



HAL
open science

La région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 : structures, fonctions et interactions avec des ligands

Jean-Christophe Paillart

► **To cite this version:**

Jean-Christophe Paillart. La région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 : structures, fonctions et interactions avec des ligands. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2006. tel-00271207

HAL Id: tel-00271207

<https://theses.hal.science/tel-00271207>

Submitted on 8 Apr 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I
Faculté des Sciences de la Vie et de la Santé

Habilitation à Diriger des Recherches

**LA REGION 5' NON TRADUITE DE L'ARN GENOMIQUE DU
VIH-1 : STRUCTURES, FONCTIONS ET INTERACTIONS
AVEC DES LIGANDS**

Jean-Christophe PAILLART

UPR 9002 du CNRS
Architecture et Réactivité de l'ARN
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Strasbourg

TABLE DES MATIÈRES

	pages
CURRICULUM VITAE	1
◆ Etat civil	3
◆ Titres et diplômes universitaires	3
◆ Carrière scientifique	3
◆ Prix	4
◆ Administration de la recherche	4
◆ Activités d'encadrement	4
 SYNTHÈSE DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE	
7	
Avant propos	
9	
 A. La dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	10
1. Identification du site d'initiation de la dimérisation (DIS)	10
2. Etude structurale du site d'initiation de la dimérisation	13
3. Importance fonctionnelle du DIS dans la réplication virale	14
4. Tentative d'inhibition de la dimérisation	14
a. Stratégie antisens	14
b. Fixation d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides	15
 B. Structure et versatilité de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1	16
1. Interaction tertiaire dans la région 5' terminale	17
2. Analyse conformationnelle de l'ARN génomique <i>ex vivo</i>	18
3. Variabilité structurale du complexe d'initiation de la reverse transcription	20
 C. Rôle de la protéine de Matrice du VIH-1 dans le ciblage membranaire du précurseur protéique Pr55^{gag}	21
21	
 TRAVAUX EN COURS ET PROJETS	23
 A. Dimérisation et encapsidation de l'ARN génomique du VIH-1	25
25	
1. Quel est le lieu de formation des dimères d'ARN génomique ?	26
2. Transport et sélection des ARN génomiques	27
 B. Fixation de dérivés d'aminoglycosides au DIS et inhibition de la réplication virale	29
29	

C. Rôle des protéines Vif et hDBR1 dans la réplication virale du VIH-1	
32	
1. Fixation de la protéine Vif sur l'ARN génomique du VIH-1	32
2. Vif influence-t-elle le processus de rétrotranscription au niveau structural et/ou fonctionnel ?	34
3. La protéine Vif régule-t-elle la traduction des protéines APOBEC-3F/3G ?	35
a. Fixation de Vif à l'ARNm d'APOBEC-3G/3F	36
b. Régulation de la traduction d'APOBEC-3G/3F par Vif	36
c. Analyse structurale de la région 5' et/ou 3' non traduite	37
4. La protéine hDBR1 et la réplication virale du VIH-1	37

RÉFÉRENCES

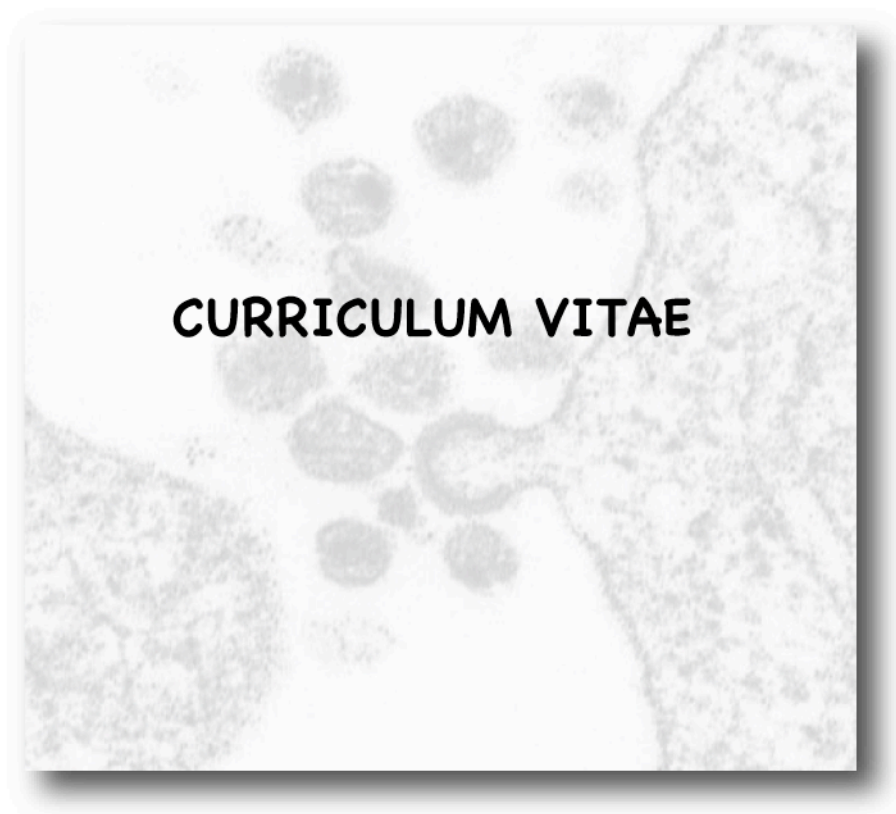
39

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

45

PUBLICATIONS

51



1 - ETAT CIVIL

Jean-Christophe PAILLART

Né le 17 Janvier 1968 à Montargis (45)

Nationalité française

Marié, 2 enfants

Service National effectué du 1/08/91 au 30/06/92 à Entzheim (67)

Adresses

personnelle : 47, rue du Neufeld, 67100 Strasbourg. Tel : 03.88.34.20.50

professionnelle : IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex

Tel : 03.88.41.70.35 Fax : 03.88.60.22.18

Electronique : jc.paillart@ibmc.u-strasbg.fr

2 - TITRES ET DIPLOMES UNIVERSITAIRES

1996 Doctorat d'Université de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Louis Pasteur, Strasbourg 1, soutenue le 28 juin 1996 - Mention Très Honorable avec Félicitations du jury.

Directeurs de thèse : Prof. B. Ehresmann et Dr. C. Ehresmann. UPR 9002 du CNRS

Titre de la thèse : *La dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) : Etudes structurale et fonctionnelle.*

1991 Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Moléculaire et Cellulaire, option Biochimie et Biologie Moléculaire tendance Biophysique, Université Louis Pasteur, Strasbourg I - mention B

Titre du rapport : *Etude des éléments intervenant dans la dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) par mutagenèse dirigée.*

1990 Maîtrise de biochimie (Université d'Orléans) - juin 1990 – Mention B

Stage de Maîtrise, société Synthelabo, Amilly (45)

Titre du rapport : *Séparation et dosage des acides aminés par chromatographie échangeuse d'ions. Approche d'une méthode de validation.*

1989 Licence de biochimie (Université d'Orléans) - juin 1989 -Mention AB

1988 Diplôme Universitaire de Technologie de Biologie Appliquée, option Analyses Biologiques et Biochimiques (IUT de Tours) - Mention AB

Titre du rapport : *Effet d'un apport exogène de cholestérol sur le développement du foie gras chez l'oie. (INRA de Tours-Nouzilly-37)*

1986 Baccalauréat série D (Lycée en Forêt de Montargis) – Mention AB

3 - CARRIERE SCIENTIFIQUE

Chargé de Recherche au CNRS (CR2) depuis le 1/12/1998, CR1 depuis le 1/10/2001 - UPR 9002 du CNRS, Strasbourg (directeur : Pr. E.Westhof), équipe "Réplication des virus à ARN et des rétrotransposons" (Dr. R. Marquet).

Stage post-doctoral : laboratoire du Dr. Heinrich Göttlinger (Harvard Medical School, Dana Farber Cancer Institute, Division of Human Retrovirology, Boston, USA)

Rôle de la protéine de matrice dans la régulation du ciblage membranaire du précurseur Gag

Modulation de la transduction des signaux cellulaires par la protéine Nef du VIH-1

Du 1/01/1997 au 30/11/1998 : chercheur associé

Obtention d'une bourse d'étude dans le cadre du jumelage Strasbourg-Boston

Post-doctorant : laboratoire du Prof. B. Ehresmann et du Dr. C. Ehresmann

Du 1/07/1996 au 31/12/1996 : boursier ANRS

Doctorant : laboratoire du Prof. B. Ehresmann et du Dr. C. Ehresmann

Du 1/01/1996 au 30/06/1996 : boursier ANRS

Du 1/10/1995 au 31/12/1995 : Vacataire

Du 1/10/1992 au 30/09/1995 : boursier MRT

4 - PRIX

1998 Lauréat du prix de Thèse de la Fondation Dina-Surdin (Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire)

5 – ADMINISTRATION DE LA RECHERCHE

- *Enseignement et diffusion de l'information scientifique et technique*

Organisateur du XXVIIIème Forum des jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire – Strasbourg, du 3 au 7 septembre 2001 (250 participants)

- *Partenariat et valorisation*

- Co-responsable du contrat ANRS avec R. Marquet : *Relations entre la protéine Vif et l'ARN génomique dans la réplication virale du virus de l'immunodéficiency humaine de type 1 (VIH-1)*. Appel d'offre 2005 durée 24 mois – 91 966 €

- Contribution à l'élaboration et à la rédaction du contrat ANRS introduit par C. Ehresmann : *Importance de la structure et versatilité de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 dans la réplication virale*. Appel d'offre 2003 - durée 24 mois – 138 380 €

- Contribution à l'élaboration et à la rédaction du contrat ANRS introduit par B. et C. Ehresmann: "*structure de la région leader de l'ARN génomique du VIH-1 et réplication virale* " Appel d'offre 2001 - durée 24 mois – 137 658 k€

- Expertise d'articles pour les journaux suivants : Journal of Virology, Nucleic Acids Research, RNA, Journal of General Virology, Journal of Molecular Biology, Central European Journal of Biology.
- Membre élu du Conseil de Laboratoire de l'UPR 9002 du CNRS, Strasbourg depuis 2000
- Membre élu du Conseil de la Fédération de Recherche du CNRS n°1589, Strasbourg depuis 2006
- Membre de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire depuis 1993
- Président du groupe thématique "Forum Jeunes Chercheurs" de la SFBBM – 2005-2008

6 – ACTIVITE D'ENCADREMENT

- *Encadrement de chercheurs post-doctorants*

- **Dr. Markus DETTENHOFER**, Department of Molecular Microbiology and Immunology (X.-F. Yu), Johns Hopkins University, Baltimore, USA. Cartographie de l'ARN viral du VIH-1 dans les cellules infectées et les virus. Influence de Vif sur la structure de l'ARN. Du 21/09/00 au 31/01/01

- **Dr Miranda SHEHU-XHILAGA**, MacFarlane Burnet Institute, Victoria, Australie. Cartographie *in vitro* du site de dimérisation de l'ARN génomique du VIH-2. Du 1/12/01 au 20/01/02

- **Dr. Boulbaba SELMI**. Rôle de la protéine Vif du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans la réplication virale : relation avec la protéine CEM15 et son ARN messenger. Boursier ANRS du 1/01/04 au 31/12/04

- *Encadrement d'étudiants en thèse de doctorat, en DEA et Master*

- **Simon HENRIET**. Etude de la fixation de la protéine Vif sur l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1). Du 01/09/01 au 30/06/02. Responsable de stage du DEA obtenu le 2/07/02 - Mention B.

Encadrement de sa thèse à partir du 1/09/02 (Bourse MRT)

- **Gaëlle MERCENNE**. Rôle de l'enzyme de débranchement des lassos d'ARN (hDBR1) dans la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et sa rétrotranscription. Responsable de stage du DEA du 01/09/04 au 30/06/05 (obtenu le 02/07/05 – Mention B).

Co-directeur de thèse avec R. Marquet depuis le 01/09/05 (Bourse MRT) : Rôle de la protéine Vif dans la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) : influence sur la traduction des protéines APOBEC-3G/3F.

- **Lucile SINCK**. Spécificité d'encapsidation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Responsable de stage de Master Recherche du 01/02/06 au 30/06/06

- *Encadrement d'étudiants et techniciens*

- **Delphine RICHER**, Assistante Ingénieur CNRS. Etude structure-fonction des ARN

- **Maria PROKUDIN**, stage de maîtrise de Biochimie (Initiation à la Recherche Scientifique) de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg du 15/06/05 au 13/08/05. Effets des aminoglycosides sur la stabilité des dimères d'ARN du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) *in vitro*.



Avant-propos

J'ai débuté mon travail de recherche lors de mon arrivée à Strasbourg en 1990 pour y effectuer un DEA dans l'équipe de Bernard et Chantal Ehresmann. A cette époque, Roland Marquet, alors jeune post-doc, et Florence Baudin, tout juste "thésée" démarraient une nouvelle thématique suite à une collaboration établie avec l'équipe de Jean-Luc Darlix (ENS-Lyon). C'est ainsi que je me suis intéressé à la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 pendant cette année de DEA et les 4 années de thèse qui ont suivi, toujours encadré par Roland qui entre temps avait obtenu un poste de CR1 au CNRS. Avec l'aide de Eugene Skripkin, chercheur post-doctorant russe, nous avons identifié le site d'initiation de la dimérisation (DIS) de cet ARN rétroviral et grâce à de nombreux séjours dans le laboratoire de Jean-Luc, où j'ai pu me familiariser avec les techniques de virologie moléculaire, nous avons montré que la dimérisation de l'ARN était cruciale pour la réplication virale.

Suite à l'obtention de ma thèse en juin 1996, j'ai voulu parfaire ma formation initiée à Strasbourg et à Lyon et j'ai rejoint l'équipe d'Heinrich Gottlinger (Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, MA, Boston, USA), spécialiste réputé de l'assemblage viral. Mon travail était de comprendre le mécanisme de régulation qui permettrait aux précurseurs protéiques viraux de se fixer à la membrane plasmique, lieu d'assemblage des virions. J'ai ainsi confirmé l'existence du "switch conformationnel" de l'acide myristique localisé en N-terminal de la protéine de Matrice du VIH-1. Pendant ces deux ans outre atlantique, j'ai bénéficié du support constant de Bernard, Chantal et Roland et mes efforts ont été récompensés en 1998 par l'obtention d'un poste de CR2 au CNRS.

À mon retour, je me suis replongé dans le monde de l'ARN, point central du laboratoire, mais en y insérant un aspect cellulaire. Ainsi, après avoir mis en évidence un motif de structure tertiaire dans la région 5' terminale de l'ARN génomique du VIH-1, nous avons pu, en collaboration avec Markus Dettenhofer (Baltimore, MD, USA), caractériser pour la première fois la structure secondaire de cet ARN dans les cellules infectées et les particules virales. Cette avancée technologique nous a permis par la suite (1) d'analyser avec Valérie Goldschmidt, alors doctorante au laboratoire, les variabilités structurales existantes au sein du complexe d'initiation de la rétrotranscription et (2) de montrer, en collaboration avec l'équipe de Philippe Dumas (UPR9002), que des antibiotiques de la famille des aminoglycosides se fixent spécifiquement dans la boucle du DIS de l'ARN génomique du VIH-1 en culture cellulaire.

Parallèlement à ces différentes études, nous avons initié en 2002 une nouvelle thématique portant sur les relations existant entre la protéine Vif du VIH-1 et son ARN génomique. Cette étude, débutée lors du DEA de Simon Henriot et poursuivie lors de sa thèse, nous aura permis de montrer que la protéine Vif se fixe de façon spécifique à la région 5' terminale du génome du VIH-1. Cette fixation pourrait être à l'origine de la régulation de plusieurs étapes clés de la réplication virale.

Dans ce mémoire, après avoir exposé les différents résultats obtenus, regroupés par thématique, je présenterai les travaux en cours et les projets qui en découlent. Ces projets s'inscrivent non seulement dans un élargissement des connaissances fondamentales sur le VIH-1 (relation dimérisation/encapsidation de l'ARN génomique, rôle de protéines virales et cellulaires dans la réplication virale) mais aussi dans le développement de nouveaux agents antiviraux capables de cibler le DIS et d'inhiber efficacement la réplication virale.

A. La dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Depuis la fin des années 70, nous savons que les rétrovirus encapsident deux molécules d'ARN génomique de polarité positive. Des clichés de microscopie électronique obtenus sur divers rétrovirus ont montré que, dans tous les cas étudiés, les deux molécules d'ARN sont associées à proximité de leur extrémité 5', dans une région appelée DLS (Dimer Linkage Structure) (8, 9, 79). La conservation du caractère diploïde des rétrovirus traduit l'existence d'une forte pression de sélection et suggère un rôle fonctionnel important. Il avait d'ailleurs été proposé que la dimérisation pourrait réguler positivement l'encapsidation de l'ARN génomique et négativement la traduction des gènes *gag* et *pol*. En effet, l'ARN viral sert non seulement de génome, mais fonctionne aussi comme ARNm codant les protéines structurales et enzymatiques. De plus, la dimérisation de l'ARN représente un avantage évident pour la recombinaison pendant la rétrotranscription. Elle permet en particulier au virus de se répliquer malgré la présence de lésions dans l'ARN génomique et favorise la variabilité génétique.

