

Université de Montréal

# **Étude de la traduction IRES-dépendante du VIH-1**

par

Karine Gendron

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de PhD

en biochimie

mai 2012

© Karine Gendron, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

## **Étude de la traduction IRES-dépendante du VIH-1**

Présentée par :

Karine Gendron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, président-rapporteur

Léa Brakier-Gingras, directeur de recherche

Nikolaus Heveker, co-directeur

Luis Rokeach, membre du jury

Martin Bisailon, examinateur externe

Guy Lemay, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est responsable de la pandémie du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise). Des souches virales résistantes aux antirétroviraux actuellement utilisés apparaissent rapidement. Il est donc important d'identifier de nouvelles cibles dans le cycle de réplication du VIH-1 pour développer de nouveaux agents contre ce virus. La traduction des protéines de structure et des enzymes du VIH-1 est une étape essentielle du cycle de réplication virale. Ces protéines sont exprimées à partir de l'ARN messager (ARNm) pleine-longueur (ARNm<sup>PL</sup>) à la fin du cycle de réplication. L'ARNm<sup>PL</sup> du VIH-1 peut utiliser un mode d'initiation de la traduction coiffe-dépendant, comme la majorité des ARNm cellulaires, mais peut aussi utiliser un mode d'initiation alternatif, car sa région 5' non-traduite (5'UTR) contient un site interne d'entrée du ribosome (IRES), ce qui lui permet d'initier la traduction suivant un mode IRES-dépendant. L'initiation IRES-dépendante permet à l'ARNm<sup>PL</sup> d'être traduit quand l'initiation coiffe-dépendante est inhibée. L'activité de l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm<sup>PL</sup> du VIH-1 (IRES<sup>5'UTR</sup>) est faible dans des conditions physiologiques, mais est stimulée lorsque la cellule est arrêtée à la transition G2/M du cycle cellulaire, un arrêt qu'induit l'infection par le VIH-1. Une grande portion de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, que nous nommons IRES<sup>5'UTRc</sup>, est présente dans tous les ARNm viraux et a une activité semblable à celle de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, ce qui indique que le mode IRES-dépendant peut être utilisé par tous les messagers du VIH-1.

Lors de mes études doctorales, j'ai caractérisé le fonctionnement de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. J'ai transfecté des cellules lymphocytaires Jurkat T, dérivées des cibles naturelles du VIH-1, avec un vecteur dual-luciférase contenant les séquences codantes des luciférases de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc) séparées par la région 5'UTR de l'ARNm<sup>PL</sup> du VIH-1. La traduction de la Rluc est coiffe-dépendante alors que celle de la Fluc dépend de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai d'abord effectué une analyse mutationnelle et j'ai identifié trois régions qui stimulent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et une tige-boucle qui réprime l'activité de cet IRES, que j'ai nommée IRENE (*IRES negative element*). J'ai montré que l'effet répresseur d'IRENE est aboli lorsque les cellules sont soumises à un stress oxydatif, un type de stress induit lors d'une infection par le VIH-1. Nous proposons que IRENE maintiendrait l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans une conformation peu active dans des conditions physiologiques. On sait

que les IRES sont activés par divers facteurs cellulaires, appelés ITAF (*IRES trans-acting factors*). Nous proposons que l'IRES<sup>5'UTR</sup> adopterait une conformation active suite à la liaison d'un ITAF exprimé ou relocalisé lors d'un stress oxydatif. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Gendron et al., 2011, *Nucleic Acids Research*, 39, 902-912). J'ai ensuite étudié l'effet de la protéine virale Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. En plus de son rôle essentiel dans la transactivation de la transcription des ARNm viraux, Tat stimule leur traduction coiffe-dépendante, en empêchant l'inhibition d'un facteur d'initiation canonique, eIF2, induite par la protéine kinase modulée par l'ARN double-brin (PKR) et en déroulant la structure TAR présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm du VIH-1. Elle affecte aussi l'expression de plusieurs gènes cellulaires. J'ai montré que les isoformes Tat86 et Tat72, mais non Tat101, stimulent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Cet effet est indépendant de PKR et de TAR, mais dépendrait de la conformation de Tat. Nous proposons que Tat activerait un facteur de transcription cellulaire qui déclenche l'expression d'un ITAF de l'IRES<sup>5'UTR</sup> ou encore qu'elle activerait directement un tel ITAF. J'ai de plus montré que PKR stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, ce qui est surprenant puisque PKR est une protéine antivirale. Cet effet est indépendant de l'inhibition d'eIF2 par PKR et pourrait résulter de l'activation d'un ITAF. Sachant qu'une portion active de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, IRES<sup>5'UTRc</sup>, est présente dans tous les ARNm viraux, notre hypothèse est que la stimulation de cet IRES par PKR permettrait de traduire l'ARNm de Tat au début du cycle de réplication, ce qui permettrait ensuite la traduction coiffe-dépendante des ARNm du VIH-1, qui est stimulée par Tat. Ces travaux font l'objet d'un manuscrit (Gendron et al., soumis à RNA).

Mes résultats, couplés aux données de la littérature, me conduisent à la conclusion que, à la fin du cycle de réplication du VIH-1, l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est stimulée par le stress oxydatif, l'arrêt en G2/M et la présence de quantités élevées de Tat, alors que la traduction coiffe-dépendante est compromise. L'initiation IRES-dépendante serait alors indispensable pour que le VIH-1 traduise l'ARNm<sup>PL</sup>. L'IRES<sup>5'UTR</sup> constituerait donc une cible très intéressante pour développer des agents anti-VIH.

**Mots-clés** : VIH-1, IRES, 5'UTR, initiation de la traduction, Tat, stress oxydatif, PKR

## Abstract

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the causative agent of AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Viral strains that are resistant to antiretroviral agents used for the treatment of HIV-1 infected patients rapidly emerge. It is thus important to study the viral replication cycle in order to discover new targets for the development of novel agents against HIV-1. Translation of structural proteins and viral enzymes is a key step of the viral replication cycle. These proteins are translated from the HIV-1 full-length mRNA during late stages of the replication. This mRNA can be translated by a cap-dependent mode which is used by the majority of cellular mRNAs. However, since its 5' untranslated region (5'UTR) contains an internal ribosome entry site (IRES) that we call IRES<sup>5'UTR</sup>, it can also be translated by an IRES-dependent mode. The IRES-dependent mode enables the full-length mRNA to be translated when the cap-dependent mode is impaired. The activity of the IRES<sup>5'UTR</sup> is weak in physiological conditions, but it is stimulated when the cell cycle is arrested at the G2/M transition, an arrest induced by HIV-1 infection. A large portion of this IRES, which we name IRES<sup>5'UTRc</sup>, is present in all HIV-1 mRNAs and its activity is similar to the activity of the complete IRES, which indicates that the IRES-dependent mode can be used by all HIV-1 mRNAs.

During my doctoral studies, I investigated how the HIV-1 IRES<sup>5'UTR</sup> functions. I transfected Jurkat T cells, a lymphocytic cell line derived from the natural target cells of HIV-1, with a dual-luciferase reporter containing the coding sequences of the *Renilla* luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc) separated by the complete 5'UTR of the HIV-1 full-length mRNA. Translation of Rluc is cap-dependent while translation of Fluc depends on HIV-1 IRES<sup>5'UTR</sup>. First, I performed a mutational analysis and I discovered three regions that stimulate the activity of IRES<sup>5'UTR</sup> and a stem-loop that represses its activity, which we named IRENE (*IRES negative element*). I showed that the repression induced by IRENE is relieved when cells are exposed to oxidative stress, a type of stress caused by HIV-1 infection. We propose that IRENE maintains the IRES<sup>5'UTR</sup> in a weakly active conformation in physiological conditions. It is known that IRESes are activated by

cellular factors, called ITAFs (*IRES trans-acting factors*). We propose that the IRES<sup>5'UTR</sup> adopts an active conformation triggered by the binding of an ITAF that is expressed or relocalized during oxidative stress. These results generated a publication (Gendron et al. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39, 902-912). I then decided to study the effect of the viral protein Tat on the IRES<sup>5'UTR</sup> activity. In addition to its essential role in the transcription of HIV-1 mRNAs, Tat stimulates the cap-dependent translation of HIV-1 mRNAs by interfering with the inhibition of a canonical initiation factor, eIF2, induced by the protein kinase modulated by double-stranded RNA (PKR) and by unwinding the TAR structure present at the 5' end of all HIV-1 mRNAs. Tat also affects the expression of several cellular genes. I showed that the Tat86 and Tat72 isoforms, but not Tat101, stimulate the activity of the IRES<sup>5'UTR</sup>. This effect is independent of PKR and TAR, but appears to be dependent upon the conformation of Tat. We suggest that Tat could activate a transcription factor that controls the expression of an ITAF of the IRES<sup>5'UTR</sup> or else that Tat could directly activate such an ITAF. I also showed that PKR stimulates the IRES<sup>5'UTR</sup> activity, which is surprising since PKR is an antiviral protein. This effect is independent of the inhibition of eIF2 by PKR and could result from the activation of an ITAF. Knowing that IRES<sup>5'UTRc</sup>, an active portion of IRES<sup>5'UTR</sup> is present in all HIV-1 RNAs, our hypothesis is that the stimulation of the IRES activity by PKR would allow Tat mRNA to be translated in the beginning of the replication cycle. This would subsequently allow the cap-dependent translation of HIV-1 mRNAs to proceed, which is stimulated by Tat. These results generated a manuscript that is submitted for publication to RNA.

Altogether, my results, coupled to data from literature, lead me to conclude that, in the late phases of the replication cycle, the activity of the HIV-1 IRES<sup>5'UTR</sup> is stimulated by oxidative stress, by the cell cycle arrest in G2/M and by the presence of high amounts of Tat, while cap-dependent translation is impaired. The IRES<sup>5'UTR</sup> would thus be critical to translate the HIV-1 full-length mRNA. Consequently, the IRES<sup>5'UTR</sup> would constitute a very interesting target for the development of novel anti-HIV agents.

**Keywords** : HIV-1, IRES, 5'UTR, translation initiation, oxidative stress, PKR

## Table des matières

Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).....	2
1.2.1 Le génome du VIH-1.....	4
1.2.2 Résumé du cycle de réplication du VIH-1.....	10
1.2.2.1 Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1.....	10
1.2.2.2 La transition entre les étapes précoces et les étapes tardives.....	11
1.2.2.3 Les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1.....	13
1.2.2.3 Rôle des différentes protéines virales.....	18
1.2.3 La protéine virale Tat.....	21
1.2.3.1 Description de la protéine virale Tat.....	21
1.2.3.2 Transactivation de la transcription par Tat.....	25
1.2.3.2.1 Bref résumé de la transcription.....	25
1.2.3.2.2 Transactivation de la transcription TAR-dépendante.....	25
1.2.3.2.3 Transactivation de la transcription via des facteurs de transcription cellulaires : exemple de NF- $\kappa$ B.....	26
1.2.3.2.4 Transactivation de la transcription via le remodelage des histones.....	30
1.2.3.2.5 Contrôle de l'activité transcriptionnelle de Tat par des modifications post-traductionnelles.....	30
1.2.3.3 Effet de Tat sur la traduction des protéines du VIH-1.....	31
1.2.3.3.1 Tat et la région 5'UTR du VIH-1.....	31
1.2.3.3.2 Tat et PKR.....	32
1.2.3.4 Survol des différents effets de Tat dans les cellules T.....	33
1.2.3.4.1 Effet de Tat sur l'expression de protéines cellulaires.....	36
1.2.3.4.2 Induction et inhibition de l'apoptose par Tat.....	36
1.2.3.4.3 Induction du stress oxydatif par Tat.....	37
1.2.3.4.4 Effet de Tat sur l'interférence par l'ARN.....	38

1.3	La traduction chez les eucaryotes .....	39
1.3.2	Les étapes de la traduction.....	42
1.3.3	L'initiation de la traduction .....	44
1.3.3.1	L'initiation coiffe-dépendante de la traduction .....	44
1.3.3.2	Le contrôle de l'initiation coiffe-dépendante .....	48
1.3.3.2.1	PKR, la kinase régulée par l'ARN double-brin (ARNdb).....	50
1.3.3.3	L'initiation IRES-dépendante de la traduction.....	52
1.3.3.3.1	Les IRES viraux.....	56
1.3.3.3.3	La traduction IRES-dépendante chez les rétrovirus .....	65
1.3.3.3.4	La traduction IRES-dépendante chez le VIH-2.....	69
1.4	La traduction des protéines de structure et des enzymes du VIH-1 .....	71
1.4.1	L'ARN pleine-longueur du VIH-1 et sa région 5' non-traduite (région 5'UTR) 71	
1.4.1.1	L'ARN pleine-longueur du VIH-1 .....	71
1.4.1.2	La région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 .....	74
1.4.2	La traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 .....	82
1.4.2.1	Le contrôle de la traduction de l'ARNm pleine-longueur par des protéines cellulaires et des protéines virales .....	82
1.4.2.2	Les barrières à la traduction coiffe-dépendante chez le VIH-1 .....	84
1.4.3	La traduction IRES-dépendante de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 .....	87
1.4.3.1	Description des IRES identifiés dans le génome du VIH-1 .....	88
1.4.3.2	Y a-t-il un doute sur l'utilisation de la traduction IRES-dépendante par le VIH-1? .....	92
1.4.3.3	L'importance de la traduction IRES-dépendante pour la réplication du VIH-1 .....	93
1.5	But de mon projet .....	95
Chapitre 2.	.....	97
The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element.....		97
Abstract.....		99
Introduction .....		100

Materials and Methods .....	103
Results.....	106
Discussion.....	110
References.....	114
Chapitre 3.....	134
The Tat protein stimulates the IRES activity of HIV-1 in T cells .....	134
Abstract.....	136
Introduction.....	137
Results.....	140
Discussion.....	143
Materials and Methods .....	146
References.....	151
Chapitre 4. Discussion .....	170
4.1 Rappel de la problématique .....	170
4.2 Analyse mutationnelle de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	174
4.2.1 Identification de la tige-boucle IRENE qui réprime l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	175
4.2.2 Effet des conformations LDI et BMH proposées pour la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> .....	180
4.2.3 Analyse des résultats préliminaires de l'étude mutationnelle de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans des cellules HeLa-P4.....	181
4.2.4 Comparaison des séquences de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur des sous-types B, A et C du groupe M du VIH-1 .....	186
4.3 Analyse de l'effet de stress cellulaires sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	187
4.4 Comparaison de l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans différents types cellulaires .....	193
4.5 Analyse des résultats préliminaires sur l'effet de TAR sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	194
4.6 Analyse de l'effet de Tat sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	195

4.6.1 Effet du stress oxydatif induit par Tat sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .	198
4.6.2 Effet de l'inhibition de l'interférence par l'ARN sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	199
4.6.3 Présentation d'un modèle expliquant la stimulation de l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 par Tat .....	204
4.6.4 Comparaison de l'effet des trois isoformes de Tat sur la transcription et la traduction coiffe-dépendante .....	206
4.6.5 Effet de PKR sur l'activité de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 .....	206
4.7 Raffinement du modèle concernant le rôle de l'IRES <sup>5'UTR</sup> du VIH-1 lors de la réplication virale en tenant compte des effets de Tat et de PKR.....	208
4.8 Conclusions et Perspectives.....	211

## Liste des figures

**Figure 1- 1 : Schéma du génome du VIH-1.** Le génome du VIH-1 (9 kb) est composé de neuf cadres de lecture ouverts (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* et *nef*) codant pour quinze protéines. L'ARN viral possède le promoteur LTR (*long terminal repeat*) qui contient des séquences régulatrices de la transcription des gènes viraux. La région U3 contient une boîte TATA et des sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires dont NF- $\kappa$ B et Sp1. La région R contient la tige-boucle TAR et la tige-boucle polyA (pA). La région U5 contient les nucléotides suivant la tige-boucle poly(A) jusqu'au site de liaison de l'amorce pour la transcription inverse (PBS, *primer binding site*). L'ADN proviral est flanqué par deux régions LTR, la région LTR étant dupliquée lors de la transcription inverse de l'ARN viral. La région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur contient la région R, la région U5, le PBS, le site majeur donneur d'épissage (SD, *splicing donor site*), le site d'initiation de la dimérisation de l'ARN génomique (DIS, *dimerisation initiation site*) et le signal d'encapsidation  $\psi$ . Le gène Tat et le gène Rev sont chacun séparés par un intron éliminé des transcrits lors de l'épissage. L'intron est représenté par une ligne qui relie les deux exons. Ce schéma n'est pas à l'échelle. Pour les détails, voir le texte. ....6

**Figure 1- 2 : Schéma de la maturation du virion (adapté de D'Souza et Summers (2005)).** Le virion immature sort de la cellule par bourgeonnement. La protéase virale est alors activée par dimérisation et clive les précurseurs Gag et Gag-Pol. Suite à ce réarrangement, le virion est mature et infectieux. Le précurseur Gag contient différentes portions (MA, CA, SP1, NC, SP2 et p6) qui correspondent aux différentes protéines qui seront produites suite au clivage par la protéase virale. Le précurseur Gag-Pol contient différentes portions (MA, CA, SP1, NC, p6\*, PR, RT et IN). Seul le précurseur Gag est représenté dans le schéma du virion immature et mature. ....8

**Figure 1- 3 : Schéma du cycle de réplication du VIH-1 adapté de Scherer et al. (2007).** Le cycle de réplication du VIH-1 est séparé en deux phases soit les étapes précoces (représentées en haut) et les étapes tardives (représentées en bas). Le cycle de

réplication d'un virus mature et infectieux débute par son entrée dans la cellule cible par fusion des membranes. Suite à la décapsidation de l'ARN génomique viral, cet ARN viral simple-brin est rétrotranscrit en ADN proviral double-brin. L'ADN proviral est importé au noyau grâce au complexe de pré-intégration (PIC) où il est intégré au génome cellulaire grâce à l'IN virale. L'ADN proviral intégré est appelé provirus. Le provirus est transcrit à un niveau basal et les transcrits précoces sont complètement épissés. De courts transcrits avortés contenant la structure TAR sont produits en grande quantité lors des étapes précoces dû à une élongation inefficace de la transcription. Les protéines précoces sont traduites (Tat, Rev et Nef). Tat et Rev sont alors importés au noyau. Tat se lie à la structure TAR présente à l'extrémité 5' des ARNm du VIH-1 et transactive la transcription du génome du VIH-1. Rev facilite l'exportation des ARNm partiellement épissés et de l'ARN pleine-longueur. Les protéines tardives sont traduites (Vif, Vpr, Vpu, Env, Gag et Gag-Pol). Les virions sont assemblés au niveau de la membrane plasmique grâce à Gag. L'ARN génomique dimérise et est encapsidé dans le virion. Le virion est relâché par bourgeonnement sous forme immature. Il est mûré par la protéase virale et peut commencer un cycle de réplication en infectant une nouvelle cellule cible. Pour les détails, voir le texte... 14

**Figure 1- 4 : Schéma des différentes espèces d'ARNm du VIH-1 (adapté de Tazi et al. (2010)).** Les transcrits précoces codant pour Tat, Rev ou Nef sont complètement épissés et ont une taille d'environ 2 kb. Les transcrits tardifs codant pour Vif, Vpr, Vpu et Env sont partiellement épissés et ont une taille d'environ 4 kb. Le transcrit tardif codant pour Gag et Gag-Pol n'est pas épissé et a une taille d'environ 9 kb. Il est aussi appelé ARN viral pleine-longueur. Seulement les espèces principales sont représentées. .... 16

**Figure 1- 5 : Schéma des différentes régions de la protéine virale Tat.** La protéine Tat est codée par deux exons. Elle peut être divisée en six régions caractérisées par leur contenu en acides aminés soit la région acide en N-terminale (aa 1 à 21), la région riche en cystéines (aa 22 à 37), la région centrale (aa 38 à 48), la région basique (aa 49 à 59), la région riche en arginines et en glutamines (aa 60 à 72) et la région C-

terminale (aa 73 à 101). Chaque région possède des fonctions spécifiques. Pour les détails, voir le texte.....22

**Figure 1- 6 : Schéma de la transactivation de l'élongation de la transcription par Tat et du contrôle de cette transactivation par les modifications post-traductionnelles de Tat (adapté de Ott (2011)).**

A) Tat est transcriptionnellement inactive dû à la méthylation par PRMT6 et SETDB1. P-TEFb (cycline T1 et CDK9) est séquestré dans le complexe 7SK snRNP sous forme inactive. TAR est liée à NELF qui réprime l'élongation de la transcription. Le complexe de polymérase est donc arrêté prématurément après avoir débuté l'élongation. B) Tat est phosphorylée par PKR, acétylée par PCAF, méthylée par KMT7 et ubiquitinée par Hdm2, ce qui augmente son affinité pour TAR et pour la cycline T1. Tat est alors transcriptionnellement active et liée à TAR et à la cycline T1. P-TEFb est relâché du 7SK snRNP. CDK9 phosphoryle alors le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Pol II), ce qui augmente sa processivité, et phosphoryle le facteur NELF qui est alors relâché. C) Tat est acétylée par p300/CBP et hGCN5 ce qui induit sa dissociation de TAR et de la cycline T1. Tat est transférée sur le complexe de polymérase en élongation et recrute des facteurs cellulaires dont PCAF et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Le recyclage de Tat nécessite la désacétylation de ses lysines 50 et 51 par la SIRT1. Plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans ce processus sont omis par souci de concision et de clarté. Pour les détails, voir le texte. ....28

**Figure 1- 7 : Schéma de l'activation de PKR (adapté de Hinnebusch (2005)).**

PKR est composé d'un domaine N-terminal contenant des sites de liaison à l'ARNdb (dsRBD) et d'un domaine C-terminal, séparé en deux lobes, contenant l'activité kinase. PKR est constitutivement présent sous forme de monomère inactif dû à la présence des dsRBD qui masquent le domaine kinase. En présence de faibles quantités d'ARNdb (exemple : TAR), deux monomères se lient au même ARNdb, ce qui favorise leur dimérisation et leur autophosphorylation. PKR ainsi activé lie son substrat, eIF2 $\alpha$ , et le phosphoryle. En présence de grandes quantités d'ARNdb, chaque monomère de PKR

lie un ARNdb, ce qui défavorise leur dimérisation et, par conséquent, leur activation. .... 34

**Figure 1- 8 : Représentation des deux sous-unités du ribosome liés à un ARNm (adapté de Liljas (1999)).** Les sites A, P et E sont représentés sur la petite sous-unité (40S) et la grande sous-unité (60S). Le site T est représenté sur la 60S. Un aminoacyl-ARNt est présent au site d'entrée A/T. Un peptidyl-ARNt est présent au site P/P. Un ARNt désacétylé est présent au site E/E. Le schéma n'est pas à l'échelle. .... 40

**Figure 1- 9 : Schéma de l'initiation coiffe-dépendante et des mécanismes de contrôle de cette initiation (adapté de Jackson et al. (2010))** A) La sous-unité ribosomique 40S est associée avec les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A et eIF3. B) Le facteur d'initiation eIF2 associé au GTP recrute l'ARNt initiateur chargé de la méthionine, Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>, pour former le complexe ternaire. C) Le complexe ternaire s'associe à la 40S pour former le complexe de préinitiation 43S. D) Le complexe eIF4F, formé d'eIF4E lié à la coiffe, eIF4G et eIF4A, est attaché à l'ARNm qui est circularisé grâce à PABP qui lie eIF4G et la queue de poly(A). Le complexe 43S les rejoint. E) Le complexe 43S balaie la région 5'UTR de l'ARNm. F) La 40S fait une pause. L'anticodon de l'ARNt initiateur reconnaît le codon initiateur sur l'ARNm. Elle forme alors le complexe d'initiation 48S. G) Suite à l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, plusieurs eIF se détachent de la 40S. H) La 60S, associée à eIF5B-GTP, rejoint la 40S pour former la 80S. I) Suite à l'hydrolyse du GTP lié à eIF5B, les derniers eIF sont libérés du ribosome. J) L'élongation débute et se poursuit jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon de terminaison. K) Suite à la terminaison, les sous-unités ribosomiques sont dissociées et un nouveau cycle de traduction commence. L) Le GDP lié à eIF2 relâché est échangé pour du GTP grâce à eIF2B. M) Lorsque eIF2 est phosphorylé par une kinase, il lie et séquestre eIF2B qui ne peut alors plus échanger le GDP en GTP. La traduction est inhibée. Grâce à des phosphatases qui déphosphorylent eIF2, eIF2B est libéré et la traduction n'est plus inhibée. N) Lorsque que 4E-BP (*4E binding protein*) est hypophosphorylé, il lie et séquestre eIF4E, ce qui inhibe la traduction. Grâce à des kinases qui phosphorylent 4E-BP, eIF4E est libéré et la traduction n'est plus inhibée. Par souci de clarté, certains eIF n'ont pas été

représentés et une seule molécule de PABP est dessinée. Pour les détails, voir le texte.

