectively. (B) Quantification of the data: blue bars, % of +6 product; purple bars, % of tRNA^{Lys3} annealed to dimeric RNA; yellow bars, % of tRNA^{Lys3} annealed to monomeric + dimeric RNA.

sites (62). While the effects of NC on tRNA^{Lys3} annealing and ssDNA synthesis have been well documented (62), the combined effects of Vif and NC on these steps have never been studied. Furthermore, as Vif has been shown to modulate processing of the Gag precursor (47), we also studied the effects of NCp9 and NCp15, together with Vif, on these steps. Primer tRNA^{Lys3} annealing and extension experiments were performed as described above, except that NC proteins were present at a concentration corresponding to complete coverage of the RNA template (1 NCp/5 nt) (71) (Figure 4). In the absence of Vif, this saturating concentration of NCp allowed very efficient hybridization of tRNA^{Lys3} to the PBS, with a maximum of 90% hybrids with NCp9 and NCp15 and a slightly reduced efficiency with NCp7 (70% hybrids) (Figure 4B, yellow bars), in agreement with previous studies (61). Unexpectedly, increasing Vif concentrations had an

inhibitory effect on the formation of tRNA^{Lys3}/vRNA hybrids induced by NCp (Figure 4A and B, yellow bars), with a corresponding decrease in +6 product formation (Figure 4B, blue bars).

Moreover, while the tRNA^{Lys3}/vRNA complex formed by heating or in the presence of Vif migrated as a single band, two tRNA^{Lys3}/vRNA complexes could be observed in the presence of NC proteins, with the main one migrating slower than the complex formed in the presence of Vif (Figure 4A). These two bands correspond to tRNA^{Lys3} annealed to monomeric and dimeric forms of HIV-1 RNA. Indeed, when using a fragment of HIV-1 genomic RNA with point mutations (AAA) in the dimerization initiation site (DIS), which is crucial for RNA dimerization (51,52), the monomeric form of the hybrid became largely predominant, even in the presence of NCp7 (Figure 4A, right panel). Interestingly, increasing

Vif concentrations progressively inhibited NCp7-induced RNA dimerization, and inhibition was almost complete at the highest Vif concentrations (Figure 4A, left panel). Vif had similar effects when tRNA^{Lys3} annealing and HIV-1 RNA dimerization were induced by NCp15, i.e. Vif efficiently inhibited both processes (Figure 4B right panel). However, tRNA^{Lys3} annealing and especially HIV-1 RNA dimerization promoted by NCp9 were more resistant to inhibition by Vif (Figure 4B, central panel).

These results prompted us to analyze more precisely the capacity of Vif to modulate HIV-1 RNA dimerization in the absence of tRNA^{Lys3} and in absence or in presence of NCp7 (Figure 5). Indeed, HIV-1 RNA can form two different kinds of dimers *in vitro*, termed loose and tight dimers (51). Loose dimers are formed first and correspond to kissing complexes interacting by the DIS loop (57,72,73). Formation of tight dimers depends on the presence of the sequences 3' to the major splice donor site, the incubation temperature and the presence of NCp. Although several authors have proposed that tight dimers could correspond to extended duplexes, this has not been demonstrated conclusively on large RNA fragments, and alternatively the kissing complexes could be stabilized by tertiary interactions that remain to be identified (51). Using an RNA fragment encompassing the first 615 nt of HIV-1 genomic RNA, we analyzed dimerization using two different electrophoresis conditions: (i) native electrophoresis in Tris-Borate magnesium (TBM) buffer at 4°C, under which both loose and tight dimers are stable (Figure 5A) and (ii) semi-denaturing electrophoresis in Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer at room temperature, under which only the tight dimers survive (Figure 5B) (72). In the absence of NCp, Vif stimulated RNA dimerization in a concentration dependant manner, and a dimerization yield of 30% was observed at 5 µM Vif (Figure 5A). This Vif-induced RNA dimer is a loose dimer, as it dissociated during electrophoresis under semi-denaturing conditions (Figure 5B) (57,72,73). In the absence of Vif, a saturating NCp concentration induced >90% RNA dimerization, and the NCp-induced dimer was predominantly the tight dimer (compare Figure 5A and B), in keeping with previous studies (72,74). However, increasing Vif concentration progressively decreased the dimerization yield from >90% to ~50% (Figure 5A), and the RNA dimer remaining at the highest Vif concentration was exclusively the loose dimer (compare Figure 5A and B). Thus, Vif was able to promote formation of the loose dimer, and to inhibit formation of the tight dimer by NCp, indicating that, as in the tRNA^{Lys3} annealing experiments, the effect of Vif was dominant over NCp. Taken together, these results suggest that the dominant effect of Vif over NC proteins is due to Vif/NC interactions, rather than to Vif-RNA interactions.

Next, we compared the efficiency of ssDNA synthesis in the presence of NCp15, NCp9 and NCp7 (Figure 6). At a concentration of 1 NCp/5 nt, a ~4.5-fold increase of ssDNA was observed with NCp9 after 60 min of reaction, which correlated with a strong decrease in the intensity of RT pauses (Figure 6, middle panel, black triangles). Comparatively, NCp7 and NCp15 had

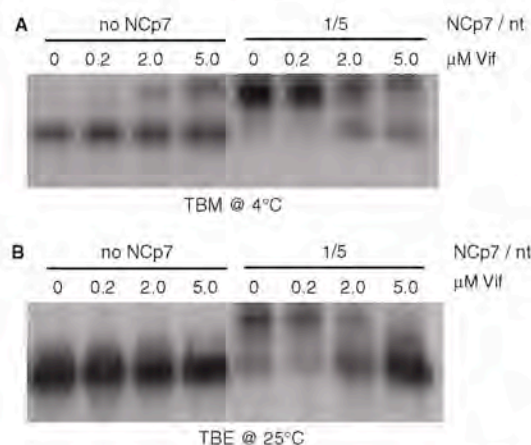


Figure 5. Vif and NC-mediated HIV-1 RNA dimerization *in vitro*. HIV-1 RNA 1-615 (100 nM) was allowed to dimerize *in vitro* with Vif (0, 0.2, 2.0 and 5.0 µM) in absence or in presence of NCp7 protein (saturating concentration, 6 µM). After removal of Vif and NCp7, RNA was loaded on an agarose gel and run in (A) native (Tris-Borate-Magnesium, TBM, at 4°C) and (B) semi-denaturing (Tris-Borate-EDTA, TBE, at 25°C) electrophoresis conditions.

a smaller stimulatory effect (~2.5 and ~3-fold, respectively) and less influence on RT pausing (Figure 6).

Given the stimulatory effect of Vif on ssDNA synthesis (Figure 3B), we tested whether Vif could act synergistically with NC to increase the yield of ssDNA. Compared with DNA synthesis performed with NC or Vif alone, reactions performed in the presence of both Vif and NC showed no significant synergy. Addition of 2 µM Vif to reactions containing saturating amounts of NC significantly delayed ssDNA synthesis, and similar yields of ssDNA were observed only at the last time point (60 min) (Figure 6). However, RT pauses specifically induced by either NCp7 or NCp15 (Figure 6, left and right panels, asterisks) were strongly diminished in the presence of 2 µM Vif. Note that NCp7 and NCp15 generated different pausing patterns, suggesting that these two proteins preferentially bind to different RNA motifs in the R region, but that Vif had similar effects in these two reactions. These results suggest that both NC and Vif contributed to increase the processivity of RT and that NC-RNA interactions are affected by Vif binding to RNA.

Stimulation of the first strand transfer by Vif and NC intermediates

The presence of repeated (R) sequences at both ends of retroviral genomes allows transfer of the neo-synthesized ssDNA from the 5' to the 3'-terminal region of the viral RNA (75). It has been shown that the first strand transfer is strongly enhanced by NCp9 and NCp7 *in vitro* (62,76,77), and interactions between NC and the TAR loop of the viral RNA or its complement cTAR on the ssDNA play an important role in this process (49,78). As we recently showed that the TAR apical loop is a high affinity Vif-binding site (33) (Bernacchi *et al.*, in press for publication), we tested the influence of Vif on the first

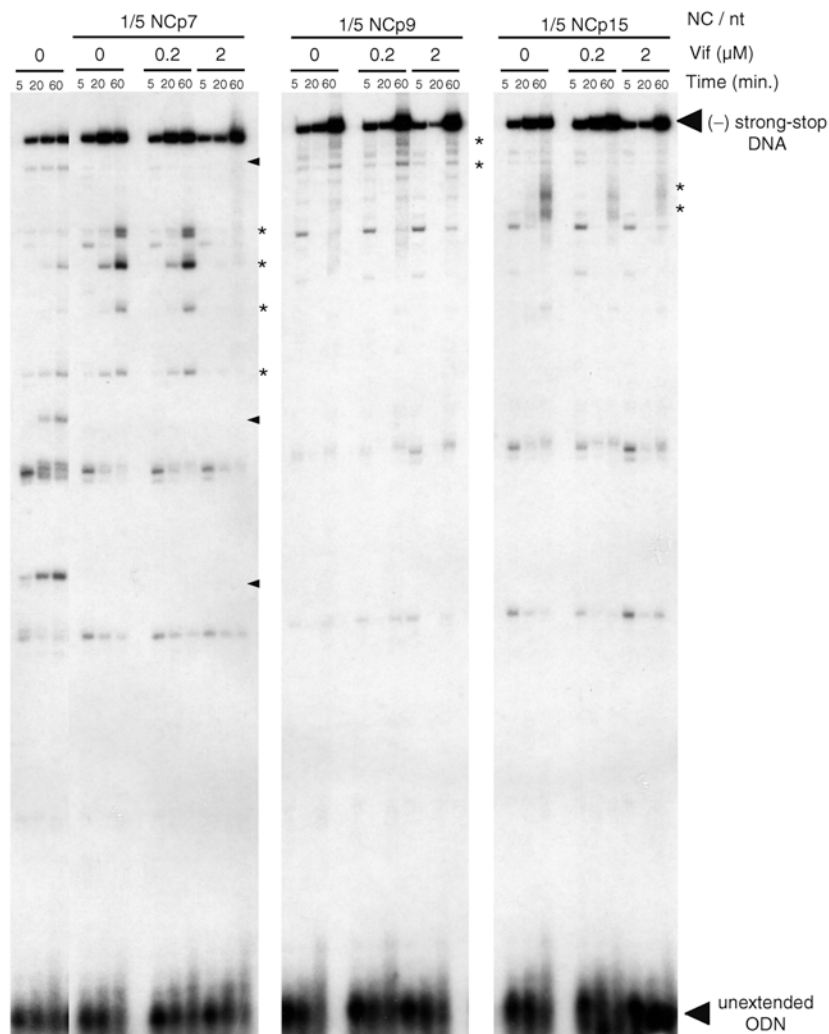


Figure 6. Minus strong-stop DNA synthesis in the presence of Vif and NC proteins. ODN extension products were analyzed by denaturing PAGE. Asterisks indicate RT pauses specifically induced by the different NC proteins and suppressed by high concentration of Vif proteins. Black triangles indicate RT pauses specifically suppressed by high concentration of NC proteins. The NC coverage of 1NCp/5nt corresponds to a concentration of 6 μM of NCp.

strand transfer. For that purpose RNA 1–311 was used as the donor template, and RNA 8607–9229 as the acceptor RNA, as previously described (53).

During ssDNA synthesis, as the RNA template is being degraded by RNase H, the cTAR sequence in ssDNA can fold into a hairpin structure that is able to ‘self-prime’ reverse transcription, yielding abortive products that are longer than ssDNA. First, we used an RNase H(–) HIV-1 RT that is unable to give rise to strand transfer and self-priming products to unambiguously identify ssDNA (Figure 7A, first lane). Longer products were observed with wild-type RT in the presence of acceptor RNA but in the absence of Vif or NC proteins. These were self-priming products, since PCR amplification of the corresponding

gel-eluted nucleic acid bands did not yield any products when using primers specific to strand-transfer products (see Experimental Procedures section, data not shown). On the other hand, strand transfer reactions performed with wild-type RT and increasing Vif concentrations yield a faint but reproducible product near the top of the gel, identified as full-length strand transfer product by PCR (Figure 7A). Quantification showed that ~5% of the ssDNA was converted into full-length transfer product in the presence of 2 μM Vif. Thus, Vif can stimulate the strand transfer reaction, albeit with a limited efficiency.

In the absence of Vif and in the presence of a saturating concentration of NC proteins, strand transfer proceeded with varying efficiency, depending on the protein: the

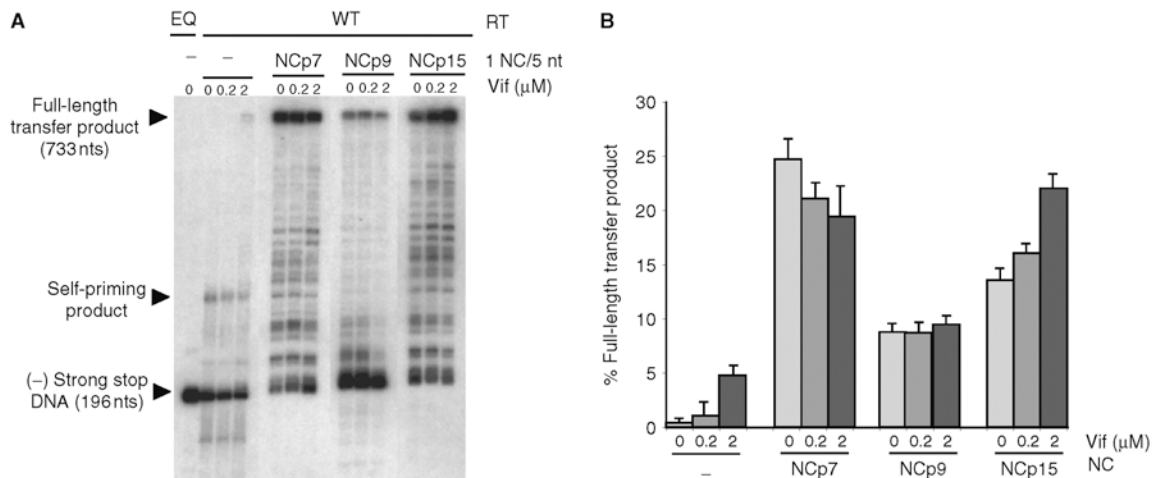


Figure 7. Effects of Vif and NC proteins on the first strand transfer. (A) PAGE analysis of transfer products. ODN/RNA 1–311 complexes were incubated with RT, dNTPs, acceptor RNA, Vif and/or NC proteins (6 μM). A control using RNase H(-) E478Q HIV-1 RT is shown in first lane. Minus strong-stop DNA, self-priming products and full-length transfer product are indicated. (B) Quantification of the data strand transfer efficiency was calculated as described in the Materials and Methods section. The errors bars correspond to the mean ± SD of three experiments.

highest efficiency was obtained with NCp7, giving rise to ~25% of full-length transfer product, while NCp15 and NCp9 were less potent (~14% and ~8% of full-length product, respectively) (Figure 7). This result clearly shows that mature NCp7 promotes strand transfer more efficiently than NC maturation intermediates, probably due to the different nucleic acids chaperone and aggregating activities of these proteins (59). Adding increasing concentrations of Vif to a saturating concentration of NC led to a dose-dependent modulation of NCp7 and NCp15 activity, while no effect was observed on NCp9. Although Vif moderately decreased the amount of full-length transfer product in NCp7-mediated transfer reaction, Vif showed an opposite effect in presence of NCp15, where addition of 2 μM of Vif reproducibly increased the yield of full-length transfer product by ~40%. Taken together, these results show that Vif alone slightly promote the first strand transfer reaction and that this protein is able to specifically modulate the activity of NCp7 and NCp15 in this process.

DISCUSSION

Several reports demonstrated that deletion of the *vif* gene affected reverse transcription during the entry phase of the viral life cycle (39,40,42,44) and prevented endogenous reverse transcription (29,36,43), suggesting that Vif could interact with virion components involved in the regulation of reverse transcription such as RT (44), NC (31,32), tRNA^{Lys3} (29,79) and genomic RNA (28–30,33). However, the molecular mechanisms of Vif function in reverse transcription have remained unclear. Since we recently showed that Vif is an RNA-binding protein that preferentially binds to the 5' terminal region of HIV-1 genomic RNA, including the

PBS, we decided to examine for the first time the *in vitro* contribution of Vif to the initial steps of reverse transcription, either alone or in combination with NC proteins at different maturation stages. In addition, since Vif is present in the HIV-1 assembly complexes (32), we studied the effect of Vif on RNA dimerization, as this step is a prerequisite to efficient HIV-1 RNA packaging (51). In order to analyze the intrinsic properties of Vif, we first studied this protein in the absence of other viral proteins. Then, to evaluate the potential biological significance of our results, we studied the effects of Vif in the presence of NC proteins.

In the absence of NC proteins, Vif enhances several early steps of the reverse transcription process. First, Vif is able to anneal tRNA^{Lys3} to a PBS-containing RNA fragment quite efficiently (Figure 1A), even though Vif is less efficient than NCp7, NCp9 and NCp15 in this respect (Figure 4B). In addition, the resulting primer–template complex is fully functional, since HIV-1 RT was able to initiate reverse transcription of these complexes (Figure 1B). The annealing activity of Vif might be important for HIV-1 replication in non-permissive cells, since it was recently shown that inhibition of tRNA^{Lys3}-primed reverse transcription of Δ*Vif* viruses by APOBEC3G and 3F accounts for an important part of its antiviral effect, independently of its deaminase activity (21,80).