Lors de mon arrivée au laboratoire en 1990, les conditions de dimérisation des ARN *in vitro* avaient déjà été mises au point par Roland Marquet (71). Ceci a été rendu possible grâce à l'équipe de Jean-Luc Darlix, qui, un an auparavant, avait montré que la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 pouvait être reproduite *in vitro* en utilisant des ARN synthétiques correspondant à l'extrémité 5' de ces génomes (26, 95). Ainsi, et confirmant ce qui avait été observé en microscopie électronique, nos deux laboratoires ont montré l'importance de la région située en aval du site donneur (SD) d'épissage dans la dimérisation de l'ARN génomique par un mécanisme impliquant des quartets de G (71). Bien que plusieurs laboratoires ont confirmé ces résultats, nous avons démontré par la suite avec Eugene Skripkin (chercheur post-doctorant dans notre laboratoire) que le signal crucial pour la dimérisation de l'ARN génomique est localisé en amont du SD et que le mécanisme de dimérisation est différent de celui initialement proposé.

1. Identification du site d'initiation de la dimérisation (DIS)

(avec Eugene Skripkin, chercheur post-doctorant, Delphine Richer, AI)

Dès 1994, nous avons suspecté que des séquences en amont du SD étaient impliquées dans la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 (isolat MAL) (73). Nous avons, par interférence chimique et mutagenèse dirigée, identifié le site d'initiation de la dimérisation, que nous avons nommé DIS (Dimerization Initiation Site, également appelée SL1) (**figure 1**) (83, 87, 108). Il s'agit d'un élément structural en tige-boucle très conservé dans les différents isolats du VIH-1, contenant une boucle de neuf nucléotides dont six forment une séquence autoccomplémentaire de type GUGCAC (sous-type A&G) ou GCGCGC (sous-type B&D). La délétion de cette tige-boucle abolit la dimérisation, bien que la DLS présumée (séquence 305-615) soit présente. Nous avons montré que l'étape initiale de la dimérisation est réalisée par des appariements de type Watson Crick entre les séquences autoccomplémentaires de chacun des deux monomères (**figure 1**) (83, 84, 86). Ce complexe boucle-boucle ou "kissing-complex" peut éventuellement être converti en duplex étendu suite à la

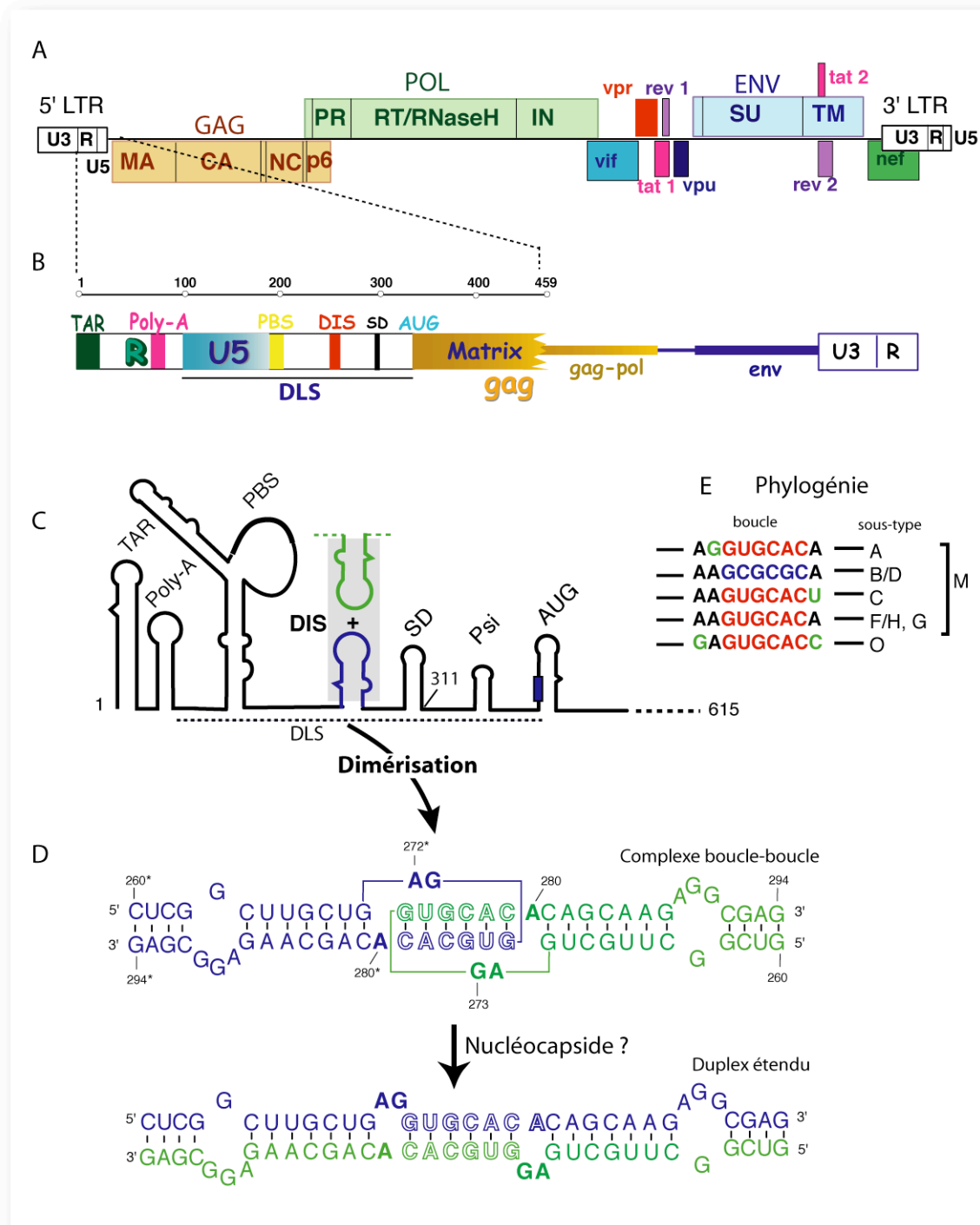


Figure 1 : Identification du site d'initiation de la dimérisation du VIH-1

(A) Organisation génétique de l'ADN proviral du VIH-1. Les différents cadres de lecture sont indiqués. (B) Représentation schématique de l'ARN génomique du VIH-1. **R** séquence répétée ; **TAR** élément de transactivation de la transcription ; **poly-A** copie du signal de polyadénylation en 5' ; **U5** séquence unique en 5' ; **PBS** site de fixation de l'ARNt^{lys,3}, amorce de la rétrotranscription ; **DIS** site d'initiation de la dimérisation ; **SD** site donneur d'épissage ; **gag** séquence codant les protéines structurales. (C) Modèle de structure secondaire des 500 premiers nucléotides de l'ARN génomique du VIH-1. Les structures secondaires principales sont représentées : TAR, Poly-A, PBS, DIS, SD, Psi (signal d'encapsidation), AUG (codon d'initiation de traduction du gène *gag*). Deux régions DIS sont impliquées dans la formation du complexe « boucle-boucle ». (D) Schéma du mécanisme de la dimérisation des ARN du VIH-1 montrant le complexe « boucle-boucle » qui peut être converti en « duplex étendu ». (E) Comparaison de la séquence du DIS des différents groupes du VIH-1 (M, Main et O, outlier) et sous-types (A, B, C, D, F, G et H).

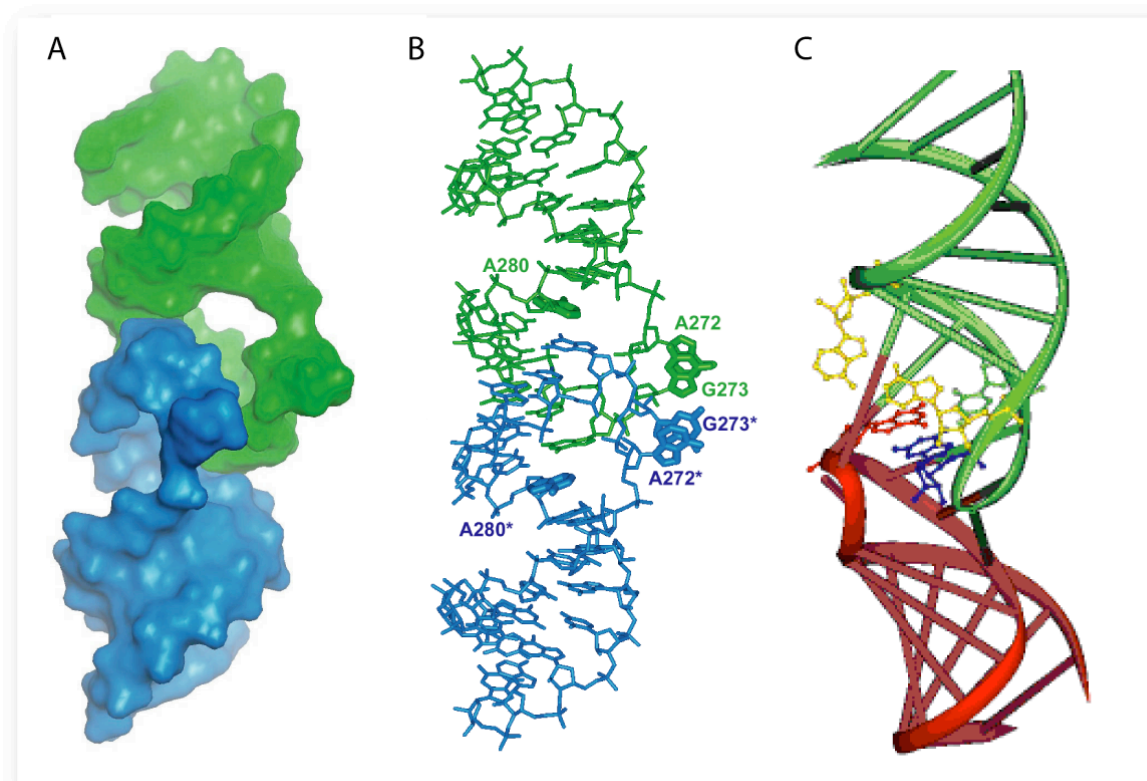


Figure 2 : Structure cristallographique du complexe boucle-boucle du DIS de sous-type A (A & B) et modèle tridimensionnel établi à la suite d'expériences de cartographie en solution (C).

fusion et à l'appariement intermoléculaire des hélices du DIS. Cette transition ne semble cependant pas avoir lieu dans le contexte d'un ARN synthétique contenant la région 5'-terminale complète (ARN 1-615) (86). Les appariements boucle-boucle ne sont pas les seules interactions impliquées dans la formation d'un dimère d'ARN stable. Nous avons en effet montré que des mutations dans des séquences localisées en aval du SD (region 305-415), bien que n'empêchant pas la dimérisation, réduisent considérablement la stabilité thermique du dimères d'ARN (83). L'ensemble de nos résultats indique que la dimérisation est un processus en deux étapes : (1) reconnaissance entre les deux monomères par l'intermédiaire du DIS (initiation) ; (2) établissement d'interactions additionnelles impliquant des séquences puriniques conservées en aval du SD et sans doute d'autres séquences non encore identifiées (**figure 1D**).

Tous ces résultats ont depuis été largement documentés et confirmés par la communauté scientifique (19, 65, 77) (pour revue voir (85)). Il a cependant été proposé qu'un duplex étendu puisse se former soit par traitement thermique pour les ARN de petite taille (64, 76), soit par action de la protéine de nucléocapside NCp7 (75). Il n'est cependant pas exclu que dans ces conditions particulières, le duplex étendu se forme par hybridation d'ARN plus ou moins dénaturé, plutôt que par propagation à partir du complexe boucle-boucle. La formation de ce duplex étendu a été relié *ex vivo* à une étape dite de "maturation" de l'ARN génomique qui s'accompagne, au sein de la particule virale, d'une stabilisation thermique accrue de son dimère d'ARN comme cela a été montré chez VIH-1 et MoMuLV (40, 41). Cette étape semble être directement reliée à la maturation des précurseurs protéiques bien que cela ait été remis en cause très récemment (39). Il est évident que la protéine de

nucléocapside (NC) est en partie responsable de la stabilisation du dimère dans le virion. Cependant, l'amalgame a rapidement été fait entre cette maturation et le passage du DIS de la forme boucle-boucle à la forme duplex étendu. Bien que cela ait été observé *in vitro* avec des systèmes minimalistes (petits ARN) en présence de NC, ce passage n'a jamais été démontré *ex vivo*.

2. Etude structurale du site d'initiation de la dimérisation

(avec Fabrice Jossinet, doctorant, Delphine Richer, AI ; collaboration avec Eric Westhof, UPR 9002, Strasbourg)

Une étude phylogénétique réalisée sur plus de 30 isolats du VIH-1, VIH-2 et rétrovirus apparentés (SIV) nous a permis de montrer que non seulement la séquence autoccomplémentaire du DIS mais aussi les purines flanquantes sont très conservées (84) (**figure 1E**). La majorité des isolats se répartit en deux classes suivant la séquence de la boucle du DIS : la séquence AGGUGCACA présente dans les isolats de sous-type A et les recombinants de ce sous-type (exemple MAL) ; la séquence AAGCGCGCA se retrouve quant à elle dans les isolats des sous-types B et D (exemple Lai). Cette conservation reflète une forte contrainte évolutive. Par mutagenèse dirigée et étude des paramètres cinétiques de dimérisation (T_m , K_d), nous avons montré l'importance des purines en amont de la séquence auto-complémentaire (88). Par la suite, le travail initié lors de ma thèse s'est poursuivi avec Fabrice Jossinet. Nous nous sommes intéressés à comparer les mécanismes de dimérisation de l'ARN des sous-types A et B (deux représentants majeurs des DIS du VIH-1). Ainsi, par des expériences d'interférence des modifications chimiques, nous avons montré que la dimérisation s'avère particulièrement sensible à des modifications subtiles de la conformation du squelette ribose-phosphate. La différence essentielle entre les deux sous-groupes concerne le rôle du Mg^{2+} dans le processus de dimérisation. Contrairement à celle du sous-groupe B, la dimérisation de l'ARN du sous-groupe A requiert la fixation d'un ion Mg^{2+} dans la boucle du DIS (56). Nos résultats de cartographie en solution (56, 88) nous ont permis de construire, en collaboration avec Eric Westhof (UPR9002), un modèle tridimensionnel du complexe boucle-boucle du DIS (**figure 2**). Dans ce modèle, les hélices s'empilent de façon co-axiale et la structure est contrainte par des interactions non-canoniques entre les deux purines à la base de la boucle (interaction sheared A-A) (56). De plus, la purine en deuxième position de la boucle serait impliquée dans une interaction triple dont la nature dépendrait de la séquence des deux paires de bases centrales : elle serait intramoléculaire pour le sous-type B et intermoléculaire pour le sous-type A.

Depuis ces travaux, de nombreuses données structurales ont été obtenues sur des ARN de petite taille correspondant au DIS, par cristallographie aux rayons X (35, 36) (**figure 2**) et par RMN (42, 59, 60, 74, 113), que ce soit sur le complexe boucle-boucle ou sur le duplex étendu. Ces études ont majoritairement confirmé l'empilement parfaitement coaxial des deux tige-boucles. En revanche, les études cristallographiques ont montré que les deux purines conservées en 5' de la boucle (A272, R273) étaient expulsées de l'hélice et que la base A280, quoique parfaitement empilée dans l'hélice, reste non appariée.

3. Importance fonctionnelle du DIS dans la réplication virale

(collaboration avec Lionel Berthoux, Michèle Ottman et Jean.-Luc. Darlix, INSERM U758-ENS, Lyon)

L'identification du DIS *in vitro* nous a offert la possibilité de déterminer de manière précise le rôle de la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 dans la réplication virale. Plusieurs mutations ont été introduites au niveau du DIS dans un clone moléculaire infectieux du VIH-1 (pNL4.3) et leurs effets ont été testés après infection de cellules lymphoïdes CD4⁺ (82). Nous n'avons pas observé d'effet sur la traduction et la maturation des précurseurs protéiques viraux. En revanche, les mutants étudiés sont 10-100 (substitutions de la boucle) à 1000 (délétion du DIS) fois moins infectieux que des virus sauvages. Cette chute d'infectivité a au moins deux origines : d'une part, la quantité d'ARN génomique encapsidé dans les virions mutés est diminuée d'un facteur 2 à 5 ; d'autre part, les virus mutés présentent un défaut au niveau de la réverse transcription. Nous avons montré par PCR semi-quantitative que la quantité d'ADN proviral est fortement diminuée, alors que les premières étapes de la rétrotranscription ne le sont pas. L'analyse de l'ARN génomique montre une fraction importante de monomère dans les particules virales, suggérant que les dimères formés en absence de DIS sont peu stables. Ainsi, le DIS ne serait pas absolument requis pour la dimérisation de l'ARN génomique *in vivo*, mais les dimères formés en absence de DIS seraient anormaux. Parallèlement à nos travaux, plusieurs groupes ont montré l'importance du DIS pour l'encapsidation de l'ARN génomique et la réplication virale (13, 18, 45, 66). Depuis, le DIS est considéré comme partie intégrante du signal d'encapsidation (Ψ , Psi) de l'ARN génomique du VIH-1.