.....46

**Figure 1- 10 : Schéma des IRES et des eIF nécessaires pour l'activité de l'IRES de la région intergénique du CrPV (adapté de Costantino et al. (2008)), de l'IRES du VHC (adapté de Lukavsky (2009)) et de l'IRES du EMCV (adapté de Fraser et Doudna (2007)).** L'IRES de la région intergénique du CrPV n'a besoin d'aucun eIF classique pour recruter la 40S et la 60S (gris). L'IRES du VHC nécessite le complexe ternaire (eIF2-GTP/Met-ARN<sub>t<sub>i</sub><sup>Met</sup>) (orange) et eIF3 (bleu) pour recruter la 40S. Les domaines II, III et IV de la région 5'UTR formant l'IRES sont identifiés. L'IRES du EMCV nécessite presque tous les eIF classiques sauf eIF4E, le fragment N-terminal d'eIF4G, eIF1 et eIF1A. Les domaines H à L de la région 5'UTR formant l'IRES sont représentés. La séquence riche en pyrimidines est représentée par un rectangle noir et le motif GNRA par un rectangle gris. Le schéma n'est pas à l'échelle et ne représente pas les sites réels de liaison des eIF aux IRES. ....62</sub>

**Figure 1- 11 : Schéma de la relation entre la traduction et l'encapsidation de l'ARN pleine-longueur A) chez le MuLV, B) chez le VIH-2 et C) chez le VIH-1 (adapté de Butsch et Boris-Lawrie (2002)).** Chez MuLV, il existe deux pools indépendants d'ARN pleine-longueur, soit un pool spécialisé pour la traduction et un pool spécialisé pour l'encapsidation. Chez le VIH-2, l'ARN pleine-longueur encapsidé a obligatoirement été traduit. Chez le VIH-1, l'ARN pleine-longueur peut être encapsidé sans avoir été traduit préalablement, mais sa traduction favorise son encapsidation. ..72

**Figure 1- 12 : Schéma de la conformation de Weeks de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 adaptée de Wilkinson et al. (2008).** Les structures TAR, poly(A), PAS, PBS, DIS, SD et  $\psi$  ainsi que le codon initiateur AUG sont indiquées. La réactivité SHAPE est indiquée par un code de couleurs : noir = nt apparié pour former des structures secondaires d'ARN; jaune ou rouge = nt très réactif et donc exposé ; vert = nt faiblement réactif. ....76

**Figure 1- 13 : Schéma comparatif des conformations proposées pour la région 5'UTR du VIH-1 A) Conformation de Weeks (Wilkinson et al. 2008) B) Conformation**

proposée par Damgaard et al. (2004) C) Conformation BMH et D) Conformation LDI, deux conformations proposées par Huthoff et Berkhout (2001b) (pour les détails, voir le texte)..... 80

**Figure 2- 1 : Weeks conformation of the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA.** This representation is adapted from Wilkinson et al. (2008). The regulatory motifs are indicated: the TAR structure (nt 1-57), the polyadenylation signal (polyA), the primer binding site (PBS), the dimerization initiation site (DIS), the major splice donor site (SD) and the packaging signal ( $\psi$ ) (nt 312-325). The AUG initiator codon is boxed. (B) Representation of the dual-luciferase reporter, plasmid pFRT-dual-IRES-HIV. This plasmid contains the Rluc and the Fluc coding sequences, under control of a CMV and a T7 promoter, and separated by the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA (nt 1-369 based on pLAI). Translation of Rluc is cap-dependent while translation of Fluc depends on the 5'UTR IRES of HIV-1 RNA. The initiator codon for the Fluc coding sequence is within the 5'UTR IRES. An oligonucleotide coding for a peptide linker was inserted between the 30 nt from the Gag coding sequence that are present in the construct and the beginning of the Fluc coding sequence. (C) Effect of RNA interference against Rluc on the expression of Rluc and Fluc. Jurkat T-cells were cotransfected with the dual-luciferase reporter and either pBS-U6-RLi that expresses a shRNA targeting Rluc or pBS-U6-ApaI that expresses a control shRNA. Jurkat T-cell lysates were assayed for Fluc and Rluc activities 48h post-transfection and these activities were normalized for the protein content. A value of 100% is ascribed to the Rluc and Fluc activity with the control plasmid. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. .... 122

**Figure 2- 2 : HIV-1 5'UTR IRES activity is modulated by two RNA regions.** (A) Two deletion mutations, represented in the Weeks conformation were made in HIV-1 5'UTR IRES and their effect on the IRES activity is shown. (B) Mutations of the upper part of the stem-loop 134-178, named IRENE, increase the IRES activity. The mutations are indicated in boxes. Note that this figure describes the mutations that were introduced but not the structure adopted by the mutant stem-loops (see Fig. 5).

(C) Replacement of the 3A bulge of IRENE by 3C or 3U but not by 3G increases the IRES efficiency. The IRES activities for the mutants were assessed in lysates from Jurkat T cells transfected with the corresponding dual-luciferase plasmids. The Fluc/Rluc ratio obtained with the wild-type pFRT-dual-IRES-HIV (WT) was arbitrarily set at 100%. Results are the mean ± SEM of six independent experiments. The asterisk indicates mutants that were significantly different from WT ( $p < 0.05$ ).

..... 124

**Figure 2- 3 : HIV-1 5'UTR IRES activity is increased in presence of agents that induce oxidative stress.** Jurkat T cells were exposed to different agents (DMSO: control (6 h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide (4 h), thaps: thapsigargin (6 h), TBHQ: tert-butylhydroquinone (6 h) and DFX: deferoxamine (8 h)). (A) The cap-dependent translation is decreased following exposure to the different agents, as shown by metabolic labeling with [<sup>35</sup>S]methionine and measurement of the radioactivity incorporated into trichloroacetic acid-precipitable material. Radioactive counts were normalized for total protein content. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the control sample (DMSO). (B) The activity of WT and M4.stem143 mutant IRES was assessed in cell lysates as described in the legend to Figure 2. Results show the Fluc/Rluc ratio and the Fluc and Rluc activities. A value of 100% was arbitrarily ascribed to WT. Results are the mean ± SEM of three independent experiments. The asterisk indicates the treatments that significantly increase the activity of the WT IRES ( $p < 0.05$ ). The activity of the mutant IRES was not significantly altered by exposure to the different agents. .... 126

**Figure 2- 4 : HIV-1 5'UTR IRES activity is decreased when nt 240-242 or nt 302-305 are mutated.** The mutants studied here were previously found by Abbink et al. (2005) to favor the BMH or the LDI conformation of the HIV-1 5'UTR (see the text). Mutations (boxes) or a deletion (filled triangle) are represented in the Weeks conformation and the conformation they favor is indicated. The WT and mutant IRES efficiencies were assessed in lysates from Jurkat T cells as described in the legend to Figure 2. .... 128

**Figure 2- 5 : The structure of IRENE influences the activity of HIV-1 5'UTR IRES.**

(A) The secondary structure (boxed) of WT IRENE. The presence of the 3A bulge causes a bend between the upper and the lower parts of this stem-loop. (B) In the absence of IRENE (M2. $\Delta$ SL134-178), the IRES activity is increased 1.5 fold. (C) With the M3.stem134, M6.stem143bot, M7 $\Delta$ loop151 and M8.loop151 mutants, the IRES activity is unchanged and the secondary structure of IRENE (boxed) is very similar to that of WT. (D) In the M4.stem143 mutant, the structure of IRENE is drastically changed and the IRES activity is increased two-fold. (E) The M5.stem143up mutation moderately changes the structure of IRENE (boxed), and the IRES activity is increased 1.5 fold. The secondary structure of WT or mutant IRENE was predicted by the mfold algorithm (version 3.2; <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) (Mathews et al. 1999; Zuker 2003). ..... 130

**Figure 2- 6 : A hypothetical model that accounts for the effects of IRENE and oxidative stress on HIV-1 5'UTR IRES activity.** The model proposes that WT IRENE maintains the IRES in a weakly active conformation, which is stabilized by the binding of a repressor cellular protein (rep). In the course of HIV-1 infection, a decrease in global protein synthesis would decrease the level of this repressor. IRENE could then interact with a stimulatory ITAF, whose expression or relocalization was induced by oxidative stress. Binding of this ITAF causes a conformational change and promotes a more active IRES conformation (see the text). ..... 132

**Figure 3- 1 : Plasmids used in this study.** (A) Representation of the dual-luciferase reporter, plasmid pFRT-dual-IRES-HIV, used to monitor HIV-1 IRES activity. This plasmid contains the Rluc and the Fluc coding sequences, under control of a CMV promoter, separated by the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA plus the initiator codon for Fluc plus 30 nt from the Gag sequence (nt 1-368 based on pLAI). Translation of Rluc is cap-dependent while translation of Fluc depends on the HIV-1 5'UTR IRES. An oligonucleotide coding for a peptide linker was inserted between the 30 nt from the Gag coding sequence that are present in the construct and the beginning

of the Fluc coding sequence. (B) Representation of the plasmid pFRT-Tat that contains the coding sequence for wild-type or mutant Tat under control of a CMV promoter. Tat expressed from this plasmid is fused to a HA-tag in its N-terminus. (C) Representation of the three isoforms of Tat and of the mutants of Tat used in this study. The different regions of Tat are indicated as well as the nature and the location of the selected mutations of Tat investigated in this study. The highly conserved first exon contains a N-terminal acidic domain (aa 1-21), a cysteine rich domain (aa 22-37) and a core region (aa 38-48) that constitute the activation domain. There is also a basic domain (aa 49-59) that is involved in RNA binding and nuclear localization and an arginine/glutamine rich domain (aa 60-72). The second exon contains the C-terminal domain of Tat (aa 73-101) and contributes to non-transcriptional effects of Tat..... 160

**Figure 3- 2 : Effect of the Tat isoforms on the level of dual-luciferase reporter mRNA, on HIV-1 IRES activity and on the efficiency of the cap-dependent translation.**

The effect of increasing amounts of the different isoforms of Tat (Tat72, Tat86 and Tat101) on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0 µg of the dual-luciferase reporter pFRT-dual-IRES-HIV and a Tat-expressing vector (pFRT-Tat72, pFRT-Tat86 or pFRT-Tat101). (A) Expression of the Tat isoforms. Equal amounts of proteins from lysates of Jurkat T cells transiently transfected with the Tat-expressing vectors at 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 µg were separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with an anti-HA monoclonal antibody. Anti-tubulin (tub) blotting was used as an internal control for loading. (B) Variations in the levels of the dual-luciferase reporter mRNA, as analyzed by quantitative real-time PCR. The mRNA expression levels in presence of increasing amounts of Tat are compared to their levels in cells transfected with the dual-luciferase reporter in absence of Tat. (C) The HIV-1 IRES activity in presence of increasing amounts of Tat is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. (D) The efficiency of cap-dependent translation in presence of increasing amount of Tat is represented by the Rluc activity normalized by the mRNA level analyzed by qPCR. In B, C and D, a value of 100% was arbitrarily

ascribed to the values obtained in absence of Tat. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The asterisks indicate values that were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the value in absence of Tat. .... 162

**Figure 3- 3 : Effect of the Tat isoforms on HCV IRES activity.** The effect of different isoforms of Tat (Tat72, Tat86 and Tat101) on HCV IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu$ g of the dual-luciferase reporter pFRT-dual-IRES-HCV and 1.0 or 4.0  $\mu$ g of the Tat-expressing vectors. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the value obtained in absence of Tat. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The asterisks indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the IRES activity obtained in absence of Tat. .... 164

**Figure 3- 4 : Mutating C31, K41 or K51 in Tat86 prevents Tat from stimulating HIV-1 IRES activity while eliminating TAR does not interfere with this effect of Tat.** (A) The effect of Tat86 on the HIV-1 IRES activity in absence of the TAR structure in the 5'UTR inserted between the Rluc and the Fluc genes was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu$ g of pFRT-dual-IRES-HIV or pFRT-dual-IRES $\Delta$ TAR-HIV, that is devoid of the TAR structure, and with increasing amounts of the Tat86-expressing vector. The asterisks indicate IRES activities that were significantly different ( $p < 0.05$ ) from the activity in absence of Tat. (B) The effect of wild-type Tat86 or its mutants on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with pFRT-dual-IRES-HIV and 1.0 or of 4.0  $\mu$ g of the different Tat86-expressing vector. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the IRES activity in absence of Tat. The asterisks indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the IRES activity obtained in absence of Tat. (C) Expression of the mutants of Tat86 was assessed by Western blot as described in Fig. 2B. .... 166

**Figure 3- 5 : Wild-type PKR increases HIV-1 IRES activity.** The effect of PKR on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu$ g

of pFRT-dual-IRES-HIV, 2.0  $\mu$ g of Tat86-expressing vector or an identical vector except for the absence of Tat coding sequence and 2.0  $\mu$ g of the different PKR-expressing vector or of a vector expressing the control protein,  $\beta$ -galactosidase. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the result obtained in presence of the  $\beta$ -galactosidase and in the absence of Tat. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The asterisks in the left part of the graph indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the IRES activity in absence of Tat and in presence of the  $\beta$ -galactosidase (column 4). In the right part of the graph, no IRES activities were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the IRES activity obtained with Tat86 in presence of  $\beta$ -galactosidase (column 8). ..... 168

- Figure 4- 1 : Repliement d'IRENE dans les différentes conformations proposées pour la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1** A) Le *bulge* de trois A séparant la tige du haut de celle du bas fait face à une C dans la conformation de Wilkinson et al. (2008). B) Le *bulge* séparant la tige du haut de celle du bas fait face à deux C dans les conformations de Huthoff et Berkhout (2001b), de Paillart et al. (2004) et de Damgaard et al. (2004). ..... 176
- Figure 4- 2 : Comparaison de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage du VIH-1 dans des cellules Jurkat T, dans des cellules HEK293T et dans des cellules HeLa-P4.** L'activité de l'IRES sauvage a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T, HEK293T ou HeLa-P4 transfectées avec le vecteur dual-luciférase sauvage. Le rapport Fluc/Rluc obtenu à partir du lysat de cellules Jurkat T a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM) de trois expériences indépendantes. La description du vecteur dual-luciférase utilisé se trouve dans le chapitre 2. .... 182
- Figure 4- 3 : Effet de la délétion des nt 202-217, de la mutation des nt 240-242 et des nt 302-305 ainsi que de la délétion et des mutations de la tige-boucle IRENE (nt 134-178) sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans les cellules HeLa-P4.** L'activité

des IRES a été mesurée dans des lysats de cellules HeLa-P4 transfectées avec le vecteur dual-luciférase sauvage ou mutant. Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de six expériences indépendantes. Les détails sur les vecteurs utilisés se trouvent dans le chapitre 2. Rappelons en bref que les nt 202 à 217 sont délétés chez le mutant M1 $\Delta$ loop202-217, que IRENE est délétée chez le mutant M2 $\Delta$ SL134-178, que la tige du haut d'IRENE est muté chez le mutant M4.stem143, que les nt 240-242 sont mutés chez le mutant M12.DIS240 et que les nt 302-305 sont mutés chez le mutant M16.loop302. .... 184

**Figure 4- 4 : Conformation de la région 5'UTR des sous-types B, A et C du groupe M du VIH-1.** Les conformations des régions 5'UTR des sous-types A et C sont basées sur la conformation de Weeks, proposée par Wilkinson et al. (2008) pour la région 5'UTR du sous-type B. Les séquences consensus pour les sous-types A et C ont été déterminées à partir des séquences disponibles sur la base de données de Los Alamos (2011)..... 188

**Figure 4- 5 : La structure secondaire d'IRENE du sous-type B, A et C du groupe M du VIH-1.** La structure secondaire d'IRENE du sous-type B contient un *bulge* de trois A qui induit une inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas de cette tige-boucle. La structure secondaire d'IRENE du sous-type A ne possède pas d'inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas. La structure secondaire d'IRENE du sous-type C contient un *bulge* de trois A qui induit une inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas et un autre *bulge* de trois nt, CAG, qui induit une seconde inclinaison dans la tige du haut. La structure secondaire de IRENE a été prédite par l'algorithme classique Mfold (version 3.2; <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) (Mathews et al. 1999; Zuker 2003)..... 190

**Figure 4- 6 : Effet de la délétion de TAR et de la région TAR-poly(A) sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en conditions physiologiques ou en conditions de stress oxydatif.** (A) L'activité des IRES a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T transfectées avec l'un des différents vecteurs dual-luciférase examinés, soit le vecteur dual-luciférase contenant la région 5'UTR complète (IRES

sauvage), le vecteur contenant la région 5'UTR amputée des nt 1 à 57 ( $\Delta$ TAR), le vecteur contenant la région 5'UTR amputée des nt 1 à 104 ( $\Delta$ TAR $\Delta$ poly(A)) et, à titre de comparaison, le vecteur contenant un mutant de l'IRES où la tige supérieure d'IRENE est déstabilisée (M4.stem143) (voir le chapitre 2 pour ce dernier). Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage a été établi arbitrairement à 100%. (B) Les cellules Jurkat ont été transfectées avec les vecteurs dual-luciférase décrits en A et ont été exposées pendant 6 h au DMSO (contrôle) ou au TBHQ (*tert*-butylhydroquinone) qui induit un stress oxydatif. L'activité des IRES a ensuite été mesurée dans des lysats de ces cellules. Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage et exposé au DMSO a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de trois expériences indépendantes. .... 196

**Figure 4- 7 : Mesure des espèces réactives à l'oxygène (ROS) produites en présence de Tat86 ou de Tat86-C31S.** Les niveaux de ROS intracellulaires dans les cellules Jurkat T exposées à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (A) ou préalablement transfectées avec 4,0  $\mu$ g d'un vecteur vide ou d'un vecteur exprimant Tat86 ou Tat86-C31S (B) ont été mesurés par coloration au DCFH-DA (diacétate de dichlorodihydrofluoresceine ; Sigma). L'intensité du marquage a été mesurée par cytométrie en flux. Les données ont été recueillies à la longueur d'ondes d'émission FL-1 (530/30 nm). La courbe se déplace vers la droite du graphique plus le stress oxydatif est fort (concentration croissante de  $H_2O_2$ ), ce qui montre que la technique fonctionne. .... 200

**Figure 4- 8: Effet de la diminution de l'expression de Dicer sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.** L'activité de l'IRES a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T transfectées d'abord avec des ARNsi contrôles (*SignalSilence*<sup>®</sup> *control siRNA*) ou des ARNsi dirigés contre Dicer (*SignalSilence*<sup>®</sup> *Dicer siRNA I* (Cell Signaling Technology)), puis re-transfectées 24 h plus tard avec le vecteur dual-luciférase sauvage. Le rapport Fluc/Rluc, l'activité Fluc et l'activité Rluc obtenus avec le vecteur dual-luciférase sauvage en présence des ARNsi contrôle ont été établis arbitrairement

à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de trois expériences indépendantes.

Le vecteur sauvage est décrit dans le chapitre 2.....202

## Liste des abréviations

A	adénine
A	alanine
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double-brin
ARNm	ARN messenger
ARNmi	microARN
ARNr	ARN ribosomique
ARNsb	ARN simple-brin
ARNsi	petit ARN interférent
ARNt	ARN de transfert
ARNt <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	ARNt initiateur qui sera chargé par la méthionine
BHK-21	<i>baby hamster kidney cells</i> ; cellules de reins de bébé hamsters
BMH	<i>branched multiple hairpin</i> ; multiples tige-boucles embranchées
C	cytosine
C	cystéine
C33A	cellules humaines de carcinome cervical
CA	protéine de la capsid
CAT	chloramphénicol acétyltransférase
CBP80	la protéine 80 liant la coiffe
CCR5	récepteur de chémokines à motif C-C de type 5
CDK9	<i>cyclin-dependent kinase 9</i> ; kinase 9 dépendante de la cycline
CMV	cytomégalovirus
COS	cellules fibroblastiques provenant de reins de singe

CRM-1	<i>chromosome maintenance region 1</i> ; région 1 pour l'entretien du chromosome
CrPV	virus de la paralysie du cricket
CXCR4	récepteur de chémokines à motif C-X-C de type 4
cys	cystéine
DCFH-DA	diacétate de dichlorodihydrofluoresceine
DDX3	<i>DEAD box polypeptide 3</i> ; polypeptide 3 contenant une boîte DEAD
DIS	signal d'initiation de la dimérisation
eIF	facteur d'initiation de la traduction eucaryote
EMCV	virus de l'encéphalomyocardite
Env	précurseur des protéines de l'enveloppe virale
ESM	erreur standard sur la moyenne
Fluc	luciférase de la luciole
FMDV	virus de la fièvre aphteuse
G	guanine
Gag	précurseur des protéines de structures virales
GDP	guanosine-5'-diphosphate
gln	Glutamine
GTP	guanosine-5'-triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HAART	traitement antiviral hautement actif
HEK293T	cellules rénales embryonnaires humaines
HeLa	cellules épithéliales humaines provenant d'un carcinome cervical
HeLa-P4	cellules épithéliales humaines provenant d'un carcinome cervical exprimant les récepteurs CD4
HIF-1 $\alpha$	facteur 1 $\alpha$ inductible à l'hypoxie
hnRNP	ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes
hRIP	<i>human Rev-interacting protein</i> ; protéine humaine interagissant avec la protéine Rev du VIH-1

HuR	<i>human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like</i> ; la protéine humaine ressemblant à la protéine de vision anormale létale pour l'embryon chez la drosophile
IN	intégrase virale
IRES	site interne d'entrée du ribosome
IRES <sup>5'UTR</sup>	site interne d'entrée du ribosome localisé dans la région 5' non-traduite de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1
ITAF	IRES <i>trans-acting factor</i> ; facteur agissant en trans de l'IRES
Jurkat T	cellules T CD4+
K	lysine
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
LDI	<i>long-distance interaction</i> ; interactions à longue distance
LTR	<i>long terminal repeat</i> ; répétitions longues à l'extrémité
lys	lysine
MA	protéine de la matrice
Met-ARNt <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	ARNt initiateur chargé de méthionine
NC	protéine de la nucléocapside
Nef	<i>negative factor</i> ; facteur négatif
NF-κB	facteur de transcription nucléaire κB
NIH-3T3	cellules fibroblastiques embryonnaires murines
NS	cellules non-synchronisées
nt	nucléotide
ORF	<i>open reading frame</i> ; cadre de lecture ouvert
PABP	<i>poly(A) binding protein</i> ; protéine liant la queue de poly(A)
PAS	signal d'activation de l'amorce
PBS	site de liaison de l'amorce pour la transcription inverse
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PKR	protéine kinase modulée par l'ARN double-brin ou <i>protein kinase r</i>
Pol/Gag-Pol	précurseur des enzymes virales

poly(A)	signal de polyadénylation
PR	protéase
Ψ	signal d'encapsidation de l'ARN génomique viral
PTB	protéine liant une séquence polypyrimidine
P-TEFb	facteur positif d'élongation de la transcription
qPCR	amplification d'ADN par PCR quantitative
RHA	hélicase d'ARN A
Rluc	luciférase de la <i>Renilla</i>
RNP	ribonucléoprotéine
ROS	espèces réactives à l'oxygène
RRE	<i>Rev-responsive element</i> ; élément répondant à la protéine Rev du VIH-1
RRL	lysat de réticulocytes de lapin
RSS	<i>RNA silencing suppressor</i>
RT	transcriptase inverse
RT-qPCR	rétrotranscription d'ARN en ADN suivie d'une qPCR
S	Svedberg
S	sérine
SD	site donneur majeur d'épissage
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
snRNP	petites ribonucléoprotéines nucléaires
SP1	peptide espaceur 1
SP2	peptide espaceur 2
SU	protéine de surface
T	thymidine
Tat	<i>transactivator of transcription</i> ; trans-activateur de la transcription
TAR	<i>trans-activating response region</i> ; région réponse de la trans-activation de la transcription
TBP	TATA binding protein
TBHQ	<i>tert</i> -butylhydroquinone
TFIID	facteur de transcription IID

TM	protéine transmembranaire
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor</i> ; facteur de nécrose des tumeurs
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i> ; protéine liant l'ARN TAR
U	uracile
UTR	<i>untranslated region</i> ; région non-traduite
VHC	virus de l'hépatite C
Vif	<i>viral infectivity factor</i> ; facteur d'infectivité virale
VIF	virus de l'immunodéficience féline
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	virus de l'immunodéficience humaine de type 2
VIS	virus de l'immunodéficience simienne
VPg	<i>viral protein g</i> ; protéine virale g
Vpr	<i>viral protein R</i> ; protéine virale R
Vpu	<i>viral protein U</i> ; protéine virale U
X	n'importe quel nucléotide
4E-BP	<i>4E binding protein</i> ; protéine liant eIF4e
3'UTR	région non-traduite en 3'
5'UTR	région non-traduite en 5'

n.b. Afin d'éviter toute confusion, je n'ai jamais accordé les abréviations en nombre dans le texte en français.

*À mon papa Raymond qui a perdu la vie et à  
mon fils Thomas qui commence la sienne*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice, Léa Brakier-Gingras pour tout le temps qu'elle m'a donné sans compter, pour son incroyable patience et pour toutes les discussions, scientifiques ou philosophiques, que nous avons eues. *Mme Gingras, je vous remercie pour l'aide que vous m'avez procurée tout au long de mes études et de la rédaction de cette thèse. Je vous remercie aussi pour vos encouragements qui étaient souvent nécessaires. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci Mme Gingras, du fond du cœur pour votre dévouement.* Je remercie aussi mon co-directeur Nikolaus Heveker sans qui je ne serais pas là aujourd'hui puisque c'est lui qui m'a convaincu de poursuivre mes études supérieures. *Nikolaus, merci pour votre passion scientifique contagieuse et vos idées.* Un merci particulier à Gerardo Ferbeyre, un collaborateur précieux, pour ses idées, sa passion et son enthousiasme. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant ces années, particulièrement Dominic Dulude pour sa patience, son intelligence et son dévouement. Je remercie aussi feu nos mascottes hamsters, Boulette et Katie, qui ont égayés mes journées de travail. Je remercie mon comité de thèse pour les discussions constructives et mon jury de thèse d'avoir accepté de prendre le temps de lire ma thèse, fruit d'un long travail. Merci enfin à tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin au succès de mes études.

Sur une note plus personnelle, je remercie ma collègue et amie Johanie Charbonneau pour sa présence, sa bonne humeur et sa patience. *Johanie, merci d'avoir partager toutes ces années avec moi et merci pour tous les services que tu m'as rendues. Je me souviendrai particulièrement des congrès où nous sommes allées ensemble, des fous rires que nous avons eus au cours de ces années, de nos discussions littéraires et de notre passion commune : la loi de Murphy. Merci d'être mon amie.* Je remercie aussi mes beaux-parents Carole et Serge sans qui la rédaction de cette thèse n'aurait pas été possible. *Merci d'être là pour moi et merci de vous être si bien occupé de Thomas pendant que je rédigeais. Merci pour tous les dîners et soupers que tu m'as préparés Carole et merci de m'avoir chouchouter pendant que je rédigeais. Merci aussi à Serge pour son expertise de*

*cytométrie en flux. Je vous aime. Je remercie Lysandre, la gardienne préférée de Thomas, pour les heures qu'elle a accordées bénévolement à Thomas pendant que je rédigeais. Merci à mon amie de longue date, Renée, pour faire partie de ma vie. Même si on se voit moins qu'avant, tu es importante pour moi. Merci à toute ma famille, particulièrement à mes grands-parents Mirelle et Philippe Desrosiers, à mon oncle André et ma tante Carole et à mes cousins Éric et Maxime et leurs familles respectives. Merci de faire partie de ma vie, je vous aime et j'espère vous garder encore longtemps avec moi. Un merci particulier à ma mère Carole qui se dévoue corps et âme pour ses enfants et à mon père Raymond qui était le meilleur papa du monde. Merci de m'avoir élevé et d'avoir fait de moi la personne que je suis. Merci de m'avoir transmis le plaisir d'apprendre. Merci pour les sacrifices que vous avez faits pour que je puisse faire des études universitaires. Merci à toi, mon papa d'amour, de m'avoir transmis ta curiosité scientifique. Si tu pouvais me voir, tu serais fier de moi. Je t'aime. Merci pour tout maman, je t'aime. Merci à mon frère adoré Christophe. Merci d'exister. Des personnes comme toi, ça me redonne confiance en l'humanité. Je t'aime. Ne change pas. Merci à mon conjoint et père de mon fils Patrick. Mille mercis pour ta grande et majestueuse patience avec moi. Merci d'être qui tu es. J'apprécie chaque moment passé à tes côtés. Tu me fais du bien. Je t'aime. Merci enfin à mon petit garçon Thomas d'illuminer toutes mes journées (même s'il me tient réveillé souvent la nuit). L'amour d'une mère ça ne se décrit pas. C'est difficile de rédiger avec toi, mais la vie est ô combien plus amusante. Je me souviendrai toujours de ces moments de rédaction parce qu'ils sont étroitement liés à toi. J'ai rédigé pendant que tu dormais dans mes bras, pendant que je t'allaitais et pendant que tu jouais à côté de moi. Tu voulais toujours m'aider à travailler sur mon ordinateur. Je t'aime Thomas, mon cœur déborde d'amour pour toi. Je te souhaite d'être heureux autant que tu me rends heureuse.*

# Chapitre 1. Introduction

## 1.1 Problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent causant le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). L'ONUSIDA estime à 34 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH-1 et à 30 millions le nombre de personnes décédées depuis son apparition il y a 30 ans (UNAIDS 2011). Il existe plusieurs classes d'inhibiteurs pour traiter les personnes infectées par le VIH-1 (AIDSinfo 2012). Le traitement antiviral hautement actif (HAART) est basé sur l'utilisation d'antirétroviraux ciblant l'entrée du virus, la protéase virale, l'intégrase virale et la transcriptase inverse virale (Broder 2010; AIDSinfo 2012). Malheureusement, des souches virales résistantes à ces antirétroviraux apparaissent rapidement (Van Vaerenbergh 2001; Stebbing and Moyle 2003). Il est donc important d'approfondir notre compréhension du cycle de réplication virale pour trouver de nouvelles cibles pour développer des agents anti-VIH-1.