Second, Vif significantly decreases pausing of RT and enhances ssDNA synthesis (Figure 3). RT pausing most often occurs when RT is blocked by stable secondary structures present in the RNA template (68,69). Indeed, we previously showed that Vif binds to several secondary structure motifs in the R and U5' regions of the genomic RNA (33), and our present results suggest that Vif is able to destabilize these structures, allowing a better processivity of HIV-1 RT. The effect of Vif on RT

pausing might also be the result of an affinity increase of RT for the primer template complex in the presence of Vif, as observed by Cancio *et al.* (44) using poly(rA)/oligo(dT). Even though the exact mechanism by which Vif increases RT processivity remains to be established, this activity is analogous to the previously described effect of NCp7 on RT pausing (62,68).

We also reproducibly observed that Vif stimulates the first strand transfer, albeit with a reduced efficiency compared to NC proteins: Vif was 2-fold less efficient than NCp9, 3-fold less efficient than NCp15 and 5-fold less efficient than NCp7 (Figure 7). Nevertheless, Vif shares with NC proteins the ability to anneal tRNA^{Lys3} to the PBS, decrease RT pausing, and promote strand transfer. These properties, especially the first and the third one, are characteristic of the RNA chaperone activity of NC proteins (59). In addition, we found that Vif, like NCp (74), promotes dimerization of HIV-1 RNA, even though the former induces formation of loose dimers, while the latter favors tight dimers. Therefore, our results show that Vif is an authentic RNA chaperone (81).

These results prompted us to look for potential synergic effects between Vif and various Gag processing products such as NCp15, NCp9 and NCp7. Processing of the Gag precursor takes place in a sequential manner during maturation of HIV-1 viral particles due to differences in cleavage site efficiency (82). Cleavage starts at the p2/NC junction, resulting in the production of MA-CA-p2 and NCp15 intermediates products. Secondary cleavage releases the mature MA protein as well as the NCp9 (NCp7-p1) intermediate after removal of p6 (83). Tertiary cleavage produces mature CA and NCp7 proteins. Mature viral particles are not only composed of fully processed Gag and Gag-Pol products, but also contain residual amounts of Gag precursors and processing intermediates (47). Moreover, Vif modulates the HIV-1 protease activity, leading to the possibility that virion incorporation of Vif could stabilize NC intermediates (45-47). A number of molecular rearrangements occur in the RNP during or just after budding, including tRNA^{Lys3} hybridization (70), RNA dimer maturation (84) and initiation of reverse transcription (70).

In the tRNA^{Lys3} annealing reactions, Vif clearly has a dominant effect over NC proteins (Figure 4). Indeed, increasing concentrations of Vif significantly inhibited NC-induced tRNA^{Lys3} annealing (Figure 4B) and RNA dimerization (Figures 4A and 5). This inhibitory effect of NC-mediated functions might explain why excessive Vif expression is detrimental to viral infectivity (47). Importantly, the highest Vif concentration used in this study corresponds to a Vif/NCp ratio of 1/3, which is close to the 1/2 Vif/Gag ratio in the assembly complexes (32,39). Thus, Vif might initiate tRNA^{Lys3} annealing in the assembly complexes, and since it is mostly excluded from the virions (the Vif/NCp ratio in virions is between 1/20 and 1/40), its inhibitory effect would be relieved after assembly of the virions, and NC proteins could complete tRNA^{Lys3} annealing. In this context, inhibition of the initiation of reverse transcription by Vif (Figure 2) might prevent premature initiation of DNA synthesis in the assembly complexes of the producing cell.

Interestingly, identical effects have been observed with the Tat protein (85,86). Similarly, inhibition of the NC-induced viral RNA dimerization by Vif (Figure 5) might temporally regulate RNA packaging and prevent premature maturation of the loose kissing loop complex into a more thermostable tight dimer. Thus, our results suggest that Vif is a negative regulator of several NC-associated functions in the assembly complexes, and that the NC domain (either in Gag or its maturation product) becomes fully active in the viral particles, from which Vif is mostly excluded. Inhibition of the NCp-mediated tRNA^{Lys3} annealing and RNA dimerization, as well as inhibition of the initiation of reverse transcription by Vif might allow temporal fine-tuning of these steps.

During ssDNA synthesis, both Vif and NC proteins decrease RT pausing. However, NC proteins also appear to induce pausing at sites that were specific for each NC species (Figure 6). These pauses could result from increased RNase H activity of RT in the presence of NC proteins (62). No additional pauses were observed with Vif; on the contrary Vif suppressed the NC-induced pauses. Thus, Vif act in cooperation with NC proteins to increase RT processivity and favor synthesis of long DNA products.

The effect of Vif on NC-induced strand transfer is limited, but, unexpectedly, Vif has either a positive, null or negative effect depending on the maturation stage of NC proteins (Figure 7). Significantly, NCp9 is the most efficient NC species in ssDNA synthesis, whereas NCp7 has the most efficient strand transfer activity, suggesting that maturation of the NC intermediates might regulate the early steps of HIV-1 reverse transcription.

Thus far, it was unclear whether Vif has a direct role in reverse transcription. Our data strongly suggest that Vif does play a role during the early phase of this process in coordination with other components of the viral core such as Gag and its maturation products and during the dimerization of genomic RNA. Taken together, our data lead to the possibility that Vif might be a temporal regulator during viral assembly: (i) by interacting with genomic RNA and NC-derived products, Vif may prevent RNA dimerization/packaging and premature initiation of reverse transcription; (ii) however, still in conjunction with Gag precursors, Vif could promote the placement of tRNA^{Lys3} on to the PBS, stabilizing NC intermediates to increase, at the right time, the efficiency of the early steps of reverse transcription. Obviously, a detailed temporal analysis of the effects of Vif on HIV-1 replication will be required to test our hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr Philippe Walter for providing us with HIV-1 RT. This work was supported by a grant from the 'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA' (ANRS). S.H. was supported by a fellowship from SIDACTION. This project has been funded in part with federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under contract N01-CO-12400 (RJG). The content of this publication does not

necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the U.S. Government. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by ANRS.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Borman, A.M., Quillent, C., Charneau, P., Dauguet, C. and Clavel, F. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J. Virol.*, **69**, 2058–2067.
2. Bouyac, M., Rey, F., Nascimbeni, M., Courcou, M., Sire, J., Blanc, D., Clavel, F., Vigne, R. and Spire, B. (1997) Phenotypically Vif- human immunodeficiency virus type 1 is produced by chronically infected restrictive cells. *J. Virol.*, **71**, 2473–2477.
3. Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A. and Sodroski, J. (1992) Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.*, **66**, 6489–6495.
4. Sakai, H., Shibata, K., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Kawamura, M. and Adachi, A. (1993) Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.*, **67**, 1663–1666.
5. 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.
6. Sova, P. and Volsky, D.J. (1993) Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **67**, 6322–6326.
7. 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.
8. Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gribourne, J., Dunham, I., Scott, J. and Navarathnam, N. (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, **79**, 285–296.
9. Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S. and Malim, M.H. (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, **113**, 803–809.
10. 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.
11. Khan, M.A., Kao, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Goila-Gaur, R., Opi, S., Gipson, C.L., Parslow, T.G., Ly, H. et al. (2005) Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J. Virol.*, **79**, 5870–5874.
12. Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottinger, H. and Bieniasz, P.D. (2004) APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.*, **78**, 12058–12061.
13. Alce, T.M. and Popik, W. (2004) APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.*, **279**, 34083–34086.
14. Svarovskaia, E.S., Xu, H., Mbisa, J.L., Barr, R., Gorelick, R.J., Ono, A., Freed, E.O., Hu, W.S. and Pathak, V.K. (2004) Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35822–35828.
15. Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C. and Gao, L. (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, **424**, 94–98.
16. Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. and Trono, D. (2003) Broad antiretroviral defence by human

- APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, **424**, 99–103.
17. Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. and Hance, A.J. (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*, **300**, 1112.
18. Bishop, K.N., Holmes, R.K. and Malim, M.H. (2006) Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J. Virol.*, **80**, 8450–8458.
19. Holmes, R.K., Koning, F.A., Bishop, K.N. and Malim, M.H. (2007) APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.*, **282**, 2587–2595.
20. Newman, E.N., Holmes, R.K., Craig, H.M., Klein, K.C., Lingappa, J.R., Malim, M.H. and Sheehy, A.M. (2005) Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.*, **15**, 166–170.
21. Guo, F., Cen, S., Niu, M., Saadatmand, J. and Kleiman, L. (2006) The inhibition of tRNA^{Lys3}-primed reverse transcription by human APOBEC3G during HIV-1 replication. *J. Virol.*, **80**, 11710–11722.
22. 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.
23. 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.
24. Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. and Kalat, D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.*, **9**, 1398–1403.
25. Yu, Y., Xiao, Z., Ehrlich, E.S., Yu, X. and Yu, X.F. (2004) Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev.*, **18**, 2867–2872.
26. 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.
27. 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.
28. Khan, M.A., Aberham, C., Kao, S., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S. and Strebel, K. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J. Virol.*, **75**, 7252–7265.
29. Dettnerhofer, M., Cen, S., Carlson, B.A., Kleiman, L. and Yu, X.F. (2000) Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J. Virol.*, **74**, 8938–8945.
30. 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.
31. Bouyac, M., Courcou, M., Bertoia, G., Baudat, Y., Gabuzda, D., Blanc, D., Chazal, N., Boulanger, P., Sire, J. et al. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J. Virol.*, **71**, 9358–9365.
32. Simon, J.H., Carpenter, B.A., Fouchier, R.A. and Malim, M.H. (1999) Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. *J. Virol.*, **73**, 2667–2674.
33. Henriot, 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.
34. Chowdhury, J.L., Chao, W., Potash, M.J., Sova, P., Gendelman, H.E. and Volsky, D.J. (1996) vif-negative human immunodeficiency virus type 1 persistently replicates in primary macrophages, producing attenuated progeny virus. *J. Virol.*, **70**, 5336–5345.
35. Courcou, M., Patience, C., Rey, F., Blanc, D., Harnache, A., Sire, J., Vigne, R. and Spire, B. (1995) Peripheral blood mononuclear cells produce normal amounts of defective Vif- human immunodeficiency

- virus type 1 particles which are restricted for the prerenotranscription steps. *J. Virol.*, **69**, 2068–2074.
36. Goncalves, J., Korin, Y., Zack, J. and Gabuzda, D. (1996) Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.*, **70**, 8701–8709.
 37. Simon, J.H. and Malin, M.H. (1996) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J. Virol.*, **70**, 5297–5305.
 38. von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. and Trono, D. (1993) Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.*, **67**, 4945–4955.
 39. Carr, J.M., Davis, A.J., Coolen, C., Cheney, K., Burrell, C.J. and Li, P. (2006) Vif-deficient HIV reverse transcription complexes (RTCs) are subject to structural changes and mutation of RTC-associated reverse transcription products. *Virology*, **351**, 80–91.
 40. Ohagen, A. and Gabuzda, D. (2000) Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J. Virol.*, **74**, 11055–11066.
 41. Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. and Gabuzda, D. (1994) Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology*, **201**, 349–355.
 42. Nascimbeni, M., Bouyac, M., Rey, F., Spire, B. and Clavel, F. (1998) The replicative impairment of Vif- mutants of human immunodeficiency virus type 1 correlates with an overall defect in viral DNA synthesis. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1945–1950.
 43. Domadula, G., Yang, S., Pomerantz, R.J. and Zhang, H. (2000) Partial rescue of the Vif-negative phenotype of mutant human immunodeficiency virus type 1 strains from nonpermissive cells by intraviral reverse transcription. *J. Virol.*, **74**, 2594–2602.
 44. Cancio, R., Spadari, S. and Maga, G. (2004) Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem. J.*, **383**, 475–482.
 45. Koller, M., Simm, M., Zhao, Y.S., Sova, P., Chao, W., Ohnora, S.F., Roller, R., Krachmarov, C., Potash, M.J. et al. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro. *J. Virol.*, **71**, 5774–5781.
 46. Bardy, M., Gay, B., Pebernard, S., Chazal, N., Courcou, M., Vigne, R., Decroly, E. and Boulanger, P. (2001) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol precursors: co-encapsulation and interference with viral protease-mediated Gag processing. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2719–2733.
 47. Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A. and Strebel, K. (2004) High level expression of human immunodeficiency virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/ nucleocapsid processing site. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12355–12362.
 48. Lener, D., Tanchou, V., Roques, B.P., Le Grice, S.F. and Darlix, J.L. (1998) Involvement of HIV-1 nucleocapsid protein in the recruitment of reverse transcriptase into nucleoprotein complexes formed in vitro. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33781–33786.
 49. Godet, J., de Rooquigny, H., Raja, C., Glasser, N., Picheux, D., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2006) During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem. *J. Mol. Biol.*, **356**, 1180–1192.
 50. Wu, W., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Rein, A. and Levin, J.G. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcription pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *J. Virol.*, **70**, 7132–7142.
 51. Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. and Mak, J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 461–472.
 52. Russell, R.S., Liang, C. and Wainberg, M.A. (2004) Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology*, **1**, 23.
 53. Brule, F., Bec, G., Keith, G., Le Grice, S.F., Roques, B.P., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (2000) In vitro evidence for the interaction of tRNA(3)Lys with U3 during the first strand transfer of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 634–640.
 54. 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.
 55. Lodmell, J.S., Paillart, J.C., Mignot, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (1998) Oligonucleotide-mediated inhibition of genomic RNA dimerization of HIV-1 strains MA1 and LA1: a comparative analysis. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **8**, 517–529.
 56. Benas, P., Bec, G., Keith, G., Marquet, R., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Dumas, P. (2000) The crystal structure of HIV reverse-transcription primer tRNA(Lys,3) shows a canonical anticodon loop. *RNA*, **6**, 1347–1355.
 57. Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (1996) A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5572–5577.
 58. Yang, X., Goncalves, J. and Gabuzda, D. (1996) Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10121–10129.
 59. Crucciani, M., Urbaneja, M.A., Hixon, C.V., Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J. et al. (2006) Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 593–605.
 60. Le Grice, S.F. and Gruninger-Leitch, F. (1990) Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 307–314.
 61. Brule, F., Marquet, R., Rong, L., Wainberg, M.A., Roques, B.P., Le Grice, S.F., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (2002) Structural and functional properties of the HIV-1 RNA-tRNA(Lys)3 primer complex annealed by the nucleocapsid protein: comparison with the heat-annealed complex. *RNA*, **8**, 8–15.
 62. Levin, J.G., Guo, J., Rouzina, I. and Musier-Forsyth, K. (2005) Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **80**, 217–286.
 63. Ise, C., Lanchy, J.M., Le Grice, S.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (1996) Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA(Lys). *EMBO J.*, **15**, 917–924.
 64. Priet, S., Gros, N., Navarro, J.M., Boretto, J., Canard, B., Querat, G. and Sire, J. (2005) HIV-1-Associated Uracil DNA glycosylase activity controls dUTP Misincorporation in viral DNA and is essential to the HIV-1 life cycle. *Mol. Cell*, **17**, 479–490.
 65. Priet, S., Sire, J. and Querat, G. (2006) Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr. HIV Res.*, **4**, 31–42.
 66. Lanchy, J.M., Ise, C., Ehresmann, C., Marquet, R. and Ehresmann, B. (1996) Structural and functional evidence that initiation and elongation of HIV-1 reverse transcription are distinct processes. *Biochimie*, **78**, 1087–1096.
 67. Lanchy, J.M., Keith, G., Le Grice, S.F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (1998) Contacts between reverse transcriptase and the primer strand govern the transition from initiation to elongation of HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24425–24432.
 68. Klasens, B.I., Huthoff, H.T., Das, A.T., Jeeninga, R.E. and Berkhout, B. (1999) The effect of template RNA structure on elongation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1444**, 355–370.
 69. Suo, Z. and Johnson, K.A. (1997) Effect of RNA secondary structure on the kinetics of DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **36**, 12459–12467.
 70. Cen, S., Khorchid, A., Gabor, J., Rong, L., Wainberg, M.A. and Kleiman, I. (2000) Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)Lys genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **74**, 10796–10800.
 71. Dih-Haji, F., Kahn, R. and Giedroc, D.P. (1993) Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity. *Protein Sci.*, **2**, 231–243.
 72. Laughrea, M. and Jetté, L. (1996) Kissing-loop model of HIV-1 genome dimerization: HIV-1 RNA can assume alternative dimeric forms, and all sequences upstream or downstream of hairpin 248–271 are dispensable for dimer formation. *Biochemistry*, **35**, 1589–1598.