4. Tentative d'inhibition de la dimérisation

Du fait de l'intervention du DIS dans les étapes précoces (transcription inverse) et tardives (encapsidation) du cycle rétroviral, il nous est apparu intéressant d'un point de vue stratégique de cibler le DIS pour essayer d'inhiber la réplication virale.

a. Stratégie antisens

(avec Eugene Skripkin & Steve Lodmell, chercheurs post-doctorant, Delphine Richer, AI - collaboration avec M. Blumenfeld, Genset, Paris)

La forte pression évolutive souligne l'importance structurale et fonctionnelle du DIS et c'est pour cette raison que nous avons envisagé la possibilité d'inhiber la réplication virale en ciblant le DIS par une approche sens ou antisens. Avec E. Skripkin, nous avons ainsi testé la capacité d'une large panoplie d'oligonucléotides ARN et ADN de diverses tailles (9 à 35 nucléotides) à interférer avec le dimère d'un ARN 1-615 (sous-type A) préformé. Nous savions déjà à cette époque que le complexe boucle-boucle était en équilibre dynamique, et qu'un dimère d'ARN préformé pouvait être aisément déplacé par un ARN compétiteur (86). Plusieurs résultats inattendus ont été obtenus. D'une part, les ARN s'avèrent beaucoup plus efficaces que leurs homologues ADN, qu'ils soient sens ou antisens (107). En revanche, un oligonucléotide sens constitué d'une tige ADN et d'une boucle ARN à la même capacité d'inhibition que son homologue ARN, démontrant une fois de plus l'importance de la structure fine de la boucle. D'autre part, les oligonucléotides antisens sont beaucoup plus efficaces que les sens. Cette différence a deux origines. Les tige-boucles sens, capables de dimériser sur elle-mêmes,

forment des interactions boucle-boucle réversibles et agissent par un mécanisme d'*inhibition competitive*. Au contraire, les tige-boucles antisens (qui dimérisent très mal sur elles-mêmes) forment avec l'ARN viral un complexe très stable, probablement un duplex étendu, qui est *irréversible*.

Cette étude a été comparée à l'inhibition de la dimérisation *in vitro* d'ARN de sous-type B (isolat Lai) (68). 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 ont ainsi confirmé que les purines situées de part et d'autre de la séquence autoccomplémentaire étaient cruciales pour la structuration de la boucle et que la formation d'un duplex étendu nécessitait une stricte complémentarité entre les deux boucles. Un des rôles des purines non complémentaires pourrait être d'empêcher la propagation des interactions intermoléculaires.

b. Fixation d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides

(collaboration avec Eric Ennifar & Philippe Dumas, UPR 9002, Strasbourg)

Après avoir résolu la structure cristallographie du complexe boucle-boucle (35), l'équipe de cristallographie de notre unité (E. Ennifar & P. Dumas) a récemment observé une ressemblance structurale frappante entre le DIS et le site A de l'ARN 16S présent dans la petite sous-unité (30S) du ribosome d'*Echerichia coli* (34) (**figure 3**). La structure du DIS se superpose de manière quasi parfaite à celle du site A complexé à la paromomycine. Le site A du ribosome fixe certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides, comme la néomycine et la paromomycine. Ces antibiotiques bloquent la croissance bactérienne en interférant avec la fidélité de la traduction. En collaboration avec cette équipe, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le DIS fixerait certains des aminoglycosides se fixant au site A bactérien (34). En utilisant des ARN synthétiques correspondant au DIS des sous-types A et F du VIH-1 et des ARN de grande taille contenant le DIS (ARN 1-615), nous avons confirmé la fixation spécifique de la néomycine et de la paromomycine, alors que d'autres antibiotiques comme la kanamycine B, la généticine ou la tobramycine ne se fixent pas. La fixation des aminoglycosides est détectée par inhibition de la coupure à l'acétate de plomb (entre les nts A272 et G273) et/ou protection des modifications au DMS (positions N1-A280 et N7-G274). Ainsi, par analogie structurale avec le site A du ribosome, nous avons montré que l'uridine en seconde position dans la séquence autoccomplémentaire des sous-types A, C, F, G et H joue un rôle clé dans la fixation des aminoglycosides (**figure 3** et **figure 1E** pour la phylogénie). De ce fait, aucune fixation spécifique n'a pu être détectée sur le DIS des sous-types B&D qui contient un C à la place du U dans la séquence autoccomplémentaire. Nous avons également montré que la fixation des aminoglycosides stabilise le complexe boucle-boucle du DIS.

L'obtention récente par le groupe de P. Dumas de structures cristallographiques du DIS du sous-type F complexé à divers aminoglycosides nous ouvre une voie vers le « drug design ». Il nous est en effet maintenant possible d'imaginer les modifications chimiques à apporter aux aminoglycosides pour qu'ils fixent avec une plus grande spécificité le DIS des différents sous-types du VIH-1, dont le sous-type B (voir projet).

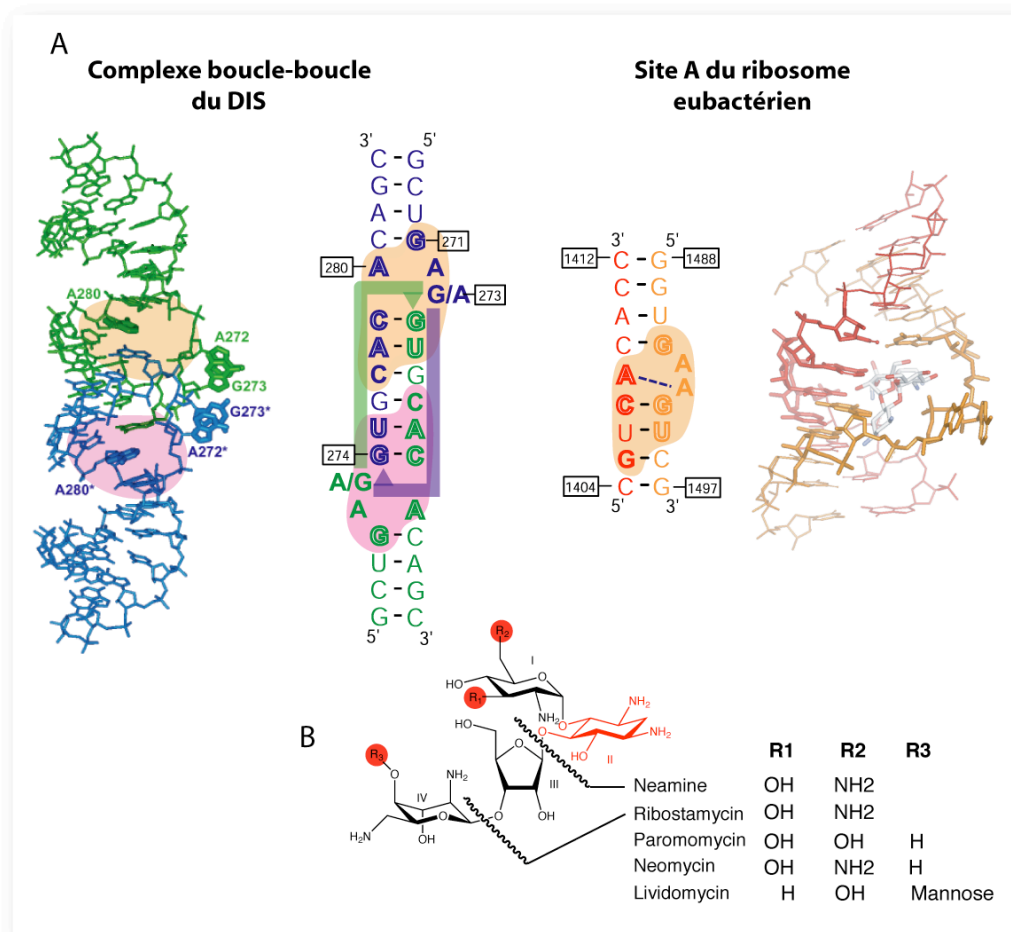


Figure 3 : Similitude entre le complexe boucle-boucle du DIS et le site A du ribosome bactérien. (A) Les nucléotides identiques dans les 2 ARN sont en gras ; ceux qui sont nécessaires pour la fixation des aminoglycosides sont en gras et ouvert. De part et d'autre sont représentées les structures cristallographiques 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. (B) Structure chimique des aminoglycosides utilisés. Le cycle désoxystreptamine (DOS) est en rouge.

B. Structure et versatilité de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1

La structure secondaire de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 a été largement étudiée depuis maintenant plus de 10 ans et plusieurs modèles de structure secondaire ont été proposés (6, 10, 25, 46). Cette région, qui est la plus conservée du génome, peut être décomposée en plusieurs domaines structurellement et fonctionnellement indépendants impliqués dans des étapes clés de la réplication virale. La région R comprend le signal de trans-activation de la transcription (TAR), site de fixation de la protéine Tat, et le signal de poly-adénylation dont la copie 5' est réprimée. La région U5 localisée en aval de R, contient le site de fixation de l'ARNt₃^{Lys} amorce de la rétrotranscription (PBS). Plus en aval sont localisées des tiges-boucles qui contiennent des éléments essentiels à la réplication virale : le site d'initiation de la dimérisation (DIS), le site majeur d'épissage (SD), le signal d'encapsulation de l'ARN génomique (Psi) et le codon AUG initiateur de la traduction.

La détermination et la compréhension des mécanismes qui régissent la structuration des ARN en général et de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 en particulier revêt un intérêt considérable. En effet, il apparaît de plus en plus probable que la versatilité structurale de la région 5' non traduite puisse réguler le devenir (traduction, dimérisation, encapsidation, assemblage) de l'ARN génomique du VIH-1. Cependant, la majorité des études réalisées à ce jour (*in vitro*) manque cruellement de correspondance cellulaire et d'analyse tridimensionnelle du repliement de cette région.

1. Interaction tertiaire dans la région 5' terminale

L'encapsidation de l'ARN génomique du VIH-1 nécessite non seulement un signal d'encapsidation spécifique et multipartite constitué par une succession de tiges-boucles mais également des facteurs protéiques rétroviraux (précurseur Pr55^{gag} en particulier) (24). Il apparaît de plus en plus probable qu'une étape de condensation de l'ARN génomique soit nécessaire à son empaquetage dans la particule virale. De plus, il semble que l'ARN soit indispensable à l'assemblage de la particule virale en formant un "échafaudage" (78) et que les protéines virales Gag induisent un changement conformationnel de la région leader du VIH-1 (116). Ces résultats combinés sont en accord avec la reconnaissance d'une conformation bien structurée de la région leader du génome au moment de l'assemblage des particules virales.

Récemment, nous avons identifié, par des expériences de « ladder selection » (sélection d'ARN progressivement hydrolysés à leur extrémité 5' ou 3') et de mutagenèse dirigée, une interaction à longue distance entre deux régions de l'ARN génomique du VIH-1 distantes de plus de 300 nucléotides : l'une est localisée dans une région non traduite en aval du signal de polyadénylation (séquence 77GCUUGCC83), l'autre dans la séquence codant la protéine de la matrice M_{Ap}15 (séquence 460GGCAAGC466) (91). L'importance fonctionnelle potentielle de ce pseudo-noeud est étayée par sa conservation dans les différents isolats du VIH-1 et chez d'autres lentivirus. En collaboration avec A.M. Aubertin (UMR544-INSERM, Strasbourg), nous avons introduit plusieurs mutations dans un clone moléculaire infectieux du VIH-1 (pNL43) et testé leurs effets sur la réplication virale. Malheureusement, aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents virus mutants et sauvage, quelque soit le type cellulaire utilisé (lignées stables ou PBMC). Bien que ces résultats ne soient pas ceux attendus, l'existence d'un pseudo-noeud dans cette région n'est pas remise en cause car : (1) il est possible que les substitutions testées ne soient pas suffisantes pour observer un effet significatif ou que des facteurs en *trans* (protéines ou séquence ARN redondante) masquent l'effet des mutations ; (2) des résultats ont suggéré que l'inhibition du signal de polyadénylation en 5' pourrait être due à des séquences en aval dans la région leader (non encore définies) et que la structure tertiaire de l'ARN amènerait à proximité ces deux régions (3) ; (3) enfin, la même interaction intramoléculaire a été mise en évidence récemment dans les virions d'un virus murin (MoMuLV) (48), confirmant l'importance de cette région dans la structuration de l'ARN génomique.

2. Analyse conformationnelle de l'ARN génomique *ex vivo*

(collaboration avec Markus Dettenhofer et Xiao-Fang Yu, Baltimore, USA)

Depuis 1992, date de la première structure secondaire de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 (46), notre équipe s'est continuellement intéressée au repliement de cet ARN *in vitro* (6, 44, 53, 88, 108). De nombreux modèles de structures secondaires ont été proposés et le débat sur la conformation de la région 5'-terminale de l'ARN génomique du VIH-1 a toujours été très animée. Il y a quelques années, le groupe de Ben Berkhout (Amsterdam, ND) a proposé que la région 5' non traduite du VIH-1 (1, 2, 11, 12, 52) et du VIH-2 (29, 62) pourrait former des structures secondaires alternatives.

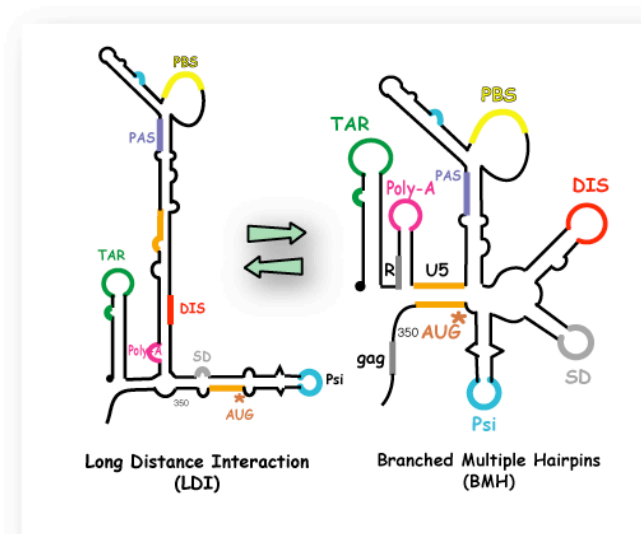


Figure 5 : Représentation schématique des deux conformères proposés par Ben Berkhout. LDI (Long Distance Interaction) et BMH (branched Multiple Hairpins).

En fait, cette région serait en équilibre dynamique entre deux conformations : la première, très stable serait formée par appariement entre le signal de polyadénylation et le DIS (*LDI*, *Long Distance Interaction*) ; la deuxième, métastable serait formée d'une succession de tiges-boucles (*BMH*,

Branched structure with Multiple Hairpins) et correspondrait à la conformation que nous avons mise en évidence en culture cellulaire, à l'exception des interactions à longue distance (U5/AUG) (**figure 5**). S'il existe, ce « switch » conformationnel pourrait réguler de façon temporelle différents éléments régulateurs présents dans la région 5' de l'ARN génomique. Ainsi, dans la conformation *LDI*, la séquence du DIS, masquée par un appariement à longue distance, empêcherait l'ARN de dimériser et d'être encapsidé. En revanche, la boucle du DIS est formée dans la conformation *BMH*. Ce changement de conformation (*LDI* vers *BMH*) pourrait être induit *in vivo* par la protéine de nucléocapside NCp7 (52). Dans cette optique, il est possible d'envisager un mécanisme en deux étapes : (1) au moment de la traduction, le ribosome détruirait des interactions à longue distance pour induire un changement conformationnel de la région 5' ; (2) Après traduction, le domaine NC du précurseur Pr55^{gag} interagirait préférentiellement avec son propre ARN messager (67, 93) pour induire des changements conformationnels importants (*BMH*) modulant la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN génomique. Ce modèle n'a pas été démontré pour le moment.

Avec Markus Dettenhofer (doctorant aux USA), nous avons adapté la technique de cartographie des ARN en solution et mis au point les conditions expérimentales pour déterminer la structure

secondaire de la région 5'-terminale de l'ARN génomique du VIH-1 dans les cellules infectées et les particules virales. Nous avons pu obtenir pour la première fois une cartographie de l'ARN du VIH-1 *ex vivo* de qualité similaire à celle obtenue *in vitro* sur des ARN synthétiques (**figure 4**) (89). Nous avons ainsi montré que la structure secondaire de la région 5' non traduite de l'ARN du VIH-1 dans les cellules infectées et les particules virales est de manière générale très similaire à celle obtenue *in vitro*. Ces résultats (hyper-réactivité du A263, accessibilité du PBS dans les cellules et protection dans les virions due à l'hybridation avec l'ARNt₃^{lys}) suggèrent que les différents domaines fonctionnels proposés sont présents dans un contexte cellulaire. Cependant, en comparant les profils de réactivité chimique des ARN provenant des cellules infectées et des particules virales, nous avons montré qu'il existe des différences significatives pour certains domaines.