La traduction de l'ARN messager (ARNm) pleine-longueur du VIH-1 entraîne la synthèse des protéines de structure et des enzymes du virus. C'est une étape essentielle qui se déroule à la fin du cycle de réplication virale (revue dans Freed 2001). La traduction des protéines est majoritairement contrôlée au niveau de l'initiation. L'initiation de la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 peut se faire de façon coiffe-dépendante. C'est le mode d'initiation utilisé par la majorité des ARNm cellulaires. Vers la fin du cycle de réplication du VIH-1, l'initiation coiffe-dépendante est inhibée. Un site interne d'entrée du ribosome (IRES) a été identifié dans la région 5' non-traduite (5'UTR) de cet ARNm pleine-longueur, ce qui permet un mode alternatif d'initiation de la traduction. Le mode IRES-dépendant permet de traduire les protéines virales lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée. L'importance de la contribution de l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 dans le contexte d'une infection virale n'est cependant pas connue. Une hypothèse intéressante est que le VIH-1 utilise l'initiation coiffe-dépendante ou IRES-dépendante selon les conditions cellulaires afin de favoriser l'expression de ses protéines. Il est donc nécessaire de caractériser l'IRES de la région

5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 afin de mieux comprendre son mécanisme. Si la traduction IRES-dépendante est essentielle à la réplication virale dans des cellules infectées, une nouvelle classe d'agents anti-VIH-1 qui ciblerait spécifiquement cette étape pourrait être développée.

Lors de mes études doctorales, je me suis intéressée à la traduction IRES-dépendante chez le VIH-1. Le but de mon projet était de caractériser l'IRES contenu dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. J'ai d'abord fait une étude mutationnelle de cet IRES et j'ai étudié l'effet de différents stress cellulaires sur son activité. Ensuite, j'ai testé l'effet de la protéine virale Tat et de la kinase cellulaire PKR (*protein kinase R*) sur l'activité de cet IRES. Ces deux protéines affectent la traduction coiffe-dépendante et sont impliquées dans la réplication du VIH-1. Dans l'Introduction, je décrirai brièvement le cycle de réplication du VIH-1 et les différentes protéines virales. Je détaillerai particulièrement les différents rôles et effets de la protéine Tat. Je parlerai ensuite de la traduction coiffe-dépendante et IRES-dépendante chez les eucaryotes ainsi que des mécanismes de contrôle de la traduction. Je porterai une attention particulière à PKR. Finalement, je ferai une revue de la littérature détaillée sur l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, sur sa région 5'UTR et sur sa traduction, plus particulièrement sur l'initiation IRES-dépendante de sa traduction.

## **1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)**

Le VIH est un rétrovirus complexe du genre lentivirus (pour des revues sur le VIH-1, voir Freed 2001; Lever and Jeang 2011). Les lentivirus sont caractérisés par un génome très organisé qui code pour plusieurs protéines régulatrices et accessoires absentes chez les rétrovirus simples. Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH est contenu dans une molécule d'ARN simple-brin, présente en deux copies dans les virions. Ce génome d'ARN simple-brin est rétrotranscrit en ADN double-brin lors du cycle de réplication pour former le génome proviral. Le VIH infecte les cellules humaines, principalement les lymphocytes T CD4+, mais aussi d'autres types de cellules comme les monocytes, les macrophages et

les cellules dendritiques. Le tropisme du virus, c'est-à-dire l'entrée et la réplication préférentielle du virus dans certains types cellulaires, est principalement déterminé par les co-récepteurs présents à la surface des cellules (voir plus loin).

Le VIH est dérivé du virus de l'immunodéficience simienne (VIS), un lentivirus qui infecte les primates non-humains (pour des revues sur les origines du VIH et sur sa classification, voir Hahn et al. 2000; Hillis 2000; Requejo 2006; Sharp and Hahn 2010). Il a été transmis plusieurs fois des primates aux humains, ce qui a entraîné une grande diversification du virus. Le VIH est classé en deux types soit le type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2). Le VIH-1 a été transmis aux humains par le chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) et le VIH-2 a été transmis par le mangabey enfumé (*sooty mangabeys*). Dans le cadre de cette thèse, je me concentrerai sur le VIH-1 qui est responsable de la pandémie, le VIH-2 étant confiné à l'Afrique de l'Ouest. Le VIH-1 est subdivisé en quatre groupes, M (*Main*), O (*Outlier*), N (*non-M, non-O*) et P (*Putative*). L'organisation du génome est similaire d'un groupe à l'autre, mais la séquence génomique est très différente. Le groupe M est responsable de plus de 98% des infections mondiales. Il est subdivisé en sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2 G, H, J et K) d'après des analyses phylogénétiques. Il existe aussi plus de 20 formes recombinantes appelées CRF (*circulating recombinant forms*). Les CRF proviennent de l'infection d'une cellule par différents sous-types et résultent de la recombinaison génétique de deux sous-types. Le groupe O rassemble les virus dont les séquences génomiques se ressemblent, mais diffèrent de celles des virus du groupe M. Le groupe N n'est pas clairement défini et englobe des virus qui ne font partie ni du groupe M, ni du groupe O. Le groupe P est un nouveau groupe dont les virus sont étroitement liés au VIS des gorilles (VISgor) (Plantier et al. 2009). La plupart des recherches sont faites sur le sous-type B du groupe M, le groupe prépondérant en Europe et en Afrique du Nord, malgré le fait que les sous-types A et C soient les deux sous-types les plus répandus mondialement.

### 1.2.1 Le génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 (9 kb) est représenté à la figure 1-1. Il contient neuf cadres de lecture ouverts (ORF : *open reading frame*) qui codent pour quinze protéines (pour des revues, voir Freed 2001; Briggs and Krausslich 2011; Lever and Jeang 2011). Il contient aussi la région LTR (*long terminal repeat*) qui n'est pas traduite et qui sert de promoteur pour la transcription des gènes viraux. Le génome du VIH-1 contient les trois gènes communs aux rétrovirus soit les gènes *gag*, *pol* et *env*. Ces trois gènes sont traduits sous forme de précurseurs polyprotéiques. Le gène *gag* produit le précurseur Gag qui code pour les protéines de structure du virus. Le gène *pol* produit le précurseur Pol qui code pour les enzymes virales. Le gène *env* produit le précurseur Env qui code pour les protéines de l'enveloppe virale. Le précurseur Env est clivé par la furine, une protéase cellulaire, alors que les précurseurs Gag et Pol sont clivés par la protéase virale.

Les gènes *gag* et *pol* se trouvent sur le même ARNm soit l'ARNm pleine-longueur, dans deux cadres de lecture différents, et se chevauchent sur une courte région. Le gène *gag* est exprimé par traduction conventionnelle et produit le précurseur Pr55<sup>Gag</sup> ainsi qu'une forme tronquée du côté N-terminal de ce précurseur appelée p40. Le gène *pol*, qui ne possède pas de codon initiateur au début de sa séquence codante, est exprimé grâce à un mécanisme de traduction non conventionnel appelé changement programmé du cadre de lecture -1 ou *frameshift* -1 (pour une revue sur le frameshift du VIH-1, voir Brakier-Gingras and Dulude 2010). Ce *frameshift* -1 se produit durant la traduction du gène *gag* et entraîne la synthèse d'une protéine de fusion nommée Gag-Pol ou Pr160<sup>Gag-Pol</sup>. En effet, jusqu'à la région de *frameshift*, la séquence de Gag-Pol est identique à celle de Gag (Figure 1-1). Comme le *frameshift* -1 se produit seulement entre 5 et 10% du temps, cette stratégie permet au virus de contrôler le niveau d'expression de ses enzymes par rapport à ses protéines de structure. Le maintien du rapport Gag-Pol/Gag est critique pour la réplication virale.

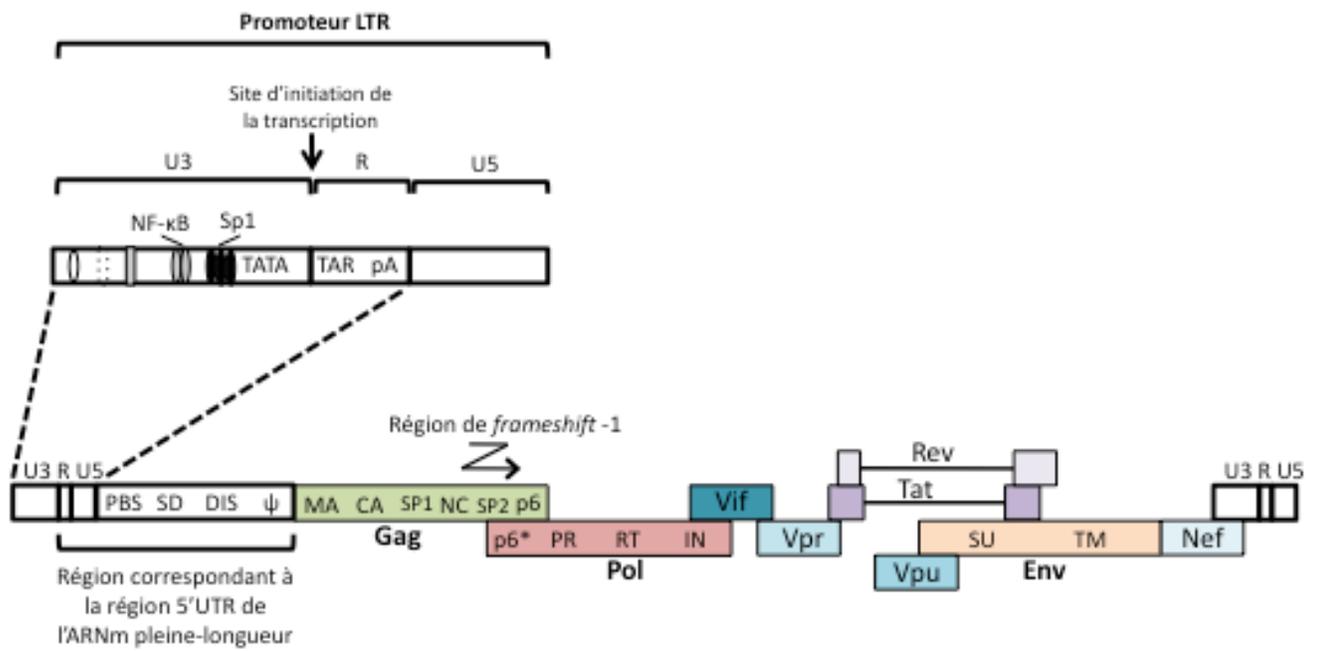
Le clivage de Pr55<sup>Gag</sup> génère les protéines de structure soit la matrice (MA), la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC) qui forment le coeur du virion. Le virion est représenté à la figure 1-2. Ces protéines entourent et protègent le génome d'ARN viral. Le

précurseur Gag contient aussi la protéine p6 et deux peptides espaceurs, SP1 et SP2. Le rôle de l'isoforme tronquée de Pr55<sup>Gag</sup>, p40, sera discuté dans la section 1.4.3. Le clivage du précurseur Pol produit les enzymes virales essentielles à la réplication, soit la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Le précurseur Pol contient aussi la protéine p6\*. Le clivage du précurseur Env génère la protéine de surface (SU ou gp120) et la protéine transmembranaire (TM ou gp41) qui sont localisées dans l'enveloppe lipidique virale. Ces protéines ont pour rôle de reconnaître les récepteurs et co-récepteurs cellulaires afin de permettre la fusion des membranes et l'entrée du virus dans une cellule.

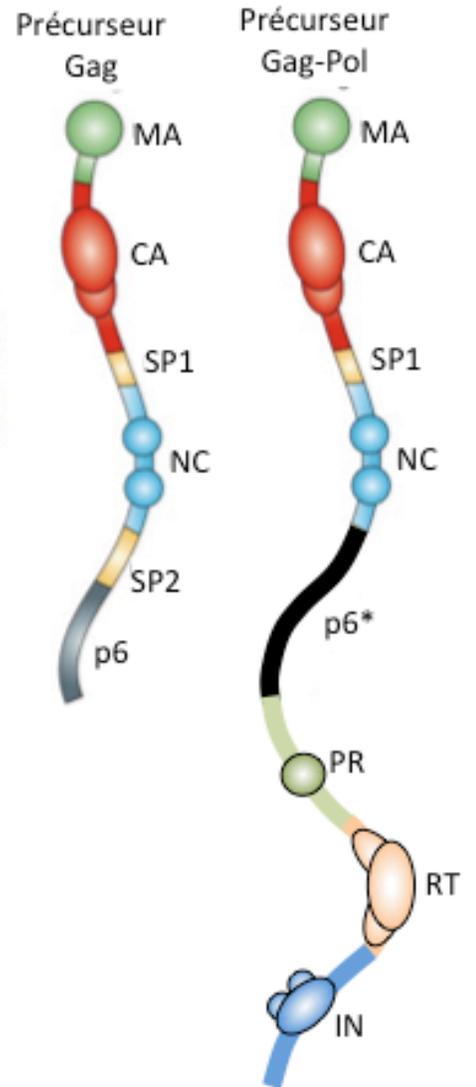
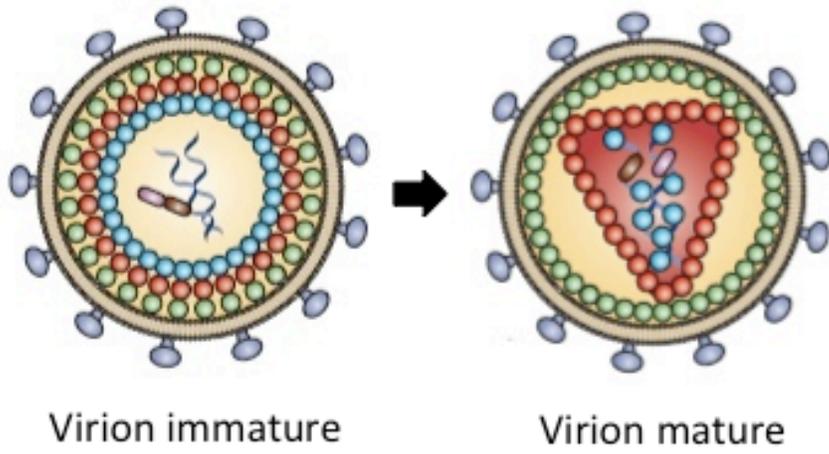
Le génome du VIH-1 code aussi pour deux protéines régulatrices, Tat et Rev, et pour quatre protéines accessoires, Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein r*), Vpu (*viral protein u*) et Nef (*negative factor*). Leur rôle sera décrit dans la section 1.2.2.3. Tat est essentielle pour la transcription des ARNm du VIH-1. Rev joue un rôle majeur dans le transport du noyau au cytoplasme des ARNm viraux partiellement épissés et non-épissé. Les protéines accessoires jouent différents rôles qui affectent la réplication virale et/ou la pathogenèse induite par le VIH-1. Le cycle de réplication du VIH-1 est représenté à la figure 1-3.

La transcription du génome du VIH-1 génère un transcrit primaire de 9 kb aussi appelé l'ARN pleine-longueur ou ARN non-épissé. Ce transcrit est ensuite épissé alternativement grâce à de multiples sites donneurs et accepteurs d'épissage, ce qui génère une quarantaine de transcrits différents (Tazi et al. 2010). Les différentes espèces d'ARNm générées par le génome du VIH-1 sont représentées à la figure 1-4. Les protéines Tat, Rev et Nef sont traduites à partir des transcrits précoces, complètement épissés, d'une taille d'environ 2 kb. Les protéines Vif, Vpr, Vpu et le précurseur Env sont traduits à partir de transcrits tardifs partiellement épissés d'une taille d'environ 4 kb. L'ARN pleine-longueur de 9 kb sert aussi d'ARNm pour les précurseurs Gag et Gag-Pol et d'ARN génomique pour les nouvelles particules virales.

**Figure 1- 1 : Schéma du génome du VIH-1.** Le génome du VIH-1 (9 kb) est composé de neuf cadres de lecture ouverts (*gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env* et *nef*) codant pour quinze protéines. L'ARN viral possède le promoteur LTR (*long terminal repeat*) qui contient des séquences régulatrices de la transcription des gènes viraux. La région U3 contient une boîte TATA et des sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires dont NF- $\kappa$ B et Sp1. La région R contient la tige-boucle TAR et la tige-boucle polyA (pA). La région U5 contient les nucléotides suivant la tige-boucle poly(A) jusqu'au site de liaison de l'amorce pour la transcription inverse (PBS, *primer binding site*). L'ADN proviral est flanqué par deux régions LTR, la région LTR étant dupliquée lors de la transcription inverse de l'ARN viral. La région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur contient la région R, la région U5, le PBS, le site majeur donneur d'épissage (SD, *splicing donor site*), le site d'initiation de la dimérisation de l'ARN génomique (DIS, *dimerisation initiation site*) et le signal d'encapsidation  $\psi$ . Le gène Tat et le gène Rev sont chacun séparés par un intron éliminé des transcrits lors de l'épissage. L'intron est représenté par une ligne qui relie les deux exons. Ce schéma n'est pas à l'échelle. Pour les détails, voir le texte.



**Figure 1- 2 : Schéma de la maturation du virion (adapté de D'Souza et Summers (2005)).** Le virion immature sort de la cellule par bourgeonnement. La protéase virale est alors activée par dimérisation et clive les précurseurs Gag et Gag-Pol. Suite à ce réarrangement, le virion est mature et infectieux. Le précurseur Gag contient différentes portions (MA, CA, SP1, NC, SP2 et p6) qui correspondent aux différentes protéines qui seront produites suite au clivage par la protéase virale. Le précurseur Gag-Pol contient différentes portions (MA, CA, SP1, NC, p6\*, PR, RT et IN). Seul le précurseur Gag est représenté dans le schéma du virion immature et mature.



La variabilité du génome du VIH-1 est très grande. Cette caractéristique est principalement due aux erreurs faites par la RT virale lors de la transcription inverse comme des substitutions ou des recombinaisons. La RT virale ne possède pas de mécanisme de détection des erreurs de transcription. Elle génère environ une erreur par  $10^4$  nucléotides (nt), ce qui correspond à la taille du génome du VIH-1. Autrement dit, chaque ADN proviral transcrit par la RT porte au moins une mutation. Les mutations s'accumulent lors des cycles de réplication successifs. Chaque nouveau virion produit est un variant de la souche sauvage. Chez un patient infecté, la population virale est composée de souches sauvages et variantes. Parmi les souches variantes, celles qui ont un avantage sélectif peuvent devenir prédominantes. Cela permet au VIH-1 de s'adapter rapidement à des nouvelles conditions dans les cellules humaines. Par exemple, le virus peut développer rapidement une résistance aux antirétroviraux utilisés pour traiter les patients infectés.

### **1.2.2 Résumé du cycle de réplication du VIH-1**

La réplication du VIH-1 consiste en une suite d'événements pouvant être séparés en deux parties, soit les étapes précoces et les étapes tardives (pour des revues, voir Freed 2001; Seelamgari et al. 2004; D'Souza and Summers 2005; Ganser-Pornillos et al. 2008; Briggs and Krausslich 2011). Le cycle de réplication est représenté à la figure 1-3. Le VIH-1 interagit avec plusieurs facteurs cellulaires durant sa réplication et certains de ces facteurs sont essentiels pour accomplir des étapes du cycle de réplication. Seulement quelques-uns de ces facteurs seront mentionnés dans ce résumé (pour des revues sur ces interactions, voir Komano et al. 2005; Lever and Jeang 2011).

#### **1.2.2.1 Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1**

L'entrée du virus dans une cellule se fait par fusion de son enveloppe lipidique avec la membrane cellulaire. La protéine SU de l'enveloppe virale interagit avec le récepteur cellulaire CD4 présent à la surface des lymphocytes T. Il s'ensuit un changement conformationnel permettant à la SU d'interagir avec un co-récepteur cellulaire (CCR5 ou CXCR4). Cette interaction expose le peptide de fusion de la protéine TM, ce qui entraîne la

fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le coeur du virus, contenant les protéines de structure, les enzymes et le génome du virus, est relâchée dans le cytoplasme où il est débarrassé des protéines de structure. Le complexe de transcription inverse est formé pour rétrotranscrire le génome d'ARN viral simple-brin en ADN proviral double-brin. La région LTR est dédoublée durant ce processus. Le génome proviral est donc flanqué par deux régions LTR. Ensuite, le complexe de pré-intégration (PIC), contenant entre autres l'ADN proviral et l'intégrase virale, est formé. Ce complexe permet le transport actif de l'ADN proviral linéaire au noyau de la cellule. L'intégrase catalyse ensuite l'intégration du génome proviral dans le génome cellulaire. La forme intégrée de l'ADN proviral est appelée provirus et se comporte essentiellement comme un gène cellulaire. Le provirus est transcrit à un niveau basal par le complexe de l'ARN polymérase II cellulaire. La région LTR du VIH-1 sert de site d'initiation de la transcription et contient les éléments requis pour la synthèse d'ARN. Elle est composée de trois régions, soit U3 (extrémité 3' unique), R (région répétée) et U5 (extrémité 5' unique) (Figure 1-1) (Gaynor 1992). La transcription est initiée à la jonction des régions U3 et R. La région U3 contient les éléments pour recruter l'ARN polymérase II dont une boîte TATA et un site de liaison du facteur de transcription IID (TFIID). Elle recrute un complexe protéique formé par la protéine liant la boîte TATA (TBP) et les co-facteurs nécessaires à la transcription (TAF). Elle contient aussi des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaires dont NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) et SP1 qui sont les plus étudiés (voir plus loin). Les transcrits viraux précoces sont complètement épissés (Figure 1-4) et sont exportés dans le cytoplasme par la même voie que les transcrits cellulaires. Ils sont ensuite traduits par les ribosomes cellulaires, ce qui permet la synthèse des protéines précoces, soit les protéines régulatrices Tat et Rev et la protéine accessoire Nef. Pour des détails sur le rôle de Tat, voir la section 1.2.3 et pour des détails sur le rôle de Rev et Nef, voir la section 1.2.2.3.

### **1.2.2.2 La transition entre les étapes précoces et les étapes tardives**

La transition des étapes précoces aux étapes tardives dépend de l'efficacité de la transcription de l'ARNm viral et donc de l'expression de Tat (pour des revues, voir Hakre

et al. 2011; Karn 2011; Siliciano and Greene 2012). Lors des étapes précoces, l'activité transcriptionnelle du promoteur LTR du VIH-1 est faible dû à une élongation inefficace (voir la section 1.2.3.2 et la figure 1-6). L'initiation de la transcription se fait normalement, mais ce sont majoritairement de courts transcrits avortés contenant la structure TAR en 5' qui sont produits (voir la section 1.4.1.2 pour la description de la structure TAR). L'activité de base du promoteur LTR dépend principalement des facteurs de transcription cellulaires. Par exemple, les sites de liaison à Sp1, un facteur de transcription constitutivement exprimé, sont nécessaires pour la transcription basale à partir du promoteur LTR du VIH-1 (Marcello et al. 2004). Cette activité de base est nécessaire pour transcrire l'ARNm viral primaire au début du cycle de réplication et produire les ARNm précoces, principalement l'ARNm de Tat qui est nécessaire pour transactiver la transcription de cet ARNm primaire (pour la description de Tat et de ses fonctions, voir la section 1.2.3). Charnay et al. (2009) ont montré que Tat stimule fortement la traduction de son ARNm, même lorsqu'il est présent en très faible quantité parmi de très grandes quantités d'ARNm cellulaires. Cette boucle d'auto-stimulation permet au virus de traduire efficacement Tat lors des étapes précoces lorsque la transcription est à un niveau basal. L'expression efficace de Tat permet de passer aux étapes tardives.

La transition des étapes précoces aux étapes tardives peut se faire plus ou moins rapidement selon que la cellule est en phase productive ou en phase de latence. Lorsque le cycle viral est arrêté aux étapes précoces parce que le provirus est transcriptionnellement inactif, on dit que le virus est en latence. La latence est établie quand des cellules T CD4+ activées sont infectées et survivent suffisamment longtemps pour devenir des cellules T CD4+ mémoires au repos, des cellules non-permissives à l'expression du génome du VIH-1. Dans ces cellules mémoires, la transcription de l'ARNm viral est inactivé par plusieurs mécanismes dont un remodelage de la chromatine, la séquestration de facteurs de transcription dans le cytoplasme et l'inactivation du facteur positif d'élongation de la transcription (P-TEFb) (voir la section 1.2.3.2.2 pour une description de P-TEFb). La réactivation de la transcription est nécessaire pour que le provirus en latence redevienne productif. Cette réactivation est déclenchée par l'activation des cellules T CD4+ mémoires infectées suite à la rencontre d'un antigène par exemple. La transcription basale de l'ARNm

viral est ainsi activée et l'expression de Tat qui s'ensuit permet de passer aux étapes tardives.