73. Muriaux,D., Fosse,P. and Paoletti,J. (1996) A kissing complex together with a stable dimer is involved in the HIV-1_{LAI} RNA dimerization process in vitro. *Biochemistry*, **35**, 5075-5082.
74. Muriaux,D., De,R.H., Roques,B.P. and Paoletti,J. (1996) NCp7 activates HIV-1_{LAI} RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33686-33692.
75. Gilboa,E., Mitra,S.W., Goff,S. and Baltimore,D. (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell*, **18**, 93-100.
76. You,J.-C. and McHenry,C.S. (1994) HIV nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31491-31495.
77. Allain,B., Lapadat-Tapolsky,M., Berlioz,C. and Darlix,J.L. (1994) Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome. *EMBO J.*, **13**, 973-981.
78. Kanevsky,L., Chaminade,F., Ficheux,D., Moumen,A., Gorelick,R., Negroni,M., Darlix,J.L. and Fosse,P. (2005) Specific interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and the TAR element. *J. Mol. Biol.*, **348**, 1059-1077.
79. Gaddis,N.C., Chertova,E., Sheehy,A.M., Henderson,L.E. and Malim,M.H. (2003) Comprehensive investigation of the molecular defect in vif-deficient human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.*, **77**, 5810-5820.
80. Yang,Y., Guo,F., Cen,S. and Kleiman,L. (2007) Inhibition of initiation of reverse transcription in HIV-1 by human APOBEC3F. *Virology*. **365**, 92-100.
81. Cristofari,G. and Darlix,J.L. (2002) The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 223-268.
82. Pettit,S., Moody,M., Wehbie,R., Kaplan,A., Nantermet,P., Klein,C. and Swanstrom,R. (1994) The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.*, **68**, 8017-8027.
83. Wieggers,K., Rutter,G., Kottler,H., Tessmer,U., Hohenberg,H. and Krausslich,H.G. (1998) Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J. Virol.*, **72**, 2846-2854.
84. Shehu-Xhilaga,M., Krausslich,H.G., Pettit,S., Swanstrom,R., Lee,J.Y., Marshall,J.A., Crowe,S.M. and Mak,J. (2001) Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J. Virol.*, **75**, 9156-9164.
85. Guo,X., Kameoka,M., Wei,X., Roques,B., Gotte,M., Liang,C. and Wainberg,M.A. (2003) Suppression of an intrinsic strand transfer activity of HIV-1 Tat protein by its second-exon sequences. *Virology*, **307**, 154-163.
86. Kameoka,M., Morgan,M., Binette,M., Russell,R.S., Rong,L., Guo,X., Moulard,A., Kleiman,L., Liang,C. *et al.* (2002) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J. Virol.*, **76**, 3637-3645.

3. Vif inhibe la formation de dimères stables induit par la NC sur de larges fragments d'ARN

Vif est présente en très faible quantité dans les particules virales alors que sa concentration cellulaire est élevée. Afin de tester la capacité de Vif à moduler la dimérisation de l'ARNg en présence ou en absence de NC, nous avons analysé la dimérisation *in vitro* de fragments d'ARN (contenant les 311 ou les 615 premiers nts de l'ARNg du HIV-1) en présence de concentration croissante de Vif et dans deux conditions électrophorétiques différentes. La première dite "native" (Tris-Borate-Magnesium à 4°C) permet la visualisation de deux types de dimères d'ARN : des dimères peu stables correspondant au complexe boucle-boucle formé par l'interaction au niveau de la boucle du DIS (« loose dimer ») ; et des dimères stables correspondant aux dimères matures (« tight dimer »). La deuxième condition dite "semi-dénaturante" (Tris-Borate-EDTA à 25°C) ne permet la visualisation que des dimères stables.

Dans cet article, nous avons analysé la dimérisation *in vitro* d'un fragment d'ARN contenant les 615 premiers nts de l'ARNg du HIV-1 en présence de Vif dans ces deux conditions électrophorétiques (Figure 58A et B). Nous avons constaté qu'en absence de NC, Vif stimule la formation de dimères correspondant à des formes boucles-boucles (« loose dimer ») (Figure 58A) car elles se dissocient en condition semi-dénaturante (Figure 58B). Les dimères induits par la NC sont en majorité des dimères stables (« tight dimer »), mais lorsque des concentrations croissantes de Vif sont ajoutées, les dimères disparaissent progressivement (Figure 58A). A la plus forte concentration de Vif en condition native, les dimères restants correspondent essentiellement à des dimères peu stables (Figure 58A) car ces derniers disparaissent en condition semi-dénaturante (Figure 58B). Ainsi, Vif est capable de promouvoir la formation de dimères d'ARNg 1-615 peu stables et inhibe la formation de dimères stables induits par la NC.

De manière intéressante, lorsque ces mêmes expériences sont réalisées sur un fragment d'ARN plus court (contenant les 311 premiers nts de l'ARNg du HIV-1), nous constatons cette fois-ci que Vif est capable d'induire la formation d'un mélange de dimères peu stables et stables puisqu'ils subsistent en condition semi-dénaturantes (Figure 58 C/D, partie gauche). En présence de NC, et contrairement aux ARN 1-615, des concentrations croissantes de Vif

ne déstabilisent plus les dimères d'ARN 1-311 étant donné que Vif forme essentiellement des dimères stable (Figure 58C/D, partie droite).

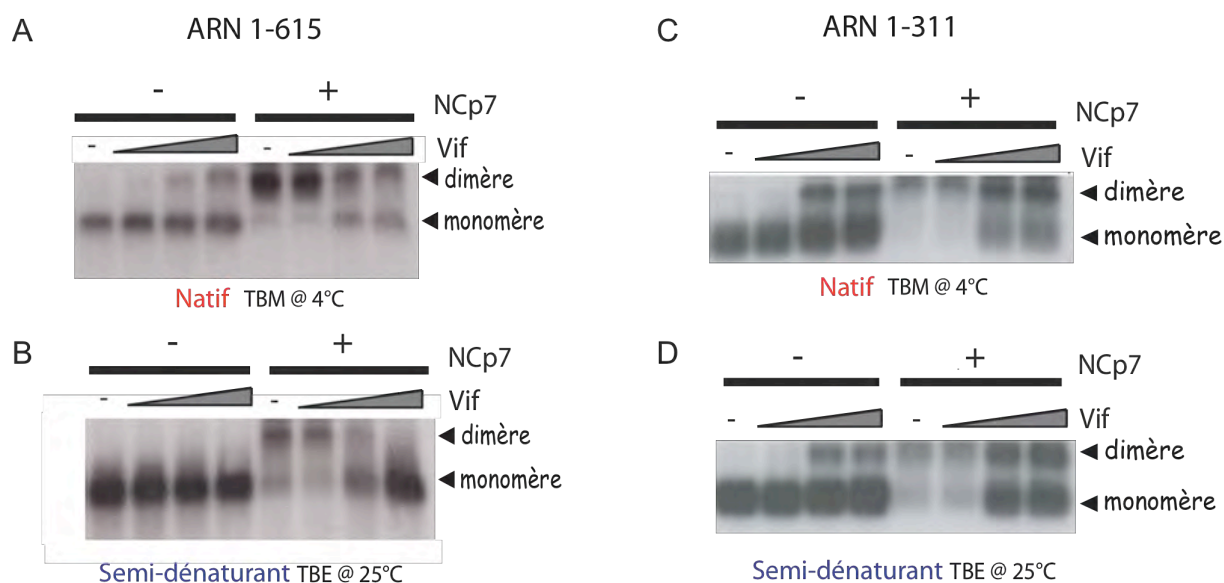


Figure 58 : Dimérisation *in vitro* de fragments d'ARNg du HIV-1 induit par Vif et la NC. La dimérisation *in vitro* des ARN 1-615 (A et B) et 1-311 (C et D) a été obtenue par incubation en présence de concentration croissante de Vif (0, 0,2, 2 et 5 μ M) en absence ou en présence de NcP7 (concentration saturante, 6 μ M). Après déprotéinisation, les ARN sont déposés sur gel d'agarose et la migration est réalisée en condition native (A et C, Tris-Borate-Magnesium, TBM, à 4°C) ou semi-dénaturante (B et D, Tris-Borate-EDTA, TBE, à 25°C).

4. Discussion

Récemment, nous avons montré que Vif est une protéine que lie l'ARNg du HIV-1 et plus particulièrement sa région 5'UTR, incluant le DIS (185). D'autre part, la mise en évidence de ses activités chaperon d'ARN pendant certaines étapes de la rétrotranscription nous ont amené à examiner ses contributions *in vitro* vis-à-vis de la dimerisation de l'ARN viral. Cette activité a été étudiée en coordination avec la NcP7, autre protéine virale connue depuis longtemps pour ses propriétés chaperon d'ARN (261).

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence la capacité de Vif à moduler la dimérisation *in vitro* de fragments d'ARN du HIV-1, ainsi que son effet prédominant sur celui de la NC, suggérant une possible interaction entre Vif et la NC. Cette hypothèse a par ailleurs récemment fait l'objet d'une étude *ex vivo* par double hybride mettant en évidence la capacité de Vif à interagir avec le domaine NC de Gag (435). Les propriétés de Vif sont caractéristiques d'une protéine chaperon d'ARN (87, 88). L'inhibition par Vif de la

dimérisation des ARN induit par la NC pourrait réguler temporellement l'encapsidation des ARN viraux et l'étape de maturation des dimères. En effet, dans la cellule, au moment de l'assemblage, Vif présente en grande quantité pourrait inhiber la formation prématurée de dimères stables. A l'inverse, dans les virions, la concentration de Vif étant faible, le dimère d'ARN pourrait alors être maturé par la NC. Ainsi, nos résultats suggèrent que Vif pourrait être un régulateur négatif de certaines fonctions associées à la NC dans le complexe d'assemblage et moduler temporellement l'état de maturation du dimère et donc son encapsidation.

Par ailleurs, l'analyse de la dimérisation *in vitro* de l'ARN 1-311 nous montre que Vif ne déstabilise plus la formation de dimères en présence de NC. Cette observation suggère que le dimère 1-311 stable adopte une conformation différente de celle de l'ARN 1-615 (Figure 59). En effet, dans le cas de l'ARN 1-311, le DIS est situé à son extrémité 3', ce qui entraîne une diminution des contraintes topologiques et pourrait ainsi permettre la formation d'un complexe plus stable, probablement par la formation d'un duplex étendu par extension des interactions le long de la tige de SL1 (Figure 59). À l'inverse, le DIS de l'ARN 1-615, situé au milieu de la séquence, permettrait la stabilisation du complexe boucle-boucle sans formation d'un duplex étendu mais par des interactions tertiaires qui restent à caractériser (339, 459). En effet, bien que de nombreux auteurs aient proposé que les dimères stables puissent correspondre à des duplexes étendus (127, 129, 224, 429), ceci n'a jamais fait l'objet de démonstration sur des fragments d'ARN de grande taille. Ainsi, la formation de dimères stables d'ARN 1-311, et de petits fragments d'ARN de façon générale, peut être considéré comme « artéfactuelle ». D'autre part, les dimères d'ARN matures obtenus dans les virions par l'action de la NC pourraient être dus à des interactions à longue distance avec des séquences localisées en aval du SD (95, 340, 459) ou à tout autre séquence ou structure non encore identifiées. Ainsi l'ensemble de ces résultats suppose que l'activité chaperon d'ARN de Vif dépend non seulement de sa capacité à interagir avec la région 5'UTR de l'ARNg (185), mais également de l'état conformationnel de l'ARN.

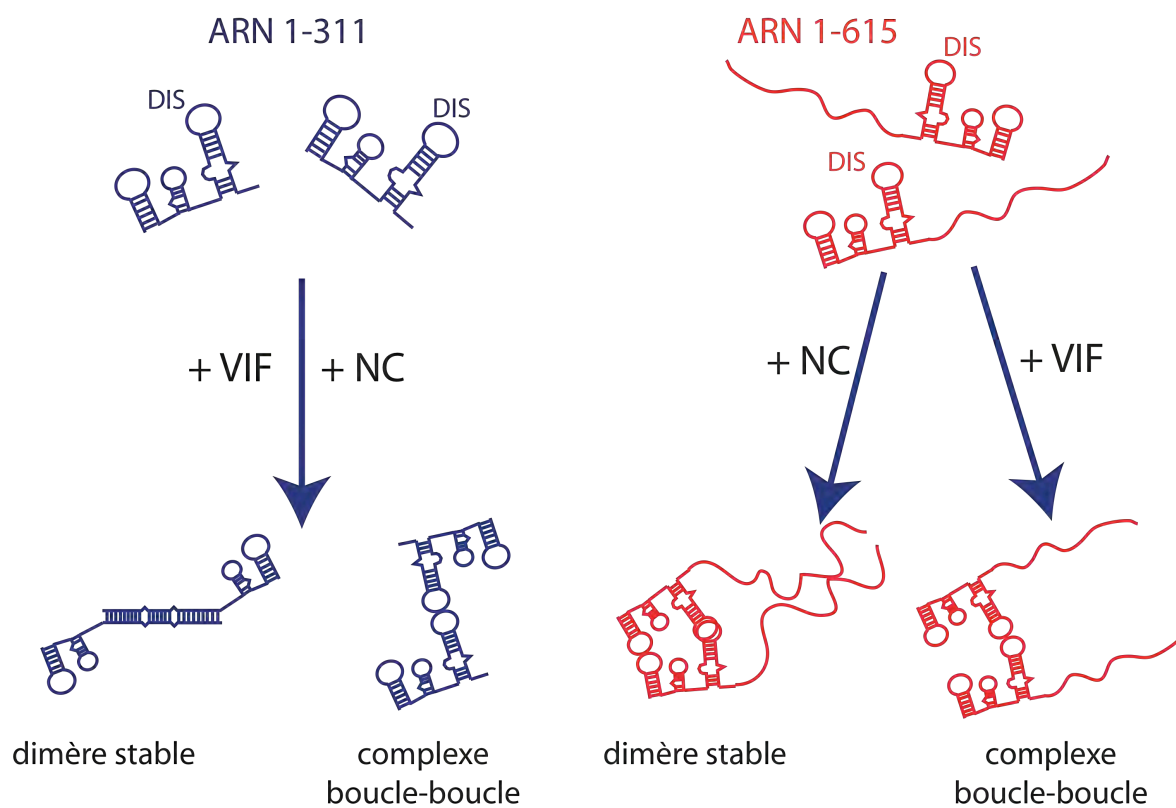


Figure 59 : Modèle de dimérisation des fragments d'ARNg 1-311 (en bleu) et 1-615 (en rouge) du HIV-1 induit par Vif et la NC.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La stratégie répliquative du HIV-1, nécessitant le passage par une forme provirale intégrée, ainsi que la nature diploïde de son génome conditionnent la voie d'encapsidation de l'ARN génomique et l'assemblage viral. En effet, une fois synthétisé au sein du noyau, l'ARNg doit être acheminé jusqu'à la membrane plasmique où deux molécules d'ARN sont préférentiellement sélectionnées afin de produire une nouvelle particule infectieuse. Le processus de sélection du génome viral semble ainsi impliquer de nombreux mécanismes, en plus d'une reconnaissance directe de l'ARN par le précurseur Gag, comme l'épissage, l'export nucléaire, le transport cytoplasmique et la dimérisation de l'ARN, pré-requis à son encapsidation (339, 377).

Quel est le rôle joué par le DIS et la dimérisation dans l'encapsidation ?

Afin d'augmenter sa capacité codante, le HIV-1 produit un grand nombre d'ARN épissés qui permettent la synthèse des protéines d'enveloppe et des protéines régulatrices et auxiliaires nécessaires à la pathogénèse virale. Ces ARN contiennent la majorité des signaux requis pour l'encapsidation de l'ARNg, comme le DIS, site d'initiation de la dimérisation, qui constitue un déterminant prépondérant de l'encapsidation de l'ARNg (193).

Nous avons émis l'hypothèse que la présence du DIS sur tous les ARN épissés viraux pourrait leur permettre de dimériser *in vivo* et d'être encapsidés sous forme d'hétérodimères avec l'ARNg. Par conséquent, mon premier objectif a été de déterminer la capacité de dimérisation *in vitro* des ARN viraux épissés, les résultats attendus devant apporter plus de précisions quant à la fonctionnalité du DIS dans ce contexte et sur son rôle potentiel dans leur encapsidation. Grâce à des expériences de dimérisation *in vitro*, de cartographie en solution et d'inhibition de la dimérisation par un oligonucléotide antisens, nous avons montré qu'*in vitro* les ARN épissés du HIV-1 sont capables d'homodimériser et d'hétérodimériser avec l'ARNg par l'intermédiaire d'interactions boucle-boucle réversibles au niveau du DIS. De plus, de manière intéressante, nous avons mis en évidence qu'il n'y a pas de corrélation entre la stabilité thermique des différentes espèces dimériques étudiées et l'efficacité d'encapsidation des ARN épissés. Enfin, en combinant des expériences de dimérisation et de transcription *in vitro*, nous avons montré que l'accessibilité du DIS est primordiale dans la formation d'hétérodimères entre ARNg et épissés. Ces résultats, ainsi que les travaux récents de W.S.

Hu mettant en évidence la formation de dimère d'ARN dans le cytoplasme (311) , suggèrent que les ARN viraux adoptent une conformation dynamique, régulant la présentation de motifs structuraux probablement à l'origine d'une dimérisation précoce des ARN viraux dans la cellule.

La capacité de dimérisation des ARN épissés du HIV-1 constitue un réel paradoxe pour les mécanismes d'encapsidation de l'ARNg. En effet, alors que la dimérisation de l'ARN est un pré-requis à son encapsidation, les ARN épissés viraux qui possèdent un DIS fonctionnel, sont largement exclus des particules virales (193). Ces résultats, ainsi que la localisation particulière du DIS à proximité du site majeur donneur d'épissage (SD), nous ont amenés à étudier le lien potentiel entre dimérisation et épissage, et leur implication dans la sélection spécifique et l'encapsidation de l'ARNg. Nos travaux ont montré pour la première fois que le motif SL1 et/ou la dimérisation régulent de façon positive l'encapsidation de l'ARNg et négative l'épissage, limitant la formation d'ARN viraux épissés et augmentant ainsi la proportion d'ARNg capable d'être encapsidée et la production optimale de particules virales infectieuses.

Mon travail de thèse a ainsi permis de mieux comprendre le rôle du DIS et de la dimérisation dans la réplication virale et de proposer un mécanisme de régulation de l'épissage et de l'encapsidation de l'ARNg qui seraient dépendants non seulement du motif SL1 lui-même, mais aussi de sa position particulière en amont du SD et du processus de dimérisation. Ainsi, l'encapsidation sélective des ARNg du HIV-1 ne dépendrait pas uniquement de la sélection cytosolique du bon ARN par les protéines Gag et le mécanisme de dimérisation constituerait un processus central pour la production de particules virales infectieuses.