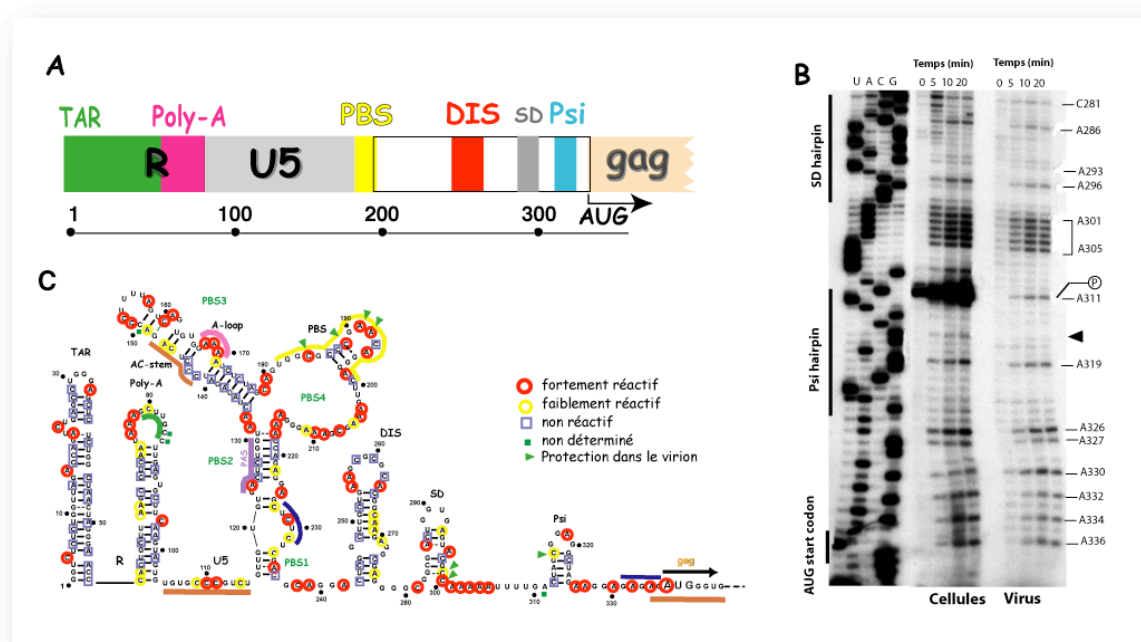


Figure 4 : Représentation schématique de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 et de sa structure secondaire. (A) Les différentes régions fonctionnelles sont indiquées. (B) Exemple de profils de réactivité vis-à-vis du DMS de la région 280-340. (C) Modèle de structure secondaire déduit des expériences de cartographie *in situ*.

En particulier, l'hélice du SD est protégée vis-à-vis du DMS dans les particules virales tout comme certains nucléotides du domaine d'encapsidation (hélice Psi) ce qui suggère qu'un changement conformationnel a eu lieu au niveau de ces deux hélices au moment de l'encapsidation (89). Ce changement pourrait être induit soit par l'interaction avec d'autres séquences ARN, soit par la fixation de protéines cellulaires ou virales comme notamment la protéine de nucléocapside (NCp7) ou son précurseur Gag. Enfin, cette étude nous aura permis de définir que la représentation sous forme de tige-boucles de l'ARN génomique est l'espèce conformationnelle la plus représentée au sein de la cellule (**figure 4**) (89).

3. Variabilité structurale du complexe d'initiation de la réverse transcription (avec V. Goldschmidt, doctorante)

Chez tous les rétrovirus, la rétrotranscription est initiée à partir d'un ARNt cellulaire ($\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ chez le VIH-1) et nécessite l'hybridation des 18 nucléotides situés en 3' de l'ARNt à la séquence complémentaire PBS de l'ARN viral (ARNv) (72). En plus de cette interaction, des interactions spécifiques ont été décrites chez plusieurs rétrovirus et rétrotransposons à LTR. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus suivant les isolats du VIH-1 étudiés. En effet, alors que certains travaux montrent l'existence d'une interaction entre la séquence riche en A de l'ARN viral de l'isolat HxB2 (sous-type B) et l'anticodon de l' $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$, comme ce qui a été proposé par notre laboratoire pour l'isolat MAL (sous-type A) (53, 54), d'autres proposent des interactions alternatives entre l'amorce et la matrice (7, 55). L'isolat MAL diffère des isolats de sous-type B (NL4.3, Lai, HxB2) par une insertion de 23 nts en aval du PBS et des mutations ponctuelles, ce qui a pour conséquence une variabilité locale de la structure secondaire au niveau du domaine PBS.

Afin de comprendre plus finement les remaniements structuraux au niveau du complexe d'initiation de la réverse transcription entre les différents isolats, nous avons mené avec Valérie Goldschmidt une étude de cartographie *in situ* sur l'ARNv de l'isolat NL4.3 et de l'isolat chimérique NL4.3/MAL, dont le domaine PBS de NL4.3 a été substitué par celui de l'isolat MAL (43), et nous avons comparé les profils de réactivité au DMS dans les cellules (ARNt non hybridé) et dans les virions (ARNt hybridé). Les données de cartographie des ARNv MAL et NL4.3 dans les cellules infectées et les particules virales confirment les modèles de structures secondaires préalablement établis *in vitro*. Non seulement la conformation des ARNv nus (sans ARNt) mais également celle des ARNv hybridés à l' $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ diffèrent radicalement. Nous avons ainsi pu confirmer que de nombreux remaniements conformationnels intra- et intermoléculaires s'opèrent au niveau du complexe d'initiation de la rétrotranscription de l'isolat MAL (**figure 6**). À l'inverse, celui de l'isolat NL4.3 subit peu de réarrangements structuraux. Seul le PBS est protégé et la région riche en A complémentaire à l'anticodon de l' $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ reste accessible, suggérant que cette interaction n'est pas essentielle à l'initiation de la rétrotranscription dans l'isolat NL4.3 alors qu'elle l'est pour l'isolat MAL (**figure 6**). En effet, des études cinétiques de synthèse d'ADN « strong-stop » (-) ont montré que l'initiation de la rétrotranscription de l'ARN MAL est très affectée lorsque l'amorce naturelle est remplacée par un $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ transcrit *in vitro* (pas de modification post-transcriptionnelle), ou par un oligonucléotide complémentaire au PBS ($\text{ORN}_3^{\text{Lys}}$). Ces résultats confirment le rôle des bases modifiées de l' $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ et l'importance des interactions intermoléculaires du complexe d'initiation de l'isolat MAL. Cependant, la substitution de l' $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ naturel par un $\text{ARNt}_3^{\text{Lys}}$ transcrit *in vitro* ou par un $\text{ORN}_3^{\text{Lys}}$ affecte peu l'initiation de la rétrotranscription de l'ARN NL4.3. Ainsi, les interactions intermoléculaires ne semblent pas requises pour l'initiation de la rétrotranscription de l'ARNv de l'isolat NL4.3.

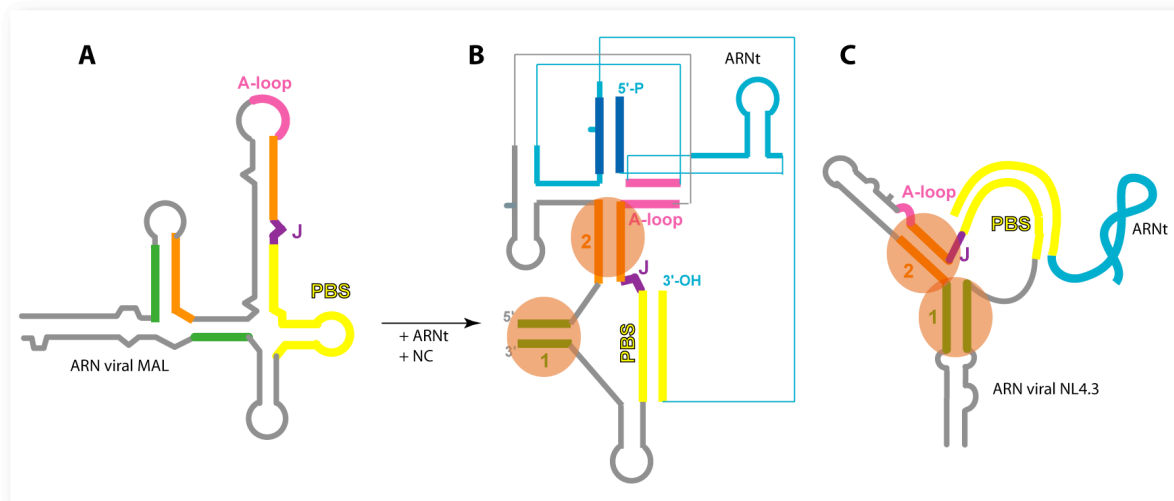


Figure 6 : Modèles de structure secondaire de l'ARN ν MAL, de son complexe avec l'ARN t_3^{Lys} et de l'ARN ν NL4.3. (A) Structure secondaire de la région 5'-terminale de l'ARN ν MAL. Le PBS et la boucle riche en A sont indiqués. (B) Structure secondaire du complexe ARN ν /ARN t_3^{Lys} . L'ARN t_3^{Lys} est coloré en bleu excepté les régions interagissant avec l'ARN ν (anticodon, région 3'-terminale). Les hélices 1 et 2 et la jonction (J) entre le PBS et l'hélice 2 sont indiquées respectivement en rose et violet. (C) Structure secondaire de la région PBS de l'ARN ν NL4.3 en interaction avec l'ARN t_3^{Lys} . Les hélices 1 et 2 sont entourées en rose.

C. Rôle de la protéine de Matrice du VIH-1 dans le ciblage membranaire du précurseur protéique Pr55^{gag}

Lors de mon stage post-doctoral effectué dans le laboratoire du Dr. H. Göttlinger (Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA), je me suis intéressé à l'assemblage des particules virales du VIH-1 et plus particulièrement au rôle du domaine de fixation aux membranes (domaine M) de la protéine de la Matrice (MAp15) dans cette étape. Les protéines de structure interne du VIH-1 sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur polyprotéique de 55 KDa, Pr55^{gag}, qui est rapidement transporté au niveau de la membrane plasmique (dans la plupart des cellules) où l'assemblage du virus s'effectue, en partie, par l'auto-assemblage de Pr55^{gag} (domaines CA et NC). Pendant ou après le relargage des particules virales, Pr55^{gag} est clivé par la protéase virale pour donner la Matrice (MAp17), la Capside (CAp24), la Nucléocapside (NCp7) et la p6, qui constituent les protéines structurales internes du virion mature. Le ciblage de Pr55^{gag} au niveau du site d'assemblage du virion est indépendant des glycoprotéines de l'enveloppe (SUgp120 et TMgp41) qui atteignent la membrane plasmique par la voie sécrétoire classique. De ce fait, les protéines Gag sont suffisantes pour former des particules pseudo-virales (VLP).

La protéine de Matrice joue un rôle crucial dans plusieurs étapes du cycle répliatif du VIH-1 et notamment dans le ciblage des précurseurs protéiques au niveau du lieu d'assemblage. Le domaine M est localisé dans la partie N-terminale de la protéine et est composé d'un cluster d'acides aminés basiques et d'un acide myristique lié de façon covalente à l'extrémité N-terminale. Ces deux motifs sont nécessaires pour une fixation optimale aux membranes de la cellule.

Au moment où nous avons abordé ce travail, la structure cristallographique de la Matrice non myristillée était connue et avait révélé que les résidus basiques du domaine M étaient orientés à la surface de la protéine, favorisant ainsi leur interaction avec les groupements chargés négativement des

phospholipides des membranes (49). De plus, un modèle de régulation basé sur le "switch" conformationnel de l'acide myristique avait été proposé (**figure 7**) (110, 119). Ce modèle suggèrait que l'acide myristique serait enfoui à l'intérieur d'une poche hydrophobe de la Matrice jusqu'à ce qu'un changement conformationnel ait lieu et expose le groupe myristate. Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons montré par des expériences de mutagenèse dirigée que la substitution d'un seul acide aminé dans l'extrémité N-terminale de la Matrice (L8A) abolit complètement la formation de particules virales sans pour autant compromettre la myristylation. Cependant, l'association de cette protéine mutante à la membrane plasmique est fortement altérée (taux équivalents à une protéine non myristylée) suggérant que le groupement myristique ne doit plus être disponible pour un ancrage à la membrane plasmique. Les effets de la mutation L8A ont pu être compensés par l'incorporation d'une seconde mutation (W16A) dans le cœur hydrophobe de la protéine, augmentant ainsi l'association à la membrane plasmique et le taux de particules virales produites (90). Ainsi, nos résultats suggèrent que le cœur globulaire très compact de la Matrice doit séquestrer le groupement myristyle pour empêcher des associations aberrantes avec les membranes intracellulaires, alors que la partie N-terminale de la protéine doit contrôler de façon spécifique l'exposition de l'acide myristique pour son insertion dans la membrane plasmique (90).

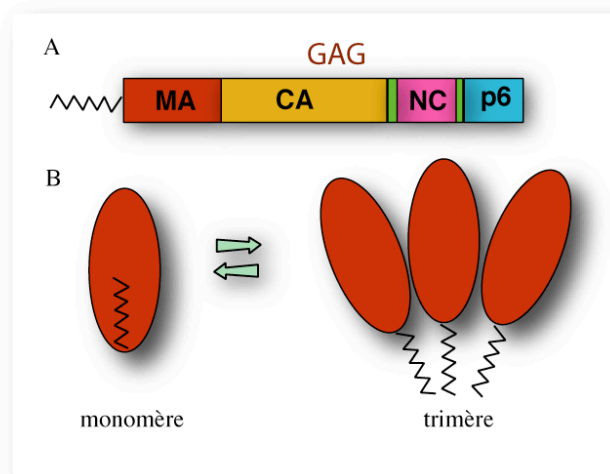


Figure 7 : Structure de la protéine Gag du VIH-1. A. Représentation schématique du précurseur Pr55gag et de ses sous-domaines. B. Modèle du « switch » conformationnel de l'acide myristique de la protéine de Matrice proposé par Tang *et al.* (114). Schéma adapté de (94).

Depuis, des avancées spectaculaires ont eu lieu. Récemment, la structure de la Matrice accrochée à son myristate a été résolue par RMN (94, 114). Cette étude a montré l'existence de deux états de la protéine (**figure 7**) : une forme dans laquelle l'acide myristique est exposé, et une autre où il est séquestré dans la structure. Dans cette dernière, l'acide myristique est inséré dans une cavité pré-existante de la protéine et interagit avec des acides aminés de la partie N-terminale, si bien que le changement conformationnel pour passer d'une forme à l'autre ne serait pas dramatique. Ceci conforte notre étude et explique le fait que la substitution d'un seul acide aminé dans le domaine M puisse changer l'état de la protéine (ouvert ou fermé).



Mon projet de recherche s'articule autour de deux thèmes principaux : le premier est dans la continuité de mes activités antérieures sur le rôle de la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 dans la réplication virale et sur le repliement tridimensionnel de cet ARN au sein de la cellule infectée et de la particule virale. Le deuxième concerne le rôle de la protéine virale Vif et de la protéine cellulaire hDBR1 sur la réplication virale et leurs relations avec l'ARN génomique du VIH-1. Cet axe de recherche a débuté avec l'arrivée de **Simon Henriet** en 2002 et s'est trouvé renforcé avec deux chercheurs post-doctorants, successivement **Boulbaba Selmi** (année 2004) et **Serena Bernacchi** (depuis 2005), et dernièrement avec **Gaëlle Mercenne** (doctorante, depuis septembre 2005).

A. Mécanismes de dimérisation et d'encapsidation de l'ARN génomique du VIH-1

Il est maintenant bien établi que la séquence auto-complémentaire du DIS est cruciale pour la réplication virale (pour revue voir (85)). Il est cependant nécessaire de rappeler que d'une part, des mutations partielles ou complètes du DIS n'éliminent jamais totalement la présence d'ARN dimérique dans les particules virales (50, 66, 85, 104, 105), et d'autre part, que des séquences en dehors de la tige-boucle du DIS sont aussi importantes pour la dimérisation de l'ARN génomique (31, 96, 97, 101). Le fait qu'il y ait toujours une portion d'ARN dimérique présent dans ces virions mutants suggère que la séquence auto-complémentaire du DIS est le point de départ pour la dimérisation de l'ARN génomique, mais soulève également le fait que des régions en dehors du DIS pourraient être impliquées dans ce processus.

Le lien entre dimérisation et encapsidation de l'ARN génomique a toujours été une question très discutée du fait du chevauchement de ces deux domaines au niveau de la région 5' terminale du génome du VIH-1 (**figure 8**). Qui de la dimérisation ou de l'encapsidation a lieu en premier dans la cellule ? L'ARN encapsidé est-il dimérique ou monomérique ? Récemment, ces questions importantes ont fait l'objet d'une revue (98). A l'heure actuelle, nous pensons que la dimérisation est un pré-requis pour l'encapsidation de l'ARN génomique, ou tout du moins pour la production de particules virales infectieuses. En effet, l'ARN génomique peut être encapsidé sous forme de monomère ou de dimère instable (18, 99, 100, 103, 104) mais ces mutants qui présentent des défauts de dimérisation ne se répliquent généralement pas aussi bien qu'un virus sauvage. De plus, l'idée de pré-requis de la dimérisation pour l'encapsidation de l'ARN génomique (98) soulève inévitablement la question du lieu de formation des dimères d'ARN génomique. Sont-ils formés directement après transcription dans le noyau ? Des facteurs protéiques sont-ils nécessaires à sa formation ? Ce sont ces questions auxquelles nous essayerons d'apporter des réponses.