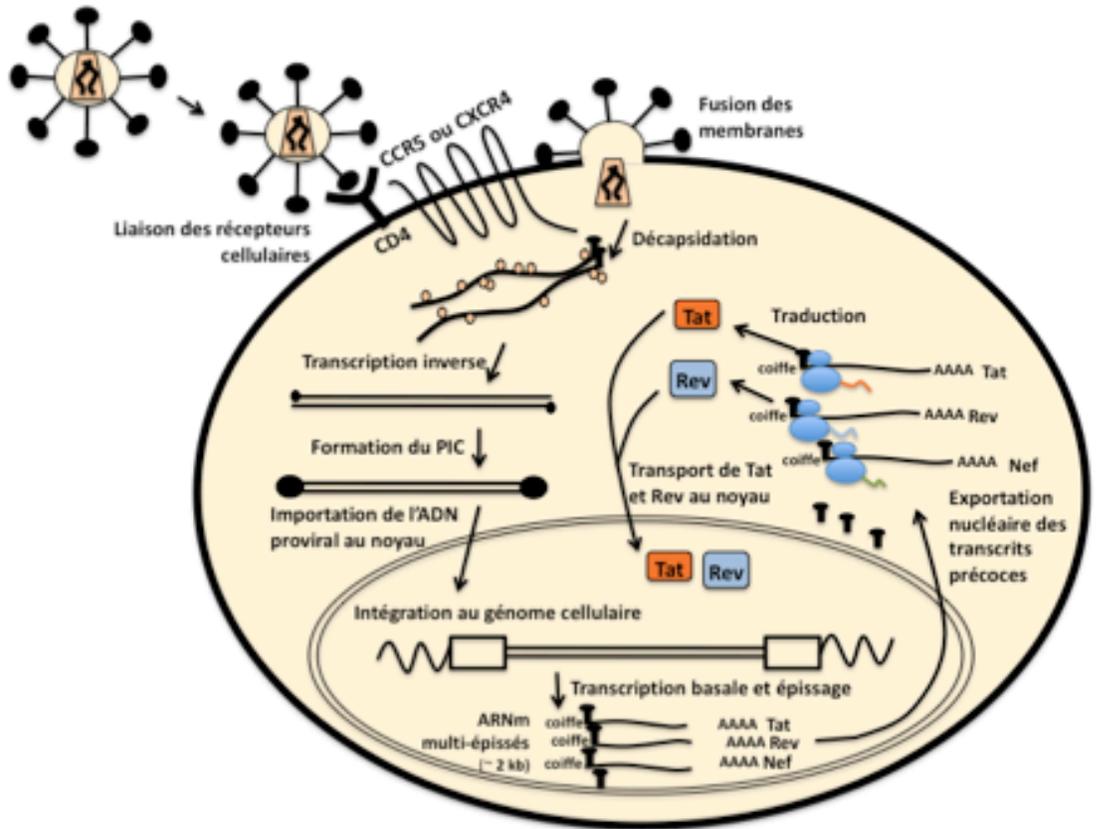
### 1.2.2.3 Les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1

L'expression de la protéine virale Tat déclenche le passage aux étapes tardives. La transactivation de la transcription par Tat est essentielle pour que la transcription du génome du VIH-1 soit efficace. Une description détaillée de Tat et ses fonctions est donnée à la section 1.2.3. Lors des étapes précoces, le transcrit primaire est complètement épissé. Cependant, Vpr, Vif, Vpu et le précurseur Env sont exprimés à partir de transcrits partiellement épissés et les précurseurs Gag et Gag-Pol sont exprimés à partir du transcrit pleine-longueur (Figure 1-4). La protéine Rev est nécessaire pour l'exportation nucléaire des transcrits tardifs, qui sont partiellement épissés ou pleine-longueur, par la voie Crm1 (*chromosome maintenance region 1*) (pour les détails, voir section 1.2.2.3). Les transcrits tardifs sont ensuite traduits par les ribosomes cellulaires. L'assemblage des particules virales (aussi appelées virions) se fait rapidement suite à la synthèse du précurseur Gag (Figure 1-2). Le précurseur Gag non-clivé est principalement en charge de l'assemblage. Gag s'associe spécifiquement avec la membrane plasmique cellulaire grâce à la portion MA et il forme des interactions avec d'autres Gag et avec des Gag-Pol. L'ARN pleine-longueur est ensuite recruté à la membrane de la cellule, au niveau du site d'assemblage, grâce au signal d'encapsulation  $\psi$  qui interagit avec la portion NC de Gag. L'ARN pleine-longueur est encapsidé dans les particules virales sous forme de dimère d'ARN simple-brin grâce au site d'initiation de la dimérisation qu'il contient et sert alors d'ARN génomique aux nouvelles particules virales. Gag donne le signal pour relâcher la nouvelle particule virale par bourgeonnement de la membrane plasmique grâce à une interaction entre la portion p6 et la protéine cellulaire TSG-101, une protéine du complexe ESCRT (*endosomal sorting*

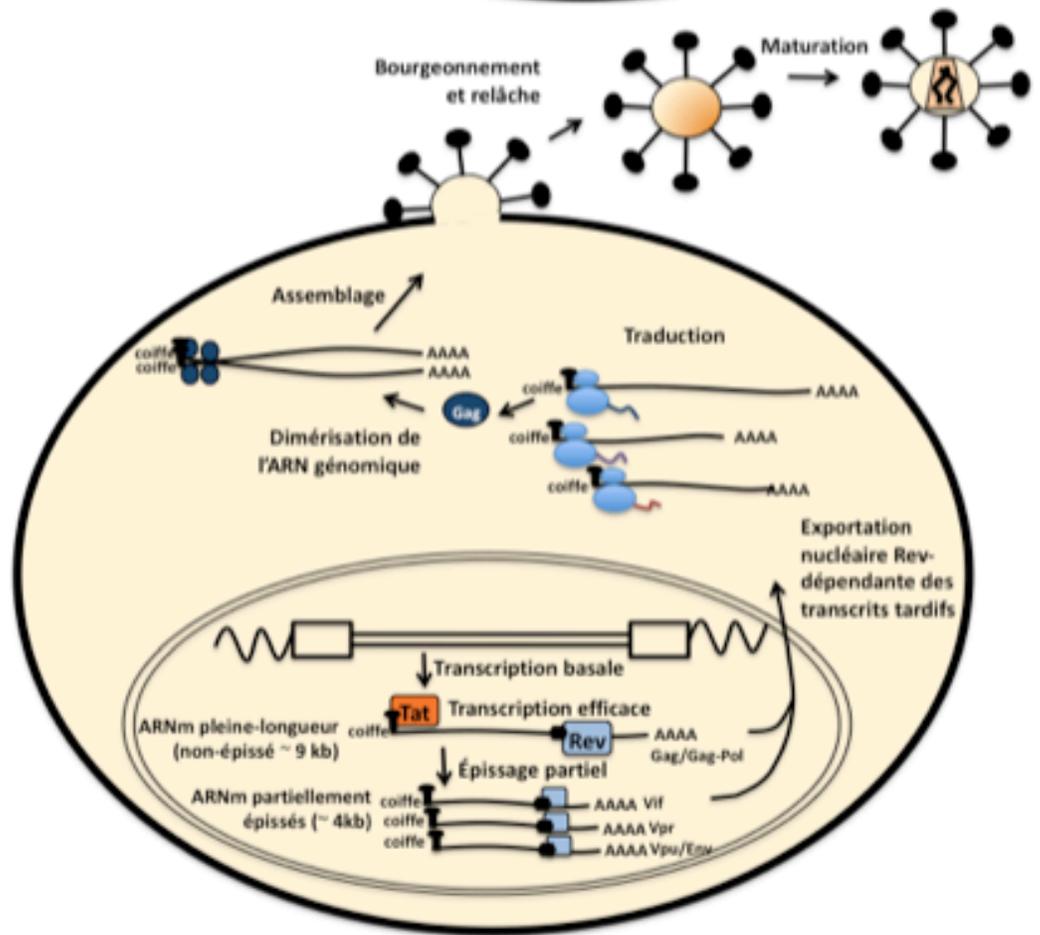
**Figure 1- 3 : Schéma du cycle de réplication du VIH-1 adapté de Scherer et al. (2007).**

Le cycle de réplication du VIH-1 est séparé en deux phases soit les étapes précoces (représentées en haut) et les étapes tardives (représentées en bas). Le cycle de réplication d'un virus mature et infectieux débute par son entrée dans la cellule cible par fusion des membranes. Suite à la décapsidation de l'ARN génomique viral, cet ARN viral simple-brin est rétrotranscrit en ADN proviral double-brin. L'ADN proviral est importé au noyau grâce au complexe de pré-intégration (PIC) où il est intégré au génome cellulaire grâce à l'IN virale. L'ADN proviral intégré est appelé provirus. Le provirus est transcrit à un niveau basal et les transcrits précoces sont complètement épissés. De courts transcrits avortés contenant la structure TAR sont produits en grande quantité lors des étapes précoces dû à une élongation inefficace de la transcription. Les protéines précoces sont traduites (Tat, Rev et Nef). Tat et Rev sont alors importés au noyau. Tat se lie à la structure TAR présente à l'extrémité 5' des ARNm du VIH-1 et transactive la transcription du génome du VIH-1. Rev facilite l'exportation des ARNm partiellement épissés et de l'ARN pleine-longueur. Les protéines tardives sont traduites (Vif, Vpr, Vpu, Env, Gag et Gag-Pol). Les virions sont assemblés au niveau de la membrane plasmique grâce à Gag. L'ARN génomique dimérise et est encapsidé dans le virion. Le virion est relâché par bourgeonnement sous forme immature. Il est mûré par la protéase virale et peut commencer un cycle de réplication en infectant une nouvelle cellule cible. Pour les détails, voir le texte.

Étapes précoces

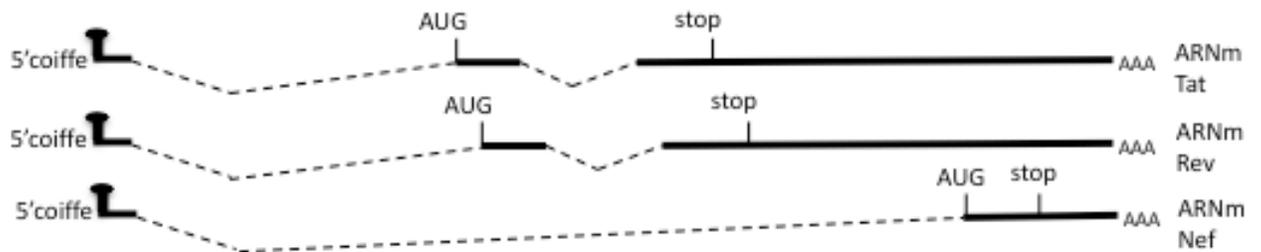


Étapes tardives

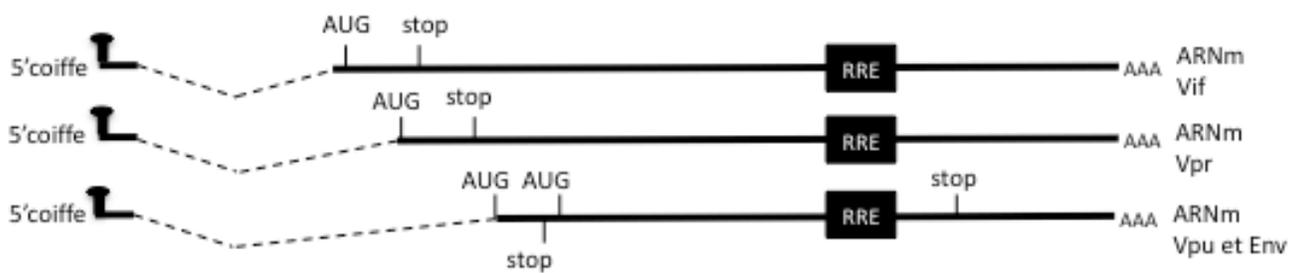


**Figure 1- 4 : Schéma des différentes espèces d'ARNm du VIH-1 (adapté de Tazi et al. (2010)).** Les transcrits précoces codant pour Tat, Rev ou Nef sont complètement épissés et ont une taille d'environ 2 kb. Les transcrits tardifs codant pour Vif, Vpr, Vpu et Env sont partiellement épissés et ont une taille d'environ 4 kb. Le transcrit tardif codant pour Gag et Gag-Pol n'est pas épissé et a une taille d'environ 9 kb. Il est aussi appelé ARN viral pleine-longueur. Seulement les espèces principales sont représentées.

### Transcrits précoces - multi-épissés (~ 2kb)



### Transcrits tardifs - mono-épissés (~ 4 kb)



### - pleine-longueur (~ 9 kb)



*complex required for transport*). Une publication récente montre que la portion SP2 serait aussi importante pour le bourgeonnement de la particule virale (Gan and Gould 2011). Ce bourgeonnement permet la formation de l'enveloppe virale constituée d'une bicouche de phospholipides à laquelle sont associées SU et TM résultant du clivage de Env par la furine, une protéase cellulaire, lors du transport de Env à la membrane cellulaire. Les nouvelles particules virales sont relâchées sous forme immature (Figure 1-2) et contiennent entre autres les précurseurs Gag et Gag-Pol, le dimère d'ARN génomique simple-brin, des protéines virales dont Vpr et des facteurs cellulaires. Dans les particules virales, les précurseurs Gag-Pol sont rapprochées, ce qui permet la dimérisation de la protéase et son activation. La protéase virale activée clive les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol. Il s'ensuit un réarrangement important des particules virales, appelé maturation, durant lequel se forme la capsid conique qui contient entre autres le génome viral (Figure 1-2). Les virions matures peuvent infecter une nouvelle cellule afin de commencer un nouveau cycle de réplication.

### **1.2.2.3 Rôle des différentes protéines virales**

Dans les lignes qui suivent, je parlerai brièvement du rôle principal des différentes protéines du VIH-1 (pour des revues, voir Freed 2001; Komano et al. 2005; Ganser-Pornillos et al. 2008; Lever and Jeang 2011). Dans la section 1.2.3, je parlerai plus en détail des différents rôles et effets de Tat dans la cellule infectée.

Le clivage du précurseur polyprotéique Gag lors de la maturation des particules virales produit les trois protéines de structure du virus, soit MA, CA et NC et trois petites protéines soit p6, SP1 et SP2 (voir Figure 1-2). Les molécules de MA sont associées avec la membrane interne de l'enveloppe virale, les molécules de NC enrobent le génome d'ARN viral pour former la nucléocapside et les molécules de CA s'assemblent pour former la capsid conique entourant la nucléocapside. La p6 joue un rôle dans la relâche des particules virales par bourgeonnement. Les portions SP1 et SP2 jouent un rôle lorsqu'elles sont dans le précurseur Gag non-clivé. La portion SP1 du précurseur Gag, située entre la CA et la NC, est importante pour l'assemblage des particules virales. Selon une étude

récente, la portion SP2, située entre la NC et la p6, serait importante pour déclencher le bourgeonnement de la particule virale nouvellement formée (Gan and Gould 2011).

Le clivage du précurseur polyprotéique Gag-Pol génère les trois enzymes virales, soit la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase en plus de la MA, de la CA, de la SP1 et de la NC qui sont présentes dans la portion Gag du précurseur Gag-Pol. La région de *frameshift* étant localisé en amont de la SP2, Gag-Pol ne génère ni la SP2 ni la p6, mais génère la protéine p6\*. La protéase virale clive les précurseurs polyprotéiques lors de la maturation des particules virales. La transcriptase inverse rétrotranscrit le génome viral d'ARN simple-brin en ADN double-brin. L'intégrase catalyse l'intégration du génome d'ADN proviral dans le génome des cellules infectées. La protéine p6\*, aussi appelée *transframe*, est nécessaire pour la maturation des particules virales par la protéase (Chiu et al. 2006).

Le clivage du précurseur Env produit la SU et la TM. La SU est présente à la surface de l'enveloppe virale et interagit directement avec les récepteurs et co-récepteurs présents sur la cellule cible. La TM traverse l'enveloppe virale et sert à ancrer le complexe SU/TM dans l'enveloppe virale et à catalyser la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire permettant l'entrée du virus dans la cellule-hôte.

Le rôle principal de la protéine régulatrice Tat est de transactiver l'élongation de la transcription des ARNm du VIH-1 (voir détails dans la section 1.2.3.2). Dans le noyau, Tat recrute P-TEFb, un complexe formé par la cycline T1 et la CDK9 (*cyclin-dependent kinase 9*), sur la structure TAR présente à l'extrémité 5' du transcrit viral. Ce recrutement entraîne la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II et une augmentation très importante de la processivité de la transcription du provirus.

Le rôle principal de la protéine régulatrice Rev est de permettre le transport des ARNm viraux partiellement épissés et pleine-longueur du noyau au cytoplasme. Dans le noyau, Rev se lie à une région d'ARN hautement structurée présente sur l'ARNm viral dans la séquence codante pour Env appelée RRE (*Rev-responsive element*). La liaison de Rev au RRE permet aux transcrits tardifs d'utiliser la voie d'exportation nucléaire médiée

par la protéine CRM1 normalement utilisée par les petits ARN nucléaires cellulaires et l'ARN ribosomique (ARNr). Rev retourne ensuite au noyau grâce à son signal de localisation nucléaire, faisant ainsi la navette entre le noyau et le cytoplasme. Plusieurs co-facteurs sont nécessaires pour le fonctionnement de Rev. Par exemple, des hélicases d'ARN (DDX3/DDX1) aideraient à transporter ces longs ARNm viraux (pour les détails, voir Jeang and Yedavalli 2006; Lever and Jeang 2011). Aussi, Rev recrute sur les transcrits portant un RRE l'enzyme PIMT (*peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein with methyl-transferase*) qui hyperméthyle la structure coiffe. Cette coiffe est présente à l'extrémité 5' des ARNm cellulaires et des ARNm du VIH-1. Les informations sur la structure coiffe et son rôle dans la traduction se trouvent dans la section 1.3. La PIMT modifie la structure coiffe m<sup>7</sup>G (7-méthylguanosine) des transcrits en coiffe TMG (triméthylguanosine) (Yedavalli and Jeang 2010). Cette modification facilite la reconnaissance des transcrits tardifs par CRM1 et leur exportation nucléaire. La coiffe TMG augmente aussi spécifiquement la traduction des transcrits viraux qui la porte (pour les détails, voir Yedavalli and Jeang 2010; Lever and Jeang 2011; Yedavalli and Jeang 2011).

La protéine accessoire Vpr est incorporée dans les virions via une interaction avec la portion p6 du précurseur Gag. Vpr stimule faiblement l'expression des gènes sous contrôle du LTR du VIH-1. Vpr induit aussi l'arrêt des cellules à la transition G2/M du cycle cellulaire (voir la section 1.4.2.2). Enfin, elle facilite le transport du PIC vers le noyau. La protéine accessoire Vif protège le génome viral en liant APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide like 3G*), une protéine cellulaire qui peut altérer l'intégrité du génome du VIH-1 en convertissant les guanines (G) en adénines (A). Vif induit la dégradation d'APOBEC3G par le protéasome et l'empêche de s'incorporer dans les particules virales. Une équipe a montré que Vif participe à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, mais cet effet a été observé chez une seule souche virale de laboratoire (Wang et al. 2007; Izumi et al. 2010) (voir la section 1.4.2.2). La protéine accessoire Nef joue un rôle dans la pathogenèse induite par le VIH-1. Elle diminue l'expression des récepteurs CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) à la surface des cellules infectées. La diminution des CMH-1 à la surface des cellules infectées empêche les

lymphocytes T cytotoxiques de les détecter et de les éliminer. La protéine accessoire Vpu a deux rôles principaux. D'abord, elle stimule la relâche des particules virales en antagonisant la tétherine, une protéine cellulaire qui retient les virions complètement formés à la surface des cellules infectées. Elle promeut aussi la dégradation des récepteurs CD4 via la voie ubiquitine/protéasome.

### **1.2.3 La protéine virale Tat**

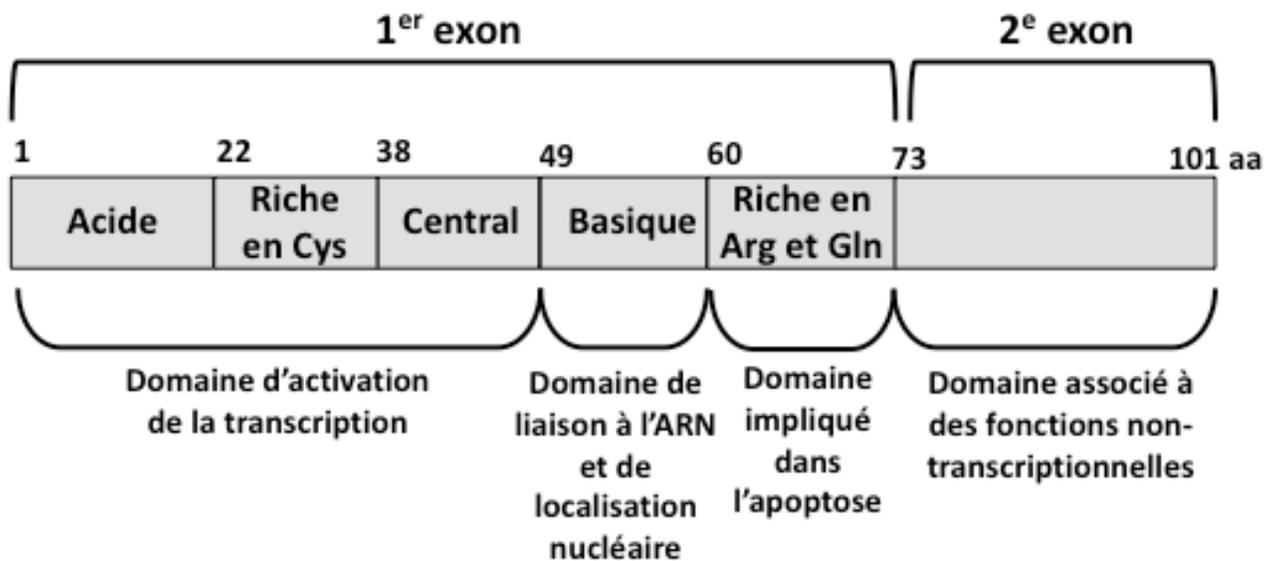
#### **1.2.3.1 Description de la protéine virale Tat**

La protéine virale Tat (14-16 kDa) est une protéine nucléaire essentielle à la réplication du VIH-1 (pour des revues sur Tat, voir Jeang et al. 1999; Karn 1999; Karn 2001; Barboric and Peterlin 2005; Pugliese et al. 2005; Johri et al. 2011). Elle est synthétisée au début du cycle de réplication lors des étapes précoces. Son rôle principal est de transactiver la transcription de l'ADN proviral. Tat est sécrétée par les cellules infectées et peut entrer dans les cellules environnantes. Le gène de Tat contient deux exons situés de part et d'autres de la séquence codante pour Env, la recouvrant même partiellement. Il existe deux isoformes naturelles de Tat, une contenant les deux exons (101 acides aminés) et une contenant uniquement le premier exon (72 acides aminés). L'isoforme de Tat contenant 101 acides aminés (Tat101) est principalement exprimée lors des étapes précoces du cycle de réplication alors que l'isoforme contenant 72 acides aminés (Tat72) est principalement exprimée lors des étapes tardives (Malim et al. 1988). Dans plusieurs souches virales de laboratoire, il existe une forme de Tat101 tronquée en C-terminale contenant 86 acides aminés (Tat86) qui est souvent utilisée dans les études sur le rôle de Tat (Neuveut and Jeang 1996). L'isoforme Tat86 est produite à cause d'une mutation du codon 87 qui le transforme en codon de terminaison. Tat86 n'est pas retrouvée chez les patients infectés par le VIH-1. Cela suggère que les acides aminés 87 à 101 sont importants pour la réplication du VIH-1 (Rana and Jeang 1999).

La protéine Tat peut être divisée en six régions caractérisées par leur contenu en acides aminés, chacune ayant des fonctions spécifiques. Le premier exon est très conservé

**Figure 1- 5 : Schéma des différentes régions de la protéine virale Tat.** La protéine Tat est codée par deux exons. Elle peut être divisée en six régions caractérisées par leur contenu en acides aminés soit la région acide en N-terminale (aa 1 à 21), la région riche en cystéines (aa 22 à 37), la région centrale (aa 38 à 48), la région basique (aa 49 à 59), la région riche en arginines et en glutamines (aa 60 à 72) et la région C-terminale (aa 73 à 101). Chaque région possède des fonctions spécifiques. Pour les détails, voir le texte.

### Régions de Tat:



entre les différentes souches de VIH-1. Il contient la région acide en N-terminale (aa 1 à 21), la région riche en cystéines (aa 22 à 37), la région centrale (aa 38 à 48), la région basique (aa 49 à 59) et la région riche en arginines et en glutamines (aa 60 à 72) (Kuppuswamy et al. 1989) (Figure 1-5). Les trois premières régions de Tat constituent le domaine minimal requis pour l'activation de la transcription (Derse et al. 1991; Tahirov et al. 2010). La région riche en cystéines contient sept cystéines très conservées dont six sont essentielles à la transactivation de la transcription. La mutation d'une seule de ces six cystéines abolit l'activation de la transcription par Tat (Kuppuswamy et al. 1989). La région basique, elle, contient un site de liaison à l'ARN nécessaire pour sa liaison à la structure TAR (revue dans Rana and Jeang 1999). Elle contient aussi un signal de localisation nucléaire (Ruben et al. 1989) et un motif impliqué dans l'internalisation de Tat par les cellules (Chang et al. 1995). La région riche en arginines et en glutamines est impliquée dans l'apoptose induite par Tat dans les cellules T CD4<sup>+</sup> (Campbell et al. 2004). Le deuxième exon contient la portion C-terminale de Tat101 (aa 73 à 101), une région conservée à moins de 50% entre les différentes souches virales. Cette région ne joue pas un rôle important dans l'activation de la transcription (Barillari et al. 1999), mais elle est importante pour des fonctions non-transcriptionnelles de Tat. Elle contient entre autres un motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) impliqué dans l'adhésion de Tat aux cellules.

Des études structurales de cristallographie et de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ont montré que la structure de Tat est très flexible. La protéine Tat native ne possède pas de structure secondaire clairement déterminée (Shojania and O'Neil 2006), ce qui lui permet de s'adapter à plusieurs partenaires différents (voir la section 1.2.3.4). Elle adopte ainsi différentes conformations selon le facteur cellulaire auquel elle se lie (D'Orso and Frankel 2010a; Shojania et al. 2010; Tahirov et al. 2010). Aussi, Tat subit plusieurs modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination. Ces modifications régulent sa dynamique d'interactions avec l'ARN et les facteurs cellulaires (Hetzer et al. 2005). Quelques-unes de ces modifications seront décrites dans la section 1.2.3.2.5.