La dimérisation joue t-elle un rôle dans la reconnaissance des ARN viraux par la machinerie d'encapsidation ?

Une question importante découlant de mon travail de thèse et dont la réponse est essentielle à la compréhension du mécanisme d'encapsidation de l'ARNg concerne le lieu exact de la formation des dimères. A-t-elle lieu dans les virions ou dans la cellule infectée ? Dans ce dernier cas, dans quel compartiments cellulaires, le noyau ou le cytoplasme ? En effet, bien qu'il ait récemment été mis en évidence que la formation de dimères d'ARN a lieu dans le cytoplasme (311), ce résultat prête encore à discussion car il a été proposé que la

dimérisation de l'ARNg s'établirait dans la particule néo-synthétisée après assemblage viral (415) ou dans le noyau cellulaire, comme pour MLV, (141, 142). L'accessibilité du DIS au cours de la transcription faciliterait la formation de dimères dans le noyau, comme nos résultats *in vitro* le suggèrent. De plus une dimérisation nucléaire expliquerait pourquoi le DIS et sa position par rapport au SD affectent l'épissage. Cependant, comment expliquer le faible taux d'incorporation des ARN épissés dans les virions ? Leur DIS est-il fonctionnel *in vivo* ? Si c'est le cas, les dimères d'ARN épissés sont-ils reconnus par la machinerie d'encapsidation ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, il est indispensable de déterminer la nature (monomérique, homo- ou hétérodimérique) des ARN viraux au sein des différents compartiments nucléaires et cytoplasmiques ainsi que dans les virions par des techniques directes (Northern blot). Cette technique a déjà permis la visualisation de dimères d'ARNg au sein des virions (378, 415), mais pas encore dans les cellules infectées, et ceci pour plusieurs raisons : conditions d'extraction, dimères d'ARN moins stables dans la cellule, faible quantité d'ARNg en comparaison aux ARN cellulaires, taille importante de l'ARNg ou absence de dimères dans la cellule. Ainsi, développer des conditions de purification plus douces, augmenter la détection des ARN d'intérêt seront les conditions nécessaires à l'obtention de ces nouvelles données. De plus, l'utilisation combinée de techniques de protection des ARN contre les RNase et de RT-PCR quantitative, après capture spécifique des dimères d'ARN viraux, pourrait être une méthode quantitative optimale pour déterminer l'efficacité d'homo- et d'hétérodimérisation des ARN viraux (141, 142, 298).

L'efficacité de dimérisation et de reconnaissance des ARN viraux par la machinerie d'encapsidation peut également dépendre de la structure secondaire de leur région 5' non-codante et de l'établissement d'interactions stabilisatrices. Dans le cas de l'ARNg, la stabilisation des dimères implique la formation de liaisons intermoléculaires à plus ou moins longue distance entre les séquences entourant le SD. De surcroît, nous avons montré qu'*in vitro* ces séquences affectent également la stabilité des dimères d'ARN épissés. Il serait ainsi intéressant de caractériser précisément ces séquences stabilisatrices grâce à une analyse par cartographie en solution de la structure secondaire de la région 5' non traduites des ARN épissés. Après comparaison avec la structure secondaire de l'ARNg et une fois les séquences candidates identifiées, nous pourrions valider leur implication dans une interaction stabilisatrice par mutagenèse dirigée ou par des oligonucléotides antisens et leur rôle dans la réplication virale. Cette étude nous permettra également de déterminer si la région 5'UTR des

ARN épissés adopte la même conformation que celle de l'ARNg. Une structuration différente de cette région pourrait empêcher la reconnaissance des ARN épissés par la machinerie d'encapsidation et plus particulièrement par le précurseur Gag.

Le précurseur Gag est-il capable de reconnaître les ARN viraux épissés ?

Le précurseur Gag présente un rôle central dans le processus d'encapsidation. En effet, la sélection de l'ARNg dépend d'une interaction directe entre la région leader, localisée à l'extrémité 5' de l'ARN et Gag. En outre, le modèle d'encapsidation actuellement admis propose que l'ARNg serait déjà recruté sous forme de dimères par Gag. Nos résultats, montrant que le DIS des ARN épissés est fonctionnel *in vitro*, suggèrent que ces ARN pourraient déjà dimériser précocement au sein de la cellule, comme l'ARNg et par conséquent être recrutés sous forme dimérique (homo- ou hétérodimérique avec l'ARNg) par le précurseur Gag. Cependant, ces ARN ne sont que faiblement incorporés dans les virions. Ainsi, le précurseur Gag serait-il capable de reconnaître et d'interagir avec les ARN épissés ?

Aucune étude n'a à l'heure actuelle analysé l'implication des séquences localisées en aval de la région leader dans l'interaction avec Gag. En effet, il a été montré qu'au sein de la cellule plusieurs précurseurs Gag interagissent avec l'ARNg (15), suggérant que d'autres séquences de l'ARN pourraient favoriser la liaison de Gag aux ARN viraux et affecter la sélection de l'ARNg. Il serait intéressant de déterminer quelles régions des ARNg et épissés sont capables d'interagir avec Gag, en fonction de quelle affinité se font ces interactions (rétention sur filtre, retard de migration électrophorétique, spectroscopie de fluorescence) et si ce précurseur peut interagir en absence de la région leader. Après quoi, les séquences directement impliquées dans l'interaction pourront être caractérisées par des expériences d'empreinte enzymatique. L'identification de ces séquences nous renseignera alors quant à la possibilité des ARN viraux épissés à interagir avec Gag. De plus, il est possible qu'une différence d'affinité de Gag pour les ARNg et épissés puisse participer à la discrimination des ARN viraux et à l'encapsidation sélective des ARNg. De même, nous pourrions étudier le rôle du DIS et de la dimérisation dans l'affinité de Gag pour les ARN viraux, ce qui nous renseignera sur la capacité du précurseur à recruter l'ARN sous forme dimérique au cours du processus d'encapsidation. L'ensemble de ces perspectives est d'ores et déjà en cours d'étude par une autre doctorante dans le laboratoire.

Dimérisation et épissage : régulation et rôle dans l'encapsidation des ARN viraux ?

L'analyse de la nature dimérique des ARN viraux après épissage *in vitro* suggère que l'interaction des facteurs d'épissage avec l'ARN pourrait entraîner la dissociation des dimères. De manière intéressante, nous avons remarqué que le DIS est localisé 25 nucléotides en amont du SD, à l'endroit de fixation supposée de l'EJC, complexe protéique déposé au niveau des jonctions exon-exon pendant l'épissage (250). Bien qu'il ait récemment été montré que l'EJC ne se fixe pas sur toutes les jonctions (389), son interaction avec SL1 pourrait entraîner la dissociation des dimères d'ARN épissés et expliquer en partie pourquoi les ARN épissés ne sont pas reconnus par la machinerie d'encapsidation et pourquoi le motif SL1 ne favorise pas leur encapsidation. Afin de déterminer la fonctionnalité intrinsèque du motif SL1 des ARN épissés et de mettre en évidence l'effet de l'épissage sur la dimérisation, nous envisageons de comparer *ex vivo* la nature dimérique d'un ARN viral produit par épissage ou du même ARN produit à partir de son ADNc par des expériences de northern blot en condition native. Contrairement à l'analyse de dimérisation de l'ARNg dans les cellules, les ARN testés seront surproduits, limitant ainsi les effets négatifs de la sur-abondance des ARN cellulaires. De plus, leur petite taille par rapport à l'ARNg devrait faciliter les différentes étapes de l'analyse par northern blot.

Ex vivo, nous avons mis en évidence le rôle régulateur du DIS et/ou de la dimérisation sur l'épissage des ARN viraux, suggérant que ces mécanismes pourraient réguler le taux d'ARN viral produit et plus particulièrement le ratio entre ARNg et ARN épissés dans la cellule. Par ailleurs, le transport nucléo-cytoplasmique des ARN viraux a lieu au cours du processus de transcription/épissage suggérant son rôle possible dans la régulation de ce processus. L'export nucléaire fait appel à divers facteurs d'export cellulaires et viraux qui permettent le ciblage cytoplasmique des ARN viraux en des lieux spécifiques et la régulation de l'encapsidation de l'ARNg (16, 280). Dans le but de tester le rôle du DIS dans la régulation du taux d'ARN viral produit ainsi que dans le ciblage cellulaire et de déterminer d'éventuels changements dans la distribution nucléaire et cytoplasmique des ARN viraux, une étude par RT-PCR quantitative pourrait être entreprise après purification des ARN contenus dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques et présentant ou non des mutations du DIS.

L'ensemble de ces perspectives devrait nous permettre de mieux comprendre quels mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'encapsidation de l'ARNg et comment se fait la sélection spécifique de cet ARN au détriment des ARN viraux épissés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbink, T. E., and B. Berkhout.** 2003. A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon. *J Biol Chem* **278**:11601-11611.
2. **Abbink, T. E., M. Ooms, P. C. Haasnoot, and B. Berkhout.** 2005. The HIV-1 leader RNA conformational switch regulates RNA dimerization but does not regulate mRNA translation. *Biochemistry* **44**:9058-9066.
3. **Abrahamyan, L. G., L. Chatel-Chaix, L. Ajamian, M. P. Milev, A. Monette, J. F. Clement, R. Song, M. Lehmann, L. DesGroseillers, M. Laughrea, G. Boccaccio, and A. J. Mouland.** 2010. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci* **123**:369-383.
4. **Abram, M. E., A. L. Ferris, W. Shao, W. G. Alvord, and S. H. Hughes.** 2010. The Nature, Position and Frequency of Mutations Made in a Single-Cycle of HIV-1 Replication. *J Virol*.
5. **Aldovini, A., and R. A. Young.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**:1920-1926.
6. **Ali, M. B., F. Chaminade, I. Kanevsky, E. Ennifar, L. Josset, D. Ficheux, J. L. Darlix, and P. Fosse.** 2007. Structural requirements for nucleocapsid protein-mediated dimerization of avian leukosis virus RNA. *J Mol Biol* **372**:1082-1096.
7. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-1958.
8. **Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu, and M. F. Summers.** 2000. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* **301**:491-511.
9. **Amarasinghe, G. K., J. Zhou, M. Miskimon, K. J. Chancellor, J. A. McDonald, A. G. Matthews, R. R. Miller, M. D. Rouse, and M. F. Summers.** 2001. Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J Mol Biol* **314**:961-970.
10. **Amendt, B. A., D. Hesslein, L. J. Chang, and C. M. Stoltzfus.** 1994. Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* **14**:3960-3970.
11. **Amendt, B. A., Z. H. Si, and C. M. Stoltzfus.** 1995. Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 and tat-rev exon 3: evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol Cell Biol* **15**:6480.

12. **Andersen, E. S., S. A. Contera, B. Knudsen, C. K. Damgaard, F. Besenbacher, and J. Kjems.** 2004. Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J Biol Chem* **279**:22243-22249.
13. **Andersen, E. S., R. E. Jeeninga, C. K. Damgaard, B. Berkhout, and J. Kjems.** 2003. Dimerization and template switching in the 5' untranslated region between various subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**:3020-3030.
14. **Andersen, J. L., and V. Planelles.** 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* **3**:43-51.
15. **Anderson, E. C., and A. M. Lever.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol* **80**:10478-10486.
16. **Anson, D. S., and M. Fuller.** 2003. Rational development of a HIV-1 gene therapy vector. *J Gene Med* **5**:829-838.
17. **Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen, and P. Charneau.** 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* **26**:3025-3037.
18. **Attal, J., M. C. Theron, F. Taboit, M. Cajero-Juarez, G. Kann, P. Bolifraud, and L. M. Houdebine.** 1996. The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Lett* **392**:220-224.
19. **Badorrek, C. S., C. M. Gherghe, and K. M. Weeks.** 2006. Structure of an RNA switch that enforces stringent retroviral genomic RNA dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13640-13645.
20. **Badorrek, C. S., and K. M. Weeks.** 2006. Architecture of a gamma retroviral genomic RNA dimer. *Biochemistry* **45**:12664-12672.
21. **Badorrek, C. S., and K. M. Weeks.** 2005. RNA flexibility in the dimerization domain of a gamma retrovirus. *Nat Chem Biol* **1**:104-111.
22. **Baig, T. T., J. M. Lanchy, and J. S. Lodmell.** 2007. HIV-2 RNA dimerization is regulated by intramolecular interactions in vitro. *RNA* **13**:1341-1354.
23. **Baig, T. T., J. M. Lanchy, and J. S. Lodmell.** 2009. Randomization and in vivo selection reveal a GGRG motif essential for packaging human immunodeficiency virus type 2 RNA. *J Virol* **83**:802-810.
24. **Baig, T. T., C. L. Strong, J. S. Lodmell, and J. M. Lanchy.** 2008. Regulation of primate lentiviral RNA dimerization by structural entrapment. *Retrovirology* **5**:65.
25. **Balakrishnan, M., P. J. Fay, and R. A. Bambara.** 2001. The kissing hairpin sequence promotes recombination within the HIV-I 5' leader region. *J Biol Chem* **276**:36482-36492.
26. **Baltimore, D.** 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* **35**:235-241.
27. **Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-1211.
28. **Balvay, L., M. Lopez Lastra, B. Sargueil, J. L. Darlix, and T. Ohlmann.** 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**:128-140.

29. **Balvay, L., R. Soto Rifo, E. P. Ricci, D. Decimo, and T. Ohlmann.** 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* **1789**:542-557.
30. **Barat, C., C. Gilbert, and M. J. Tremblay.** 2009. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in resting CD4⁺ T lymphocytes is induced by coculture with autologous dendritic cells in the absence of foreign antigens. *J Virol* **83**:2778-2782.
31. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
32. **Basu, V. P., M. Song, L. Gao, S. T. Rigby, M. N. Hanson, and R. A. Bambara.** 2008. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* **134**:19-38.
33. **Basyuk, E., S. Boulon, F. Skou Pedersen, E. Bertrand, and S. Vestergaard Rasmussen.** 2005. The packaging signal of MLV is an integrated module that mediates intracellular transport of genomic RNAs. *J Mol Biol* **354**:330-339.
34. **Basyuk, E., T. Galli, M. Mougel, J. M. Blanchard, M. Sitbon, and E. Bertrand.** 2003. Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* **5**:161-174.
35. **Baudin, F., R. Marquet, C. Isel, J. L. Darlix, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1993. Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol* **229**:382-397.
36. **Bender, W., and N. Davidson.** 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* **7**:595-607.
37. **Bennett, E. M., A. M. Lever, and J. F. Allen.** 2004. Human immunodeficiency virus type 2 Gag interacts specifically with PRP4, a serine-threonine kinase, and inhibits phosphorylation of splicing factor SF2. *J Virol* **78**:11303-11312.
38. **Berg, J. M.** 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**:485-487.
39. **Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss.** 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* **391**:240.
40. **Berkhout, B., A. T. Das, and J. L. van Wamel.** 1998. The native structure of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is required for the first strand transfer of reverse transcription. *Virology* **249**:211-218.
41. **Berkhout, B., A. Gatignol, A. B. Rabson, and K. T. Jeang.** 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* **62**:757-767.
42. **Berkhout, B., and J. L. van Wamel.** 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**:6723-6732.
43. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.

44. **Berkowitz, R. D., A. Ohagen, S. Hoglund, and S. P. Goff.** 1995. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* **69**:6445-6456.
45. **Bernacchi, S., S. Freisz, C. Maechling, B. Spiess, R. Marquet, P. Dumas, and E. Ennifar.** 2007. Aminoglycoside binding to the HIV-1 RNA dimerization initiation site: thermodynamics and effect on the kissing-loop to duplex conversion. *Nucleic Acids Res* **35**:7128-7139.
46. **Bieth, E., C. Gabus, and J. L. Darlix.** 1990. A study of the dimer formation of Rous sarcoma virus RNA and of its effect on viral protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* **18**:119-127.
47. **Bonnet-Mathoniere, B., P. M. Girard, D. Muriaux, and J. Paoletti.** 1996. Nucleocapsid protein 10 activates dimerization of the RNA of Moloney murine leukaemia virus in vitro. *Eur J Biochem* **238**:129-135.
48. **Borman, A. M., C. Quillent, P. Charneau, C. Dauguet, and F. Clavel.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol* **69**:2058-2067.
49. **Bowerman, B., P. O. Brown, J. M. Bishop, and H. E. Varmus.** 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* **3**:469-478.
50. **Bowzard, J. B., R. P. Bennett, N. K. Krishna, S. M. Ernst, A. Rein, and J. W. Wills.** 1998. Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J Virol* **72**:9034-9044.
51. **Brasey, A., M. Lopez-Lastra, T. Ohlmann, N. Beerens, B. Berkhout, J. L. Darlix, and N. Sonenberg.** 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* **77**:3939-3949.
52. **Briones, M. S., C. W. Dobard, and S. A. Chow.** 2010. Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. *J Virol* **84**:5181-5190.
53. **Brooks, G., K. Carroll, J. Butel, S. Morse, and T. Mietzner.** 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Fifth Edition.
54. **Buck, C. B., X. Shen, M. A. Egan, T. C. Pierson, C. M. Walker, and R. F. Siliciano.** 2001. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* **75**:181-191.
55. **Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-669.
56. **Bushman, F. D.** 2002. Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol* **261**:165-177.
57. **Butsch, M., and K. Boris-Lawrie.** 2000. Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol* **74**:11531-11537.