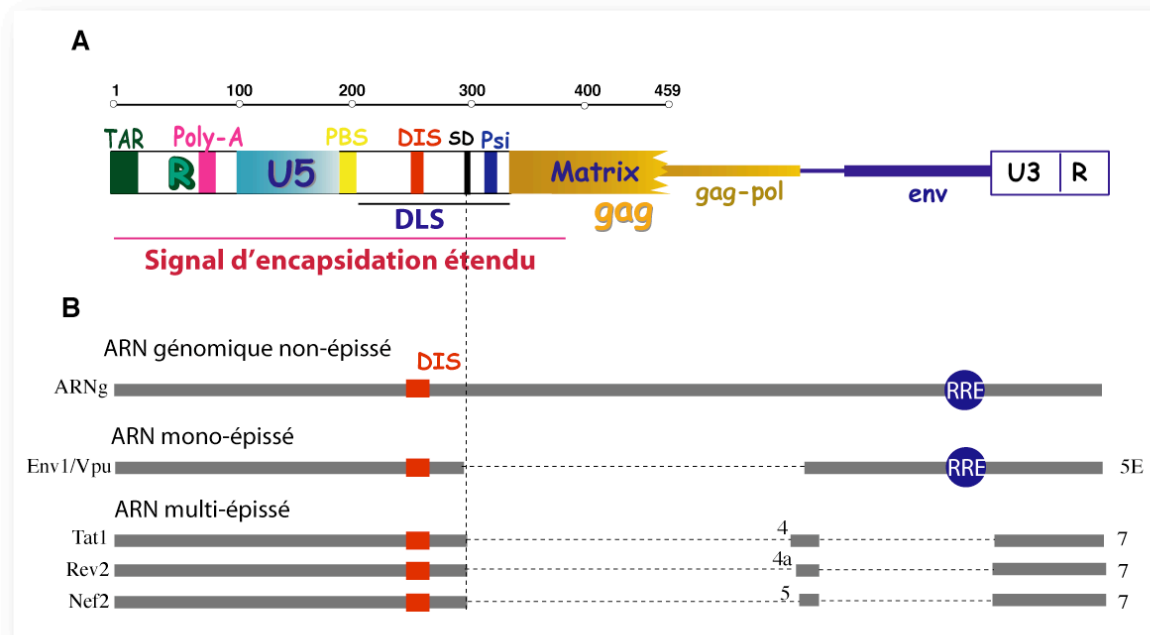


Figure 8 : Localisation des sites d'encapsulation (Psi) et de dimérisation (DIS/DLS) de l'ARN génomique du VIH-1. (A) Représentation schématique de la région 5'-UTR du génome du VIH-1. Les principaux motifs fonctionnels sont représentés. **(B)** ARN génomique et exemples d'ARN mono et multi-épissés.

1. Quel est le lieu de formation des dimères d'ARN génomique ?

(avec Delphine Richer, AI)

Afin de répondre à cette question, nous envisageons de mettre à profit l'expertise acquise au laboratoire sur l'étude *in vitro* de la dimérisation des ARN et sur l'analyse de la structure *ex vivo* de la région 5'-UTR de l'ARN génomique du VIH-1. Dans un premier temps, nous étudierons la dimérisation *in vitro* d'ARN du VIH-1 de tailles différentes (de 300 à 9000 nucléotides). La dimérisation des grands ARN n'est pas une chose triviale, et aucune étude n'a pour le moment montré qu'il était possible de dimériser *in vitro* des ARN correspondant à la taille complète des génomes rétroviraux. Une explication possible est que le domaine de dimérisation n'est plus accessible dans ces grands ARN ou qu'il nécessite un remodelage conformationnel induit par la NC pour dimériser. L'hypothèse idéale serait alors que l'ARN puisse dimériser avant qu'il ne soit complètement transcrit, suggérant que la dimérisation démarre dans le noyau. Des analyses préliminaires effectuées sur les isolats MAL (sous-type A) et NL4.3 (sous-type B) avec des ARN de 300 à 4000 nucléotides de long vont tout à fait dans le sens que la dimérisation s'effectue de façon co-transcriptionnelle. En revanche, et spécifiquement pour les grands ARN, nous avons observé que le taux de dimère diminuait fortement lorsque ces ARN étaient soumis au test de dimérisation *in vitro* après une étape de dénaturation thermique. Ces résultats confirment que la probabilité de collision productive entre le DIS de deux molécules d'ARN diminue avec la taille de l'ARN. Il est aussi possible que ces ARN adoptent des conformations alternatives qui les rendent incompétents pour la dimérisation. Nous envisageons de confirmer cette hypothèse en étudiant la formation d'hétérodimère (dimère formé entre des ARN de taille différentes) et en déterminant la stabilité thermique des différents ARN testés. Une étude récente réalisée sur MoMuLV va tout à fait dans le sens d'une initiation de la dimérisation pendant le

processus de transcription (38). De plus, la dimérisation co-transcriptionnelle serait un argument supplémentaire à l'homoploïdie des génomes rétroviraux (37, 58).

*Dans un deuxième temps, nous réaliserons une étude de fractionnement cellulaire (cytoplasme/noyau) sur des cellules infectées. Les ARN seront isolés et les deux compartiments seront comparés (Northern) quant à la nature dimérique ou monomérique de l'ARN rétroviral. Parallèlement, les compartiments nucléaires et cytoplasmiques seront isolés directement après modification des ARN au DMS (voir *Activité Scientifique*, §B.2.). Dans ce cas, nous analyserons l'accessibilité de la boucle du DIS et en déduirons la forme de l'ARN présent dans chacun des compartiments. Ces expériences seront répétées avec des mutants du motif de transport nucléo-cytoplasmique (Rev/RRE) ou après traitement des cellules avec des agents bloquant le transport de l'ARN génomique du VIH-1 (leptomycine). Par ces méthodologies complémentaires, nous devrions être en mesure de retenir les ARN génomiques du VIH-1 dans le noyau et ainsi enrichir la quantité d'ARN à analyser après extraction.*

2. Transport et sélection des ARN génomiques

(avec Lucile Sinck, étudiante M2 ; collaboration avec Marylène Mougel, UMR5121, Montpellier)

Le transport des ARN rétroviraux est une étape importante de la réplication virale. Les différents rétrovirus ont adapté leur système suivant leur complexité. Ainsi, le VIH-1 code pour un adaptateur viral, Rev, qui va entrer en contact avec la machinerie de transport, Crm1. Crm1 est un transporteur de la famille des karyophérines qui induit non seulement l'export nucléaire de protéines possédant un motif NES (Nuclear Export Signal) riche en leucine, mais également de diverses classes d'ARN comme l'ARNr 5S, des snARN, et de certains ARNm fixant des protéines contenant un NES comme la protéine Rev (22). La protéine Rev quant à elle interagit avec un signal en *cis* sur l'ARN viral, le RRE (Rev Responsive Element) présent uniquement sur les ARN génomiques et mono-épissés (**figure 8**). En utilisant une technique de fluorescence, il a été montré que dans des cellules vivantes (cellules d'encapsidation ou chroniquement infectées), les ARN du virus de la leucémie murine (MLV) sont transportés par des vésicules endosomiques (5) (**figure 9**). Ce transport est dépendant des protéines virales Gag et Env, elles-mêmes transportées à la surface des vésicules d'endosomes. Gag est ainsi principalement présente dans les endosomes tardifs mais se redistribue à la surface des endosomes précoces et de recyclage en présence d'enveloppe. Ces résultats suggèrent que Env et Gag servent de protéines adaptatrices pour arrimer l'ARN à un système de transport vésiculaire endosomique et le diriger ainsi vers des sites spécifiques de la membrane plasmique (5, 92).

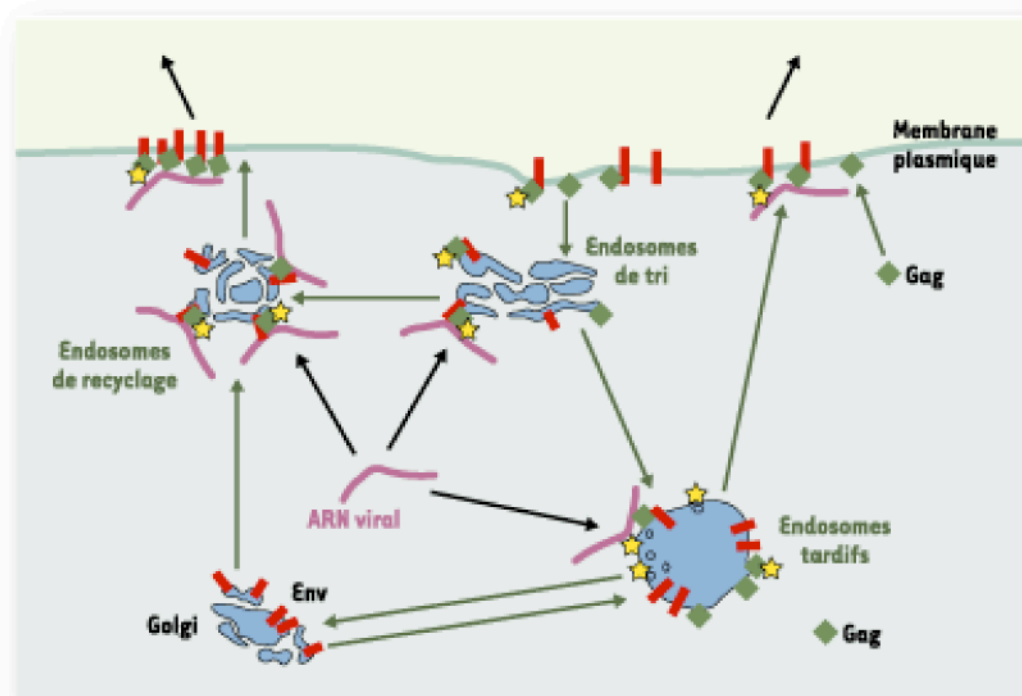


Figure 9 : Transport vésiculaire des ARN rétroviraux dans le cytoplasme. D'après (5).

Récemment, deux équipes (dont celle de M. Mougel) ont montré que le signal d'encapsidation de l'ARN génomique de MoMuLV (4 tiges boucle appelées A, B, C et D) serait impliqué dans le transport nucléo-cytoplasmique des ARN non épissés et dans le transport endosomal (4, 109). De manière intéressante, ce motif se superpose, comme chez le VIH-1, au domaine nécessaire à la dimérisation de l'ARN génomique (27).

En collaboration avec le groupe de Marylène Mougel, nous envisageons de vérifier l'importance du DIS dans le transport nucléo-cytoplasmique du génome du VIH-1. Plusieurs mutants de délétion au niveau des signaux de dimérisation (DIS) et d'encapsidation (Ψ) ont déjà été réalisés. L'effet de ces mutations sera suivi par hybridation in situ (FISH).

De façon complémentaire, nous voulons introduire un site aptamère fixant la streptavidine dans la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 (111). Ainsi, en utilisant des conjugués or-streptavidine, nous devrions être capable de (1) distinguer les molécules d'ARN monomériques et dimériques sur des cellules fixées et (2) de suivre le trafic de l'ARN dans la cellule.

Enfin, nous chercherons à comprendre pourquoi seules les molécules d'ARN génomiques sont encapsidées dans les particules virales alors que les ARN épissés contiennent eux aussi une grande partie des signaux requis pour cette encapsidation (TAR, polyA, DIS – voir figure 8). Il a en effet été montré qu'une quantité non négligeable d'ARN viral épissé peut être encapsidée lorsque l'encapsidation de l'ARN génomique est réduite (par des mutations du motif Ψ par exemple) (96). L'encapsidation des ARN viraux épissés et/ou leur exclusion des particules virales suggère que certaines séquences d'ARN viral ou leur conformation est importante pour l'assemblage efficace et/ou l'intégrité structurale de la particule virale en elle-même (63). Afin de mieux comprendre cette étape, nous proposons d'étudier l'effet de l'épissage sur la sélection de l'ARN génomique du VIH-1. Altère-t-

*il la présentation de motifs requis pour la dimérisation et donc l'encapsidation de l'ARN ? Nous tenterons de répondre à cette question en comparant la dimérisation *in vitro* et la structure secondaire d'ARNm viraux épissés à celle de l'ARN génomique.*

B. Fixation de dérivés d'aminoglycosides au DIS et inhibition de la réplication virale

(collaboration avec Eric Ennifar & Philippe Dumas, UPR9002 ; Patrick Pale, UMR7123, ULP, Strasbourg ; Jean-Luc Décout, UMR5063, Grenoble ; Anne-Marie Aubertin, UMR544, Strasbourg)

Suite à la mise en évidence par l'équipe de P. Dumas d'une forte analogie structurale entre le DIS et le site A du ribosome bactérien, nous avons montré comme ce dernier, que le complexe boucle-boucle du DIS est capable de fixer de manière spécifique certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides (33). En particulier, cette fixation est restreinte aux sous-types A&G et F&H du VIH-1 et seules la néomycine et la paromomycine sont capables de se fixer et de stabiliser le complexe boucle-boucle. L'ensemble de ces résultats démontre que le DIS constitue une cible de choix pour des agents antiviraux dérivés des aminoglycosides existants.

Depuis, cette étude *in vitro* a été élargie à d'autres aminoglycosides. Nous avons pu établir que les aminoglycosides de type DOS (DésOxyStreptamine)_{4,5} disubstitués (neomycine, paromomycine et lividomycine) fixent de manière spécifique les complexes boucle-boucle du DIS et stabilisent les dimères d'ARN 1-615 *in vitro*. De manière intéressante, seuls les composés de cette série possédant 4 (néomycine et paromomycine) ou 5 cycles (lividomycine) sont de bons fixateurs et stabilisateurs. En revanche, ceux ne possédant que 3 cycles (ribostamycine, butyrosine), les DOS _{4,6} disubstitués (kanamycine, tobramycine) et le DOS 6 monosubstitué (apramycine) ne se fixent pas et ne stabilisent que faiblement les dimères d'ARN *in vitro*.

Bien qu'elle n'inhibe pas la dimérisation de l'ARN génomique *in vitro*, la fixation des aminoglycosides au DIS pourrait interférer avec la réplication virale en altérant la reconnaissance de celui-ci par la machinerie d'encapsidation, ou en bloquant les étapes tardives de la rétrotranscription au cours de laquelle le dimère d'ARN doit se dissocier. De plus, la conversion éventuelle du complexe boucle-boucle en duplex étendu lors de la maturation des particules virales pourrait aussi être inhibée par les aminoglycosides. Dans le but d'étudier l'effet des antibiotiques sur la réplication virale, nous avons tout d'abord cherché à vérifier que les aminoglycosides considérés comme bons fixateurs (néomycine, paromomycine et lividomycine) se fixaient au DIS de l'ARN génomique dans les cellules infectées et les particules virales. Nous avons dans un premier temps introduit des mutations ponctuelles dans le clone moléculaire infectieux pNL4.3 (sous-type B) pour convertir le DIS en sous-types A&G, C, et F&H. En effet, les clones moléculaires infectieux du VIH-1 communément utilisés appartiennent au sous-type B, pour lequel nous avons montré que le DIS ne fixe pas les aminoglycosides. Après production d'un stock de virus possédant les DIS désirés, des cellules lymphoïdes CD4⁺ ont été infectées en présence ou en absence d'aminoglycosides. Quatre jours après infection, les cellules infectées et les particules virales ont été récoltées et modifiées au DMS (voir Activité Scientifique, §B.2). Nous avons ainsi montré que le nucléotide A280 est protégé vis-à-vis de

la modification au DMS dans les sous-types A et F en présence des antibiotiques, et ceci aussi bien dans les cellules infectées que dans les virions (**figure 10**). A l'inverse, le profil de réactivité du DIS du sous-type B est identique à celui qui est observé sans antibiotique, confirmant que les aminoglycosides ne se fixent pas au DIS de sous-type B.

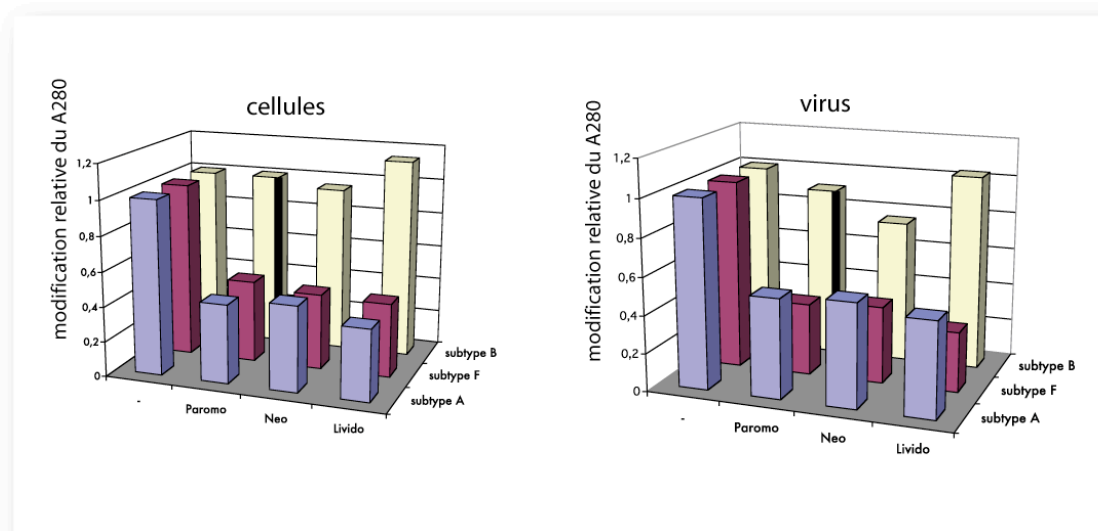


Figure 10 : Protection du DIS vis-à-vis du DMS induite par la fixation des aminoglycosides dans les cellules CEMx174 et dans les virions. Les gels ont été quantifiés et la modification du A280, normalisée par rapport au A272, a été comparée à celle obtenue sans aminoglycoside.