### **1.2.3.2 Transactivation de la transcription par Tat**

La fonction principale de Tat est de transactiver la transcription des gènes sous le contrôle du promoteur du VIH-1. En absence de Tat, l'élongation de la transcription de l'ARNm viral est inefficace. Dans les lignes qui suivent, je ferai un bref résumé de la transcription. Puis, je décrirai différents mécanismes utilisés par Tat pour transactiver la transcription. Je décrirai ensuite le contrôle de l'activité transcriptionnelle de Tat par des modifications post-traductionnelles.

#### *1.2.3.2.1 Bref résumé de la transcription*

La transcription est une étape-clé de l'expression des gènes qui se déroule dans le noyau (pour une revue sur la transcription, voir Hager et al. 2009). C'est un processus dynamique divisé en plusieurs étapes. D'abord, le promoteur des gènes recrute les facteurs généraux de transcription. Ces facteurs entraînent la formation des complexes de pré-initiation de la transcription. L'ARN polymérase II reconnaît ces complexes et initie la synthèse de l'ARN. Les complexes de polymérase font l'élongation de la transcription. La terminaison, la fixation de la coiffe et la polyadénylation des transcrits sont les dernières étapes de la transcription. Plusieurs mécanismes permettent de contrôler la transcription à court terme et à long terme. Par exemple, la disponibilité des facteurs généraux de transcription contrôle la vitesse d'initiation à court terme. Aussi, les complexes de polymérase en élongation peuvent être arrêtés et réactivés. À long terme, le remodelage de la chromatine par des complexes de remodelage comme le complexe SWI/SNF permet d'ouvrir ou de fermer des portions du génome à l'appareil transcriptionnel. Le complexe SWI/SNF est un complexe essentiel pour réguler la transcription des gènes cellulaires.

#### *1.2.3.2.2 Transactivation de la transcription TAR-dépendante*

Tat agit principalement sur les facteurs cellulaires contrôlant l'élongation par le complexe de l'ARN polymérase II (Figure 1-6) (pour des revues, voir Karn 1999; Karn 2001; Seelamgari et al. 2004; Barboric and Peterlin 2005; Karn and Stoltzfus 2012). Tat interagit directement avec le facteur positif de l'élongation de la transcription P-TEFb

(D'Orso and Frankel 2010a; Tahirov et al. 2010), un facteur-clé de l'élongation. P-TEFb est un complexe kinase cycline-dépendant composé de la kinase CDK9 et de la cycline T1. Tat utilise P-TEFb pour promouvoir une élongation productive du transcrite primaire du VIH-1. Dans le noyau, Tat se lie spécifiquement à la cycline T1. Cette liaison modifie la conformation de Tat et augmente drastiquement son affinité et sa spécificité pour la structure d'ARN TAR. Cette structure TAR est présente à l'extrémité 5' du transcrite primaire du VIH-1 et se retrouve à l'extrémité 5' de tous les ARNm de ce virus. Elle sera décrite dans la section 1.4.1.2. L'interaction entre Tat et TAR nécessite l'intégrité de la région basique de Tat. Tat et la cycline T1 lient coopérativement TAR, recrutant ainsi P-TEFb au niveau de TAR. La liaison de Tat et P-TEFb active alors constitutivement la kinase CDK9 qui hyperphosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II pour augmenter sa processivité. CDK9 phosphoryle aussi le facteur négatif de l'élongation NELF, un facteur qui inhibe l'élongation de la transcription en induisant l'arrêt des complexes de polymérase en élongation. En absence de Tat, NELF lie directement TAR et réprime l'élongation de la transcription. La phosphorylation de NELF par CDK9 dissocie la liaison entre NELF de TAR, l'empêchant d'exercer son effet inhibiteur. Dans la cellule, l'activité de P-TEFb est finement régulée. P-TEFb est séquestré dans un large complexe ribonucléoprotéique appelé complexe 7SK snRNP, ce qui le rend catalytiquement inactif (Figure 1-6). Le complexe 7SK snRNP comprend un ARN appelée ARN 7SK et plusieurs protéines liant cet ARN. Une étude récente montre que le complexe inactif entre P-TEFb et 7SK snRNP est recruté au promoteur du VIH-1 au moment de l'initiation de la transcription (D'Orso and Frankel 2010b). La transcription des ARNm du VIH-1 reste à un niveau basal en absence de Tat puisque le promoteur est lié à un P-TEFb inactif. Tat active l'activité kinase de P-TEFb en détruisant la liaison entre 7SK snRNP et P-TEFb, ce qui s'effectue par compétition avec 7SK snRNP pour la liaison de la cycline T1 du complexe P-TEFb.

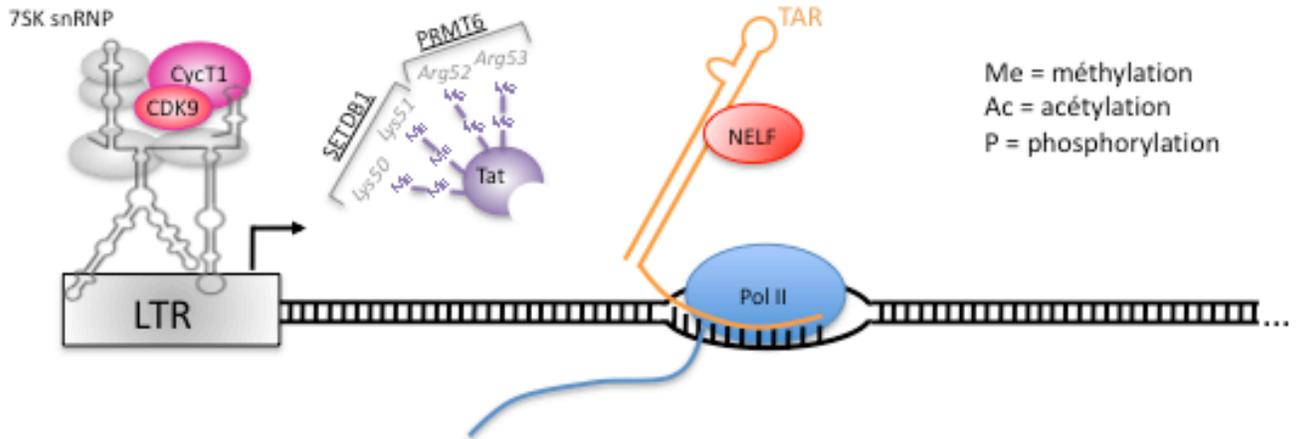
*1.2.3.2.3 Transactivation de la transcription via des facteurs de transcription cellulaires : exemple de NF- $\kappa$ B*

Tat active aussi la transcription de façon TAR-indépendante (Berkhout et al. 1990; Kim and Risser 1993; Dandekar et al. 2004). En effet, Tat stimule l'expression de plusieurs facteurs de transcription. Tat interagit entre autres avec TBP (*TATA binding protein*) (Kashanchi et al. 1994; revue dans Brady and Kashanchi 2005; Raha et al. 2005) et avec les facteurs de transcription SP1 (Jeang et al. 1993) et NF- $\kappa$ B (Yang et al. 1997). Tat peut ainsi activer la transcription à partir du promoteur du VIH-1 qui contient des sites de liaison pour SP1 et NF- $\kappa$ B (voir Figure 1-1). Tat peut aussi activer la transcription à partir de promoteurs cellulaires portant des sites de liaison à SP1 et NF- $\kappa$ B, ce qui lui permet de modifier l'expression de nombreux gènes cellulaires (Gibellini et al. 2002) (pour des détails, voir section 1.2.3.4.1). Tat promeut donc l'assemblage des complexes de pré-initiation de la transcription sur différents promoteurs.

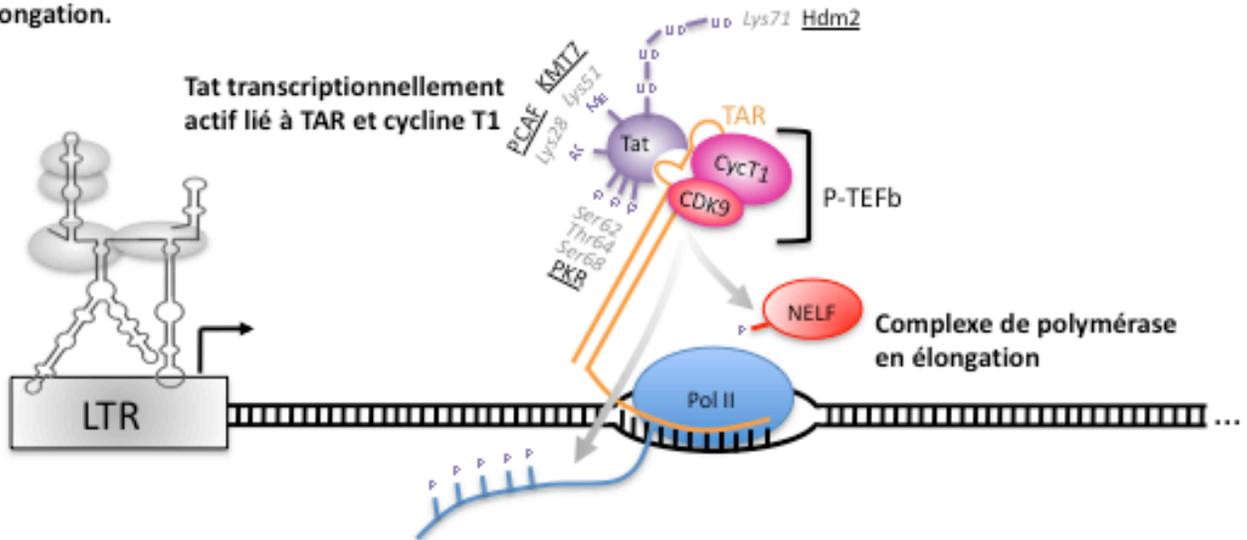
Le promoteur du VIH-1 est lié par des facteurs de transcription cellulaires d'au moins sept grandes familles (Marcello et al. 2004). L'activation de NF- $\kappa$ B est nécessaire pour la transcription du VIH-1 (Alcami et al. 1995). Les autres facteurs de transcription ont un effet modeste (Marcello et al. 2004). Il a été montré que Tat active fortement le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, mais le mécanisme utilisé par Tat est encore sujet à débat. Certains ont observé que Tat stimule NF- $\kappa$ B en altérant l'équilibre redox de la cellule (voir la section 1.2.3.4.3) (Westendorp et al. 1995; Israel and Gougerot-Pocidalo 1997). Ce mécanisme implique les nt 72 à 86 localisés dans la région C-terminale de Tat. D'autres chercheurs proposent que Tat affecte l'activité de NF- $\kappa$ B via l'induction de TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) et de la voie de signalisation induite par le récepteur de TNF- $\alpha$  (Biswas et al. 1995). Enfin, plusieurs études ont observé que Tat induit la phosphorylation et la dégradation d'un inhibiteur de NF- $\kappa$ B appelé I $\kappa$ B- $\alpha$  qui empêche NF- $\kappa$ B d'être importé au noyau (Demarchi et al. 1996; Demarchi et al. 1999; Mahlknecht et al. 2008). Demarchi et al. (1999) suggèrent que la phosphorylation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  dépend de la région basique de Tat et de sa liaison à la kinase modulée par l'ARN double-brin (ARNdb) appelée PKR (la description de PKR est à la section 1.3.3.2.1) alors que Mahlknecht et al. (2008) proposent

**Figure 1- 6 : Schéma de la transactivation de l'élongation de la transcription par Tat et du contrôle de cette transactivation par les modifications post-traductionnelles de Tat (adapté de Ott (2011)).** A) Tat est transcriptionnellement inactive dû à la méthylation par PRMT6 et SETDB1. P-TEFb (cycline T1 et CDK9) est séquestré dans le complexe 7SK snRNP sous forme inactive. TAR est liée à NELF qui réprime l'élongation de la transcription. Le complexe de polymérase est donc arrêté prématurément après avoir débuté l'élongation. B) Tat est phosphorylée par PKR, acétylée par PCAF, méthylée par KMT7 et ubiquitinée par Hdm2, ce qui augmente son affinité pour TAR et pour la cycline T1. Tat est alors transcriptionnellement active et liée à TAR et à la cycline T1. P-TEFb est relâché du 7SK snRNP. CDK9 phosphoryle alors le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Pol II), ce qui augmente sa processivité, et phosphoryle le facteur NELF qui est alors relâché. C) Tat est acétylée par p300/CBP et hGCN5 ce qui induit sa dissociation de TAR et de la cycline T1. Tat est transférée sur le complexe de polymérase en élongation et recrute des facteurs cellulaires dont PCAF et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Le recyclage de Tat nécessite la désacétylation de ses lysines 50 et 51 par la SIRT1. Plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans ce processus sont omis par souci de concision et de clarté. Pour les détails, voir le texte.

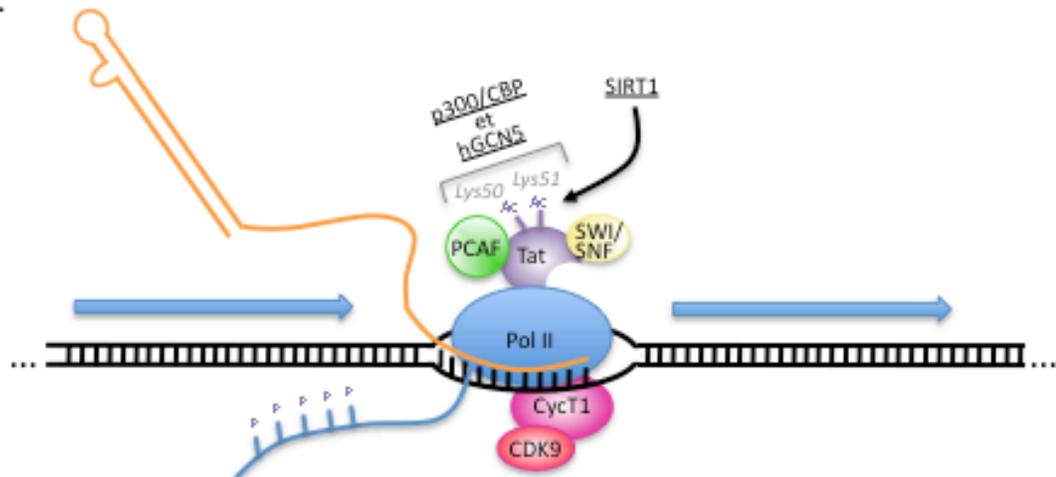
A) Tat est transcriptionnellement inactive. P-TEFb est séquestré par 7SK snRNP. Le complexe de polymérase est arrêté.



B) Tat est transcriptionnellement active et liée à TAR et à cycline T1. Le complexe de polymérase est en élévation.



C) Tat est transférée sur le complexe de polymérase en élévation. Le recyclage de Tat est fait par SIRT1.



qu'elle dépend plutôt des nt 87 à 101 localisés dans la région C-terminale de Tat. Il est probable que ces différents mécanismes sont utilisés dans différents types cellulaires ou dans différentes conditions cellulaires ou même co-existent dans un même type cellulaire.

#### *1.2.3.2.4 Transactivation de la transcription via le remodelage des histones*

Tat stimule aussi l'initiation de la transcription de l'ADN proviral en agissant sur le remodelage de la chromatine. En effet, Tat recrute les acétyltransférases p300/CBP et PCAF sur le promoteur du VIH-1 (pour des revues, voir Marcello et al. 2001; Peruzzi 2006). L'acétylation des histones par p300/CBP et PCAF déstabilise les interactions entre les histones et l'ADN et active la transcription. En recrutant p300/CBP et PCAF sur la région LTR du VIH-1, Tat induit un remodelage de la chromatine et active l'initiation de la transcription du génome du VIH-1. Tat recrute aussi le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF sur le promoteur du VIH-1 (pour une revue, voir Bukrinsky 2006). Tat interagit directement avec BRM et BRG1 qui sont les sous-unités catalytiques du complexe SWI/SNF.

#### *1.2.3.2.5 Contrôle de l'activité transcriptionnelle de Tat par des modifications post-traductionnelles*

Tat subit plusieurs modifications post-traductionnelles qui servent à moduler son rôle dans la transactivation de la transcription du génome du VIH-1 (Figure 1-6) (pour des revues, voir Hetzer et al. 2005; Gatignol 2007; Johri et al. 2011; Ott et al. 2011). D'abord, plusieurs de ces modifications facilitent la liaison de Tat avec TAR et avec la cycline T1 (Figure 1-6 B). La phosphorylation de la sérine 62, de la thréonine 64 et de la sérine 68 par PKR augmente l'affinité de Tat pour TAR (voir aussi la section 1.2.3.3.2). L'acétylation de la lysine 28 par PCAF augmente la force de la liaison entre Tat et cycline T1 ainsi que l'affinité du complexe Tat/cycline T1 pour TAR. L'ubiquitination de lysines dont la lysine 71 par Hdm2 et la monométhylation de la lysine 51 par la méthylase KMT7 permettent d'initier l'interaction entre Tat, cycline T1 et TAR. Au contraire, l'acétylation de Tat par p300/CBP et hGCN5 sur les lysines 50 et 51 entraîne la dissociation de l'interaction entre la cycline T1, Tat et TAR (Figure 1-6 C). Elle induit aussi le transfert de Tat sur le

complexe de polymérase en élongation. La désacétylation de Tat sur la lysine 50 est médiée par la sirtuine SIRT1, une désacétylase de classe III. Cette étape est nécessaire pour recycler Tat et lui permettre de transactiver la transcription à nouveau. En effet, l'acétylation de la lysine 50 nuit à la liaison de Tat à TAR, qui est essentielle dans les premières étapes du cycle de transcription. Enfin, la méthylation des arginines 52 et 53 par PRMT6 ou des lysines 50 et 51 par SETDB1 induit la dissociation de l'interaction entre Tat et le complexe de polymérase en élongation (Figure 1-6 A). D'autres recherches sont nécessaires pour comprendre le rôle, l'ordre et l'importance des différentes modifications post-traductionnelles de Tat lors de la transcription du VIH-1.

### **1.2.3.3 Effet de Tat sur la traduction des protéines du VIH-1**

Dans les lignes qui suivent, je m'intéresserai aux mécanismes utilisés par la protéine virale Tat pour stimuler la traduction des protéines du VIH-1.

#### *1.2.3.3.1 Tat et la région 5'UTR du VIH-1*

La traduction des protéines du VIH-1 est ralentie par la présence de la région 5'UTR qui est longue et qui contient plusieurs structures d'ARN importantes pour la réplication virale (Parkin et al. 1988; SenGupta et al. 1990; Geballe and Gray 1992; Miele et al. 1996; Buck et al. 2001; Charbonneau et al. 2012; Ka et al. 2012). Principalement, la tige-boucle TAR présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits du VIH-1 (voir section 1.4.1.2) bloque l'accessibilité des ARNm, ce qui perturbe la liaison du ribosome lors de l'initiation de la traduction (Parkin et al. 1988). Plusieurs protéines cellulaires comme l'autoantigène La (Chang et al. 1994; Svitkin et al. 1994), la protéine Staufen (Dugre-Brisson et al. 2005), la protéine liant TAR (TRBP) (Dorin et al. 2003) et des hélicases d'ARN comme la RHA (Fujii et al. 2001) lient TAR et atténuent ce blocage, probablement en déstabilisant cette structure directement ou indirectement. Différents groupes ont observé que Tat peut contrecarrer cet effet de TAR dans des cellules en culture (Cullen 1986; Charbonneau et al. 2012), dans des lysats de réticulocytes (SenGupta et al. 1990) et dans les oocytes de *Xenopus* (Braddock et al. 1990). Le mécanisme utilisé par Tat n'est pas

clairement déterminé. Tat pourrait déstabiliser directement la structure TAR en s'y liant. Cependant, il est peu probable que Tat lie TAR dans le cytoplasme puisqu'elle a besoin d'un facteur nucléaire, la cycline T1, pour lier fortement et spécifiquement la structure TAR (pour une revue sur cette question, voir Bannwarth and Gatignol 2005). Dans un article récent de notre groupe, nous proposons que Tat déstabilise indirectement la structure TAR en augmentant l'expression d'une hélicase d'ARN ou d'une autre protéine qui déstabilise TAR (Charbonneau et al. 2012). En effet, Tat induit l'expression de plusieurs protéines cellulaires (voir la section 1.2.3.4.1) dont l'hélicase d'ARN DDX3 (Yedavalli et al. 2004). Aussi, Tat interagit directement avec l'hélicase RHA (Van Duyne et al. 2009) et une étude a montré que la RHA stimule la traduction des ARNm du VIH-1 (Bolinger et al. 2010). L'effet de Tat sur la traduction pourrait donc se faire via la RHA (voir aussi la section 1.4.2.1).

Le fait que Tat contrecarre le blocage physique induit par la présence de TAR reste controversé puisque certaines études n'ont pas observé cet effet de Tat dans des cellules en culture (Chin et al. 1991), dans des lysats de réticulocytes (Svitkin et al. 1994) et dans les oocytes de *Xenopus* (Parkin et al. 1988). Si l'effet de Tat implique un changement dans l'expression de protéines cellulaires, il est normal que l'effet ne soit pas observé dans les lysats de réticulocytes ou dans les oocytes de *Xenopus*. Cependant, nous ne pouvons expliquer les contradictions dans la littérature concernant l'effet de Tat sur le blocage de la traduction causé par TAR dans les cellules en culture.

#### *1.2.3.3.2 Tat et PKR*

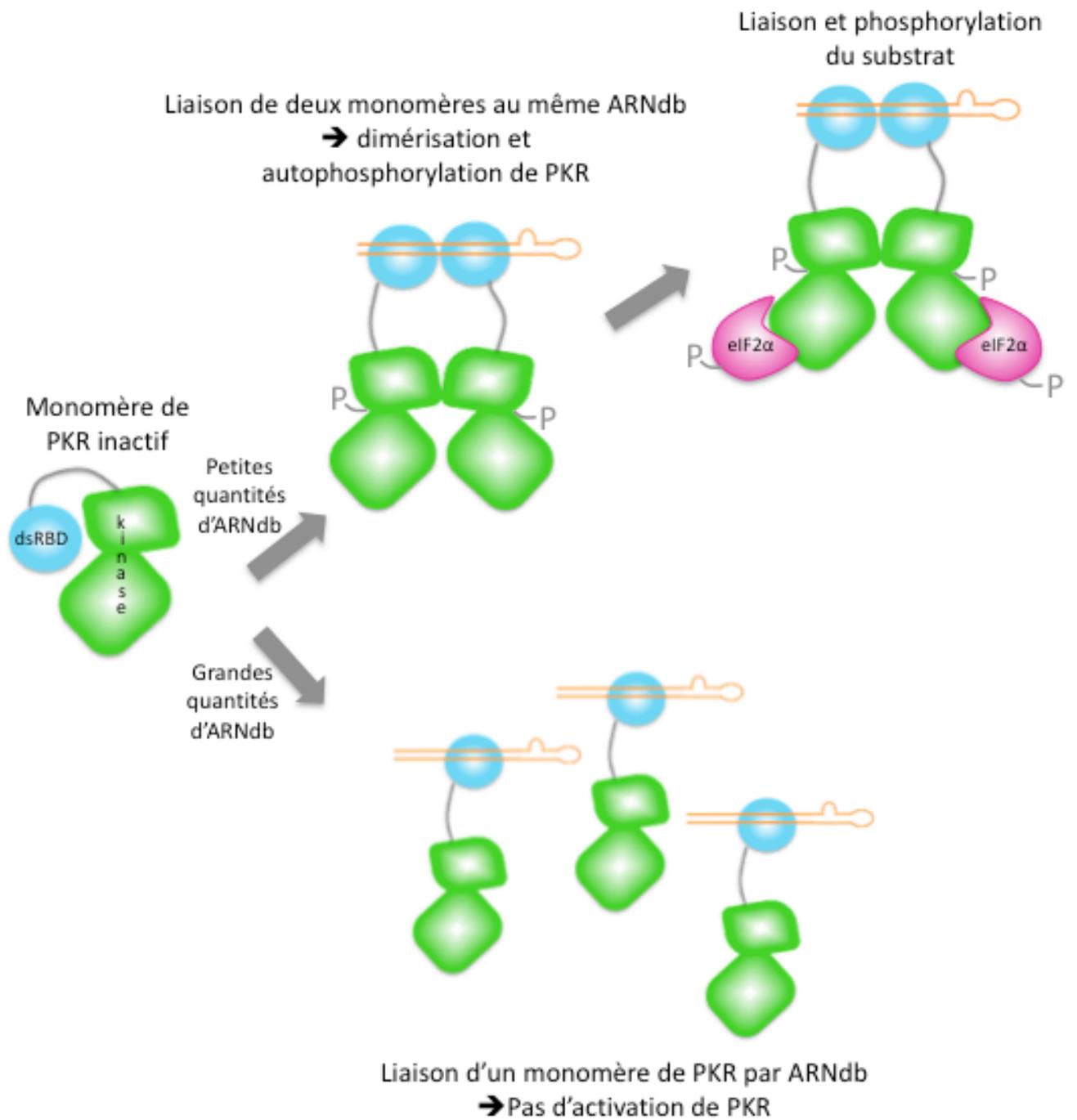
Le blocage de l'initiation de la traduction des ARNm du VIH-1 est aussi dû à l'activation de PKR, la kinase modulée par l'ARNdb (pour des détails sur PKR, voir la section 1.3.3.2.1) (pour une revue, voir Clerzius et al. 2011). Cependant, cet effet est plus faible que celui engendré par le problème d'accessibilité de l'extrémité 5' des ARNm viraux (SenGupta et al. 1990; Geballe and Gray 1992). La présence de petites quantités d'ARNdb comme la tige-boucle TAR entraîne la dimérisation et l'autophosphorylation de PKR (Figure 1-7). Ainsi activée, PKR phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation eIF2 (eIF2 $\alpha$ ), ce qui entraîne une inhibition globale de la synthèse protéique. Le VIH-1

utilisent plusieurs mécanismes pour contrecarrer l'inhibition globale de la traduction coiffe-dépendante induite par PKR (voir la section 1.3.3.2.1). Un de ces mécanismes implique Tat. En effet, les isoformes Tat72 et Tat86 compétitionnent avec eIF2 $\alpha$  pour la liaison à PKR et sont phosphorylées par PKR (Brand et al. 1997; Cai et al. 2000). Elles empêchent ainsi la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'inhibition de la traduction qui s'ensuit. Comme mentionné précédemment, il a été montré que, chez Tat86, cette phosphorylation sur la sérine 62, la thréonine 64 et surtout la sérine 68 augmente l'efficacité et la force de sa liaison à la structure TAR, ce qui stimule la transcription virale (Endo-Munoz et al. 2005). Une autre étude montre que seule l'isoforme Tat86 est phosphorylée par PKR (McMillan et al. 1995). Selon cette étude, Tat72 lie PKR et inhibe directement son autophosphorylation et, par conséquent, son activation. Dans ce cas, Tat72 n'est pas phosphorylée par PKR. Une ou des isoformes de Tat pourrait donc inhiber directement PKR en plus de compétitionner avec eIF2 $\alpha$ , mais cette étude n'a pas encore été confirmée. Enfin, on a longtemps pensé que Tat empêchait TAR d'activer PKR en se liant à cette structure. Cependant, il est peu probable que Tat lie TAR dans le cytoplasme puisqu'elle a besoin de facteurs cellulaires nucléaires comme la cycline T1 pour lier TAR dans le noyau, comme je l'ai dit dans la section précédente.