58. **Cain, D., O. Erlwein, A. Grigg, R. A. Russell, and M. O. McClure.** 2001. Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *J Virol* **75**:3731-3739.
59. **Calnan, B. J., S. Biancalana, D. Hudson, and A. D. Frankel.** 1991. Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev* **5**:201-210.
60. **Camerini, V., D. Decimo, L. Balvay, M. Pistello, M. Bendinelli, J. L. Darlix, and T. Ohlmann.** 2008. A dormant internal ribosome entry site controls translation of feline immunodeficiency virus. *J Virol* **82**:3574-3583.
61. **Campbell, E. M., and T. J. Hope.** 2003. Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:761-771.
62. **Campbell, S., and A. Rein.** 1999. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**:2270-2279.
63. **Campbell, S., and V. M. Vogt.** 1997. In vitro assembly of virus-like particles with Rous sarcoma virus Gag deletion mutants: identification of the p10 domain as a morphological determinant in the formation of spherical particles. *J Virol* **71**:4425-4435.
64. **Campbell, S., and V. M. Vogt.** 1995. Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:6487-6497.
65. **Camus, G., C. Segura-Morales, D. Molle, S. Lopez-Verges, C. Begon-Pescia, C. Cazevielle, P. Schu, E. Bertrand, C. Berlioz-Torrent, and E. Basyuk.** 2007. The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. *Mol Biol Cell* **18**:3193-3203.
66. **Caputi, M., A. Mayeda, A. R. Krainer, and A. M. Zahler.** 1999. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J* **18**:4060-4067.
67. **Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**:2814-2820.
68. **Chen, C., and L. A. Chasin.** 1998. Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation. *Somat Cell Mol Genet* **24**:249-256.
69. **Chin, M. P., J. Chen, O. A. Nikolaitchik, and W. S. Hu.** 2007. Molecular determinants of HIV-1 intersubtype recombination potential. *Virology* **363**:437-446.
70. **Chin, M. P., S. K. Lee, J. Chen, O. A. Nikolaitchik, D. A. Powell, M. J. Fivash, Jr., and W. S. Hu.** 2008. Long-range recombination gradient between HIV-1 subtypes B and C variants caused by sequence differences in the dimerization initiation signal region. *J Mol Biol* **377**:1324-1333.
71. **Chin, M. P., T. D. Rhodes, J. Chen, W. Fu, and W. S. Hu.** 2005. Identification of a major restriction in HIV-1 intersubtype recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9002-9007.

72. **Cimarelli, A., S. Sandin, S. Hoglund, and J. Luban.** 2000. Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* **74**:3046-3057.
73. **Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-695.
74. **Clavel, F., and J. M. Orenstein.** 1990. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol* **64**:5230-5234.
75. **Clever, J., C. Sasseti, and T. G. Parslow.** 1995. RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:2101-2109.
76. **Clever, J. L., D. A. Eckstein, and T. G. Parslow.** 1999. Genetic dissociation of the encapsidation and reverse transcription functions in the 5' R region of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**:101-109.
77. **Clever, J. L., D. Miranda, Jr., and T. G. Parslow.** 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **76**:12381-12387.
78. **Clever, J. L., and T. G. Parslow.** 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* **71**:3407-3414.
79. **Clever, J. L., M. L. Wong, and T. G. Parslow.** 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**:5902-5908.
80. **Cochrane, A. W., M. T. McNally, and A. J. Mouland.** 2006. The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology* **3**:18.
81. **Coffin, J. H., S.H. and Varmus, H.E.** 1997. Retroviruses.
82. **Coffin, J. M.** 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* **42**:1-26.
83. **Corbin, A., B. Grigorov, P. Roingeard, J. L. Darlix, and D. Muriaux.** 2008. [Revisiting HIV-1 assembly]. *Med Sci (Paris)* **24**:49-55.
84. **Covey, S. N.** 1986. Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **14**:623-633.
85. **Coyle, J. H., B. W. Guzik, Y. C. Bor, L. Jin, L. Eisner-Smerage, S. J. Taylor, D. Rekosh, and M. L. Hammariskjold.** 2003. Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol Cell Biol* **23**:92-103.
86. **Craigie, R.** 2001. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J Biol Chem* **276**:23213-23216.
87. **Cristofari, G., and J. L. Darlix.** 2002. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**:223-268.
88. **Cruceanu, M., M. A. Urbaneja, C. V. Hixson, D. G. Johnson, S. A. Datta, M. J. Fivash, A. G. Stephen, R. J. Fisher, R. J. Gorelick, J. R. Casas-Finet, A. Rein, I.**

- Rouzina, and M. C. Williams.** 2006. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res* **34**:593-605.
89. **Cullen, B. R.** 2005. Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* **433**:26-27.
90. **Cullen, B. R.** 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**:419-424.
91. **D'Souza, V., J. Melamed, D. Habib, K. Pullen, K. Wallace, and M. F. Summers.** 2001. Identification of a high affinity nucleocapsid protein binding element within the Moloney murine leukemia virus Psi-RNA packaging signal: implications for genome recognition. *J Mol Biol* **314**:217-232.
92. **D'Souza, V., and M. F. Summers.** 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**:643-655.
93. **D'Souza, V., and M. F. Summers.** 2004. Structural basis for packaging the dimeric genome of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **431**:586-590.
94. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
95. **Damgaard, C. K., E. S. Andersen, B. Knudsen, J. Gorodkin, and J. Kjems.** 2004. RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *J Mol Biol* **336**:369-379.
96. **Damgaard, C. K., H. Dyhr-Mikkelsen, and J. Kjems.** 1998. Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 gag and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res* **26**:3667-3676.
97. **Damier, L., L. Domenjoud, and C. Branlant.** 1997. The D1-A2 and D2-A2 pairs of splice sites from human immunodeficiency virus type 1 are highly efficient in vitro, in spite of an unusual branch site. *Biochem Biophys Res Commun* **237**:182-187.
98. **Dangerfield, J. A., N. Windbichler, B. Salmons, W. H. Gunzburg, and R. Schroder.** 2006. Enhancement of the StreptoTag method for isolation of endogenously expressed proteins with complex RNA binding targets. *Electrophoresis* **27**:1874-1877.
99. **Darlix, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel, and F. Barre-Sinoussi.** 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* **216**:689-699.
100. **Das, A. T., A. Harwig, M. M. Vrolijk, and B. Berkhout.** 2007. The TAR hairpin of human immunodeficiency virus type 1 can be deleted when not required for Tat-mediated activation of transcription. *J Virol* **81**:7742-7748.
101. **Das, A. T., B. Klaver, B. I. Klasens, J. L. van Wamel, and B. Berkhout.** 1997. A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol* **71**:2346-2356.
102. **De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers.** 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**:384-388.

103. **de Noronha, C. M., M. P. Sherman, H. W. Lin, M. V. Cavrois, R. D. Moir, R. D. Goldman, and W. C. Greene.** 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* **294**:1105-1108.
104. **De Rocquigny, H., C. Gabus, A. Vincent, M. C. Fournie-Zaluski, B. Roques, and J. L. Darlix.** 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6472-6476.
105. **de Smit, M. H., and J. van Duin.** 1990. Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **38**:1-35.
106. **De Tapia, M., V. Metzler, M. Mougel, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1998. Dimerization of MoMuLV genomic RNA: redefinition of the role of the palindromic stem-loop H1 (278-303) and new roles for stem-loops H2 (310-352) and H3 (355-374). *Biochemistry* **37**:6077-6085.
107. **Deffaud, C., and J. L. Darlix.** 2000. Characterization of an internal ribosomal entry segment in the 5' leader of murine leukemia virus env RNA. *J Virol* **74**:846-850.
108. **Deffaud, C., and J. L. Darlix.** 2000. Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol* **74**:11581-11588.
109. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-666.
110. **Dettenhofer, M., S. Cen, B. A. Carlson, L. Kleiman, and X. F. Yu.** 2000. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* **74**:8938-8945.
111. **Dey, A., D. York, A. Smalls-Mantey, and M. F. Summers.** 2005. Composition and sequence-dependent binding of RNA to the nucleocapsid protein of Moloney murine leukemia virus. *Biochemistry* **44**:3735-3744.
112. **Dirac, A. M., H. Huthoff, J. Kjems, and B. Berkhout.** 2001. The dimer initiation site hairpin mediates dimerization of the human immunodeficiency virus, type 2 RNA genome. *J Biol Chem* **276**:32345-32352.
113. **Dirac, A. M., H. Huthoff, J. Kjems, and B. Berkhout.** 2002. Regulated HIV-2 RNA dimerization by means of alternative RNA conformations. *Nucleic Acids Res* **30**:2647-2655.
114. **Domingo, E., M. G. Mateu, C. Escarmis, E. Martinez-Salas, D. Andreu, E. Giralt, N. Verdager, and I. Fita.** 1995. Molecular evolution of aphthoviruses. *Virus Genes* **11**:197-207.
115. **Domsic, J. K., Y. Wang, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 hnRNP A/B-dependent exonic splicing silencer ESSV antagonizes binding of U2AF65 to viral polypyrimidine tracts. *Mol Cell Biol* **23**:8762-8772.
116. **Dooher, J. E., and J. R. Lingappa.** 2004. Conservation of a stepwise, energy-sensitive pathway involving HP68 for assembly of primate lentivirus capsids in cells. *J Virol* **78**:1645-1656.

117. **Dorman, N., and A. Lever.** 2000. Comparison of viral genomic RNA sorting mechanisms in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **74**:11413-11417.
118. **Dudley, J. P.** 2003. Tag, you're hit: retroviral insertions identify genes involved in cancer. *Trends Mol Med* **9**:43-45.
119. **Duesberg, P. H.** 1968. Physical properties of Rous Sarcoma Virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**:1511-1518.
120. **Dupont, S., N. Sharova, C. DeHoratius, C. M. Virbasius, X. Zhu, A. G. Bukrinskaya, M. Stevenson, and M. R. Green.** 1999. A novel nuclear export activity in HIV-1 matrix protein required for viral replication. *Nature* **402**:681-685.
121. **Eigen, M.** 1993. Viral quasispecies. *Sci Am* **269**:42-49.
122. **Ellerman, V. a. O., Bang.** 1908. Experimentelle Leukamie bei Huhnern. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* **46**:595-609.
123. **Elmen, J., H. Y. Zhang, B. Zuber, K. Ljungberg, B. Wahren, C. Wahlestedt, and Z. Liang.** 2004. Locked nucleic acid containing antisense oligonucleotides enhance inhibition of HIV-1 genome dimerization and inhibit virus replication. *FEBS Lett* **578**:285-290.
124. **Ennifar, E., and P. Dumas.** 2006. Polymorphism of bulged-out residues in HIV-1 RNA DIS kissing complex and structure comparison with solution studies. *J Mol Biol* **356**:771-782.
125. **Ennifar, E., J. C. Paillart, S. Bernacchi, P. Walter, P. Pale, J. L. Decout, R. Marquet, and P. Dumas.** 2007. A structure-based approach for targeting the HIV-1 genomic RNA dimerization initiation site. *Biochimie* **89**:1195-1203.
126. **Ennifar, E., J. C. Paillart, A. Bodlener, P. Walter, J. M. Weibel, A. M. Aubertin, P. Pale, P. Dumas, and R. Marquet.** 2006. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. *Nucleic Acids Res* **34**:2328-2339.
127. **Ennifar, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, P. Dumas, and P. Walter.** 2003. HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem* **278**:2723-2730.
128. **Ennifar, E., P. Walter, and P. Dumas.** 2003. A crystallographic study of the binding of 13 metal ions to two related RNA duplexes. *Nucleic Acids Res* **31**:2671-2682.
129. **Ennifar, E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and P. Dumas.** 2001. Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol* **8**:1064-1068.
130. **Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and P. Dumas.** 1999. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* **7**:1439-1449.
131. **Enserink, M.** 2010. Chronic fatigue syndrome. Conflicting papers on hold as XMRV frenzy reaches new heights. *Science* **329**:18-19.

132. **Erlwein, O., D. Cain, N. Fischer, A. Rethwilm, and M. O. McClure.** 1997. Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology* **229**:251-258.
133. **Fan, H.** 1997. Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: a multistep process. *Trends Microbiol* **5**:74-82.
134. **Farjot, G., A. Sergeant, and I. Mikaelian.** 1999. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* **274**:17309-17317.
135. **Farnet, C. M., and F. D. Bushman.** 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* **88**:483-492.
136. **Fassati, A., and S. P. Goff.** 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:3626-3635.
137. **Feng, Y. X., S. Campbell, D. Harvin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and A. Rein.** 1999. The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J Virol* **73**:4251-4256.
138. **Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nusslein-Volhard, and D. St Johnston.** 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**:1221-1232.
139. **Fisher, R. J., M. J. Fivash, A. G. Stephen, N. A. Hagan, S. R. Shenoy, M. V. Medaglia, L. R. Smith, K. M. Worthy, J. T. Simpson, R. Shoemaker, K. L. McNitt, D. G. Johnson, C. V. Hixson, R. J. Gorelick, D. Fabris, L. E. Henderson, and A. Rein.** 2006. Complex interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **34**:472-484.
140. **Flint, S. J. E., L.W.; Racaniello, V.R. and Skalka, A.M.** 2003. Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, second edition.
141. **Flynn, J. A., W. An, S. R. King, and A. Telesnitsky.** 2004. Nonrandom dimerization of murine leukemia virus genomic RNAs. *J Virol* **78**:12129-12139.
142. **Flynn, J. A., and A. Telesnitsky.** 2006. Two distinct Moloney murine leukemia virus RNAs produced from a single locus dimerize at random. *Virology* **344**:391-400.
143. **Forshey, B. M., U. von Schwedler, W. I. Sundquist, and C. Aiken.** 2002. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* **76**:5667-5677.
144. **Fosse, P., N. Motte, A. Roumier, C. Gabus, D. Muriaux, J. L. Darlix, and J. Paoletti.** 1996. A short autocomplementary sequence plays an essential role in avian sarcoma-leukosis virus RNA dimerization. *Biochemistry* **35**:16601-16609.
145. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-362.
146. **Fu, W., R. J. Gorelick, and A. Rein.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**:5013-5018.

147. **Fu, W., and A. Rein.** 1993. Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **67**:5443-5449.
148. **Furukawa, K.** 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* **112** (Pt 15):2485-2492.
149. **Galetto, R., A. Moumen, V. Giacomoni, M. Veron, P. Charneau, and M. Negroni.** 2004. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo. *J Biol Chem* **279**:36625-36632.
150. **Gallego, J., J. Greatorex, H. Zhang, B. Yang, S. Arunachalam, J. Fang, J. Seamons, S. Lea, R. J. Pomerantz, and A. M. Lever.** 2003. Rev binds specifically to a purine loop in the SL1 region of the HIV-1 leader RNA. *J Biol Chem* **278**:40385-40391.
151. **Gallo, R. C., B. J. Poiesz, and F. W. Ruscetti.** 1981. Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells. *Haematol Blood Transfus* **26**:502-514.
152. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
153. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.
154. **Gamble, T. R., F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Worthylake, M. Houseweart, W. I. Sundquist, and C. P. Hill.** 1996. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**:1285-1294.
155. **Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager, and W. I. Sundquist.** 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* **18**:203-217.
156. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-441.
157. **Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, and et al.** 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* **68**:7433-7447.
158. **Garbitt, R. A., J. A. Albert, M. D. Kessler, and L. J. Parent.** 2001. trans-acting inhibition of genomic RNA dimerization by Rous sarcoma virus matrix mutants. *J Virol* **75**:260-268.
159. **Gatignol, A.** 2007. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* **55**:137-159.
160. **Gatignol, A., J. Dubuisson, M. A. Wainberg, E. A. Cohen, and J. L. Darlix.** 2007. New pandemics: HIV and AIDS, HCV and chronic hepatitis, influenza virus and flu. *Retrovirology* **4**:8.