En parallèle, E. Ennifar (équipe de P. Dumas) a pu résoudre les structures cristallographiques du complexe boucle-boucle du DIS de sous-type F en présence de divers aminoglycosides (néamine, néomycine, ribostamycine et lividomycine) (**figure 11**). Ces structures démontrent que les dérivés 4,5 disubstitués forment des complexes très spécifiques avec le DIS. En effet, ces aminoglycosides forment plus de contacts directs avec le DIS qu'avec le site A du ribosome. De plus, certains cycles des aminoglycosides établissent des contacts avec les deux brins d'ARN monomère, expliquant ainsi en partie l'effet stabilisateur de ces aminoglycosides sur la dissociation des complexe boucle-boucle du DIS. Cette étude vient d'être soumise pour publication (32).

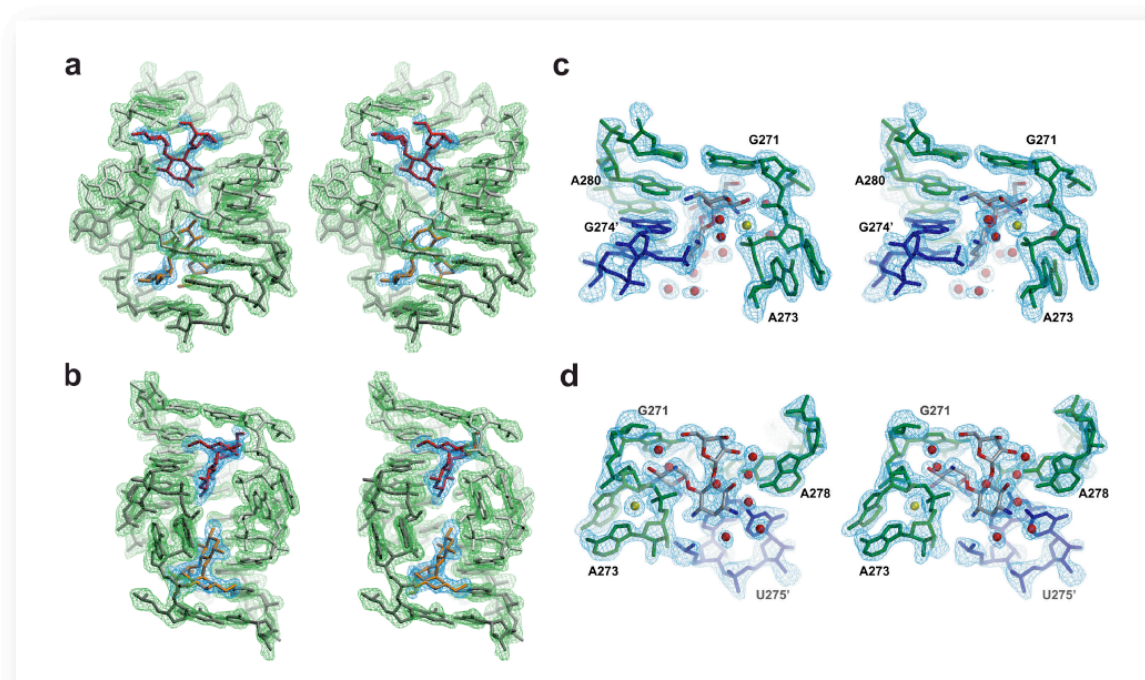


Figure 11 : Structure du complexe ribostamycine/DIS. a & b : Vue stéréoscopique du complexe ribostamycine/DIS tourné de 90°. Les deux molécules d'ARN sont représentées en gris clair et foncé et les 2 aminoglycosides en rouge et orange. La densité électronique est représentée en vert et bleu respectivement autour de l'ARN et de l'antibiotique. c & d : Détails du complexe ribostamycine/DIS. Les 2 brins d'ARN sont représentés en vert et bleu. Les cations K^+ et les molécules d'eau sont représentés respectivement par des sphères jaunes et rouges.

Bien que les aminoglycosides testés jusqu'à maintenant n'induisent pas une inhibition significative de la réplication virale du VIH-1 (ou alors à des concentrations élevées, $>\mu M$), les structures cristallographiques obtenues en présence des antibiotiques nous fournissent les connaissances requises pour initier une étude rationnelle de « drug design ». C'est pour cette raison que nous collaborons depuis quelques années avec des chimistes organiciens (P. PALE & J.-L. DECOUT) en vue de synthétiser de nouvelles molécules dérivées d'aminoglycosides capables d'interférer efficacement avec la fonction du DIS, sans préjuger de la nature de l'interférence. Une fois ces molécules obtenues, nous analyserons leurs effets in vitro (empreinte au plomb et au DMS, stabilité des dimères d'ARN) et les molécules ayant passé ce premier crible seront testées sur la réplication virale du VIH-1 (effet inhibiteur ou non) et pour leur cytotoxicité. Des étapes clés de la réplication virale comme l'encapsidation de l'ARN génomique, la stabilité du dimère d'ARN au sein de la particule virale et la rétrotranscription seront analysées.

C. Rôle des protéines Vif et hDBR1 dans la réplication virale du VIH-1

1. Fixation de la protéine Vif sur l'ARN génomique du VIH-1

(avec Simon Henriet, doctorant, Serena Bernacchi, chercheur post-doctorante, Delphine Richer, AI - collaboration avec Etienne Decroly & Robert Vigne, INSERM U372, Marseille)

Le génome des lentivirus, dont le VIH-1, code pour plusieurs protéines dites « auxiliaires » qui ne sont habituellement pas retrouvées chez les autres rétrovirus. L'étude de la réplication des lentivirus chez leurs hôtes naturels a montré que ces protéines initialement considérées comme accessoires sont essentielles à la propagation de l'infection et au développement de la pathogenèse *in vivo*. Parmi elles, Vif (Viral Infectivity Factor), une petite protéine très basique de 23 kDa, est essentielle à la formation de particules virales infectieuses dans les cellules dites « restrictives » (lymphocytes T CD4⁺, monocytes, macrophages), alors que des virus Δ Vif se répliquent efficacement dans des lignées cellulaires T dites « permissives » (Jurkat, CEMSS, ...). Récemment, plusieurs groupes ont montré que les cellules restrictives expriment de façon spécifique les protéines APOBEC-3G et APOBEC-3F, deux cytidine déaminases dont l'action hypermutatrice lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN proviral est létale pour le virus (102, 118). En réponse à ce mécanisme de défense, sans doute à l'origine dévolu aux rétrovirus endogènes, les rétrovirus ont co-évolué en exprimant la protéine Vif. En interagissant avec APOBEC-3F/3G, Vif induit leur dégradation par la voie du protéasome et leur exclusion des particules virales et permet la production de particules virales qui peuvent exprimer pleinement leur potentiel infectieux. Bien que les mécanismes moléculaires de l'exclusion d'APOBEC-3G par Vif soient peu connus à l'heure actuelle, le point commun reliant ces deux protéines est le fait qu'elles fixent l'ARN génomique du VIH-1 et qu'elles co-localisent avec le précurseur Pr55^{Gag}. Dans la mesure où Pr55^{Gag} et l'ARN génomique sont les composants majeurs du nucléoïde, Vif pourrait optimiser la morphogenèse des particules virales en interagissant avec ces composés (51, 117). En effet, le core des virus Δ Vif est instable, et ceci pourrait expliquer le défaut de démarrage de la rétro-transcription observé chez ces virus (30, 81).

Au moment où nous avons initié ce projet au laboratoire avec Simon Henriet (doctorant), il avait été montré que Vif interagissait non seulement avec le précurseur protéique Gag (14, 106) mais aussi avec l'ARN génomique (28, 57, 117). Dès lors, il nous est apparu important de définir le(s) site(s) minimum d'interaction de la protéine Vif sur l'ARN génomique du VIH-1, ainsi que les propriétés de cette fixation (motif ARN, séquences consensus ...). Plusieurs fragments d'ARN synthétiques correspondant à diverses régions du génome du VIH-1 ont été synthétisés et leur affinité pour la protéine Vif a été testée par retard de migration électrophorétique et rétention sur filtre de cellulose (**figure 12**). Nous avons montré que Vif fixe de manière coopérative les ARN rétroviraux localisés dans la région 5' du génome (région 1-1500) avec des constantes de dissociation (K_d) comprises entre 50 et 100 nM. La technique de « *ladder selection* », associée à la mutagenèse dirigée et aux empreintes à la nucléase T1 nous ont permis de montrer que plusieurs domaines dans la région 5' terminale fixent préférentiellement Vif (**figure 12**). En particulier, la tige-boucle TAR (région 1-57) est un point de

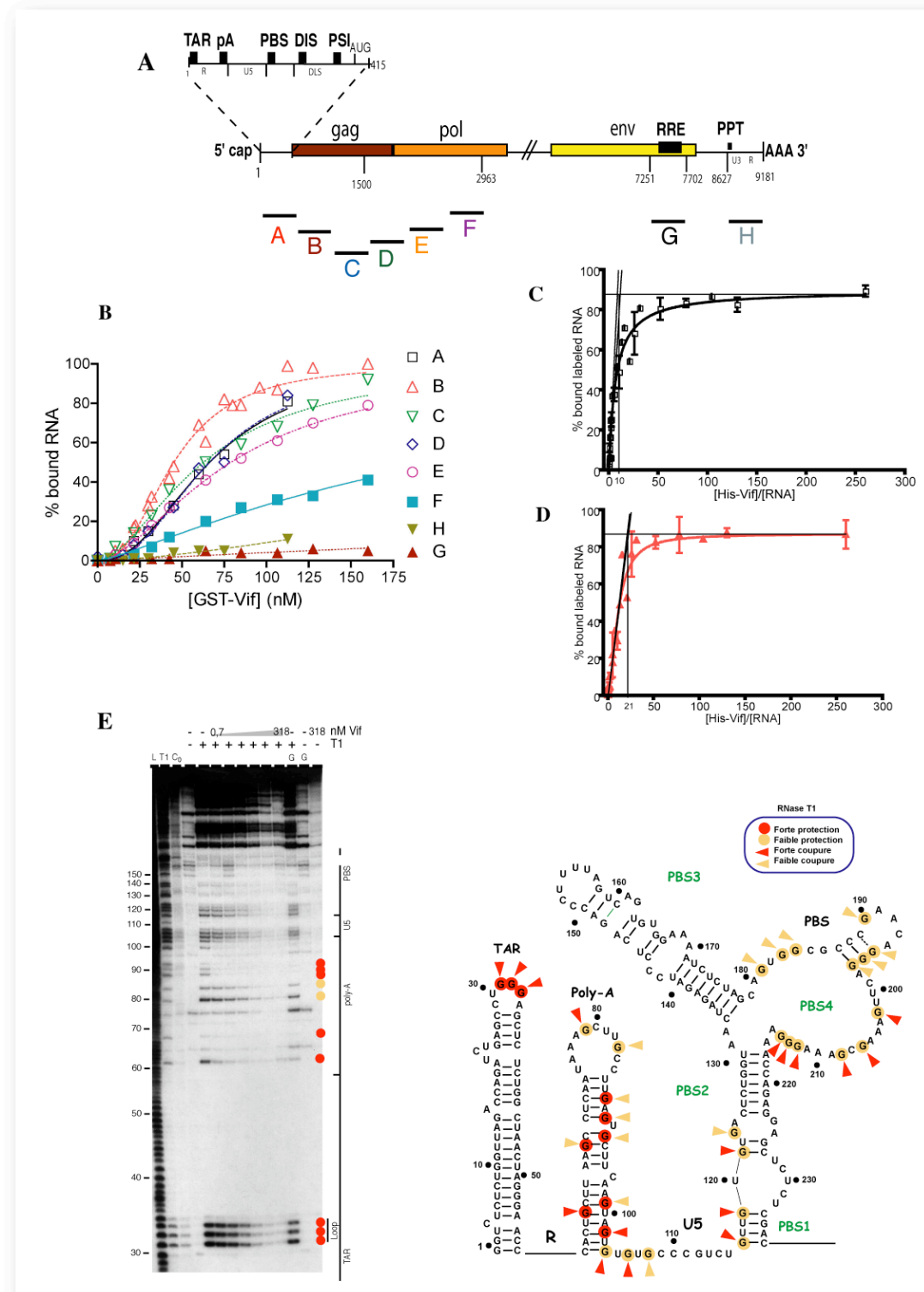


Figure 12 : Interaction de Vif avec l'ARN génomique du VIH-1. (A) fragments d'ARN testés et leur position dans génome. (B) Courbes d'affinité de la GST-Vif pour les différents fragments d'ARN. (C) et (D) Stoechiométrie de l'interaction entre His-Vif et l'ARN A (C) et B (D). (E) Empreintes enzymatique à la nucléase T1 sur l'ARN A du VIH-1. L'ARN radioactif est incubé en présence de quantité croissante de GST-Vif et les empreintes sont analysées sur gel dénaturant. (L) Ladder obtenu après hydrolyse alcaline ; (T1) traitement à la RNase T1 sur l'ARN dénaturé et renaturé (C₀) ; (G) incubation avec la GST seule (318 nM). A droite est représenté le modèle de structure secondaire de la région R-U5-PBS de l'ARN génomique du VIH-1 sur lequel sont représentées les positions de l'ARN protégées à faible concentration (cercle rouge) ou à forte concentration (cercle jaune) de GST-Vif.

nucléation nécessaire à la propagation de la fixation de Vif à l'ARN (de 5' vers 3') mais semble insuffisante pour stabiliser ces interactions. Deux autres séquences de fixation plus courtes ont été localisées entre les nucléotides 500 et 1000. Nos résultats suggèrent que Vif pourrait assister d'autres protéines virales ou cellulaires dans le repliement de l'ARN génomique de manière à faciliter son encapsidation et/ou sa transcription inverse, et qu'elle pourrait également protéger l'ARN du VIH-1 de l'action antivirale des protéines APOBEC-3G/3F. Ces résultats viennent d'être publiés (47).

En complément des méthodes biochimiques, nous utiliserons la spectroscopie de fluorescence pour caractériser la fixation de Vif à l'ARN génomique. Vif présente en effet de nombreux résidus tryptophanes, qui constituent des sondes de fluorescence intrinsèques à la protéine. La fluorescence permet de discriminer les contributions électrostatiques et non électrostatiques de la fixation de Vif à l'ARN, de déterminer le nombre de protéines fixées et leur affinité (K_d), et d'évaluer quantitativement la coopérativité. Les premiers résultats indiquent que les ARN ayant une faible affinité pour Vif dans le test de rétention sur filtre de nitrocellulose fixent cette protéine de manière essentiellement électrostatique, tandis que ceux ayant une forte affinité dans ce test fixent Vif de manière spécifique (non électrostatique). La spectroscopie de fluorescence nous permettra également d'analyser la fixation de Vif à de petits ARN qui contiennent les sites de fixation putatifs identifiés par voie biochimique. Ainsi, nous avons déjà montré que la tige-boucle TAR (nucléotides 1 à 62 de l'ARN génomique) fixe spécifiquement le même nombre de molécules de Vif (et avec une même affinité) qu'un ARN contenant les 500 premiers nucléotides du génome du VIH (environ 10 molécules de Vif).

2. Vif influence-t-elle le processus de rétrotranscription au niveau structural et/ou fonctionnel ?

(avec Simon Henriet, doctorant)

L'étape d'initiation de la rétrotranscription est un processus hautement spécifique qui implique des particularités structurales. De plus, il a été montré que Vif joue un rôle important dans la structuration et la stabilisation du nucléoïde viral et influence fortement le démarrage de la rétrotranscription (28, 51, 57, 81). En effet, bien que l'ARN_{t₃^{Lys}}, servant d'amorce à la rétrotranscription, soit encapsidé dans les particules virales Δvif (28), la synthèse du brin (-) d'ADN est déficiente. Le mécanisme par lequel Vif stimule les premières étapes de la rétro-transcription reste mal connu. Récemment, il a été suggéré que Vif (1) stimule la fixation de la reverse transcriptase (RT) sur une amorce en augmentant la vitesse d'association et (2) augmente le taux de polymérisation de la RT (15).

Nous envisageons à présent de mettre à profit les compétences acquises dans notre laboratoire sur le complexe d'initiation de la rétro-transcription du VIH-1, tant du point de vue fonctionnel que structural, pour étudier le rôle de la protéine Vif dans cette étape clé du cycle rétroviral. Cette étude a déjà débuté dans le laboratoire (S. Henriet) et nous testons actuellement l'effet de Vif sur 3 étapes clés de la rétrotranscription : l'hybridation de l'ARN_{t₃^{Lys}} sur l'ARN génomique, la synthèse de l'ADN « strong-stop » (-) en présence de la RT du VIH-1 et le 1^{er} transfert de brin. Ces tests seront réalisés en présence ou en absence de la protéine de la nucléocapside (NCp7) afin de mettre en évidence un effet synergique potentiel entre les deux protéines. En effet, il a été montré que ces deux protéines

interagissent entre elles (14, 106). A plus long terme, et dans le cas d'un effet positif, nous tenterons d'identifier par mutagenèse dirigée le(s) domaine(s) de la protéine Vif impliqué(s) dans cette activation, puis de confirmer cet effet dans un système répliatif.