#### **1.2.3.4 Survol des différents effets de Tat dans les cellules T**

Tat est reconnue pour ses effets pléiotropiques (pour des revues, voir Marcello et al. 2001; Gibellini et al. 2005; Peruzzi 2006; Romani et al. 2010; Johri et al. 2011). En effet, Tat interagit avec une grande variété de protéines cellulaires, ce qui lui permet d'être impliquée dans plusieurs aspects de la biologie cellulaire (Gautier et al. 2009; Van Duyne et al. 2009). Jusqu'à ce jour, on a identifié 775 interactions entre Tat et des protéines cellulaires, dont 219 interactions directes (Ptak et al. 2008). Les différents effets de Tat dans une cellule dépendent du type cellulaire impliqué, de la concentration cellulaire de Tat, de la localisation de Tat et de ses modifications post-traductionnelles. Les effets

**Figure 1- 7 : Schéma de l'activation de PKR (adapté de Hinnebusch (2005)).** PKR est composé d'un domaine N-terminal contenant des sites de liaison à l'ARNdb (dsRBD) et d'un domaine C-terminal, séparé en deux lobes, contenant l'activité kinase. PKR est constitutivement présent sous forme de monomère inactif dû à la présence des dsRBD qui masquent le domaine kinase. En présence de faibles quantités d'ARNdb (exemple : TAR), deux monomères se lient au même ARNdb, ce qui favorise leur dimérisation et leur autophosphorylation. PKR ainsi activé lie son substrat, eIF2 $\alpha$ , et le phosphoryle. En présence de grandes quantités d'ARNdb, chaque monomère de PKR lie un ARNdb, ce qui défavorise leur dimérisation et, par conséquent, leur activation.



peuvent différer si Tat a été synthétisée dans la cellule infectée ou si Tat a été internalisée par une cellule non-infectée. Dans la section suivante, je parlerai brièvement de quelques-uns des effets de Tat, principalement les effets observés dans les cellules T CD4+.

#### *1.2.3.4.1 Effet de Tat sur l'expression de protéines cellulaires*

Tat modifie l'expression de plusieurs protéines cellulaires impliquées dans différentes fonctions dont la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, le cycle cellulaire et la réponse immunitaire (pour des revues, voir Gibellini et al. 2005; Romani et al. 2010). Tat peut agir directement, en se liant au niveau du promoteur des gènes, ou indirectement en interagissant avec des récepteurs cellulaires qui activent des voies de transduction des signaux comme la voie de la kinase phosphatidylinositol-3 (PI-3K), la voie de la kinase AKT aussi appelée protéine kinase B, la voie de la kinase régulée par des signaux extracellulaires (ERK) ou la voie de la kinase c-jun-N-terminale (JNK). À leur tour, ces voies activent des facteurs de transcription, ce qui entraîne une modification de l'expression de plusieurs gènes. Tat peut aussi transactiver la transcription en activant directement des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, tel que mentionné dans la section 1.2.3.2.3.

#### *1.2.3.4.2 Induction et inhibition de l'apoptose par Tat*

Tat joue un rôle à la fois dans l'apoptose et dans la prolifération cellulaire (pour des revues, voir Gibellini et al. 2005; Peruzzi 2006; Romani et al. 2010). Cela peut sembler contradictoire, mais les effets de Tat sur l'apoptose et sur la prolifération cellulaire sont reliés à sa concentration. En effet, lorsque Tat est présente en petites quantités, elle induit la survie et la prolifération cellulaire. Entre autres, Tat lie des récepteurs qui activent des voies de signalisation liées à la survie et à la prolifération des cellules comme la voie AKT et la voie MAPK. Tat augmente aussi l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2. En plus grandes quantités, Tat induit l'apoptose via plusieurs mécanismes différents. Entre autres, elle modifie l'expression de facteurs pro- et anti-apoptotiques de façon à induire l'apoptose. Elle active des kinases dépendantes de la cycline impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Elle induit aussi l'apoptose médiée par la voie Fas/CD95 directement en

liant des récepteurs de mort cellulaire et indirectement en induisant un stress oxydatif (voir la section 1.2.3.4.3). Enfin, Tat déclenche l'apoptose en liant directement la tubuline. Cette liaison stabilise les microtubules et empêche leur dépolymérisation. La cellule étant une entité dynamique, elle a besoin d'une polymérisation et d'une dépolymérisation constante des microtubules. La stabilisation des microtubules par Tat déclenche donc une forte induction de l'apoptose. En résumé, des petites quantités de Tat protègent les cellules nouvellement infectées par le VIH-1 de l'apoptose lors des étapes précoces de l'infection. Au contraire, de grandes quantités de Tat induisent l'apoptose, contribuant ainsi à la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> au fur et à mesure que l'infection progresse.

#### *1.2.3.4.3 Induction du stress oxydatif par Tat*

Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre de l'équilibre redox de la cellule, qui entraîne une accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*). Les ROS causent des dommages à la structure de la cellule, aux membranes et aux lipides, aux protéines et à l'ADN, induisent la relâche de calcium (Ca<sup>2+</sup>) et conduisent éventuellement à la mort cellulaire (pour une revue, voir Valko et al. 2007). Tat joue un rôle dans l'induction d'un stress oxydatif dans plusieurs types cellulaires et par plusieurs mécanismes différents (pour des revues, voir Haughey and Mattson 2002; Pocernich et al. 2005; Romani et al. 2010; Johri et al. 2011). L'induction d'un stress oxydatif par Tat est particulièrement importante chez les neurones et est directement reliée à la neurotoxicité induite par certains sous-types du groupe M du VIH-1 (Price et al. 2006). Dans les neurones, Tat interagit avec des récepteurs neuronaux. Par exemple, elle lie directement le récepteur NMDA et entraîne son activation permanente (Song et al. 2003; Li et al. 2008). Il s'ensuit un influx de Ca<sup>2+</sup> et la mort cellulaire. La cystéine en position 31 est essentielle pour l'activation des récepteurs NMDA par Tat et la neurotoxicité induite par Tat (Li et al. 2008; Mishra et al. 2008). Tat induit aussi un stress oxydatif dans d'autres types cellulaires. Westendorp et al. (1995) ont montré que, dans des cellules HeLa et Jurkat T en culture, Tat86, mais non Tat72, supprime l'expression de la superoxyde dismutase dépendante du manganèse (Mn-SOD), une enzyme mitochondriale qui protège la cellule lors d'un stress

oxydatif. Ensuite, Albini et al. (1998) ont montré que Tat induit un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les monocytes et les macrophages en imitant les  $\beta$ -chémokines, une sous-classe de la grande famille des cytokines. Tat possède un motif Cys-Cys-Phe caractéristique des  $\beta$ -chémokines dans sa région riche en cystéines et sa région centrale. Cela lui permet d'activer les récepteurs de  $\beta$ -chémokines via une interaction directe et d'induire un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules qui portent ce type de récepteurs. Enfin, Manna et Aggarwal (2000) ont montré que Tat entraîne la production de ROS dans les cellules Jurkat T en culture via  $\text{p56}^{\text{lc}}^{\text{k}}$ , une kinase cytoplasmique spécifique aux cellules T et sensible à l'état redox de la cellule. Le stress oxydatif induit par Tat a plusieurs effets chez les cellules T. Il entraîne l'activation de NF- $\kappa$ B (Israel and Gougerot-Pocidal 1997) (voir la section 1.2.3.2.3), il induit l'apoptose par la voie Fas/CD95 et il participe à la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> (Gulow et al. 2005). Aussi, le stress oxydatif stimule l'activité transcriptionnelle de Tat (Kalantari et al. 2008; Washington et al. 2010).

#### 1.2.3.4.4 Effet de Tat sur l'interférence par l'ARN

Les microARN ou ARNmi sont des petits ARN entre 18 et 25 nt qui répriment l'expression des ARNm auxquels ils s'apparient de façon imparfaite (pour des revues sur les ARNmi, voir Zhang et al. 2007; Bartel 2009). Comme l'appariement ne nécessite pas une parfaite complémentarité, un ARNmi peut contrôler l'expression de plusieurs gènes. Si l'appariement est parfait, comme dans le cas des petits ARN interférents (ARNsi; *small interfering RNA*), l'ARNm est dégradé. Les ARNmi cellulaires régulent différents processus biologiques dont la réponse antivirale.

Il a été observé que le VIH-1 modifie le profil d'expression des ARNmi cellulaires dans des cellules HeLa en culture (Yeung et al. 2005). On sait maintenant que la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T est affectée par des ARNmi cellulaires (Huang et al. 2007; Triboulet et al. 2007). De plus, la traduction des ARNm du VIH-1 est diminuée par l'interférence par l'ARN (Qian et al. 2009). Triboulet et al. (2007) ont montré dans des cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) que Tat réprime l'expression d'un ARNmi polycistronique, miR-17/92, et que cette répression est nécessaire pour la réplication du VIH-1. Hayes et al. (2011) ont observé que Tat contribue aux changements

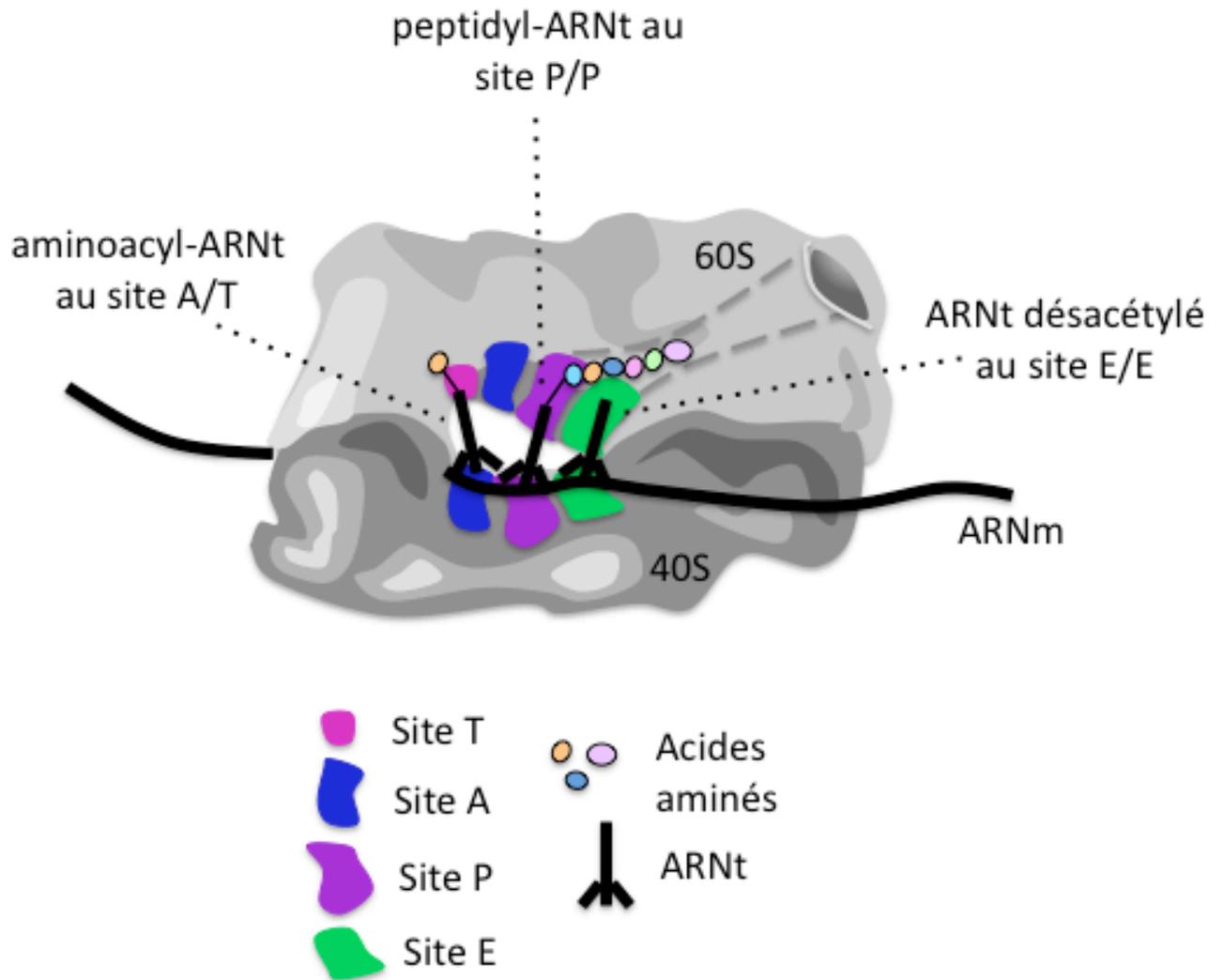
d'expression des ARNmi dans les lymphocytes. Enfin, le VIH-1 produit des ARNmi viraux dont l'ARNmi TAR provenant des courts transcrits avortés lors des étapes précoces du cycle de réplication (voir la section 1.2.2.2 et la Figure 1-3) (pour une revue, voir Narayanan et al. 2011; Schopman et al. 2012). Ces ARNmi viraux peuvent influencer la réplication virale ou l'expression de gènes cellulaires et seraient importants pour l'établissement de la latence.

Actuellement, différentes études concluent que Tat possède une activité suppressive de l'interférence par l'ARN (RSS; *RNA silencing suppressor*) globale (pour une revue, voir Narayanan et al. 2011). Bennasser et al. (2005) ont montré que, dans un RRL, Tat réprime partiellement Dicer, une ribonucléase de type III impliquée dans la maturation des ARNmi. Ils ont aussi montré que l'activité RSS de Tat nécessite sa lysine 51. Bennasser et Jeang (2006) ont ensuite observé que Tat interagit directement avec Dicer dans des cellules HEK293T en culture. Qian et al. (2009), eux, ont montré dans des cellules HeLa-P4 que Tat inhibe l'interférence par l'ARN en amont de la maturation des ARNmi, probablement en séquestrant les ARNmi matures. Cependant, Lin et Cullen (2007) n'ont pas observé d'inhibition de la production ou de l'expression d'ARNmi dans des cellules HEK293T par Tat. Dans la même ligne, Sanghvi et Steel (2011) observent que Tat n'induit pas une inhibition globale de l'interférence par l'ARN, même si certains ARNmi cellulaires nuisent à la réplication du virus dans des cellules en culture. Face à toutes ces contradictions, d'autres études sont absolument nécessaires pour clarifier la présence d'une activité RSS chez Tat.

### **1.3 La traduction chez les eucaryotes**

La traduction est le processus qui permet de synthétiser les protéines. Elle est effectuée par le ribosome, un énorme complexe ribonucléoprotéique (Figure 1-8) (pour une revue, voir Rodnina and Wintermeyer 2009; Ramakrishnan 2011). En bref, le ribosome synthétise les protéines en incorporant un à un les acides aminés en se basant sur l'information

**Figure 1- 8 : Représentation des deux sous-unités du ribosome liés à un ARNm (adapté de Liljas (1999)).** Les sites A, P et E sont représentés sur la petite sous-unité (40S) et la grande sous-unité (60S). Le site T est représenté sur la 60S. Un aminoacyl-ARNt est présent au site d'entrée A/T. Un peptidyl-ARNt est présent au site P/P. Un ARNt désacétylé est présent au site E/E. Le schéma n'est pas à l'échelle.



contenue dans les ARNm. Un ARNm est une chaîne de nucléotides qui débute par une structure coiffe, soit une guanosine méthylée ( $m^7G$ ) liée au premier nt transcrit via un lien 5'-5' triphosphate, et qui se termine par une queue de poly(A). L'ARNm est décodé en triplets de nucléotides appelés codons, en commençant par le codon initiateur (AUG) et en terminant par un des trois codons de terminaison (UAG, UGA ou UAA). La portion d'ARN contenue entre le codon initiateur et le codon de terminaison est appelée séquence codante, cadre de lecture ouvert ou ORF. Chaque codon correspond à un acide aminé particulier. Les ARN de transfert (ARNt) sont les molécules adaptatrices entre les codons et les acides aminés. Chaque ARNt contient un anticodon de trois nucléotides complémentaire d'un codon particulier et porte l'acide aminé correspondant à ce codon. Lorsque l'appariement entre un codon de l'ARNm et un anticodon de l'ARNt est correct, le ribosome incorpore l'acide aminé porté par l'ARNt à la chaîne peptidique en croissance. Je décrirai maintenant les étapes principales de la traduction. Puis je décrirai les deux modes d'initiation caractérisés chez les eucaryotes : le mode coiffe-dépendant et le mode IRES-dépendant.

### 1.3.2 Les étapes de la traduction

Le ribosome est formé de deux sous-unités ribonucléoprotéiques, la petite et la grande (appelée 40S et 60S, respectivement, chez les eucaryotes, d'après leur coefficient de sédimentation). Chaque sous-unité comporte trois sites principaux de liaison aux ARNt : le site A (aminoacyl), le site P (peptidyle) et le site E (sortie ou *exit*) (Figure 1-8). La 60S comporte un site supplémentaire appelé site T. Le site A lie l'aminoacyl-ARNt, donc l'ARNt qui porte un acide aminé venant s'ajouter à la chaîne peptidique. Le site P lie le peptidyl-ARNt, donc l'ARNt qui porte la chaîne peptidique en croissance. Le site E lie l'ARNt désacétylé prêt à quitter le ribosome. Lorsqu'un ARNt est présent au site A de la 40S et au site A de la 60S, on dit qu'il est au site A/A. Dans cette nomenclature, la première lettre correspond au site de la 40S et la seconde lettre au site de la 60S. Un site hybride dit A/T englobant la portion du site A sur la 40S et le site T sur la 60S constitue le site d'entrée des ARNt où se lie un complexe ternaire qui comprend un aminoacyl-ARNt chargé d'un acide aminé et lié au facteur d'élongation eucaryote 1 (eEF1) et à une molécule de GTP. La

traduction d'un ARNm par le ribosome comporte quatre étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Pour chacune des étapes, le ribosome est assisté par plusieurs facteurs cellulaires (pour des revues, voir Kapp and Lorsch 2004; Ehrenberg et al. 2007; Pestova et al. 2007; Taylor et al. 2007).

L'initiation est le processus par lequel le ribosome est assemblé sur l'ARNm au niveau du codon d'initiation avec l'ARNt initiateur portant la méthionine (Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) localisé au site P. En bref, le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> se lie au site P de la 40S pour former le complexe 43S avec plusieurs facteurs d'initiation. Les facteurs d'initiation sont décrits dans la section 1.3.3.1. Ce complexe est recruté sur l'ARNm et balaie l'ARNm jusqu'à ce qu'il rencontre un codon initiateur dans un contexte approprié. La région balayée est appelée région 5' non-traduite (région 5'UTR). La 60S se lie ensuite à la 40S pour former le ribosome (80S) qui peut débiter un cycle d'élongation. Chez les eucaryotes, l'initiation peut être coiffe-dépendante ou IRES-dépendante, c'est-à-dire que la 40S peut se lier au messenger soit au niveau de la coiffe soit au niveau d'un site localisé à l'intérieur du messenger appelé IRES et ces deux modes d'initiation seront décrits en détail dans la section 1.3.3. Lors de l'élongation, le ribosome allonge la chaîne peptidique en suivant les informations contenues dans l'ARNm. D'abord, le complexe ternaire, formé de l'aminoacyl-ARNt lié au facteur d'élongation eEF1 et au GTP, entre dans le site A/T du ribosome, comme indiqué plus haut. Le ribosome vérifie les interactions codon-anticodon. Si la complémentarité est correcte, eEF1 hydrolyse le GTP et quitte le ribosome et l'aminoacyl-ARNt est accommodé au site A/A. Le peptide en croissance est alors immédiatement transféré du peptidyl-ARNt situé au site P/P sur l'acide aminé de l'aminoacyl-ARNt nouvellement accommodé au site A/A avec formation d'un nouveau lien peptidique. Cette réaction est contrôlée par le ribosome. Ensuite, le peptidyl-ARNt allongé d'un acide aminé et l'ARNt désacétylé de la chaîne peptidique sont déplacés respectivement dans les sites P/P et E/E en entraînant le messenger. C'est la translocation qui nécessite l'aide d'un second facteur, eEF2, et l'hydrolyse du GTP. L'ARNt désacétylé est alors expulsé du ribosome. Le ribosome assure la fidélité de la traduction et le maintien du cadre de lecture tout au long de l'élongation. L'étape d'élongation est répétée jusqu'à ce

que le ribosome rencontre un codon de terminaison au niveau de son site A/A. À ce moment, la terminaison a lieu, c'est-à-dire l'arrêt de la traduction. Lorsqu'un codon de terminaison se trouve au site A/A, le facteur de terminaison eucaryote 1 (eRF1) le reconnaît et va occuper ce site. En association avec le facteur de terminaison eucaryote 3 (eRF3), il déclenche l'hydrolyse du lien entre la chaîne peptidique et le peptidyl-ARNt auquel elle est attachée. La protéine nouvellement synthétisée est relâchée. La 60S est dissociée de la 40S liée à l'ARNt et à l'ARNm grâce aux facteurs d'initiation eIF3 et eIF1A (Pisarev et al. 2007). Ensuite, l'ARNt désacétylé au site P est relâché grâce au facteur d'initiation eIF1, ce qui est suivi de la dissociation de l'ARNm et de la 40S grâce à la sous-unité j de eIF3. Le Met-ARNt<sup>Met</sup> se lie alors au site P de la 40S pour former le complexe 43S avec des facteurs d'initiation. La 40S est prête à recommencer un nouveau cycle de traduction.

### 1.3.3 L'initiation de la traduction

La synthèse protéique est principalement régulée au niveau de l'initiation de la traduction, ce qui permet un contrôle rapide et réversible de l'expression des gènes. L'amélioration des connaissances concernant la structure et l'activité des facteurs d'initiation ainsi que leurs interactions avec le ribosome ont permis de mieux comprendre la complexité de l'initiation de la traduction. Dans les lignes qui suivent, je décrirai en détail l'initiation coiffe-dépendante et l'initiation IRES-dépendante ainsi que les mécanismes de régulation de l'initiation de la traduction.