161. **Gaynor, R.** 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**:347-363.
162. **Geballe, A. P., and M. K. Gray.** 1992. Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res* **20**:4291-4297.
163. **Gherghe, C., and K. M. Weeks.** 2006. The SL1-SL2 (stem-loop) domain is the primary determinant for stability of the gamma retroviral genomic RNA dimer. *J Biol Chem* **281**:37952-37961.
164. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-112.
165. **Gifford, R. J., A. Katzourakis, M. Tristem, O. G. Pybus, M. Winters, and R. W. Shafer.** 2008. A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:20362-20367.
166. **Giles, K. E., M. Caputi, and K. L. Beemon.** 2004. Packaging and reverse transcription of snRNAs by retroviruses may generate pseudogenes. *RNA* **10**:299-307.
167. **Girard, P. M., H. de Rocquigny, B. P. Roques, and J. Paoletti.** 1996. A model of PSI dimerization: destabilization of the C278-G303 stem-loop by the nucleocapsid protein (NCp10) of MoMuLV. *Biochemistry* **35**:8705-8714.
168. **Goff, S. P.** 2007. Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**:253-263.
169. **Goff, S. P., C. J. Tabin, J. Y. Wang, R. Weinberg, and D. Baltimore.** 1982. Transfection of fibroblasts by cloned Abelson murine leukemia virus DNA and recovery of transmissible virus by recombination with helper virus. *J Virol* **41**:271-285.
170. **Goh, W. C., M. E. Rogel, C. M. Kinsey, S. F. Michael, P. N. Fultz, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and M. Emerman.** 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* **4**:65-71.
171. **Goldfarb, M. P., and R. A. Weinberg.** 1981. Structure of the provirus within NIH 3T3 cells transfected with Harvey sarcoma virus DNA. *J Virol* **38**:125-135.
172. **Gorelick, R. J., D. J. Chabot, A. Rein, L. E. Henderson, and L. O. Arthur.** 1993. The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *J Virol* **67**:4027-4036.
173. **Gorelick, R. J., L. E. Henderson, J. P. Hanser, and A. Rein.** 1988. Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8420-8424.
174. **Gorelick, R. J., S. M. Nigida, Jr., J. W. Bess, Jr., L. O. Arthur, L. E. Henderson, and A. Rein.** 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol* **64**:3207-3211.
175. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis

- in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-1431.
176. **Greatorex, J., J. Gallego, G. Varani, and A. Lever.** 2002. 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**:543-557.
177. **Greatorex, J. S., V. Laisse, M. C. Dockhelar, and A. M. Lever.** 1996. Sequences involved in the dimerisation of human T cell leukaemia virus type-1 RNA. *Nucleic Acids Res* **24**:2919-2923.
178. **Grewe, B., and K. Uberla.** 2010. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: manage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *J Gen Virol* **91**:1893-1897.
179. **Groom, H. C., E. C. Anderson, J. A. Dangerfield, and A. M. Lever.** 2009. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Gen Virol* **90**:1141-1147.
180. **Groom, H. C., M. W. Yap, R. P. Galao, S. J. Neil, and K. N. Bishop.** 2010. Susceptibility of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) to retroviral restriction factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:5166-5171.
181. **Gross, L.** 1957. Development and serial cellfree passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus. *Proc Soc Exp Biol Med* **94**:767-771.
182. **Guan, Y., K. Diallo, M. Detorio, J. B. Whitney, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2001. Partial restoration of replication of simian immunodeficiency virus by point mutations in either the dimerization initiation site (DIS) or Gag region after deletion mutagenesis within the DIS. *J Virol* **75**:11920-11923.
183. **Hansen, M. S., S. Carreau, C. Hoffmann, L. Li, and F. Bushman.** 1998. Retroviral cDNA integration: mechanism, applications and inhibition. *Genet Eng (N Y)* **20**:41-61.
184. **Hematti, P., B. K. Hong, C. Ferguson, R. Adler, H. Hanawa, S. Sellers, I. E. Holt, C. E. Eckfeldt, Y. Sharma, M. Schmidt, C. von Kalle, D. A. Persons, E. M. Billings, C. M. Verfaillie, A. W. Nienhuis, T. G. Wolfsberg, C. E. Dunbar, and B. Calmels.** 2004. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* **2**:e423.
185. **Henriet, S., D. Richer, S. Bernacchi, E. Decroly, R. Vigne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, J. C. Paillart, and R. Marquet.** 2005. Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* **354**:55-72.
186. **Herbreteau, C. H., L. Weill, D. Decimo, D. Prevot, J. L. Darlix, B. Sargueil, and T. Ohlmann.** 2005. HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol* **12**:1001-1007.
187. **Hermida-Matsumoto, L., and M. D. Resh.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55(gag) and p17MA. *J Virol* **73**:1902-1908.
188. **Hibbert, C. S., J. Mirro, and A. Rein.** 2004. mRNA molecules containing murine leukemia virus packaging signals are encapsidated as dimers. *J Virol* **78**:10927-10938.
189. **Hill, M. K., M. Shehu-Xhilaga, S. M. Crowe, and J. Mak.** 2002. Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1

- infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J Virol* **76**:11245-11253.
190. **Ho, D. D., and P. D. Bieniasz.** 2008. HIV-1 at 25. *Cell* **133**:561-565.
191. **Hoglund, S., A. Ohagen, J. Goncalves, A. T. Panganiban, and D. Gabuzda.** 1997. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* **233**:271-279.
192. **Houghton, J. L., K. D. Green, W. Chen, and S. Garneau-Tsodikova.** 2010. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *Chembiochem* **11**:880-902.
193. **Houzet, L., J. C. Paillart, F. Smagulova, S. Maurel, Z. Morichaud, R. Marquet, and M. Mougel.** 2007. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res* **35**:2695-2704.
194. **Hu, W. S., and H. M. Temin.** 1990. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1556-1560.
195. **Hull, R., and S. N. Covey.** 1986. Genome organization and expression of reverse transcribing elements: variations and a theme. *J Gen Virol* **67 (Pt 9)**:1751-1758.
196. **Hussein, I. T., N. Ni, A. Galli, J. Chen, M. D. Moore, and W. S. Hu.** 2010. Delineation of the preferences and requirements of the human immunodeficiency virus type 1 dimerization initiation signal by using an in vivo cell-based selection approach. *J Virol* **84**:6866-6875.
197. **Huthoff, H., and B. Berkhout.** 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **7**:143-157.
198. **Ikeda, T., H. Nishitsuji, X. Zhou, N. Nara, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda.** 2004. Evaluation of the functional involvement of human immunodeficiency virus type 1 integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. *J Virol* **78**:11563-11573.
199. **Ivanyi-Nagy, R., I. Kanevsky, C. Gabus, J. P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, P. Fosse, and J. L. Darlix.** 2006. Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* **34**:2618-2633.
200. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-283.
201. **Jacquet, S., A. Mereau, P. S. Bilodeau, L. Damier, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *J Biol Chem* **276**:40464-40475.
202. **Jacquet, S., D. Ropers, P. S. Bilodeau, L. Damier, A. Mougin, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing. *Nucleic Acids Res* **29**:464-478.
203. **Jalalirad, M., and M. Laughrea.** 2010. Formation of immature and mature genomic RNA dimers in wild-type and protease-inactive HIV-1: Differential roles of the Gag polyprotein, nucleocapsid proteins NCp15, NCp9, NCp7, and the dimerization initiation site. *Virology*.

204. **Jenkins, Y., M. McEntee, K. Weis, and W. C. Greene.** 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* **143**:875-885.
205. **Jensen, M. A., F. S. Li, A. B. van 't Wout, D. C. Nickle, D. Shriner, H. X. He, S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. B. Margolick, and J. I. Mullins.** 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* **77**:13376-13388.
206. **Johnson, P. E., R. B. Turner, Z. R. Wu, L. Hairston, J. Guo, J. G. Levin, and M. F. Summers.** 2000. A mechanism for plus-strand transfer enhancement by the HIV-1 nucleocapsid protein during reverse transcription. *Biochemistry* **39**:9084-9091.
207. **Jones, K. L., S. Sonza, and J. Mak.** 2008. Primary T-lymphocytes rescue the replication of HIV-1 DIS RNA mutants in part by facilitating reverse transcription. *Nucleic Acids Res* **36**:1578-1588.
208. **Jossinet, F., J. S. Lodmell, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2001. Identification of the in vitro HIV-2/SIV RNA dimerization site reveals striking differences with HIV-1. *J Biol Chem* **276**:5598-5604.
209. **Jossinet, F., J. C. Paillart, E. Westhof, T. Hermann, E. Skripkin, J. S. Lodmell, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1999. Dimerization of HIV-1 genomic RNA of subtypes A and B: RNA loop structure and magnesium binding. *RNA* **5**:1222-1234.
210. **Jouvenet, N., S. M. Simon, and P. D. Bieniasz.** 2009. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:19114-19119.
211. **Kafaie, J., M. Dolatshahi, L. Ajamian, R. Song, A. J. Mouland, I. Rouiller, and M. Laughrea.** 2009. Role of capsid sequence and immature nucleocapsid proteins p9 and p15 in Human Immunodeficiency Virus type 1 genomic RNA dimerization. *Virology* **385**:233-244.
212. **Kafaie, J., R. Song, L. Abrahamyan, A. J. Mouland, and M. Laughrea.** 2008. Mapping of nucleocapsid residues important for HIV-1 genomic RNA dimerization and packaging. *Virology* **375**:592-610.
213. **Karn, J.** 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**:235-254.
214. **Katahira, J., K. Strasser, A. Podtelejnikov, M. Mann, J. U. Jung, and E. Hurt.** 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* **18**:2593-2609.
215. **Katoh, I., H. Kyushiki, Y. Sakamoto, Y. Ikawa, and Y. Yoshinaka.** 1991. Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment. *J Virol* **65**:6845-6855.
216. **Katoh, I., T. Yasunaga, and Y. Yoshinaka.** 1993. Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. *J Virol* **67**:1830-1839.
217. **Kaye, J. F., and A. M. Lever.** 1999. Human immunodeficiency virus types 1 and 2 differ in the predominant mechanism used for selection of genomic RNA for encapsidation. *J Virol* **73**:3023-3031.

218. **Kaye, J. F., and A. M. Lever.** 1998. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol* **72**:5877-5885.
219. **Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters, and B. H. Hahn.** 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**:523-526.
220. **Khan, M. A., C. Aberham, S. Kao, H. Akari, R. Gorelick, S. Bour, and K. Strebel.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* **75**:7252-7265.
221. **Khandogin, J., K. Musier-Forsyth, and D. M. York.** 2003. Insights into the regioselectivity and RNA-binding affinity of HIV-1 nucleocapsid protein from linear-scaling quantum methods. *J Mol Biol* **330**:993-1004.
222. **Kharytonchyk, S. A., A. I. Kireyeva, A. B. Osipovich, and I. K. Fomin.** 2005. Evidence for preferential copackaging of Moloney murine leukemia virus genomic RNAs transcribed in the same chromosomal site. *Retrovirology* **2**:3.
223. **Khorchid, A., R. Halwani, M. A. Wainberg, and L. Kleiman.** 2002. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* **76**:4131-4137.
224. **Kieken, F., F. Paquet, F. Brule, J. Paoletti, and G. Lancelot.** 2006. A new NMR solution structure of the SL1 HIV-1Lai loop-loop dimer. *Nucleic Acids Res* **34**:343-352.
225. **Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane, and C. Van Lint.** 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* **18**:6106-6118.
226. **Kim, C. H., and I. Tinoco, Jr.** 2000. A retroviral RNA kissing complex containing only two G.C base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9396-9401.
227. **Kim-Ha, J., K. Kerr, and P. M. Macdonald.** 1995. Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**:403-412.
228. **Kino, T., A. Gragerov, O. Slobodskaya, M. Tsopanomichalou, G. P. Chrousos, and G. N. Pavlakis.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* **76**:9724-9734.
229. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
230. **Kleiman, L.** 2002. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* **53**:107-114.
231. **Konig, R., Y. Zhou, D. Elleder, T. L. Diamond, G. M. Bonamy, J. T. Irelan, C. Y. Chiang, B. P. Tu, P. D. De Jesus, C. E. Lilley, S. Seidel, A. M. Opaluch, J. S. Caldwell, M. D. Weitzman, K. L. Kuhlen, S. Bandyopadhyay, T. Ideker, A. P. Orth, L. J. Miraglia, F. D. Bushman, J. A. Young, and S. K. Chanda.** 2008. Global

- analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* **135**:49-60.
232. **Kozak, M.** 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**:5134-5142.
233. **Krausslich, H. G., and R. Welker.** 1996. Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:25-63.
234. **Kumar, M., B. Keller, N. Makalou, and R. E. Sutton.** 2001. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **12**:1893-1905.
235. **Kung, H. J., J. M. Bailey, N. Davidson, M. O. Nicolson, and R. M. McAllister.** 1975. Structure, subunit composition, and molecular weight of RD-114 RNA. *J Virol* **16**:397-411.
236. **Kurg, A., G. Sommer, and A. Metspalu.** 1995. An RNA stem-loop structure involved in the packaging of bovine leukemia virus genomic RNA in vivo. *Virology* **211**:434-442.
237. **L'Hernault, A., J. S. Greatorex, R. A. Crowther, and A. M. Lever.** 2007. Dimerisation of HIV-2 genomic RNA is linked to efficient RNA packaging, normal particle maturation and viral infectivity. *Retrovirology* **4**:90.
238. **Lanchy, J. M., J. D. Ivanovitch, and J. S. Lodmell.** 2003. A structural linkage between the dimerization and encapsidation signals in HIV-2 leader RNA. *RNA* **9**:1007-1018.
239. **Lanchy, J. M., and J. S. Lodmell.** 2002. Alternate usage of two dimerization initiation sites in HIV-2 viral RNA in vitro. *J Mol Biol* **319**:637-648.
240. **Lanchy, J. M., C. A. Rentz, J. D. Ivanovitch, and J. S. Lodmell.** 2003. Elements located upstream and downstream of the major splice donor site influence the ability of HIV-2 leader RNA to dimerize in vitro. *Biochemistry* **42**:2634-2642.
241. **Lanchy, J. M., Q. N. Szafran, and J. S. Lodmell.** 2004. Splicing affects presentation of RNA dimerization signals in HIV-2 in vitro. *Nucleic Acids Res* **32**:4585-4595.
242. **Lapadat-Tapolsky, M., C. Pernelle, C. Borie, and J. L. Darlix.** 1995. Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic Acids Res* **23**:2434-2441.
243. **Laughrea, M., and L. Jette.** 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* **33**:13464-13474.
244. **Laughrea, M., and L. Jette.** 1997. HIV-1 genome dimerization: kissing-loop hairpin dictates whether nucleotides downstream of the 5' splice junction contribute to loose and tight dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *Biochemistry* **36**:9501-9508.
245. **Laughrea, M., L. Jette, J. Mak, L. Kleiman, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 1997. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J Virol* **71**:3397-3406.
246. **Laughrea, M., N. Shen, L. Jette, and M. A. Wainberg.** 1999. Variant effects of non-native kissing-loop hairpin palindromes on HIV replication and HIV RNA

- dimerization: role of stem-loop B in HIV replication and HIV RNA dimerization. *Biochemistry* **38**:226-234.
247. **Lawrence, D. C., C. C. Stover, J. Noznitsky, Z. Wu, and M. F. Summers.** 2003. Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol* **326**:529-542.
248. **Le Blanc, I., J. Gretores, M. C. Dokhelar, and A. M. Lever.** 2000. A 37 base sequence in the leader region of human T-cell leukaemia virus type I is a high affinity dimerization site but is not essential for virus replication. *J Gen Virol* **81**:105-108.
249. **Le Douce, V., G. Herbein, O. Rohr, and C. Schwartz.** 2010. Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* **7**:32.
250. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* **19**:6860-6869.
251. **Le Hir, H., and B. Seraphin.** 2008. EJC's at the heart of translational control. *Cell* **133**:213-216.
252. **Le Rouzic, E., A. Mousnier, C. Rustum, F. Stutz, E. Hallberg, C. Dargemont, and S. Benichou.** 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* **277**:45091-45098.
253. **Lear, A. L., M. Haddrick, and S. Heaphy.** 1995. A study of the dimerization of Rous sarcoma virus RNA in vitro and in vivo. *Virology* **212**:47-57.
254. **Lee, N. S., T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, and J. Rossi.** 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**:500-505.
255. **Lee, N. S., and J. J. Rossi.** 2004. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res* **102**:53-58.
256. **Leis, J., D. Baltimore, J. M. Bishop, J. Coffin, E. Fleissner, S. P. Goff, S. Oroszlan, H. Robinson, A. M. Skalka, H. M. Temin, and et al.** 1988. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* **62**:1808-1809.
257. **Lever, A., H. Gottlinger, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**:4085-4087.
258. **Lever, A. M.** 2007. HIV-1 RNA packaging. *Adv Pharmacol* **55**:1-32.
259. **Levesque, K., M. Halvorsen, L. Abrahamyan, L. Chatel-Chaix, V. Poupon, H. Gordon, L. DesGroseillers, A. Gatignol, and A. J. Mouland.** 2006. Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. *Traffic* **7**:1177-1193.
260. **Levin, J. G., P. M. Grimley, J. M. Ramseur, and I. K. Berezsky.** 1974. Deficiency of 60 to 70S RNA in murine leukemia virus particles assembled in cells treated with actinomycin D. *J Virol* **14**:152-161.
261. **Levin, J. G., J. Guo, I. Rouzina, and K. Musier-Forsyth.** 2005. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**:217-286.

262. **Lewinski, M. K., M. Yamashita, M. Emerman, A. Ciuffi, H. Marshall, G. Crawford, F. Collins, P. Shinn, J. Leipzig, S. Hannenhalli, C. C. Berry, J. R. Ecker, and F. D. Bushman.** 2006. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* **2**:e60.
263. **Li, L., K. Yoder, M. S. Hansen, J. Olvera, M. D. Miller, and F. D. Bushman.** 2000. Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins. *J Virol* **74**:10965-10974.
264. **Liang, C., J. Hu, R. S. Russell, M. Kameoka, and M. A. Wainberg.** 2004. Spliced human immunodeficiency virus type 1 RNA is reverse transcribed into cDNA within infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:203-211.
265. **Liang, C., L. Rong, E. Cherry, L. Kleiman, M. Laughrea, and M. A. Wainberg.** 1999. Deletion mutagenesis within the dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 results in delayed processing of the p2 peptide from precursor proteins. *J Virol* **73**:6147-6151.
266. **Liang, C., L. Rong, Y. Quan, M. Laughrea, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 1999. Mutations within four distinct gag proteins are required to restore replication of human immunodeficiency virus type 1 after deletion mutagenesis within the dimerization initiation site. *J Virol* **73**:7014-7020.
267. **Limon, A., N. Nakajima, R. Lu, H. Z. Ghory, and A. Engelman.** 2002. Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J Virol* **76**:12078-12086.
268. **Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-626.
269. **Liu, Y. P., J. Haasnoot, O. ter Brake, B. Berkhout, and P. Konstantinova.** 2008. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res* **36**:2811-2824.
270. **Llano, M., M. Vanegas, O. Fregoso, D. Saenz, S. Chung, M. Peretz, and E. M. Poeschla.** 2004. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol* **78**:9524-9537.
271. **Lloyd, A., P. White, S. Wessely, M. Sharpe, and D. Buchwald.** 2010. Comment on "Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome". *Science* **328**:825; author reply 825.
272. **Locker, N., and P. J. Lukavsky.** 2007. A practical approach to isolate 48S complexes: affinity purification and analyses. *Methods Enzymol* **429**:83-104.
273. **Lodmell, J. S., C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2000. Convergence of natural and artificial evolution on an RNA loop-loop interaction: the HIV-1 dimerization initiation site. *RNA* **6**:1267-1276.
274. **Lodmell, J. S., J. C. Paillart, D. Mignot, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1998. Oligonucleotide-mediated inhibition of genomic RNA dimerization of HIV-1 strains MAL and LAI: a comparative analysis. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **8**:517-529.