En parallèle, nous essayerons de comprendre le rôle de Vif sur la conformation du complexe d'initiation de la rétrotranscription présent dans les particules virales. La technique de cartographie pour étudier la structure secondaire de l'ARN du VIH-1 in situ (dans les cellules infectées et les particules virales) est au point dans le laboratoire (43, 89). Elle sera utilisée sur des cellules H9 (T CD4⁺) exprimant de façon stable le virus HxB2Δenv Vif+/- . Les profils de réactivité obtenus en présence ou en absence de Vif seront comparés et nous pourrons ainsi en déduire les changements de conformation induits par la protéine. Dans ce cas précis, nous pourrons non seulement étudier l'effet de Vif sur la structuration de l'ARN dans les cellules infectées mais également sur des particules virales matures.

3. La protéine Vif régule-t-elle la traduction des protéines APOBEC-3F/3G ?

(avec Gaëlle Mercenne, doctorante ; Serena Bernacchi, chercheur post-doctorante)

De nombreux travaux ont montré que Vif contrecarre l'activité antivirale d'APOBEC-3G/3F, une enzyme de la famille des cytidines désaminases spécifique des acides nucléiques (102, 118). En présence de Vif, APOBEC-3G/3F est exclue des particules virales par un mécanisme encore inconnu. Lorsqu'elle est encapsidée, APOBEC-3G/3F s'associe au complexe de rétrotranscription où elle désamine les cytidines (dC) en uridines (dU) lors de la synthèse du brin (-) d'ADN viral. Au final, l'ADN proviral contient de nombreuses transitions dG vers dA qui conduisent à la production de protéines tronquées ou non fonctionnelles (**figure 13**). De plus, il a aussi été montré que la demi-vie d'APOBEC-3G (20, 69, 70) et que le niveau d'expression basal d'APOBEC-3G en présence d'inhibiteur du protéasome (112) sont fortement diminués en présence de Vif, suggérant que Vif pourrait réguler négativement le niveau d'expression d'APOBEC-3G/3F en agissant sur sa traduction. La capacité de Vif à lier l'ARN et le fait que des mutants de Vif dans son domaine putatif de fixation à l'ARN soient non fonctionnels cadrent tout à fait avec cette hypothèse (57).

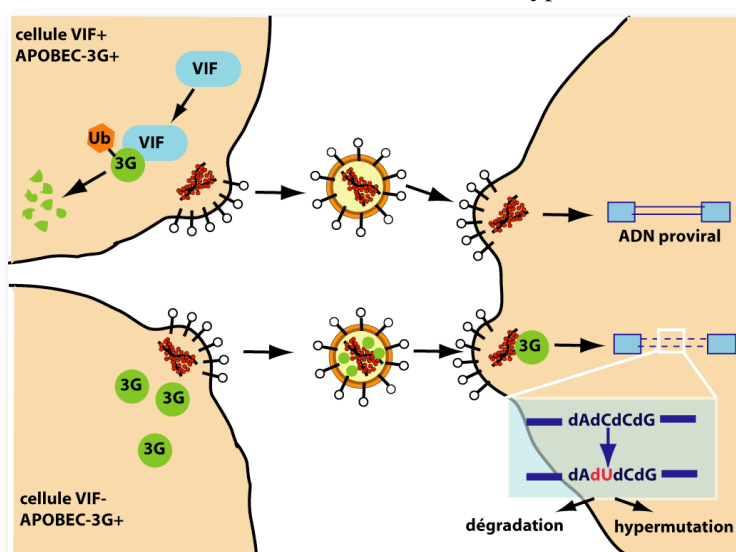


Figure 13 : Représentation schématique du mode d'action des protéines APOBEC-3G et Vif. Adapté de (23).

Afin de nous permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant à la régulation d'APOBEC-3F/3G par Vif, nous aborderons plusieurs points particuliers par la combinaison de différents techniques (biochimiques, biophysiques et cellulaires).

a. Fixation de Vif à l'ARNm d'APOBEC-3G/3F

Les clones d'APOBEC-3G et 3F exprimant un ARNm complet contenant les régions 5' et 3' non traduites sous la dépendance d'un promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 sont disponibles au laboratoire. La fixation de Vif à ces ARNm sera testée par les techniques déjà utilisées pour étudier la fixation à l'ARN génomique : retard de migration électrophorétique, rétention sur membrane de cellulose et fluorescence. Des expériences préliminaires de fluorescence ont montré que Vif se lie à l'ARNm d'APOBEC-3F avec une très forte affinité (supérieure à celle de la région 5' de l'ARN génomique du VIH). Afin de localiser de façon précise les sites de fixation, nous réaliserons des mutants dans lesquels différentes régions de l'ARN seront délétées (en particulier les régions 5' et 3' non traduites) et utiliserons des fragments d'ARN plus petits correspondant aux différentes régions de l'ARNm. Nous espérons montrer par ces expériences que Vif interagit avec l'ARNm d'APOBEC-3F/3G, en particulier avec les régions non traduites de celui-ci, souvent impliquées dans les mécanismes de régulation traductionnelle. Dans la même optique, l'empreinte de Vif sur l'ARNm sera étudiée par des expériences de protection vis-à-vis de réactifs chimiques (DMS, DEPC, radicaux hydroxyles...) et enzymatiques (nucléases S1, T1...). La comparaison des profils de coupures permettra d'identifier, au nucléotide près, le(s) site(s) de fixation de la protéine.

b. Régulation de la traduction d'APOBEC-3G/3F par Vif

Pour mener à bien cette étude, plusieurs stratégies sont envisagées. Dans un premier temps, nous fusionnerons une étiquette (HA ou autre) aux protéines APOBEC et nous testerons directement l'effet de la protéine Vif sur la traduction de l'ARNm d'APOBEC dans un lysat de réticulocytes de lapin. L'analyse quantitative des protéines HA-APOBEC sera ensuite réalisée par western blot. En fonction des résultats obtenus précédemment, nous délèterons les sites de fixation de Vif dans l'ARNm d'APOBEC et nous étudierons la traduction des ARNm mutés comme ci-dessus, en absence et en présence de Vif. Si les mutants de délétion ne sont plus réprimés par Vif, les séquences d'intérêt seront insérées en amont (région 5' non traduite) ou en aval (région 3' non traduite) d'un gène rapporteur (ex. luciférase) et l'activité luciférase sera déterminée dans un lysat de réticulocytes de lapin en présence et en absence de Vif.

En parallèle, nous testerons l'effet direct de la protéine Vif sur la traduction d'APOBEC-3G/3F étiquetée après transfection. Les plasmides exprimant les protéines Vif et APOBEC-3G/3F seront co-transfectés dans des cellules HeLa et la quantité de protéines sera analysée par immunoprécipitation et Western blot. La quantité d'ARNm d'APOBEC sera mesurée par RT-PCR quantitative. Comme précédemment, diverses constructions mutantes de l'ARNm d'APOBEC (dans les régions 5' et/ou 3' non traduites) seront testées afin de confirmer ou d'infirmer l'implication de ces régions dans la régulation de la traduction d'APOBEC. Une fois que le rôle de Vif dans la régulation de la traduction aura été établi de façon précise, nous pourrons envisager d'analyser des mutants de la protéine Vif afin de déterminer la ou les régions de la protéine impliquées dans la régulation.

c. Analyse structurale de la région 5' et/ou 3' non traduite

Les régions 5' ou 3' non traduites des ARNm impliquées dans des mécanismes de régulation traductionnelles possèdent souvent des motifs très structurés. Pour cette raison, nous souhaitons étudier la structure secondaire des régions non traduites des ARNm d'APOBEC-3G/3F. Pour mener à bien cette étude, une cartographie en solution détaillée sera réalisée *in vitro* sur des ARN synthétiques correspondant aux régions 5' et 3' non traduite à partir de sondes de structure chimiques (DMS, DEPC, kethoxal) et enzymatiques (T1, T2, VI). Ces sondes nous permettront de tester l'accessibilité des nucléotides dans la structure secondaire ou leur implication dans des interactions tertiaires.

4. La protéine hDBR1 et la réplication virale du VIH-1

(avec Gaëlle Mercenne, doctorante)

Ce projet a débuté l'année dernière avec l'arrivée dans le laboratoire de Gaëlle Mercenne. Un cribble génétique réalisé chez *S. cerevisiae* a permis d'identifier une mutation qui inhibe la transposition du rétrotransposon Ty1 de plus de 85% (16). Le gène sauvage impliqué, *dbr1*, code pour une 2'-5' phosphodiesterase qui clive les points de branchements des lassos d'ARN produits lors de l'épissage, les convertissant en molécules linéaires. La protéine DBR1 participe ainsi au recyclage des introns. Le défaut de rétrotransposition dans une levure mutante *dbr1* est lié à un défaut de rétrotranscription de l'ARN de Ty1 (80). De plus, une forte accumulation des introns excisés sous forme de lariats est observée, ce qui suggère que la liaison 2'-5', responsable de la forme des lassos, bloque la progression des exonucléases. Une étude récente a montré que l'extrémité 5' de l'ARN de Ty1 dans les VLP (Virus Like Particle) forme une liaison 2'-5' phosphodiester intramoléculaire avec la cytosine 5824 situé à la jonction entre la région R (redondante en 5' et 3' de l'ARN) et U3 (unique en 3') (17). Ainsi, cette jonction serait idéalement placée pour permettre le transfert de l'ADN « strong-stop » (-) de la copie 5' de R vers la copie 3'. Elle pourrait aussi servir de signal favorisant l'encapsidation de l'ARN au détriment de sa traduction. Ainsi, les VLP produites dans la levure sauvage contiennent des ARN possédant un phosphate à leur extrémité 5', qui résulte du clivage de la liaison 2'-5' phosphodiester par l'enzyme DBR1 (17). Cependant, la formation des lassos a récemment été remise en cause (21).

Les rétrovirus étant très proches des rétrotransposons aussi bien au niveau de leur organisation génétique que de leur cycle de réplication (à la différence majeure d'un cycle purement intracellulaire pour les rétrotransposons), nous avons décidé d'étudier le rôle de l'enzyme humaine de débranchement des lassos d'ARN (*hDBR1*) dans la réplication du VIH-1. Le gène humain *hdb1* a été cloné : il présente 40% d'identité avec le gène *dbr1* de *S. cerevisiae* et est capable de compléter la mutation *dbr1* dans cette levure (61).

Nous avons surproduit la protéine humaine *hDBR1* dans un système bactérien et mis au point un test d'activité *in vitro* à partir d'un intron catalytique de groupe II et d'un court ARN branché synthétisé par voie chimique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la protéine humaine purifiée permettait l'hydrolyse *in vitro* de l'ARN branché. Ce test préliminaire devrait nous permettre de détecter la présence de la protéine *hDBR1* dans les particules du VIH-1. En effet, si elle intervient dans le débranchement d'une liaison 2'-5' phosphodiester entre le 5' et le 3' de l'ARN génomique, il

se pourrait que cette protéine soit retrouvée au sein même de la particule virale. Nous avons construit des clones d'expression eucaryotes de la protéine hDBR1 et nous envisageons maintenant de tester cette hypothèse par des expériences de co-transfection avec le vecteur exprimant la protéine hDBR1 et un clone moléculaire infectieux du VIH-1. Les particules virales seront purifiées et testées quant à la présence de la protéine hDBR1. Cependant, même si elle n'est pas encapsidée, cette protéine pourrait jouer un rôle après l'entrée du virus dans la cellule, au moment de la rétrotranscription du génome viral.

Une étude très récente est venue nous conforter dans nos hypothèses. Il a en effet été montré que la réduction de l'expression de la protéine hDBR1 réduisait non seulement la formation de particules virales mais aussi la synthèse de l'ADN proviral (inhibition après le 1^{er} saut de brin) (115). De plus, la surexpression de la protéine restaure complètement les effets négatifs, suggérant un effet direct d'hDBR1 sur la réplication du VIH-1. Ces auteurs n'ont cependant pas testé la présence éventuelle de la protéine dans les virions et l'infectivité des virions produits en absence d'hDBR1.

Si hDBR1 est encapsidée, nous envisageons de tester le rôle de cette protéine sur la réplication virale après inhibition de son expression par la technique de « silencing ». Ainsi, les particules virales récoltées en présence ou en absence de la protéine hDBR1 seront d'une part analysées quant à leur pouvoir infectieux (infection de cellules T CD4⁺) et d'autre part étudiées quant à l'efficacité de réverse transcription endogène (incorporation d'un nucléotide radioactif après perméabilisation des virions ou par RT-PCR quantitative).

Références

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**:11601-611
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**:9058-66.
3. **Ashe, M. P., P. Griffin, W. James, and N. J. Proudfoot.** 1995. Poly(A) site selection in the HIV-1 provirus: inhibition of promoter- proximal polyadenylation by the downstream major splice donor site. *Genes Dev* **9**:3008-25.
4. **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**:330-9.
5. **Basyuk, E., T. Galli, M. Mougél, J. M. Blanchard, M. Sitbon, and E. Bertrand.** 2003. Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* **5**:161-74.
6. **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.
7. **Beerens, N., F. Groot, and B. Berkhout.** 2001. Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J Biol Chem* **276**:31247-56.
8. **Bender, W., Y. H. Chien, S. Chattopadhyay, P. K. Vogt, M. B. Gardner, and N. Davidson.** 1978. High-molecular-weight RNAs of AKR, NZB, and wild mouse viruses and avian reticuloendotheliosis virus all have similar dimer structures. *J Virol* **25**:888-96.
9. **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.
10. **Berkhout, B.** 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**:1-34.
11. **Berkhout, B., M. Ooms, N. Beerens, H. Huthoff, E. Southern, and K. Verhoef.** 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**:19967-75.
12. **Berkhout, B., and J. I. van Wamel.** 2000. The leader of the HIV-1 RNA genome forms a compactly folded tertiary structure. *RNA* **6**:282-95.
13. **Berkhout, B., and J. I. van Wamel.** 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**:6723-32.
14. **Bouyac, M., M. Courcoul, G. Bertoia, Y. Baudat, D. Gabuzda, D. Blanc, N. Chazal, P. Boulanger, J. Sire, R. Vigne, and B. Spire.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J Virol* **71**:9358-65.
15. **Cancio, R., S. Spadari, and G. Maga.** 2004. Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* **383**:475-82.
16. **Chapman, K. B., and J. D. Boeke.** 1991. Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell* **65**:483-92.
17. **Cheng, Z., and T. M. Menees.** 2004. RNA branching and debranching in the yeast retrovirus-like element Ty1. *Science* **303**:240-3.
18. **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**:3407-14.
19. **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**:5902-8.
20. **Conticello, S. G., R. S. Harris, and M. S. Neuberger.** 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* **13**:2009-13.
21. **Coombes, C. E., and J. D. Boeke.** 2005. An evaluation of detection methods for large lariat RNAs. *RNA* **11**:323-31.
22. **Cullen, B. R.** 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**:419-24.
23. **Cullen, B. R.** 2006. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* **80**:1067-76.
24. **D'Souza, V., and M. F. Summers.** 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**:643-55.
25. **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**:369-79.

26. **Darlix, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel, and S. F. Barre.** 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* **216**:689-99.
27. **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**:6077-85.
28. **Dettenhofer, M., S. Cen, B. A. Carlson, L. Kleiman, and X. F. Yu.** 2000. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* **74**:8938-45.
29. **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**:2647-55.
30. **Dornadula, G., S. Yang, R. J. Pomerantz, and H. Zhang.** 2000. Partial rescue of the Vif-negative phenotype of mutant human immunodeficiency virus type 1 strains from nonpermissive cells by intravirion reverse transcription. *J Virol* **74**:2594-602.
31. **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**:681-5.
32. **Ennifar, E., J. C. Paillart, A. Bodlener, P. Walter, J.-M. Wiebel, A. M. Aubertin, P. Pale, P. Dumas, and R. Marquet.** 2006. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA with aminoglycosides: From crystal to cell. *Soumis*.
33. **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**:2723-30.
34. **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**:2671-82.
35. **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**:1064-8.
36. **Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and P. Dumas.** 1999. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure Fold Des* **7**:1439-49.
37. **Flynn, J. A., W. An, S. R. King, and A. Telesnitsky.** 2004. Nonrandom dimerization of murine leukemia virus genomic RNAs. *J Virol* **78**:12129-39.
38. **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.
39. **Fu, W., Q. Dang, K. Nagashima, E. O. Freed, V. K. Pathak, and W. S. Hu.** 2006. Effects of Gag mutation and processing on retroviral dimeric RNA maturation. *J Virol* **80**:1242-9.
40. **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.
41. **Fu, W., and A. Rein.** 1993. Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **67**:5443-5449.
42. **Girard, F., F. Barbault, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, J. Paoletti, and G. Lancelot.** 1999. Dimer initiation sequence of HIV-1Lai genomic RNA: NMR solution structure of the extended duplex. *J Biomol Struct Dyn* **16**:1145-57.
43. **Goldschmidt, V., J. C. Paillart, M. Rigourd, B. Ehresmann, A. M. Aubertin, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 2004. Structural variability of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **279**:35923-31.
44. **Goldschmidt, V., M. Rigourd, C. Ehresmann, S. F. Le Grice, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 2002. Direct and indirect contributions of RNA secondary structure elements to the initiation of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **277**:43233-42.
45. **Haddrick, M., A. L. Lear, A. J. Cann, and S. Heaphy.** 1996. Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *J Mol Biol* **259**:58-68.
46. **Harrison, G. P., and A. M. L. Lever.** 1992. The human immunodeficiency virus type-1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol* **66**:4144-4153.
47. **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.
48. **Hibbert, C. S., and A. Rein.** 2005. Preliminary physical mapping of RNA-RNA linkages in the genomic RNA of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **79**:8142-8.