#### 1.3.3.1 L'initiation coiffe-dépendante de la traduction

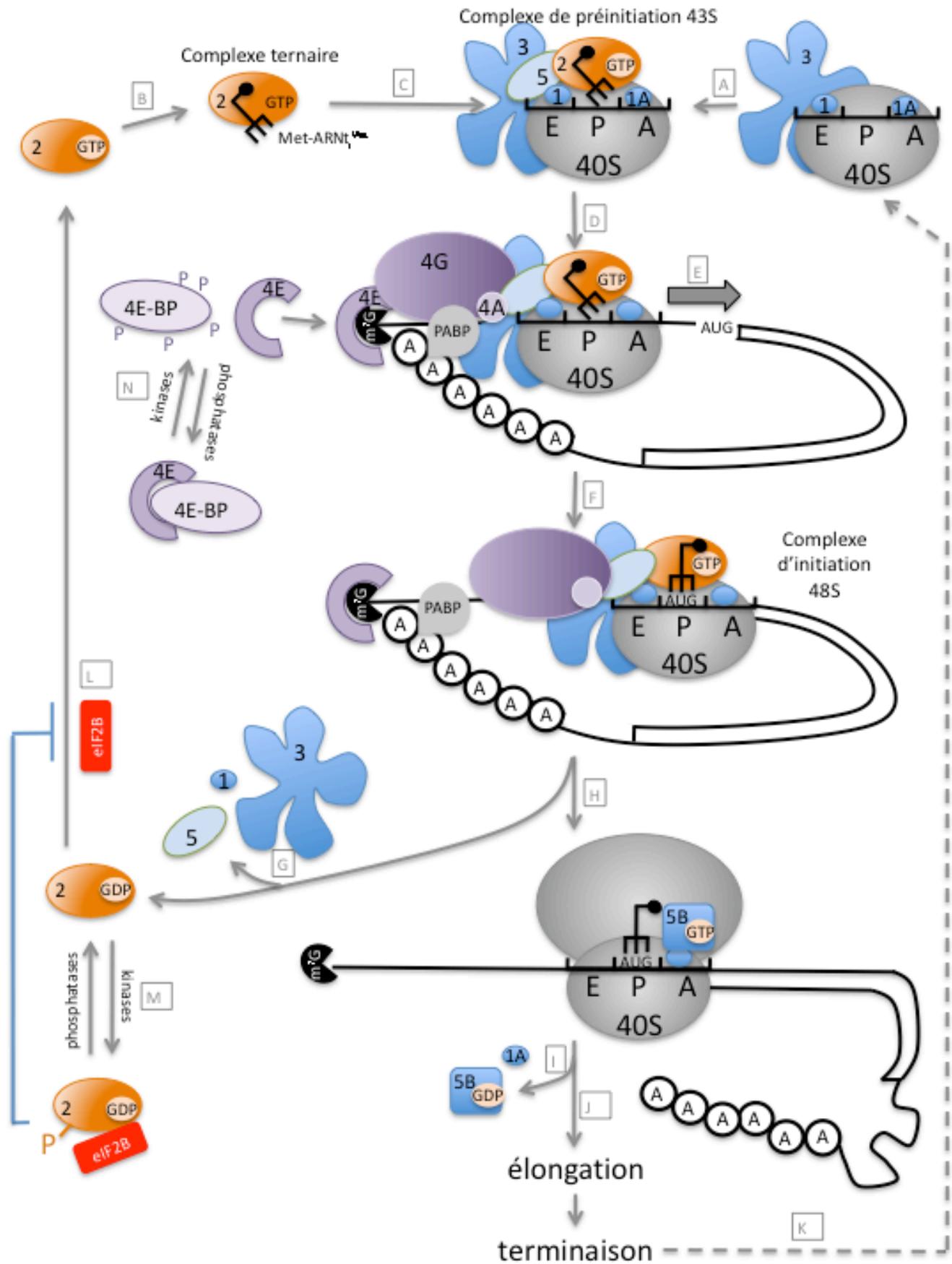
L'initiation de la traduction de la majorité des ARNm cellulaires se fait via le mode coiffe-dépendant, c'est-à-dire que la sous-unité ribosomique 40S se lie à l'extrémité 5' des ARNm, au niveau de la structure coiffe. La liaison de la 40S à la structure coiffe se fait grâce à des facteurs d'initiation eucaryotes appelés eIF (pour une revue, voir Lopez-Lastra et al. 2005; Pestova et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010). L'initiation coiffe-dépendante est représentée à la figure 1-9. Le mécanisme classique de l'initiation coiffe-dépendante débute par la formation du complexe ternaire qui comprend eIF2, du GTP et le Met-ARNt<sup>Met</sup>. Ce complexe ternaire permet de recruter l'ARNt

initiateur au ribosome. Ensuite, il y a formation du complexe de pré-initiation appelé complexe 43S qui comprend la 40S, le complexe ternaire eIF2-GTP/Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> et d'autres facteurs d'initiation incluant eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. eIF3 favorise la liaison du complexe ternaire à la 40S et empêche une réassociation prématurée des sous-unités ribosomiques. Le complexe 43S est recruté au niveau de la structure coiffe de l'ARNm grâce à l'interaction d'eIF3 et d'eIF4G, une large protéine d'échafaudage. Il existe deux isoformes d'eIF4G dans les cellules de mammifères soit eIF4GI et II qui sont identiques à environ 50%. Il semble que ces deux isoformes soient fonctionnellement interchangeables (Prevot et al. 2003). En plus de lier eIF3, eIF4G lie eIF4E, le facteur liant la coiffe, eIF4A, une hélicase d'ARN capable d'hydrolyser l'ATP, et PABP, une protéine liant la queue de poly(A) en plusieurs copies. Le complexe formé par eIF4G, eIF4A et eIF4E est appelé eIF4F. Cette liaison de PABP assure la circularisation de l'ARNm qui est nécessaire pour une initiation efficace (voir plus bas). eIF4A déroule les structures secondaires de l'ARN pour permettre le balayage de la région 5'UTR par le complexe 43S avec hydrolyse d'ATP. Généralement, les messagers cellulaires possèdent une région 5'UTR peu structurée, ce qui facilite le balayage de l'ARNm par le ribosome (Suzuki et al. 2000). Le balayage se fait en direction 5'-3' jusqu'à ce que l'anticodon du Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> reconnaisse le premier codon AUG placé dans le contexte approprié. Le contexte optimal (aussi appelé séquence Kozak) pour favoriser la reconnaissance d'un codon d'initiation chez les eucaryotes supérieurs est GCC(A/G)CCAAUGG avec une purine à la position -3 et une guanine à la position +4. Selon cette nomenclature, le A du AUG est à la position +1. La fidélité de la sélection du codon d'initiation est assurée par eIF1 et eIF1A. Suite à la reconnaissance du codon d'initiation, il y a formation du complexe 48S. Le facteur eIF5 induit l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, ce qui diminue l'affinité d'eIF2 pour le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Le facteur eIF2-GDP quitte la 40S ainsi que plusieurs autres facteurs d'initiation et la 60S vient se joindre à la 40S avec l'aide d'eIF5B et avec hydrolyse d'un GTP. Tous les facteurs qui étaient encore sur la 40S la quittent. Une fois la 80S formée, l'élongation débute.

En plus de la coiffe, la queue de poly(A) présente à l'extrémité 3' des ARNm est importante pour l'initiation. En effet, PABP lie la queue de poly(A) en plusieurs

**Figure 1- 9 : Schéma de l'initiation coiffe-dépendante et des mécanismes de contrôle de cette initiation (adapté de Jackson et al. (2010))**

A) La sous-unité ribosomique 40S est associée avec les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A et eIF3. B) Le facteur d'initiation eIF2 associé au GTP recrute l'ARNt initiateur chargé de la méthionine, Met-ARNt<sup>Met</sup>, pour former le complexe ternaire. C) Le complexe ternaire s'associe à la 40S pour former le complexe de préinitiation 43S. D) Le complexe eIF4F, formé d'eIF4E lié à la coiffe, eIF4G et eIF4A, est attaché à l'ARNm qui est circularisé grâce à PABP qui lie eIF4G et la queue de poly(A). Le complexe 43S les rejoint. E) Le complexe 43S balaie la région 5'UTR de l'ARNm. F) La 40S fait une pause. L'anticodon de l'ARNt initiateur reconnaît le codon initiateur sur l'ARNm. Elle forme alors le complexe d'initiation 48S. G) Suite à l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, plusieurs eIF se détachent de la 40S. H) La 60S, associée à eIF5B-GTP, rejoint la 40S pour former la 80S. I) Suite à l'hydrolyse du GTP lié à eIF5B, les derniers eIF sont libérés du ribosome. J) L'élongation débute et se poursuit jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon de terminaison. K) Suite à la terminaison, les sous-unités ribosomiques sont dissociées et un nouveau cycle de traduction commence. L) Le GDP lié à eIF2 relâché est échangé pour du GTP grâce à eIF2B. M) Lorsque eIF2 est phosphorylé par une kinase, il lie et séquestre eIF2B qui ne peut alors plus échanger le GDP en GTP. La traduction est inhibée. Grâce à des phosphatases qui déphosphorylent eIF2, eIF2B est libéré et la traduction n'est plus inhibée. N) Lorsque que 4E-BP (*4E binding protein*) est hypophosphorylé, il lie et séquestre eIF4E, ce qui inhibe la traduction. Grâce à des kinases qui phosphorylent 4E-BP, eIF4E est libéré et la traduction n'est plus inhibée. Par souci de clarté, certains eIF n'ont pas été représentés et une seule molécule de PABP est dessinée. Pour les détails, voir le texte.



exemplaires et stimule l'initiation de la traduction. Comme indiqué plus haut, PABP permet la circularisation des ARNm. Cette circularisation est nécessaire pour que la synthèse protéique soit efficace. Les mécanismes utilisés par PABP pour stimuler l'initiation ne sont pas clairement définis. Un modèle suggère que la circularisation des ARNm faciliterait le recyclage des ribosomes en permettant à la 40S d'initier un nouveau cycle de traduction presque immédiatement après la terminaison du cycle de traduction précédant grâce à la proximité du lieu de terminaison et du lieu d'initiation.

Il existe des exceptions au mécanisme classique d'initiation coiffe-dépendante (pour une revue, voir Jackson et al. 2007). Le saut de ribosome ou *shunting* permet au ribosome de « sauter » par-dessus de larges portions de la région 5'UTR lors du balayage, laissant les structures secondaires intactes. L'initiation à partir d'un deuxième codon initiateur ou *leaky scanning* permet au ribosome qui balaie l'ARNm de passer outre un premier codon initiateur placé dans un contexte non-optimal pour initier à un codon initiateur en aval placé dans un contexte optimal. La réinitiation est un mécanisme alternatif qui peut se produire lorsqu'un deuxième cadre de lecture est présent sur le même ARNm. Le ribosome initie et termine la traduction du premier cadre de lecture. La 40S reste attachée à l'ARNm et balaie jusqu'au prochain codon initiateur pour initier la traduction du deuxième cadre de lecture. Le ribosome peut aussi initier à certains codons non-AUG (Peabody 1989; Hann 1994). Ces codons non-AUG sont souvent placés en amont du codon AUG initiateur. L'efficacité de l'initiation à un codon non-AUG dépend principalement de la séquence du codon et du contexte qui l'entoure (Hann 1994).

### **1.3.3.2 Le contrôle de l'initiation coiffe-dépendante**

Les mécanismes de régulation de l'initiation peuvent affecter les eIF et donc toute la traduction coiffe-dépendante ou affecter directement l'ARNm en question comme l'interférence par l'ARN (voir la section 1.2.3.4.4). Je ne parlerai ici que des mécanismes qui affectent les eIF. Je décrirai brièvement les deux mécanismes qui sont les plus utilisés et les mieux caractérisés soit ceux affectant la disponibilité d'eIF2 (pour une revue, voir Dever et al. 2007; Ron and Harding 2007) ou d'eIF4F (pour une revue, voir Raught and Gingras 2007).

Après chaque cycle d'initiation, eIF2 est relâché sous forme inactive, lié à du GDP. Un facteur d'échange de guanine (GEF ou eIF2B) est nécessaire pour échanger le GDP lié à eIF2 pour du GTP et permettre un nouveau cycle d'initiation. Ce processus est régulé de façon réversible par la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) au niveau de la sérine 51. eIF2-GTP phosphorylé peut former un complexe ternaire et initier la traduction. Cependant, lorsqu'eIF2-GDP phosphorylé est relâché, il se lie fortement à eIF2B et le séquestre, l'empêchant ainsi de jouer son rôle. La quantité d'eIF2B étant limitante par rapport à la quantité d'eIF2, la phosphorylation d'une petite quantité d'eIF2 $\alpha$  entraîne la séquestration des eIF2B dans un complexe eIF2/eIF2B non-fonctionnel. Il en résulte une inhibition de la synthèse protéique coiffe-dépendante. Il existe quatre kinases régulées par des stress cellulaires qui phosphorylent eIF2 $\alpha$  chez les mammifères : HRI (*heme-regulated kinase*), PKR (*double-stranded RNA modulated kinase*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) et eIF2AK4 (kinase 4 d'eIF2 $\alpha$ ). La kinase HRI est activée par de faible niveau d'hème dans les réticulocytes. La kinase PERK réagit au stress du réticulum endoplasmique. La kinase eIF2AK4 est activée par un manque d'acide aminé. La kinase PKR, principalement activée par la présence d'ARNdb, est impliquée dans la réponse antivirale et sera traitée en détail dans la section 1.3.3.2.1. La déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est contrôlée par deux complexes contenant PP1c, la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1. Le premier complexe est un complexe exprimé constitutivement entre CReP, une sous-unité régulatrice spécifique à eIF2 $\alpha$ , et PP1c. Le second complexe est un complexe activé lors de stress cellulaires entre une sous-unité régulatrice codée par le gène *GADD34* et PP1c.

La formation du complexe liant la structure coiffe, eIF4F (eIF4E, eIF4G et eIF4A), est aussi contrôlée par phosphorylation, principalement par la phosphorylation des protéines liant eIF4E appelées 4E-BP (*4E binding protein*). Les 4E-BP et eIF4G se lient au même site de liaison sur eIF4E. Les 4E-BP hypophosphorylés lient avec une grande affinité eIF4E, bloquant ainsi son association avec eIF4G. La phosphorylation des 4E-BP diminue leur affinité pour eIF4E, le rendant alors disponible pour lier eIF4G et former le complexe

eIF4F. La phosphorylation des 4E-BPs passe par la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une voie de signalisation qui réagit à l'environnement cellulaire et qui permet de contrôler diverses fonctions dont la croissance et la prolifération des cellules (pour une revue sur mTOR, voir Weichhart 2012). Le facteur eIF4E est aussi phosphorylé directement via les kinases MNK (*MAP kinase signal-integrating kinases*) associées avec eIF4G. Le rôle de cette phosphorylation lors de l'initiation de la traduction a été controversé (Proud 2002), mais les preuves s'accumulent en faveur d'une activation de la traduction par cette phosphorylation (Konicek et al. 2011). Enfin, eIF4G est aussi phosphorylé sur plusieurs sites, mais les kinases responsables de ces phosphorylations et leur rôle lors de l'initiation ne sont pas bien connus (Dobrikov et al. 2011).

#### 1.3.3.2.1 PKR, la kinase régulée par l'ARN double-brin (ARNdb)

La protéine cellulaire PKR est une kinase modulée par l'ARNdb (pour des revues, voir Garcia et al. 2006; Pindel and Sadler 2011). Elle est impliquée dans la réponse antivirale induite par les interférons et inhibe la traduction globale des protéines via la phosphorylation d'une des sous-unités de eIF2, eIF2 $\alpha$ . PKR est activée par la présence d'ARNdb dans la cellule, mais aussi par d'autres stimuli dont le stress oxydatif. PKR activée phosphoryle une grande variété de cibles, eIF2 $\alpha$  étant le mieux caractérisé. PKR activée module aussi certaines voies de signalisation en activant des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B. Je m'attarderai uniquement sur le rôle de PKR dans le contrôle de l'initiation de la traduction et son effet lors d'une infection par le VIH-1 (pour une revue sur PKR et le VIH-1, voir Clerzius et al. 2011).

PKR comporte deux domaines soit le domaine N-terminal contenant deux motifs de liaisons à l'ARNdb (*double-stranded RNA binding domain* ou dsRBD) et le domaine kinase en C-terminale qui phosphoryle des résidues de sérine et de thréonine (Figure 1-7). PKR est constitutivement exprimée sous forme inactive en faible quantité. Le modèle actuel pour l'activation de PKR stipule que le domaine kinase de PKR monomérique est masqué par un encombrement stérique causé par les dsRBD. La liaison de l'ARNdb aux dsRBD de PKR entraîne un changement de conformation qui expose le domaine kinase. La liaison de plusieurs molécules de PKR monomériques au même ARNdb facilite leur dimérisation via

le domaine kinase. La dimérisation entraîne l'autophosphorylation en *trans* des PKR dimériques, ce qui stabilise le dimère et active la kinase. Les dimères phosphorylés se dissocient rapidement de l'ARNdb. La liaison de PKR à l'ARNdb est indépendante de la séquence de cet ARN. Il était admis auparavant que l'activation de PKR nécessitait un ARNdb d'au moins 30 paires de bases, mais actuellement, on sait que des ARNdb plus courts dont l'hélice contient des imperfections peuvent aussi activer PKR (Heinicke et al. 2011). De faibles concentrations d'ARNdb activent PKR alors que des concentrations élevées inhibent la kinase. En effet, un rapport ARNdb:PKR de 1:2 favorise la dimérisation et l'activation de PKR. Au contraire, en présence d'un excès d'ARNdb, chaque PKR lie un ARNdb différent, ce qui empêche sa dimérisation (Figure 1-7).

L'activation de PKR est une réponse antivirale des cellules lors de l'infection. Cependant, le VIH-1 se réplique efficacement dans les cellules permissives, ce qui suggère que le virus contrôle l'activité de PKR pour assurer sa réplication. Dans des lignées cellulaires de lymphocytes T, les cellules-cibles du VIH-1, PKR est activée au début de l'infection par le VIH-1 et cette activation décline au fur et à mesure que l'infection progresse. Le VIH-1 utilise plusieurs mécanismes impliquant entre autres la structure d'ARN TAR et la protéine virale Tat pour inhiber PKR (voir plus bas) (pour une revue, voir Clerzius et al. 2011). Des études récentes ont montré que l'activation de PKR lors de la réplication du VIH-1 est aussi bloquée par l'expression de protéines cellulaires comme la TRBP (*TAR binding protein*) et ADAR1 (*adenosine deaminase acting on RNA*). Dans le cadre de cette thèse, je ne m'attarderai pas aux mécanismes d'inhibition de PKR par des protéines cellulaires lors de l'infection par le VIH-1. Je me concentrerai sur le rôle de la structure TAR et de la protéine virale Tat en relation avec PKR. Les descriptions détaillées de TAR et de Tat se trouvent respectivement dans les sections 1.4.1.2 et 1.2.3. La tige-boucle d'ARN TAR présente à l'extrémité 5' de tous les messagers du VIH-1 contient des portions d'ARNdb capables d'interagir avec PKR (Kim et al. 2006). Au début du cycle de réplication virale, TAR est présente en faibles quantités, ce qui active PKR. Plus l'infection progresse, plus la quantité de TAR augmente, entre autres à cause des courts transcrits

avortés contenant TAR produits en absence de Tat (voir la section 1.2.2.2 et la figure 1-3), ce qui empêche l'activation de PKR. La protéine virale Tat joue aussi un rôle pour bloquer l'effet antiviral de PKR (voir la section 1.2.3.3.2). En bref, Tat interfère avec l'inhibition de la traduction induite par PKR en compétitionnant avec eIF2 $\alpha$  pour la liaison à PKR (McMillan et al. 1995; Brand et al. 1997; Cai et al. 2000). Tat empêche ainsi la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'inhibition de la traduction qui s'ensuit.

### **1.3.3.3 L'initiation IRES-dépendante de la traduction**

L'initiation de la traduction de certains ARNm viraux et cellulaires ne dépend pas de la structure coiffée, mais plutôt d'un IRES (Martinez-Salas et al. 2001; Jackson 2005; Lopez-Lastra et al. 2005; Doudna and Sarnow 2007; Martinez-Salas et al. 2008; Balvay et al. 2009; Filbin and Kieft 2009; Fitzgerald and Semler 2009; Pacheco and Martinez-Salas 2010; Hanson et al. 2012). Un IRES est une structure d'ARN capable de recruter directement la sous-unité 40S près de ou directement sur le codon initiateur de façon coiffe-indépendante. La traduction par IRES ne nécessite pas de coiffe, pas de eIF4E et pas ou peu de balayage de l'ARNm par la 40S. Souvent, le fragment N-terminal d'eIF4G qui contient le site de liaison d'eIF4E n'est pas nécessaire. Plusieurs IRES fonctionnent efficacement avec seulement le fragment C-terminal d'eIF4G, qui contient le site de liaison à eIF4A (voir plus loin la section 1.3.3.3.1 dans le paragraphe sur l'IRES du EMCV). La traduction IRES-dépendante permet d'échapper aux mécanismes qui régulent l'initiation coiffe-dépendante puisque les IRES sont fonctionnels même lorsque la traduction coiffe-dépendante est compromise. La traduction IRES-dépendante permet de traduire des ARNm possédant des régions 5'UTR longues et hautement structurées qui seraient difficilement traduits de façon classique, comme c'est le cas de plusieurs ARNm viraux. Il existe une grande diversité d'IRES (Bonnal et al. 2003; Mokrejs et al. 2010). Il n'y a pas de consensus au niveau de la séquence ou des motifs structuraux entre différents IRES sauf parfois entre des IRES de virus apparentés. En général, l'intégrité structurale de l'IRES est importante pour son activité, particulièrement pour les IRES viraux. Le repliement d'un IRES est un processus dynamique. Dans certains cas, l'IRES peut adopter différentes conformations pour moduler son activité en fonction des conditions cellulaires. La structure d'un IRES est

maintenue par des interactions ARN-protéines et/ou ARN-ARN. Des petites délétions, insertions ou substitutions de nucléotides peuvent réduire grandement l'activité d'un IRES, mais peuvent aussi parfois l'augmenter.

Le mécanisme utilisé par les IRES pour initier la traduction varie d'un IRES à l'autre. Certains IRES positionnent directement le codon initiateur du messager au site P de la 40S alors que d'autres recrutent la 40S près du codon initiateur et utilisent un court balayage pour positionner le codon initiateur au site P. Certains IRES peuvent même initier à deux codons d'initiation distincts et entraîner la production de protéines différentes lorsque les codons d'initiation sont situés dans des cadres de lecture différents (Baril and Brakier-Gingras 2005) ou de formes tronquées (Weill et al. 2010) ou allongées (Berlioz and Darlix 1995) d'une même protéine lorsque les codons d'initiation sont situés dans le même cadre de lecture. L'initiation par IRES nécessite habituellement la participation de eIF et est contrôlée par des facteurs cellulaires spécifiques appelés ITAF (*IRES trans-acting factors*) (pour des revues sur les ITAF, voir Fitzgerald and Semler 2009; Pacheco and Martinez-Salas 2010). Certains IRES sont actifs dans un lysat de réticulocytes de lapin (RRL), ce qui signifie qu'ils n'ont pas besoin d'ITAF pour fonctionner. D'autres IRES sont actifs seulement lorsque le RRL est supplémenté avec des extraits cellulaires, ce qui signifie que la présence d'ITAF est nécessaire à leur fonctionnement. Les ITAF sont en général des protéines liant l'ARN capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et ayant d'autres fonctions que leur rôle en tant qu'ITAF. La liste d'ITAF identifiés ne cesse de s'allonger. Parmi les plus fréquemment utilisés, on retrouve l'antigène La, la protéine liant une séquence polypyrimidine (PTB), les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) et la protéine Unr (*upstream of N-ras*). Un ITAF peut être positif, c'est-à-dire stimuler l'activité d'un IRES, ou négatif, c'est-à-dire diminuer l'activité d'un IRES. Le mécanisme via lequel les ITAF affectent le recrutement du ribosome sur un IRES donné n'est pas connu. Une hypothèse est que les ITAF possèdent une activité chaperone qui affecte le repliement de l'IRES pour augmenter ou diminuer son affinité pour le ribosome. Une autre possibilité est que les ITAF font un pont entre l'ARNm et le ribosome. Enfin, les ITAF pourraient favoriser ou défavoriser la liaison de certains eIF avec l'ARNm et/ou le

ribosome. Toutes ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Le fait que les ITAF puissent moduler l'efficacité des IRES permet d'expliquer que l'activité de plusieurs IRES est influencée par les conditions cellulaires. En effet, lorsque l'état de la cellule change, la localisation et la concentration de plusieurs protéines sont modifiées, ce qui peut changer la disponibilité et l'accessibilité des ITAF. Par exemple, un stress cellulaire peut entraîner un changement des modifications post-traductionnelles d'un ITAF, changeant alors sa localisation ou son affinité pour un IRES.

Différentes techniques existent pour identifier un IRES. La technique la plus fréquemment utilisée est la transfection de cellules avec un vecteur bicistronique dans lequel la portion d'ARN susceptible de contenir un IRES est insérée entre deux séquences codantes pour deux protéines différentes de façon à ce que la première protéine soit traduite de façon coiffe-dépendante et que la seconde soit traduite de façon IRES-dépendante. Un vecteur bicistronique souvent utilisé est le vecteur dual-luciférase qui contient la séquence codante de la Renilla luciférase (Rluc) comme premier cistron et la séquence codante de la luciférase de la luciole (Fluc) comme deuxième cistron. La présence d'un IRES est détectée lorsque la seconde protéine est exprimée et que son expression est indépendante de celle de la première. L'activité de l'IRES est évaluée par le rapport de l'expression de la seconde protéine sur l'expression de la première. L'expression des protéines peut être mesurée par immunobuvardage de type Western, mais cette technique est semi-quantitative et n'est pas toujours suffisamment sensible. Lorsque les protéines exprimées sont des enzymes, comme c'est le cas du vecteur dual-luciférase, leur expression peut être évaluée par la mesure de leur activité. Cette technique quantitative est beaucoup plus sensible. Lorsque le rapport entre les deux protéines change, il faut vérifier les variations d'expression des deux protéines individuellement. En effet, le rapport peut varier suite à un changement dans l'activité de l'IRES, ce qui modifie l'expression de la seconde protéine, ou dans l'efficacité de l'initiation coiffe-dépendante, ce qui modifie l'expression de la première protéine. De plus en plus, l'activité de l'IRES est évaluée directement par le rapport de l'expression/activité de la seconde protéine sur les quantités d'ARNm correspondant. Les quantités d'ARNm sont mesurées par RT-PCR quantitative (RT-qPCR), c'est-à-dire une

amplification d'ADN par PCR quantitative (qPCR) effectuée après la rétrotranscription de l'ARNm d'intérêt en ADN.

La technique du vecteur bicistronique exige un contrôle rigoureux. En effet, l'expression de la seconde protéine pourrait provenir d'un ARNm transcrit par un promoteur cryptique en amont de la deuxième séquence codante ou d'un ARNm résultant d'un épissage qui aurait enlever la première séquence codante. La transfection de cellules avec des ARNm bicistroniques transcrits préalablement dans un RRL permet d'éviter ces problèmes, mais cette technique empêche l'interaction entre des protéines nucléaires et l'IRES, ce qui pourrait affecter son activité. En somme, il est important de procéder à plusieurs expériences contrôles avant de conclure à la présence d'un IRES dans une séquence d'ARN (voir Van Eden et al. 2004; et Shatsky et al. 2010). L'immunobuvardage de type Northern est une technique utilisée pour analyser les différentes espèces d'ARN produites dans des cellules transfectées avec un vecteur bicistronique. Cependant, cette technique manque de sensibilité. Van Eden et al. (2004) ont développé une technique rigoureuse basée sur l'interférence par l'ARN (voir la section 1.2.3.4.4) pour détecter la présence de transcrits aberrants dans des cellules transfectées avec un vecteur dual-luciférase. Cette technique consiste à co-transfecter les cellules avec le vecteur dual-luciférase et un vecteur exprimant un ARNsi dirigé contre la séquence codante de la Rluc. Un ARNsi agit comme un ARNmi dont l'appariement est parfait, c'est-à-dire qu'il induit la dégradation de l'ARNm auquel il s'apparie. La Fluc et la Rluc étant localisées sur le même ARNm, leur activité doit être affectée également par la présence de cet ARNsi. Ce contrôle permet de déterminer si la Fluc est exprimée à partir d'un ARNm ne contenant pas la séquence codante de la Rluc, c'est-à-dire à partir d'un transcrit aberrant provenant d'un épissage alternatif ou d'un promoteur cryptique.

La traduction par IRES a été découverte simultanément chez deux picornavirus : le poliovirus (Pelletier and Sonenberg 1988) et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Jang et al. 1988). Depuis, plus de 50 IRES ont été identifiés dans des ARNm viraux et plus de 80 dans des ARNm cellulaires (voir les sections suivantes pour les détails). Il y a

plusieurs différences entre les IRES viraux et les IRES cellulaires tant au niveau de leur structure que de leur mécanisme d'action. Dans les sections suivantes, je parlerai des IRES viraux puis des IRES cellulaires et de la traduction IRES-dépendante chez les rétrovirus.