275. **Lopez-Lastra, M., C. Gabus, and J. L. Darlix.** 1997. Characterization of an internal ribosomal entry segment within the 5' leader of avian reticuloendotheliosis virus type A RNA and development of novel MLV-REV-based retroviral vectors. *Hum Gene Ther* **8**:1855-1865.
276. **Lopez-Verges, S., G. Camus, G. Blot, R. Beauvoir, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2006. 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**:14947-14952.
277. **Lorenz, C., N. Piganeau, and R. Schroeder.** 2006. Stabilities of HIV-1 DIS type RNA loop-loop interactions in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **34**:334-342.
278. **Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* **67**:6542-6550.
279. **Luban, J., and S. P. Goff.** 1994. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **68**:3784-3793.
280. **Lucke, S., T. Grunwald, and K. Uberla.** 2005. Reduced mobilization of Rev-responsive element-deficient lentiviral vectors. *J Virol* **79**:9359-9362.
281. **Lwoff, A.** 1957. The concept of virus. *J Gen Microbiol* **17**:239-253.
282. **Ly, H., D. P. Nierlich, J. C. Olsen, and A. H. Kaplan.** 1999. Moloney murine sarcoma virus genomic RNAs dimerize via a two-step process: a concentration-dependent kissing-loop interaction is driven by initial contact between consecutive guanines. *J Virol* **73**:7255-7261.
283. **Ly, H., and T. G. Parslow.** 2002. Bipartite signal for genomic RNA dimerization in Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **76**:3135-3144.
284. **Mak, J., M. Jiang, M. A. Wainberg, M. L. Hammarskjold, D. Rekosh, and L. Kleiman.** 1994. Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **68**:2065-2072.
285. **Mak, J., and L. Kleiman.** 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* **71**:8087-8095.
286. **Maldarelli, F., M. A. Martin, and K. Strebel.** 1991. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol* **65**:5732-5743.
287. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
288. **Mancebo, H. S., G. Lee, J. Flygare, J. Tomassini, P. Luu, Y. Zhu, J. Peng, C. Blau, D. Hazuda, D. Price, and O. Flores.** 1997. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* **11**:2633-2644.
289. **Mandal, D., C. M. Exline, Z. Feng, and C. M. Stoltzfus.** 2009. Regulation of Vif mRNA splicing by human immunodeficiency virus type 1 requires 5' splice site D2 and an exonic splicing enhancer to counteract cellular restriction factor APOBEC3G. *J Virol* **83**:6067-6078.
290. **Manley, J. L., and R. Tacke.** 1996. SR proteins and splicing control. *Genes Dev* **10**:1569-1579.

291. **Mansky, L. M., A. E. Krueger, and H. M. Temin.** 1995. The bovine leukemia virus encapsidation signal is discontinuous and extends into the 5' end of the gag gene. *J Virol* **69**:3282-3289.
292. **Marchand, V., A. Mereau, S. Jacquenet, D. Thomas, A. Mougin, R. Gattoni, J. Stevenin, and C. Branlant.** 2002. A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding. *J Mol Biol* **323**:629-652.
293. **Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin.** 1999. A human sequence homologue of Staufin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2212-2219.
294. **Marquet, R., F. Baudin, C. Gabus, J. L. Darlix, M. Mougel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1991. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res* **19**:2349-2357.
295. **Marquet, R., J. C. Paillart, E. Skripkin, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1994. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA involves sequences located upstream of the splice donor site. *Nucleic Acids Res* **22**:145-151.
296. **Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**:4794-4804.
297. **Maurel, S., L. Houzet, E. L. Garcia, A. Telesnitsky, and M. Mougel.** 2007. Characterization of a natural heterodimer between MLV genomic RNA and the SD' retroelement generated by alternative splicing. *RNA* **13**:2266-2276.
298. **Maurel, S., and M. Mougel.** 2010. Murine leukemia virus RNA dimerization is coupled to transcription and splicing processes. *Retrovirology* **7**:64.
299. **Meehan, A. M., D. T. Saenz, J. H. Morrison, J. A. Garcia-Rivera, M. Peretz, M. Llano, and E. M. Poeschla.** 2009. LEDGF/p75 proteins with alternative chromatin tethers are functional HIV-1 cofactors. *PLoS Pathog* **5**:e1000522.
300. **Melikyan, G. B.** 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**:111.
301. **Mely, Y., F. Cornille, M. C. Fournie-Zaluski, J. L. Darlix, B. P. Roques, and D. Gerard.** 1991. Investigation of zinc-binding affinities of Moloney murine leukemia virus nucleocapsid protein and its related zinc finger and modified peptides. *Biopolymers* **31**:899-906.
302. **Miele, G., A. Moulard, G. P. Harrison, E. Cohen, and A. M. Lever.** 1996. The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J Virol* **70**:944-951.
303. **Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**:5382-5390.
304. **Mirambeau, G., S. Lyonnais, D. Coulaud, L. Hameau, S. Lafosse, J. Jeusset, A. Justome, E. Delain, R. J. Gorelick, and E. Le Cam.** 2006. Transmission electron microscopy reveals an optimal HIV-1 nucleocapsid aggregation with single-stranded nucleic acids and the mature HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **364**:496-511.

305. **Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov, and G. B. Melikyan.** 2009. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**:433-444.
306. **Miyazaki, Y., E. L. Garcia, S. R. King, K. Iyalla, K. Loeliger, P. Starck, S. Syed, A. Telesnitsky, and M. F. Summers.** 2010. An RNA structural switch regulates diploid genome packaging by Moloney murine leukemia virus. *J Mol Biol* **396**:141-152.
307. **Mohr, I. J., T. Pe'ery and M.B. Mathews.** . 2007. "Protein synthesis and Translational Control during Viral Infection" Cold Spring Harbor Laboratory Press.
308. **Monie, T., J. Greatorex, and A. M. Lever.** 2001. Oligonucleotide mapping of the core genomic RNA dimer linkage in human T-cell leukaemia virus type-1. *Virus Res* **78**:45-56.
309. **Monie, T. P., J. S. Greatorex, M. Zacharias, and A. M. Lever.** 2004. The human T-cell lymphotropic virus type-I dimerization initiation site forms a hairpin loop, unlike previously characterized retroviral dimerization motifs. *Biochemistry* **43**:6085-6090.
310. **Moore, M. D., W. Fu, O. Nikolaitchik, J. Chen, R. G. Ptak, and W. S. Hu.** 2007. Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J Virol* **81**:4002-4011.
311. **Moore, M. D., O. A. Nikolaitchik, J. Chen, M. L. Hammarskjold, D. Rekosh, and W. S. Hu.** 2009. Probing the HIV-1 genomic RNA trafficking pathway and dimerization by genetic recombination and single virion analyses. *PLoS Pathog* **5**:e1000627.
312. **Morellet, N., N. Jullian, H. De Rocquigny, B. Maigret, J. L. Darlix, and B. P. Roques.** 1992. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *EMBO J* **11**:3059-3065.
313. **Mougel, M., N. Tounekti, J. L. Darlix, J. Paoletti, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1993. Conformational analysis of the 5' leader and the gag initiation site of Mo-MuLV RNA and allosteric transitions induced by dimerization. *Nucleic Acids Res* **21**:4677-4684.
314. **Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2000. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* **74**:5441-5451.
315. **Muriaux, D., H. De Rocquigny, B. P. Roques, and J. Paoletti.** 1996. NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J Biol Chem* **271**:33686-33692.
316. **Muriaux, D., P. M. Girard, B. Bonnet-Mathoniere, and J. Paoletti.** 1995. Dimerization of HIV-1Lai RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *J Biol Chem* **270**:8209-8216.
317. **Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-5251.

318. **Murti, K. G., M. Bondurant, and A. Tereba.** 1981. Secondary structural features in the 70S RNAs of Moloney murine leukemia and Rous sarcoma viruses as observed by electron microscopy. *J Virol* **37**:411-419.
319. **Nasioulas, G., A. S. Zolotukhin, C. Tabernero, L. Solomin, C. P. Cunningham, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1994. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol* **68**:2986-2993.
320. **Neville, M., F. Stutz, L. Lee, L. I. Davis, and M. Rosbash.** 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**:767-775.
321. **Nicholson, M. G., S. M. Rue, J. E. Clements, and S. A. Barber.** 2006. An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform. *Virology* **349**:325-334.
322. **Nydegger, S., S. Khurana, D. N. Krementsov, M. Foti, and M. Thali.** 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* **173**:795-807.
323. **O'Reilly, M. M., M. T. McNally, and K. L. Beemon.** 1995. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**:373-385.
324. **Oertle, S., and P. F. Spahr.** 1990. Role of the gag polyprotein precursor in packaging and maturation of Rous sarcoma virus genomic RNA. *J Virol* **64**:5757-5763.
325. **Ogert, R. A., L. H. Lee, and K. L. Beemon.** 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *J Virol* **70**:3834-3843.
326. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**:11055-11066.
327. **Ohlmann, T., M. Lopez-Lastra, and J. L. Darlix.** 2000. An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem* **275**:11899-11906.
328. **Onafuwa-Nuga, A. A., A. Telesnitsky, and S. R. King.** 2006. 7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. *RNA* **12**:542-546.
329. **Ooms, M., H. Huthoff, R. Russell, C. Liang, and B. Berkhout.** 2004. A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **78**:10814-10819.
330. **Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* **62**:2578-2586.
331. **Oroudjev, E. M., P. C. Kang, and L. A. Kohlstaedt.** 1999. An additional dimer linkage structure in Moloney murine leukemia virus RNA. *J Mol Biol* **291**:603-613.
332. **Ortiz-Conde, B. A., and S. H. Hughes.** 1999. Studies of the genomic RNA of leukosis viruses: implications for RNA dimerization. *J Virol* **73**:7165-7174.

333. **Ott, D. E., L. V. Coren, and T. D. Gagliardi.** 2005. Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **79**:13839-13847.
334. **Ott, M., M. Schnolzer, J. Garnica, W. Fischle, S. Emiliani, H. R. Rackwitz, and E. Verdin.** 1999. Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* **9**:1489-1492.
335. **Ottmann, M., C. Gabus, and J. L. Darlix.** 1995. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. *J Virol* **69**:1778-1784.
336. **Paillart, J. C., L. Berthoux, M. Ottmann, J. L. Darlix, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1996. A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J Virol* **70**:8348-8354.
337. **Paillart, J. C., M. Dettenhofer, X. F. Yu, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2004. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem* **279**:48397-48403.
338. **Paillart, J. C., R. Marquet, E. Skripkin, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Biol Chem* **269**:27486-27493.
339. **Paillart, J. C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**:461-472.
340. **Paillart, J. C., E. Skripkin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 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.
341. **Paillart, J. C., E. Skripkin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5572-5577.
342. **Paillart, J. C., E. Skripkin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1996. The use of chemical modification interference and inverse PCR mutagenesis to identify the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *Pharm Acta Helv* **71**:21-28.
343. **Paillart, J. C., E. Westhof, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1997. Non-canonical interactions in a kissing loop complex: the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* **270**:36-49.
344. **Paoletti, A. C., M. F. Shubsda, B. S. Hudson, and P. N. Borer.** 2002. Affinities of the nucleocapsid protein for variants of SL3 RNA in HIV-1. *Biochemistry* **41**:15423-15428.
345. **Parent, L. J., T. M. Cairns, J. A. Albert, C. B. Wilson, J. W. Wills, and R. C. Craven.** 2000. RNA dimerization defect in a Rous sarcoma virus matrix mutant. *J Virol* **74**:164-172.
346. **Parkin, N. T., E. A. Cohen, A. Darveau, C. Rosen, W. Haseltine, and N. Sonenberg.** 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* **7**:2831-2837.

347. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**:443-455.
348. **Petit, C., O. Schwartz, and F. Mammano.** 2000. The karyophilic properties of human immunodeficiency virus type 1 integrase are not required for nuclear import of proviral DNA. *J Virol* **74**:7119-7126.
349. **Plantier, J. C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemeé, F. Damond, D. L. Robertson, and F. Simon.** 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**:871-872.
350. **Pluymers, W., P. Cherepanov, D. Schols, E. De Clercq, and Z. Debyser.** 1999. Nuclear localization of human immunodeficiency virus type 1 integrase expressed as a fusion protein with green fluorescent protein. *Virology* **258**:327-332.
351. **Polge, E., J. L. Darlix, J. Paoletti, and P. Fosse.** 2000. Characterization of loose and tight dimer forms of avian leukosis virus RNA. *J Mol Biol* **300**:41-56.
352. **Pongoski, J., K. Asai, and A. Cochrane.** 2002. Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral RNA splicing. *J Virol* **76**:5108-5120.
353. **Poole, E., P. Strappe, H. P. Mok, R. Hicks, and A. M. Lever.** 2005. HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* **6**:741-755.
354. **Poon, D. T., E. N. Chertova, and D. E. Ott.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 preferentially encapsidates genomic RNAs that encode Pr55(Gag): functional linkage between translation and RNA packaging. *Virology* **293**:368-378.
355. **Pornillos, O., S. L. Alam, D. R. Davis, and W. I. Sundquist.** 2002. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Biol* **9**:812-817.
356. **Prats, A. C., C. Roy, P. A. Wang, M. Erard, V. Housset, C. Gabus, C. Paoletti, and J. L. Darlix.** 1990. cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol* **64**:774-783.
357. **Pruss, D., R. Reeves, F. D. Bushman, and A. P. Wolffe.** 1994. The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *J Biol Chem* **269**:25031-25041.
358. **Purcell, D. F., and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**:6365-6378.
359. **Pyronnet, S., L. Pradayrol, and N. Sonenberg.** 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* **5**:607-616.
360. **Rabson, A. B., and H. C. Lin.** 2000. NF-kappa B and HIV: linking viral and immune activation. *Adv Pharmacol* **48**:161-207.
361. **Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze.** 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**:718-729.
362. **Rasmussen, S. V., and F. S. Pedersen.** 2006. Co-localization of gammaretroviral RNAs at their transcription site favours co-packaging. *J Gen Virol* **87**:2279-2289.

363. **Reicin, A. S., G. Kalpana, S. Paik, S. Marmon, and S. Goff.** 1995. Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *J Virol* **69**:5904-5907.
364. **Reil, H., A. A. Bukovsky, H. R. Gelderblom, and H. G. Gottlinger.** 1998. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J* **17**:2699-2708.
365. **Rein, A., L. E. Henderson, and J. G. Levin.** 1998. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**:297-301.
366. **Rhodes, T., H. Wargo, and W. S. Hu.** 2003. High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J Virol* **77**:11193-11200.
367. **Rhodes, T. D., O. Nikolaitchik, J. Chen, D. Powell, and W. S. Hu.** 2005. Genetic recombination of human immunodeficiency virus type 1 in one round of viral replication: effects of genetic distance, target cells, accessory genes, and lack of high negative interference in crossover events. *J Virol* **79**:1666-1677.
368. **Ricci, E. P., R. Soto Rifo, C. H. Herbreteau, D. Decimo, and T. Ohlmann.** 2008. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans* **36**:690-693.
369. **Ristic, N., and M. P. Chin.** 2010. Mutations in matrix and SP1 repair the packaging specificity of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 mutant by reducing the association of Gag with spliced viral RNA. *Retrovirology* **7**:73.
370. **Rizvi, T. A., and A. T. Panganiban.** 1993. Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **67**:2681-2688.
371. **Robinson, H. L.** 1967. Isolation of noninfectious particles containing Rous sarcoma virus RNA from the medium of Rous sarcoma virus-transformed nonproducer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**:1655-1662.
372. **Roldan, A., R. S. Russell, B. Marchand, M. Gotte, C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2004. In vitro identification and characterization of an early complex linking HIV-1 genomic RNA recognition and Pr55Gag multimerization. *J Biol Chem* **279**:39886-39894.
373. **Ropers, D., L. Ayadi, R. Gattoni, S. Jacquenet, L. Damier, C. Branlant, and J. Stevenin.** 2004. Differential effects of the SR proteins 9G8, SC35, ASF/SF2, and SRp40 on the utilization of the A1 to A5 splicing sites of HIV-1 RNA. *J Biol Chem* **279**:29963-29973.
374. **Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:2071-2075.
375. **Rous, P.** 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **13**:397-411.
376. **Rulli, S. J., Jr., C. S. Hibbert, J. Mirro, T. Pederson, S. Biswal, and A. Rein.** 2007. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol* **81**:6623-6631.