49. **Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structure of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:3099-3104.
50. **Hill, M. K., M. Shehu-Xhilaga, S. M. Campbell, P. Pombourios, 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**:8329-35.
51. **Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence, and D. Gabuzda.** 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **201**:349-55.
52. **Huthoff, H., and B. Berkhout.** 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **7**:143-57.
53. **Isel, C., C. Ehresmann, G. Keith, B. Ehresmann, and R. Marquet.** 1995. Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol* **247**:236-50.
54. **Isel, C., G. Keith, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and R. Marquet.** 1998. Mutational analysis of the tRNA^{3Lys}/HIV-1 RNA (primer/template) complex. *Nucleic Acids Res* **26**:1198-204.
55. **Iwatani, Y., A. E. Rosen, J. Guo, K. Musier-Forsyth, and J. G. Levin.** 2003. Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription in vitro. Requirement for RNA sequences downstream of the primer binding site abrogated by nucleocapsid protein-dependent primer-template interactions. *J Biol Chem* **278**:14185-95.
56. **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**:1222-34.
57. **Khan, M. A., C. Aberham, S. Kao, H. Akari, R. Gorelick, S. Bour, and K. Strebel.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* **75**:7252-65.
58. **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.
59. **Kieken, F., E. Arnoult, F. Barbault, F. Paquet, T. Huynh-Dinh, J. Paoletti, D. Genest, and G. Lancelot.** 2002. HIV-1(Lai) genomic RNA: combined use of NMR and molecular dynamics simulation for studying the structure and internal dynamics of a mutated SL1 hairpin. *Eur Biophys J* **31**:521-31.
60. **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**:343-52.
61. **Kim, J. W., H. C. Kim, G. M. Kim, J. M. Yang, J. D. Boeke, and K. Nam.** 2000. Human RNA lariat debranching enzyme cDNA complements the phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* dbr1 and *Schizosaccharomyces pombe* dbr1 mutants. *Nucleic Acids Res* **28**:3666-73.
62. **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**:1007-18.
63. **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**:4585-95.
64. **Laughrea, M., and L. Jette.** 1996. HIV-1 genome dimerization: formation kinetics and thermal stability of dimeric HIV-1Lai RNAs are not improved by the 1-232 and 296-790 regions flanking the kissing-loop domain. *Biochemistry* **35**:9366-74.
65. **Laughrea, M., and L. Jetté.** 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.
66. **Laughrea, M., L. Jette, J. Mak, L. Kleiman, C. Liang, and M. 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**:3397-406.
67. **Liang, C., J. Hu, R. S. Russell, and M. A. Wainberg.** 2002. Translation of Pr55(gag) augments packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA in a cis-acting manner. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:1117-26.
68. **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**:517-29.
69. **Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
70. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-403.

71. **Marquet, R., F. Baudin, C. Gabus, J. L. Darlix, M. Mougél, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1991. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **19**:2349-57.
72. **Marquet, R., C. Isel, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* **77**:113-124.
73. **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**:145-51.
74. **Mujeeb, A., T. G. Parslow, A. Zarrinpar, C. Das, and T. L. James.** 1999. NMR structure of the mature dimer initiation complex of HIV-1 genomic RNA. *FEBS Lett* **458**:387-92.
75. **Muriaux, D., R. H. De, 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**:33686-92.
76. **Muriaux, D., P. Fosse, and J. Paoletti.** 1996. A kissing complex together with a stable dimer is involved in the HIV-1Lai RNA dimerization process in vitro. *Biochemistry* **35**:5075-82.
77. **Muriaux, D., P. M. Girard, M. B. Bonnet, 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**:8209-16.
78. **Muriaux, D., J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein.** 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-51.
79. **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**:411-19.
80. **Nam, K., G. Lee, J. Trambly, S. E. Devine, and J. D. Boeke.** 1997. Severe growth defect in a *Schizosaccharomyces pombe* mutant defective in intron lariat degradation. *Mol Cell Biol* **17**:809-18.
81. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**:11055-66.
82. **Paillart, J.-C., L. Berthou, 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**:8348-54.
83. **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**:27486-93.
84. **Paillart, J.-C., R. Marquet, E. Skripkin, C. Ehresmann, and B. Ehresmann.** 1996. Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie* **78**:639-53.
85. **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.
86. **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**:5572-7.
87. **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**:21-8.
88. **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.
89. **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**:48397-403.
90. **Paillart, J. C., and H. G. Gottlinger.** 1999. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol* **73**:2604-12.
91. **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.
92. **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**:741-55.
93. **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**:368-78.
94. **Resh, M. D.** 2004. A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:417-8.

95. **Roy, C., N. Tounekti, M. Mougel, J. L. Darlix, C. Paoletti, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and J. Paoletti.** 1990. An analytical study of the dimerization of in vitro generated RNA of Moloney murine leukemia virus MoMuLV. *Nucleic Acids Res* **18**:7287-92.
96. **Russell, R. S., J. Hu, V. Beriault, A. J. Mouland, M. Laughrea, L. Kleiman, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2003. Sequences downstream of the 5' splice donor site are required for both packaging and dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **77**:84-96.
97. **Russell, R. S., J. Hu, M. Laughrea, M. A. Wainberg, and C. Liang.** 2002. Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA caused by mutations of the u5 RNA sequences. *Virology* **303**:152-63.
98. **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.
99. **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**:959-67.
100. **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**:2557-65.
101. **Sakuragi, J., S. Ueda, A. Iwamoto, and T. Shioda.** 2003. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* **77**:4060-9.
102. **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**:646-50.
103. **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**:1834-41.
104. **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**:5729-35.
105. **Shen, N., L. Jette, M. A. Wainberg, and M. Laughrea.** 2001. Role of stem B, loop B, and nucleotides next to the primer binding site and the kissing-loop domain in human immunodeficiency virus type 1 replication and genomic-RNA dimerization. *J Virol* **75**:10543-9.
106. **Simon, J. H., R. A. Fouchier, T. E. Southerling, C. B. Guerra, C. K. Grant, and M. H. Malim.** 1997. The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *J Virol* **71**:5259-67.
107. **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**:28812-7.
108. **Skripkin, E., J.-C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann.** 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4945-9.
109. **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**:1118-28.
110. **Spearman, P., R. Horton, L. Ratner, and I. Kuli-Zade.** 1997. Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. *J Virol* **71**:6582-92.
111. **Srisawat, C., and D. R. Engelke.** 2001. Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* **7**:632-41.
112. **Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**:591-601.
113. **Takahashi, K., S. Baba, Y. Hayashi, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, H. Takaku, and G. Kawai.** 2000. NMR analysis of intra- and inter-molecular stems in the dimerization initiation site of the HIV-1 genome. *J Biochem (Tokyo)* **127**:681-6.
114. **Tang, C., E. Loeliger, P. Luncsford, I. Kinde, D. Beckett, and M. F. Summers.** 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:517-22.
115. **Ye, Y., J. De Leon, N. Yokoyama, Y. Naidu, and D. Camerini.** 2005. DBR1 siRNA inhibition of HIV-1 replication. *Retrovirology* **2**:63.
116. **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**:877-93.

117. **Zhang, H., R. J. Pomerantz, G. Dornadula, and Y. Sun.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol* **74**:8252-61.
118. **Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.
119. **Zhou, W., and M. D. Resh.** 1996. Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Virol* **70**:8540-8548.



PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**1.1. Revues à comité de lecture** (* corresponding author)

- 1.1. 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 Acid Res.*, **22**, 145-151.
- 1.2. 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. USA.*, **91**, 4945-4949.
- 1.3. Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1994) Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of HIV-1 genomic RNA. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27486-27493.
- 1.4. Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. (1996) The use of chemical modification interference and inverse PCR mutagenesis to identify the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *Pharma Acta Helvetiae*, **71**, 21-28.
- 1.5. 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.
- 1.6. Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1996) Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie*, **78**, 639-653.
- 1.7. Skripkin, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Blumenfeld, M., Ehresmann, B. et Ehresmann, C. (1996) Mechanism of inhibition of *in vitro* dimerization of HIV-1 RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28812-28817.
- 1.8. Paillart, J.-C., Berthou, L., Ottmann, M., Darlix, J.-L., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1996) A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of HIV-1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J. Virol.*, **70**, 8348-8354.
- 1.9. Paillart, J.-C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B. et 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.
- 1.10. 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.
- 1.11. Jossinet, F., Paillart, J.-C., Westhof, E., Hermann, T., Skripkin E, Lodmell, J. S., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (1999) Dimerization of HIV-1 genomic RNA of subtypes A and B: loop structure and magnesium binding. *RNA*, **5**, 1222-1234.
- 1.12. Paillart, J.-C. and Göttlinger, H. G. (1999) Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of Gag membrane binding. *J. Virol.*, **73**, 2604-2612.
- 1.13. Paillart, J.-C.*., Skripkin, E, Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. (2002) *In vitro* evidence for a long-range pseudoknot in the 5' untranslated and matrix coding regions of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 5995-6004.

- 1.14. Ennifar, E, Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Dumas, P. & Walter, P. (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.
- 1.15. Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. & Mak, J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature Review Microbiol.*, **2**, 461-472.
- 1.16. Goldschmidt, V., Paillart, J.-C., Rigourd, M., Ehresmann, B., Aubertin, A.-M., Ehresmann, C. & Marquet, R. (2004) Unsuspected variability of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35923-35931.
- 1.17. Paillart, J.-C*, Dettenhofer, M., Yu, X.-F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. (2004) First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J. Biol. Chem.* **279**, 48397-48403.
- 1.18. Henriët, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C. Paillart, J.-C*. & Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.*, **354**, 55-72.
- 1.19. Ennifar#, E. Paillart, J.-C#., Bodlener, A., Walter, P., Weibel, J.-M., Aubertin, A.-M., Pale, P., Dumas, P. & Marquet, R. (2006) Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. Soumis (#co-premier auteur)

1.2. Article dans des actes de colloques avec comité de lecture

- 2.1. Marquet, R., Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1996) in "*Biological Structure and Dynamics*", (Sarma, R.H. and Sarma M.H., Eds, Adenine Press, N.Y.), **2**, 61-72. Localization of the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA and mechanism of dimerization.
- 2.2. Vivet-Boudou, V., Paillart, J.-C., Burger, A. & Marquet, R. (2005) Synthesis and study of 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide as an anti-HIV-1 mutagenic agent. *Antiviral Research*, **65**, A51

1.3. Article dans des actes de colloques sans comité de lecture

- 3.1. Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Lodmell, J.S., Westhof, E., Ehresmann, C et Ehresmann, B. (1999) *Regards sur la Biochimie* n°1, 40-46 La dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) : une cible antivirale potentielle.
- 3.2. Paillart, J.-C., Dettenhofer, M., Yu, X.-F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Marquet, R Structure de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 dans les cellules infectées et les particules virales. Editeurs : M. Baaziz & A. Hakkou. Actes du Congrès « Congrès International de Biochimie et XXXIème Forum des Jeunes Chercheurs », p.360-363. Marrakech (Maroc), 3-6 Mai 2004
- 3.3. Henriët, S., Paillart, J.-C., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Marquet, R Etude de la fixation de la protéine Vif du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) à son ARN génomique. Editeurs : M. Baaziz & A. Hakkou. Actes du Congrès « Congrès International de Biochimie et XXXIème Forum des Jeunes Chercheurs », p.321-324, Marrakech (Maroc), 3-6 Mai 2004

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

2.1. Communications à des congrès, symposium

- 1993** Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, C. et Ehresmann, B. Résumé des communications p. 147. La dimérisation de l'ARN génomique de HIV-1 implique des séquences localisées en amont du site donneur d'épissage. Poster présenté au "Congrès d'automne de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire" : Paris-Nord (France) 7-9 décembre 1993.
- 1994** Paillart, J.-C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. Résumé des communications p. 41. The primary site of HIV-1 RNA dimerization in vitro involves sequences outside of the previously defined Dimer Linkage Structure Communication orale présentée au "Young Scientist's View of Molecular Biotechnology, 3rd International Meeting" : Ascona (Suisse) 13-19 février 1994.
- 1995** Paillart, J.-C., Skripkin, E., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresman, C. Résumé des communications p. 284. Dimerization of the HIV-1 genomic RNA: relative contribution of the sequences upstream and downstream of the splice donor site. Poster présenté au "1995 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 23-28 mai 1995.
- 1996** Paillart, J.-C., Berthoux, L., Ottmann, M., Darlix, J.-L., Marquet, R., Ehresmann, C. et Ehresmann, B. Analyse du site d'initiation de la dimérisation du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 : double rôle dans l'encapsidation de l'ARN génomique et la synthèse de l'ADN proviral. Communication orale présentée à la "Réunion du groupe thématique SIFR^{ARN} : Reconnaissance macromoléculaire dans le contrôle et l'exécution du cycle traductionnel". Palaiseau (France) 4-6 décembre 1996
- 1998** Paillart, J.-C. and Göttlinger, H. G. Differential effects of single amino acid substitutions in HIV-1 matrix support a myristyl switch model of Gag membrane binding. Poster présenté au "1998 Meeting on Retroviruses": Cold Spring Harbor, NY (USA) 26-31 Mai 1998
- 1999** Jossinet, F., Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. The dimerization of HIV-1 genomic RNA: importance of the RNA loop structure and magnesium binding. Poster présenté au "1999 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 25-30 Juin 1999
- 2001** Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, C. Ehresmann, B & Marquet, R. Identification of a long range interaction in the 5' region of HIV-1 genomic RNA. Poster présenté au 6th RNA Meeting, Banff, Alberta (Canada) 29 Mai- 3 Juin 2001
- 2002** Paillart, J.-C., Ennifar, E., Walter, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Marquet, R. and Dumas, P. Specific binding of aminoglycoside antibiotics to the RNA dimerization initiation site (DIS) of HIV-1. Communication orale présentée au "2002 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 21-26 Mai 2002
- Paillart, J.-C., Ennifar, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B, Dumas, P., Marquet, R., and Walter, P. Fixation spécifique d'aminoglycosides sur le site d'initiation de la dimérisation de l'ARN génomique du HIV-1. Poster présenté au XXIX^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (France) 1-5 Juillet 2002
- 2003** Paillart, J.-C., Beyer, C., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Aubertin, A.-M. & Marquet, R.. Effects of aminoglycoside antibiotics on the HIV-1 replication: correlation with binding to the

Dimerization Initiation Site (DIS) of the genomic RNA. Poster présenté au "2003 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 20-25 Mai 2003

Paillart, J.-C., Beyer, C., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Aubertin, A.-M. & Marquet, R.. Effects of aminoglycoside antibiotics on the HIV-1 replication: correlation with binding to the Dimerization Initiation Site (DIS) of the genomic RNA. Poster présenté au « Second Forum de la Japan Society for the Promotion of Science, JSPS », Strasbourg, 28 Novembre 2003

- 2004** Paillart, J.-C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. Secondary structure of the 5'-untranslated region of HIV-1 genomic RNA in infected cells and in viral particles. Poster présenté au « 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections », Moscone West, San Francisco (CA, USA), 8-11 février 2004.

Paillart, J.-C., Dettenhofer, M., Yu, X.-F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. Structure de la région 5' non traduite de l'ARN génomique du VIH-1 dans les cellules infectées et les particules virales. Poster présenté au Congrès International de Biochimie - XXXième Forum des Jeunes Chercheurs de la SFBBM, Marrakech (Maroc), 3-6 Mai 2004

Paillart, J.-C., Dettenhofer, M., Yu, X.-F., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R.. Secondary structure of the 5'-untranslated region of HIV-1 genomic RNA in infected cells and in viral particles. Poster présenté au "2004 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 25-30 Mai 2004

Paillart, J.-C. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. Communication orale présentée au "The retrovirus-host interface: from structure to function" : Bayreuth, (Allemagne) 1-2 octobre 2004

- 2005** Henriet, S., Paillart, J.-C., Bernacchi, S., Richer, D., Decroly, E., Vigne, R. Ehresmann, C. & Marquet, R. Specific binding of Vif to the 5'-untranslated region of HIV-1 genomic RNA. Poster présenté au "2005 Meeting on Retroviruses" : Cold Spring Harbor, NY (USA) 24-29 Mai 2005

Paillart, J.-C., Ennifar, E., Bodlener, A., Pale, P., Dumas, P. & Marquet, R. Ciblage du site d'initiation de la dimérisation (DIS) de l'ARN génomique du VIH-1 avec des aminoglycosides : du cristal à la cellule. Communication orale présentée au "Congrès Annuel et Forum des Jeunes Chercheurs de la SFBBM" : Nantes, (France) 24-26 Octobre 2005

2.2. Séminaires

- 2000** Identification d'une interaction à longue distance dans la région 5' de l'ARN génomique de HIV-1. Séminaire du département 1 de l'UPR 9002 – IBMC, Strasbourg, 2 Février 2000
- 2002** Structure de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 dans les cellules et les particules virales. Séminaire donné au cours de « la journée scientifique de l'UPR 9002 », CIARUS, Strasbourg, 31 Janvier 2002
- 2004** La structure de l'ARN génomique VIH-1 : du tube à essai à la cellule infectée. Séminaire donné au cours de la « Journée de l'IBMC », Strasbourg, 2 Avril 2004

2.3. Communication sur invitation lors de congrès international

- 1998** La dimérisation de l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) : aspects structuraux et fonctionnels. Conférencier invité au XXVème Forum des Jeunes Chercheurs, Quebec (Canada) 22-25 Juin 1998