377. **Russell, R. S., C. Liang, and M. A. Wainberg.** 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* **1**:23.
378. **Russell, R. S., A. Roldan, M. Detorio, J. Hu, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* **77**:12986-12995.
379. **Ryser, H. J., and R. Fluckiger.** 2005. Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug Discov Today* **10**:1085-1094.
380. **Saad, J. S., E. Loeliger, P. Luncsford, M. Liriano, J. Tai, A. Kim, J. Miller, A. Joshi, E. O. Freed, and M. F. Summers.** 2007. Point mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. *J Mol Biol* **366**:574-585.
381. **Saad, J. S., J. Miller, J. Tai, A. Kim, R. H. Ghanam, and M. F. Summers.** 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11364-11369.
382. **Sakaguchi, K., N. Zambrano, E. T. Baldwin, B. A. Shapiro, J. W. Erickson, J. G. Omichinski, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, and E. Appella.** 1993. Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5219-5223.
383. **Sakuragi, J., A. Iwamoto, and T. Shioda.** 2002. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **76**:959-967.
384. **Sakuragi, J., T. Shioda, and A. T. Panganiban.** 2001. Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of human immunodeficiency virus type 1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J Virol* **75**:2557-2565.
385. **Sakuragi, J. I., S. Sakuragi, M. Ohishi, and T. Shioda.** 2010. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect.*
386. **Sanchez-Luque, F. J., J. A. Reyes-Darias, E. Puerta-Fernandez, and A. Berzal-Herranz.** 2010. Inhibition of HIV-1 replication and dimerization interference by dual inhibitory RNAs. *Molecules* **15**:4757-4772.
387. **Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Galloway.** 2002. Cyclophilin A plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation. *J Virol* **76**:4671-4677.
388. **Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Galloway.** 2002. trans-Complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent of its isomerase activity. *J Virol* **76**:2255-2262.
389. **Sauliere, J., N. Haque, S. Harms, I. Barbosa, M. Blanchette, and H. Le Hir.** 2010. The exon junction complex differentially marks spliced junctions. *Nat Struct Mol Biol* **17**:1269-1271.
390. **Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso.** 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* **3**:1259-1265.

391. **Scheifele, L. Z., R. A. Garbitt, J. D. Rhoads, and L. J. Parent.** 2002. Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3944-3949.
392. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-529.
393. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* **12**:207-219.
394. **Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt.** 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *EMBO J* **16**:3256-3271.
395. **SenGupta, D. N., B. Berkhout, A. Gatignol, A. M. Zhou, and R. H. Silverman.** 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:7492-7496.
396. **Sfakianos, J. N., and E. Hunter.** 2003. M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic* **4**:671-680.
397. **Sfakianos, J. N., R. A. LaCasse, and E. Hunter.** 2003. The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* **4**:660-670.
398. **Sharp, P. M., G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 2005. Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* **79**:3891-3902.
399. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-650.
400. **Shehu-Xhilaga, M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* **75**:1834-1841.
401. **Shehu-Xhilaga, M., M. Hill, J. A. Marshall, J. Kappes, S. M. Crowe, and J. Mak.** 2002. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J Virol* **76**:4331-4340.
402. **Shehu-Xhilaga, M., H. G. Kraeusslich, S. Pettit, R. Swanstrom, J. Y. Lee, J. A. Marshall, S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J Virol* **75**:9156-9164.
403. **Sheldon, M., R. Ratnasabapathy, and N. Hernandez.** 1993. Characterization of the inducer of short transcripts, a human immunodeficiency virus type 1 transcriptional element that activates the synthesis of short RNAs. *Mol Cell Biol* **13**:1251-1263.
404. **Shen, N., L. Jette, C. Liang, M. A. Wainberg, and M. Laughrea.** 2000. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *J Virol* **74**:5729-5735.
405. **Sheng, N., S. C. Pettit, R. J. Tritch, D. H. Ozturk, M. M. Rayner, R. Swanstrom, and S. Erickson-Viitanen.** 1997. Determinants of the human immunodeficiency virus

- type 1 p15NC-RNA interaction that affect enhanced cleavage by the viral protease. *J Virol* **71**:5723-5732.
406. **Sheth, U., and R. Parker.** 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **125**:1095-1109.
407. **Shetty, S., S. Kim, T. Shimakami, S. M. Lemon, and M. R. Mihailescu.** 2010. Hepatitis C virus genomic RNA dimerization is mediated via a kissing complex intermediate. *RNA* **16**:913-925.
408. **Si, Z., B. A. Amendt, and C. M. Stoltzfus.** 1997. Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon 2. *Nucleic Acids Res* **25**:861-867.
409. **Sierra, S., B. Kupfer, and R. Kaiser.** 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* **34**:233-244.
410. **Sinck, L., D. Richer, J. Howard, M. Alexander, D. F. Purcell, R. Marquet, and J. C. Paillart.** 2007. In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs. *RNA* **13**:2141-2150.
411. **Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, M. Blumenfeld, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1996. Mechanisms of inhibition of in vitro dimerization of HIV type I RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* **271**:28812-28817.
412. **Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4945-4949.
413. **Smagulova, F., S. Maurel, Z. Morichaud, C. Devaux, M. Mougel, and L. Houzet.** 2005. The highly structured encapsidation signal of MuLV RNA is involved in the nuclear export of its unspliced RNA. *J Mol Biol* **354**:1118-1128.
414. **Sokolskaja, E., and J. Luban.** 2006. Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1. *Curr Opin Microbiol* **9**:404-408.
415. **Song, R., J. Kafaie, L. Yang, and M. Laughrea.** 2007. HIV-1 viral RNA is selected in the form of monomers that dimerize in a three-step protease-dependent process; the DIS of stem-loop 1 initiates viral RNA dimerization. *J Mol Biol* **371**:1084-1098.
416. **Sonstegard, T. S., and P. B. Hackett.** 1996. Autogenous regulation of RNA translation and packaging by Rous sarcoma virus Pr76gag. *J Virol* **70**:6642-6652.
417. **South, T. L., and M. F. Summers.** 1993. Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Sci* **2**:3-19.
418. **Spriggs, S., L. Garyu, R. Connor, and M. F. Summers.** 2008. Potential intra- and intermolecular interactions involving the unique-5' region of the HIV-1 5'-UTR. *Biochemistry* **47**:13064-13073.
419. **Srisawat, C., and D. R. Engelke.** 2001. Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* **7**:632-641.
420. **St Louis, D. C., D. Gotte, E. Sanders-Buell, D. W. Ritchey, M. O. Salminen, J. K. Carr, and F. E. McCutchan.** 1998. Infectious molecular clones with the nonhomologous dimer initiation sequences found in different subtypes of human

- immunodeficiency virus type 1 can recombine and initiate a spreading infection in vitro. *J Virol* **72**:3991-3998.
421. **Stewart, L., G. Schatz, and V. M. Vogt.** 1990. Properties of avian retrovirus particles defective in viral protease. *J Virol* **64**:5076-5092.
422. **Stoltzfus, C. M., and J. M. Madsen.** 2006. Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res* **4**:43-55.
423. **Stoltzfus, C. M., and P. N. Snyder.** 1975. Structure of B77 sarcoma virus RNA: stabilization of RNA after packaging. *J Virol* **16**:1161-1170.
424. **Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689-699.
425. **Strappe, P. M., D. W. Hampton, D. Brown, B. Cachon-Gonzalez, M. Caldwell, J. W. Fawcett, and A. M. Lever.** 2005. Identification of unique reciprocal and non reciprocal cross packaging relationships between HIV-1, HIV-2 and SIV reveals an efficient SIV/HIV-2 lentiviral vector system with highly favourable features for in vivo testing and clinical usage. *Retrovirology* **2**:55.
426. **Strauss, J. H. S., E. G.** 2002. *Viruses*.
427. **Strong, C. L., J. M. Lanchy, A. Dieng-Sarr, P. J. Kanki, and J. S. Lodmell.** 2009. A 5'UTR-spliced mRNA isoform is specialized for enhanced HIV-2 gag translation. *J Mol Biol* **391**:426-437.
428. **Summers, M. F., L. E. Henderson, M. R. Chance, J. W. Bess, Jr., T. L. South, P. R. Blake, I. Sagi, G. Perez-Alvarado, R. C. Sowder, 3rd, D. R. Hare, and et al.** 1992. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci* **1**:563-574.
429. **Sun, X., Q. Zhang, and H. M. Al-Hashimi.** 2007. Resolving fast and slow motions in the internal loop containing stem-loop 1 of HIV-1 that are modulated by Mg²⁺ binding: role in the kissing-duplex structural transition. *Nucleic Acids Res* **35**:1698-1713.
430. **Suzuki, Y., and R. Craigie.** 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**:187-196.
431. **Svitkin, Y. V., A. Pause, and N. Sonenberg.** 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* **68**:7001-7007.
432. **Swanson, C. M., and M. H. Malim.** 2006. Retrovirus RNA trafficking: from chromatin to invasive genomes. *Traffic* **7**:1440-1450.
433. **Swanson, C. M., B. A. Puffer, K. M. Ahmad, R. W. Doms, and M. H. Malim.** 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J* **23**:2632-2640.
434. **Swanstrom, R., and Wills, J.R.** . 1997. Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

435. **Syed, F., and M. A. McCrae.** 2009. Interactions in vivo between the Vif protein of HIV-1 and the precursor (Pr55(GAG)) of the virion nucleocapsid proteins. *Arch Virol* **154**:1797-1805.
436. **Tahirov, T. H., N. D. Babayeva, K. Varzavand, J. J. Cooper, S. C. Sedore, and D. H. Price.** 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* **465**:747-751.
437. **Takehisa, J., M. Osei-Kwasi, N. K. Ayisi, O. Hishida, T. Miura, T. Igarashi, J. Brandful, W. Ampofo, V. B. Netty, M. Mensah, M. Yamashita, E. Ido, and M. Hayami.** 1997. Phylogenetic analysis of HIV type 2 in Ghana and intrasubtype recombination in HIV type 2. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:621-623.
438. **Tanchou, V., D. Decimo, C. Pechoux, D. Lener, V. Rogemond, L. Berthoux, M. Ottmann, and J. L. Darlix.** 1998. Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication. *J Virol* **72**:4442-4447.
439. **Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, and J. Kjems.** 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J* **20**:5748-5758.
440. **Tange, T. O., A. Nott, and M. J. Moore.** 2004. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**:279-284.
441. **Taura, T., H. Krebber, and P. A. Silver.** 1998. A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7427-7432.
442. **Tazi, J., N. Bakkour, V. Marchand, L. Ayadi, A. Aboufirassi, and C. Branlant.** 2010. Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J* **277**:867-876.
443. **Temin, H. M.** 1991. Sex and recombination in retroviruses. *Trends Genet* **7**:71-74.
444. **Temin, H. M., and S. Mizutani.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-1213.
445. **Tounekti, N., M. Mougel, C. Roy, R. Marquet, J. L. Darlix, J. Paoletti, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1992. Effect of dimerization on the conformation of the encapsidation Psi domain of Moloney murine leukemia virus RNA. *J Mol Biol* **223**:205-220.
446. **Tritel, M., and M. D. Resh.** 2000. Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* **74**:5845-5855.
447. **Truant, R., and B. R. Cullen.** 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**:1210-1217.
448. **Ugolini, S., I. Mondor, and Q. J. Sattentau.** 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* **7**:144-149.
449. **Urbaneja, M. A., B. P. Kane, D. G. Johnson, R. J. Gorelick, L. E. Henderson, and J. R. Casas-Finet.** 1999. Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J Mol Biol* **287**:59-75.

450. **Urisman, A., R. J. Molinaro, N. Fischer, S. J. Plummer, G. Casey, E. A. Klein, K. Malathi, C. Magi-Galluzzi, R. R. Tubbs, D. Ganem, R. H. Silverman, and J. L. DeRisi.** 2006. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* **2**:e25.
451. **Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, G. J. Hannon, and R. Parker.** 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**:515-524.
452. **Van Lint, C., C. A. Amella, S. Emiliani, M. John, T. Jie, and E. Verdin.** 1997. Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol* **71**:6113-6127.
453. **Vasudevan, S., and J. A. Steitz.** 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**:1105-1118.
454. **Ventoso, I., R. Blanco, C. Perales, and L. Carrasco.** 2001. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12966-12971.
455. **von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono.** 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6992-6996.
456. **von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* **67**:4945-4955.
457. **Wang, M. L., and A. S. Lee.** 1983. Polymerization of vector DNA after transfection into hamster fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* **110**:593-601.
458. **Wang, S. W., K. Noonan, and A. Aldovini.** 2004. Nucleocapsid-RNA interactions are essential to structural stability but not to assembly of retroviruses. *J Virol* **78**:716-723.
459. **Watts, J. M., K. K. Dang, R. J. Gorelick, C. W. Leonard, J. W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C. L. Burch, and K. M. Weeks.** 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **460**:711-716.
460. **Weill, L., L. James, N. Ulryck, N. Chamond, C. H. Herbreteau, T. Ohlmann, and B. Sargueil.** 2010. A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **38**:1367-1381.
461. **Whitney, J. B., and M. A. Wainberg.** 2006. Impaired RNA incorporation and dimerization in live attenuated leader-variants of SIVmac239. *Retrovirology* **3**:96.
462. **Wichroski, M. J., G. B. Robb, and T. M. Rana.** 2006. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog* **2**:e41.
463. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian staufin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2220-2230.
464. **Wieggers, K., G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg, and H. G. Krausslich.** 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* **72**:2846-2854.

465. **Wilkinson, K. A., R. J. Gorelick, S. M. Vasa, N. Guex, A. Rein, D. H. Mathews, M. C. Giddings, and K. M. Weeks.** 2008. High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol* **6**:e96.
466. **Windbichler, N., and R. Schroeder.** 2006. Isolation of specific RNA-binding proteins using the streptomycin-binding RNA aptamer. *Nat Protoc* **1**:637-640.
467. **Wu, L., and V. N. KewalRamani.** 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**:859-868.
468. **Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken.** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **74**:9381-9387.
469. **Yang, J., and B. R. Cullen.** 1999. Structural and functional analysis of the avian leukemia virus constitutive transport element. *RNA* **5**:1645-1655.
470. **Yoon, V., M. Fridkis-Hareli, S. Munisamy, J. Lee, D. Anastasiades, and L. Stevceva.** 2010. The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Curr Med Chem* **17**:741-749.
471. **You, J. C., and C. S. McHenry.** 1993. HIV nucleocapsid protein. Expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *J Biol Chem* **268**:16519-16527.
472. **Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth.** 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* **6**:837-847.
473. **Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, W. S. Lane, and M. B. Roth.** 1993. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**:219-222.
474. **Zeffman, A., S. Hassard, G. Varani, and A. Lever.** 2000. The major HIV-1 packaging signal is an extended bulged stem loop whose structure is altered on interaction with the Gag polyprotein. *J Mol Biol* **297**:877-893.
475. **Zemmel, R. W., A. C. Kelley, J. Karn, and P. J. Butler.** 1996. Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J Mol Biol* **258**:763-777.
476. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-185.
477. **Zhang, H., R. J. Pomerantz, G. Dornadula, and Y. Sun.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol* **74**:8252-8261.
478. **Zwick, M. B., E. O. Saphire, and D. R. Burton.** 2004. gp41: HIV's shy protein. *Nat Med* **10**:133-134.

ANNEXES

1	pS polyA-apta-PBS	5'- CTCAAAGTAGTGTGTG AAAAGACCGACCAGAATCATGCAAGT GCGTAAGATAGTCGCGGGCCGGGAAAA CCCGTCTGTTGTGTG -3'
2	pAS polyA-apta-PBS	5'- CACACAACAGACGGG TTTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCA CTTGCATGATTCTGGTCGGTCTTTT CACACACTACTTTGAG -3'
3	pS DIS-apta-SD	5'- GGCAAGAGGCGAGGG AAAAGACCGACCAGAATCATGCAAGT GCGTAAGATAGTCGCGGGCCGGGAAAA GCGGCGACTG GTGAG-3
4	pAS DIS-apta-SD	5'- CTCACCAGTCGCCGCT TTTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCA CTTGCATGATTCTGGTCGGTCTTTT CCCTCGCCTCTTGCC-3'
5	pS SD-apta-PSI	5'- GTGAGTACGCC AAAAAGACCGACCAGAATCATGCAAGTGCCT AAGATAGTCGCGGGCCGGGAAAA TTTGACTAGCGGAG-3'
6	pAS SD-apta-PSI	5'-CTCCGCTAGTCAAAA TTTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCA CTTGCATGATTCTGGTCGGTCTTTT TGGCGTACTCAC -3'
7	pS PSI-apta-AUG	5'- GCGGAGGCTAGAAGG AAAAGACCGACCAGAATCATGCAAGT GCGTAAGATAGTCGCGGGCCGGGAAAA GAGAGATGG TGCG-3'
8	pAS PSI-apta-AUG	5'- CGCACCCATCTCT TTTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCAC TTGCATGATTCTGGTCGGTCTTTT CCTTCTAGCCTCCGC-3'
9	pS 3'-apta	5'-CAGATGCTGCATATA AAAAGACCGACCAGAATCATGCAAGTGC GTAAGATAGTCGCGGGCCGGGAAAA CAGCTGCTTTTTTGCC-3'
10	pAS 3'-apta	5'- GGCAAAAAGCAGCTG TTTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCA CTTGCATGATTCTGGTCGGTCTTTT ATATGCAGCATCTG -3'
11	pT7 455-474	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGGGTCTCTCTGGTTAGACC</u> 3'
12	pAS 1092-1111	5' GCTCTTCCTCTATCTTATC 3'
13	pT7 455-474	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGGGTGGATCTACCACACACA</u> 3'
14	pAS 9690-9709	5' TGCTAGAGATTTCCACACT 3'
15	pAS 808	5' CCGACGCTCTCGCACC 3'

Annexe 1 : Séquence des oligonucléotides utilisés. Les oligonucléotides 1 à 10 ont été utilisés pour la mutagenèse dirigée, la séquence de l'insertion est indiquée en bleu. Les oligonucléotides 11 à 14 ont été utilisés pour les PCR. Le promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 est souligné. L'oligonucléotide 15 a été utilisé pour la cartographie au DMS.