#### *1.3.3.3.1 Les IRES viraux*

Pour traduire leurs protéines, les virus doivent utiliser les ribosomes cellulaires des cellules qu'ils infectent. Pour combattre les infections virales, la cellule a développé des mécanismes qui inhibent l'initiation coiffe-dépendante de la traduction. L'acquisition d'IRES par les virus au cours de l'évolution leur a permis de traduire leurs protéines malgré l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante déclenchée par la cellule. En général, le fait d'inhiber la traduction coiffe-dépendante favorise la traduction IRES-dépendante, entre autres à cause de la plus grande disponibilité des eIF et des ribosomes. Pour favoriser la traduction des protéines virales, certains virus ont évolué de façon à induire eux-mêmes l'inhibition complète de la synthèse protéique lors de l'infection. Certains virus codent pour une protéase qui clive eIF4G, la protéine d'échafaudage faisant partie du complexe eIF4F. Certaines protéases virales clivent les deux isoformes d'eIF4G soit eIF4GI et eIF4GII (voir section 1.3.3.1), comme celle des picornavirus (Gradi et al. 1998), et d'autres ne clivent qu'une seule des deux isoformes, comme celle de plusieurs rétrovirus (Alvarez et al. 2003). Ce clivage inhibe la traduction coiffe-dépendante, mais les fragments d'eIF4G obtenus sont suffisants pour permettre la traduction IRES-dépendante. D'autres virus entraînent plutôt la déphosphorylation de 4E-BP ou la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  via des mécanismes variés. Il faut noter que les virus qui utilisent exclusivement un IRES n'ont pas besoin d'eIF4E et ont développé des stratégies qui leur permettent de fonctionner même quand eIF2 $\alpha$  est phosphorylé (voir plus loin, dans la section sur l'IRES du VHC). Il existe même des IRES viraux qui fonctionnent sans aucun eIF.

Les IRES ont été identifiés pour la première fois, nous l'avons vu, chez deux picornavirus. L'ARN des picornavirus ne porte pas de coiffe en 5' et possède une région 5'UTR longue (entre 600 à 1200 nt selon les virus) et riche en structures secondaires. En plus, elle contient plusieurs AUG en amont du codon initiateur authentique qui ne sont jamais utilisés comme codon initiateur. Les picornavirus inhibent sévèrement la traduction

coiffe-dépendante, mais cette inhibition n'affecte pas la traduction de leur génome. Toutes ces caractéristiques sont incompatibles avec l'initiation coiffe-dépendante classique d'où l'intérêt pour ces virus d'utiliser un mode alternatif d'initiation. Les picornavirus initient obligatoirement la traduction de leur ARNm de façon IRES-dépendante, ce qui fait de l'IRES une cible intéressante pour développer des agents contre ces virus (pour une revue sur les IRES des picornavirus, voir Martinez-Salas 2008). Suite à la découverte des premiers IRES, des IRES ont été trouvés chez plusieurs virus appartenant à différentes familles dont les flavivirus, les dicistrovirus et les rétrovirus (pour une revue, voir Balvay et al. 2009). Alors que plusieurs virus, comme les picornavirus, doivent utiliser le mode IRES-dépendant pour produire leurs protéines, d'autres virus, comme les rétrovirus, peuvent utiliser les deux modes d'initiation soit coiffe-dépendant et IRES-dépendant. J'en discuterai plus loin.

Il existe différentes façons de classer les IRES viraux. Ici, j'ai utilisé la classification basée sur leur structure proposée par Filbin et Kieft (2009), soit les IRES repliés de façon compacte (exemple : l'IRES de la région intergénique du virus de la paralysie du cricket (CrPV) de la famille des dicistrovirus) (Wilson et al. 2000), les IRES dont la conformation est déployée mais comporte des structures compactes (exemple : l'IRES du virus de l'hépatite C (VHC) de la famille des flavivirus) (Tsukiyama-Kohara et al. 1992) et les IRES dont la conformation est déployée et plutôt flexible (exemple : l'IRES d'EMCV) (Jang et al. 1988) (Figure 1-10). De façon générale, plus la structure d'un IRES viral est compacte, moins il a besoin d'eIF et d'ITAF et, au contraire, plus la structure est déployée, plus l'IRES a besoin d'ITAF. Des études structurales montrent que les IRES de la région intergénique du CrPV, du VHC et du EMCV ont des structures très différentes et des sites de liaison à la 40S différents. Pourtant, ils induisent des changements de conformation similaires chez la 40S. Dans les lignes suivantes, je décrirai ces trois IRES et leur mécanisme d'action pour illustrer un exemple de chaque catégorie. Je décrirai la traduction IRES-dépendante chez les rétrovirus dans les sections 1.3.3.3.3, 1.3.3.3.4 et 1.4.3.

Le CrPV est un virus dont le génome est un ARN simple-brin positif, c'est-à-dire un ARN qui peut être directement traduit par les ribosomes. L'ARN de CrPV porte une protéine liée de façon covalente nommée VPg (*viral protein g*) en 5' et une queue de poly(A) en 3'. Son génome est organisé en deux cadres de lecture appelés ORF1 et ORF2 codant respectivement pour les protéines non-structurales et pour les protéines structurales. Ses deux cadres de lectures sont exprimés grâce à deux IRES indépendants, l'un dans la région 5'UTR et l'autre dans la région intergénique entre les deux cadres de lecture. L'IRES présent dans la région intergénique est particulier, car il peut recruter le ribosome sans eIF, sans ITAF et même sans ARNt initiateur (Figure 1-10). La conformation de cet IRES est très compacte et est formée de trois domaines nommés 1, 2 et 3. Les domaines 1 et 2 interagissent directement avec la 40S et la 60S recrutant ainsi le ribosome sur l'IRES. Le domaine 3 a une conformation très semblable à celle de l'ARNt initiateur, l'ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>, qui se lie habituellement au codon d'initiation au site P (Costantino et al. 2008) et il occupe la place de cet ARNt initiateur au site P. La traduction débute lorsqu'il y a liaison d'un aminoacyl-ARNt au site A du ribosome, qui est occupé par un codon GCU, suivie de la translocation de cet ARNt au site P, catalysée par eEF2. Cette translocation est particulière puisqu'elle se produit sans qu'il y ait eu formation de lien peptidique au préalable et sans ARNt présent au site P (pour les détails sur la translocation lors de l'initiation coiffe-dépendante, voir la section 1.3.2). L'aminocycle-ARNt correspondant au codon suivant vient ensuite occuper le site A et l'élongation se poursuit suivant les règles conventionnelles.

Le VHC est aussi un virus dont le génome est un ARN simple-brin positif. L'ARN du VHC n'est pas coiffé et n'a pas de queue de poly(A). Ses régions 5'UTR et 3'UTR sont très structurées. Aussi, l'ARN du VHC circularise probablement via une interaction indirecte entre ses régions 5'UTR et 3'UTR qui nécessite des facteurs cellulaires encore non-identifiés et cette circularisation stimule la traduction (Brocard et al. 2007). Sa région 5'UTR contient un IRES qui est très bien caractérisé (pour une revue détaillée, voir Fraser and Doudna 2007). La région 5'UTR du VHC est repliée en quatre domaines structuraux majeurs (I, II, III et IV). L'activité IRES est partagée entre les domaines II, III et IV et nécessite les 30 nt en aval du codon initiateur (Figure 1-10). L'IRES du VHC nécessite peu

de eIF pour recruter la 40S soit le complexe ternaire (eIF2-GTP/Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) et eIF3. La 40S s'associe d'abord directement avec l'IRES via une interaction avec des protéines ribosomiques, ce qui change la conformation de la 40S et permet de positionner le codon initiateur directement au site P sans besoin de balayage. Le complexe ternaire et eIF3 sont ensuite recrutés au niveau de la 40S. L'hydrolyse du GTP associé à eIF2 permet ensuite à la 60S de se joindre pour former la 80S. Des analyses biochimiques ont identifié les structures de l'IRES du VHC qui sont impliquées dans la formation du complexe de pré-initiation. En plus de lier directement la 40S, ces structures recrutent eIF3 et le complexe ternaire sur la 40S, stabilisent ces interactions et permettent l'hydrolyse du GTP lié à eIF2. La conformation de l'IRES permet de positionner correctement ces structures pour qu'elles exécutent leur rôle. De plus, il a été montré que l'IRES du VHC peut fonctionner même lorsqu'il n'y a que très peu de complexes ternaires disponibles (Robert et al. 2006). Il utilise alors eIF5B pour amener l'ARNt initiateur au ribosome (Terenin et al. 2008). D'ailleurs, il est important de mentionner que l'IRES de plusieurs virus utilise d'autres facteurs que eIF2 pour amener l'ARNt initiateur aux ribosomes si eIF2 n'est pas disponible (revue dans Komar and Hatzoglou 2011). Ceci signifie que la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , qui empêche la formation du complexe ternaire (eIF2-GTP/Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) et inhibe l'initiation coiffe-dépendante, n'a pas d'effet sur l'initiation IRES-dépendante de ces virus. Diverses protéines cellulaires agissant comme ITAF interagissent avec l'IRES du VHC dont La et PTB. Certains groupes ont montré que La stimule cet IRES (Ali et al. 2000; Costa-Mattioli et al. 2004; Shirasaki et al. 2010). Cependant, Romero et al. (2009) ont montré que le clivage de La par la protéase granzyme H induit la translocation des fragments de La du noyau au cytoplasme où ils inhibent l'IRES du VHC. Le rôle de PTB en tant que stimulateur de l'IRES du VHC est aussi sujet à controverse puisque certains groupes observent une stimulation de l'activité de cet IRES en présence de PTB (Anwar et al. 2000; Gosert et al. 2000) alors que d'autres, non (Tischendorf et al. 2004; Brocard et al. 2007). Des études additionnelles sont absolument requises pour résoudre ces contradictions.

Le virus EMCV possède un génome d'ARN simple-brin positif dont l'extrémité 5' est lié à une protéine VPg et l'extrémité 3' porte une queue de poly(A). Son ARN est

circularisé grâce à des protéines virales qui lient les régions 5'UTR et 3' UTR. L'IRES du EMCV est un des plus efficaces dans du RRL (Borman et al. 1995). La conformation de son IRES est déployée et est divisée en différents domaines (H à L). La séquence riche en pyrimidines située à environ 25 nt en amont du codon initiateur et le motif GNRA (N = A, C, G ou U ; R = A ou G) formant une tétraboucle à l'extrémité d'une tige-boucle dans le domaine I sont deux caractéristiques importantes pour le fonctionnement de cet IRES (Martinez-Salas 2008). La séquence riche en pyrimidines sert de site de liaison à la 43S tandis que le motif GNRA est essentiel pour le repliement correct de cet IRES. Presque tous les eIF classiques sont nécessaires pour que le ribosome s'attache à l'IRES du EMCV à l'exception d'eIF4E, du fragment N-terminal d'eIF4G (portion qui lie eIF4E), d'eIF1 et d'eIF1A (Figure 1-10). Le fragment C-terminal d'eIF4G, incluant le site de liaison à l'hélicase eIF4A, est nécessaire au fonctionnement de cet IRES puisqu'il a besoin d'eIF4A même s'il ne nécessite pas de balayage pour positionner la 40S au niveau du codon d'initiation. La liaison d'eIF4A avec eIF4G sert à augmenter l'affinité de ce dernier pour l'IRES du EMCV et à dérouler localement certaines structures de l'IRES (Kolupaeva et al. 2003). La liaison du complexe eIF4G/eIF4A aux domaines J-K de l'IRES, en amont du codon initiateur, est importante pour recruter la 43S qui s'attache au niveau de la séquence riche en pyrimidines, située immédiatement en aval des domaines J-K-L, ce qui positionne directement le codon initiateur au site P de la 40S, sans qu'un balayage soit nécessaire. Cet IRES utiliserait aussi des ITAF dont PTB et La, qui stabiliseraient sa conformation, mais ils ne sont pas obligatoirement requis pour son fonctionnement.

#### 1.3.3.3.2 Les IRES cellulaires

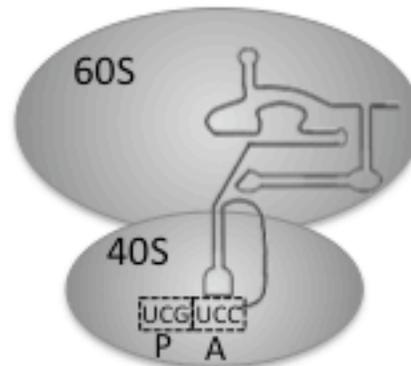
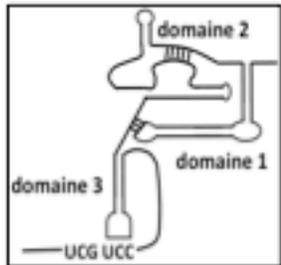
Suite à la découverte des IRES viraux, des IRES cellulaires ont été trouvés dans plusieurs ARNm cellulaires, principalement des ARNm codant pour des protéines exprimées dans des conditions où la traduction coiffe-dépendante est inhibée comme la mitose, l'apoptose, les stress cellulaires, etc (pour des revues sur les IRES cellulaires, voir Holcik et al. 2000; Spriggs et al. 2008; Komar and Hatzoglou 2011). Ils sont principalement situés dans la région 5'UTR, mais il y en a aussi dans certaines séquences codantes. Comme les ARNm cellulaires sont munis d'une coiffe en 5' et polyadénylés en 3', ils peuvent être traduits de façon coiffe-dépendante dans des conditions physiologiques,

même s'ils possèdent un IRES. La diversité des IRES cellulaires étant encore plus grande que celle des IRES viraux, leurs structures et leurs mécanismes d'action sont peu caractérisés. Il n'y a pas de séquence d'ARN commune ni de motif structural défini permettant de prédire l'existence d'un IRES cellulaire. La relation structure-fonction chez les IRES cellulaires est moins rigide que ce qui est observé chez les IRES viraux. En effet, les IRES cellulaires sont souvent fonctionnels même si des structures d'ARN qui entrent dans leur composition sont détruites. Leur activité semble dépendre de courts motifs d'ARN qu'ils contiennent appelés modules et des ITAF avec lesquels ils interagissent plutôt que de leur conformation globale (revue dans Fitzgerald and Semler 2009).

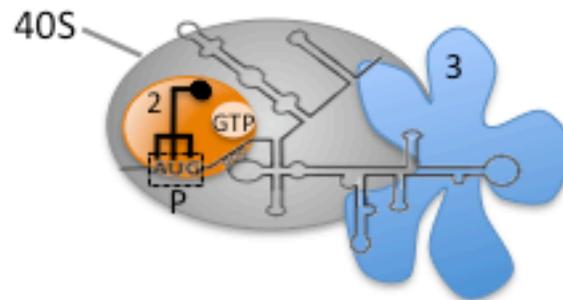
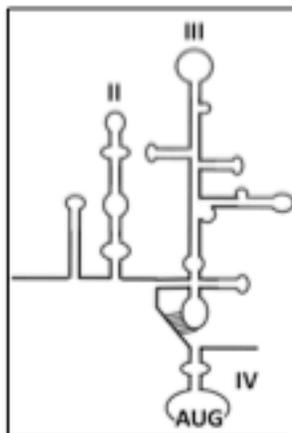
Comme les IRES viraux, la plupart des IRES cellulaires ont besoin d'eIF et d'ITAF pour recruter le ribosome. Les IRES cellulaires peuvent positionner directement le codon initiateur au site P du ribosome ou recruter le ribosome près du codon initiateur et utiliser un court balayage de l'ARNm pour atteindre ce codon. Certains IRES cellulaires utiliseraient un mécanisme similaire à celui utilisé par les procaryotes, impliquant une interaction de type Shine-Dalgarno entre l'IRES et l'ARN ribosomique 18S. Rappelons que chez les procaryotes, la petite sous-unité reconnaît un codon initiateur grâce à une séquence riche en purines située un peu en amont de ce codon. Cette séquence riche en purines, nommée séquence Shine-Dalgarno, est complémentaire d'une séquence riche en pyrimidines située dans l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 16S (pour des détails sur l'initiation chez les procaryotes, voir Malys and McCarthy 2011). La plupart des ARNm cellulaires contenant un IRES sont insensibles ou beaucoup moins sensibles à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Ils utilisent probablement une autre voie pour amener l'ARNt initiateur au ribosome. Cette autre voie pourrait impliquer eIF5B, (Terenin et al. 2008) comme c'est le cas pour l'IRES du VHC (voir plus haut section 1.3.3.3.1), ou d'autres protéines comme la ligatine, l'oncogène MCT-1 ou DENR (*density-regulated protein*) (Skabkin et al. 2010) ou encore eIF2D, un nouveau facteur de livraison d'ARNt (Dmitriev et al. 2010).

**Figure 1- 10 : Schéma des IRES et des eIF nécessaires pour l'activité de l'IRES de la région intergénique du CrPV (adapté de Costantino et al. (2008)), de l'IRES du VHC (adapté de Lukavsky (2009)) et de l'IRES du EMCV (adapté de Fraser et Doudna (2007)).** L'IRES de la région intergénique du CrPV n'a besoin d'aucun eIF classique pour recruter la 40S et la 60S (gris). L'IRES du VHC nécessite le complexe ternaire (eIF2-GTP/Met-ARNt<sup>Met</sup>) (orange) et eIF3 (bleu) pour recruter la 40S. Les domaines II, III et IV de la région 5'UTR formant l'IRES sont identifiés. L'IRES du EMCV nécessite presque tous les eIF classiques sauf eIF4E, le fragment N-terminal d'eIF4G, eIF1 et eIF1A. Les domaines H à L de la région 5'UTR formant l'IRES sont représentés. La séquence riche en pyrimidines est représentée par un rectangle noir et le motif GNRA par un rectangle gris. Le schéma n'est pas à l'échelle et ne représente pas les sites réels de liaison des eIF aux IRES.

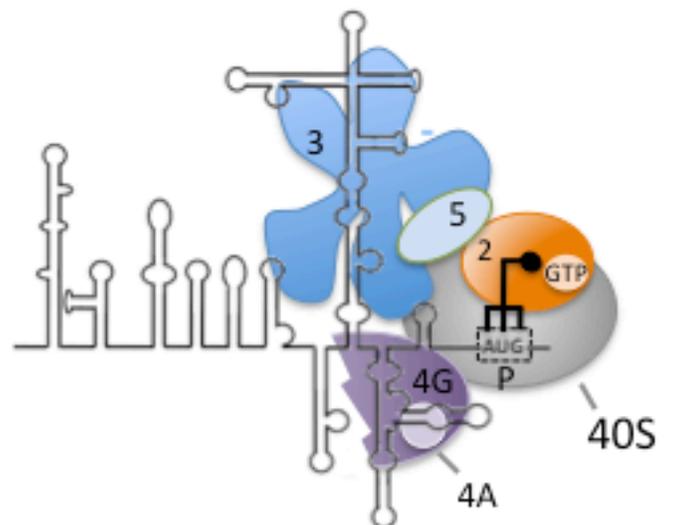
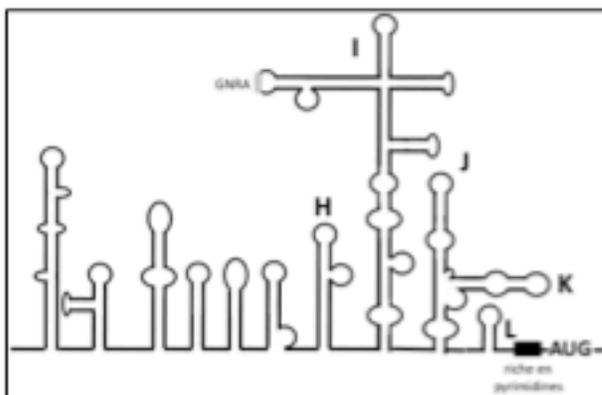
IRES replié de façon compacte  
(ex. région intergénique de CrPV)



IRES de conformation déployée avec des structures compactes  
(ex. VHC)



IRES de conformation déployée  
(ex. EMCV)



En conditions physiologiques, les IRES cellulaires sont typiquement moins efficaces que les IRES de virus qui initient uniquement de façon IRES-dépendante. Cependant, leur efficacité varie beaucoup selon les types cellulaires et surtout selon les conditions cellulaires, principalement à cause des différences dans la disponibilité en ITAF. Certains IRES sont plus actifs dans une condition particulière alors que d'autres restent peu actifs ou inactifs dans cette même condition. Il existe donc plusieurs mécanismes pour contrôler la traduction IRES-dépendante de protéines cellulaires, ce qui permet d'ajuster l'expression des protéines en fonction de l'état de la cellule. Par exemple, la traduction IRES-dépendante est importante pour contrôler la progression du cycle cellulaire (Sachs 2000). En effet, lors de la transition G2/M, la traduction coiffe-dépendante est inhibée par la déphosphorylation d'eIF4E et l'hypophosphorylation de 4E-BP qui empêchent respectivement le fonctionnement et l'assemblage du complexe eIF4F (Bonneau and Sonenberg 1987). Des voies de signalisation entraîneraient alors des changements dans les modifications post-traductionnelles d'ITAF positifs et négatifs, changeant ainsi leur concentration, leur localisation cellulaire, leur activité et/ou leurs interactions. Ces ITAF modulerait à la hausse ou à la baisse l'activité d'IRES exprimant des protéines impliquées dans le cycle cellulaire afin de permettre au cycle de se poursuivre même lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée.

Certaines publications ont mis en doute l'existence de plusieurs IRES cellulaires, prétextant que les expériences n'avaient pas été faites correctement. Dans la majorité des cas controversés, l'activité IRES avait été identifiée avec des vecteurs bicistroniques dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque la traduction coiffe-dépendante prédomine. Il est effectivement difficile d'étudier les IRES cellulaires étant donné la complexité des mécanismes de contrôle de l'expression des gènes. En sélectionnant les types cellulaires et les conditions cellulaires pour tester l'activité de l'IRES et en effectuant les contrôles appropriés (voir la section 1.3.3.3), la plupart des cas controversés ont été réglés, souvent en confirmant la présence d'un IRES fonctionnel en conditions de stress cellulaire. Cependant, des chercheurs ont aussi observé que lorsqu'eIF4E est partiellement inactivé, il est possible de traduire un ARNm cellulaire de façon coiffe-indépendante sans utilisation d'IRES. En effet, il semblerait que le ribosome puisse reconnaître l'extrémité 5'

de certains ARNm sans lier une structure coiffe et qu'il balaierait ensuite l'ARNm jusqu'au premier codon comme lors de l'initiation coiffe-dépendante conventionnelle (Shatsky et al. 2010). Les chercheurs suggèrent que ces messagers utiliseraient une structure spéciale dans l'ARNm nommée CITE (*cap independent translation enhancer*). De telles structures sont utilisées par certains virus à ARN de plantes pour stimuler l'initiation coiffe-indépendante et IRES-indépendante (pour une revue sur les CITE des virus à ARN de plantes, voir Miller et al. 2007). Les CITE connus sont localisés dans la région 3'UTR de l'ARN des virus de plantes, mais la circularisation de cet ARN les amène à proximité de l'extrémité 5' où ils permettent de recruter les eIF et le ribosome. La région 5'UTR de messagers cellulaires pourrait contenir des CITE selon Shatsky et al. (2010).

#### 1.3.3.3.3 La traduction IRES-dépendante chez les rétrovirus

Le premier IRES identifié chez un rétrovirus est celui présent dans la région 5'UTR du virus de la leucémie murine de Friend (F-MuLV) et du virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MuLV) (Berlioz and Darlix 1995; Vagner et al. 1995). Des IRES ont ensuite été identifiés chez d'autres rétrovirus comme le virus du sarcome de Rous (RSV) (Deffaud and Darlix 2000), le virus du sarcome murin Harvey (Berlioz et al. 1995), le virus de la réticuloendothéliose aviaire de type A (REV-A) (Lopez-Lastra et al. 1997), le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) (Vallejos et al. 2010), le virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1) (Attal et al. 1996), le virus de l'immunodéficience féline (VIF) (Camerini et al. 2008), le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) (Ohlmann et al. 2000; Nicholson et al. 2006) et le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (Buck et al. 2001; Brasey et al. 2003) et de type 2 (Herbreteau et al. 2005) (VIH-1 et VIH-2 respectivement) (pour des revues, voir Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2007; Ricci et al. 2008b; Balvay et al. 2009). Dans les paragraphes qui suivent, je décrirai quelques IRES de rétrovirus soit celui du MuLV, du VIF et du VIS. La traduction IRES-dépendante du VIH-2 sera détaillée dans la section 1.3.3.3.4 et celle du VIH-1, dans la section 1.4.3.

Les IRES rétroviraux sont parfois situés dans la région 5'UTR (MuLV, VIF), parfois dans la séquence codante pour Gag (VIH-2) et parfois dans les deux régions (VIH-1

et VIS). La structure des IRES trouvés chez les rétrovirus n'a aucune similarité avec celle d'autres IRES viraux ou cellulaires déjà caractérisés (Weill et al. 2010; Hanson et al. 2012). Chez le VIH-1, le VIH-2 et le VIS, certaines structures secondaires présentes à l'extrémité 5' de la séquence codante pour Gag sont conservées et sont importantes pour le fonctionnement de l'IRES présent dans la séquence codante (Weill et al. 2010). Les structures d'ARN seraient donc impliquées dans le recrutement des complexes d'initiation via ces IRES. La conservation de ces IRES et de leurs structures chez des lentivirus qui évoluent très rapidement suggère fortement que la traduction IRES-dépendante est importante pour leur réplication.

Plusieurs IRES rétroviraux initient à des codons initiateurs alternatifs présents en aval du codon initiateur authentique, ce qui produit des formes tronquées de Gag. Même si leur rôle n'est pas clairement déterminé, des études suggèrent que ces isoformes tronquées en N-terminale jouent un rôle lors de la réplication des virus (voir l'exemple du VIS plus loin, celui du VIH-2 dans la section 1.3.3.3.4 et celui du VIH-1 dans la section 1.4.3) (pour une revue, voir Ricci et al. 2008b). Dans d'autres cas, au contraire, il peut y avoir synthèse d'une forme allongée de Gag, suite à une initiation de la traduction à un codon en amont du codon initiateur authentique (voir l'exemple du MuLV plus loin).

Contrairement à d'autres virus qui utilisent exclusivement la traduction IRES-dépendante, les rétrovirus peuvent initier la traduction de façon coiffe-dépendante. Leurs ARNm contiennent une coiffe en 5' et sont polyadénylés puisqu'ils sont transcrits et maturés de la même façon que les ARNm cellulaires. Ils peuvent donc être comparé aux ARNm cellulaires contenant un IRES dont j'ai parlé plus haut. Leur région 5'UTR est longue et structurée, mais elle ne contient pas d'AUG en amont du véritable codon initiateur. Cependant, elle contient plusieurs codons d'initiation alternatifs, comme CUG, UUG ou GUG, dont certains sont dans un contexte favorable à l'initiation (Yilmaz et al. 2006; Weill et al. 2010). Une hypothèse est que les rétrovirus utilisent les deux modes d'initiation, coiffe-dépendant et IRES-dépendant, selon les conditions cellulaires de façon à favoriser la traduction de leurs protéines et leur réplication. La traduction IRES-dépendante pourrait leur être utile lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée dans les cellules

infectées. En effet, la traduction coiffe-dépendante globale est affectée par des stress cellulaires comme l'infection virale (Yilmaz et al. 2006). Par exemple, plusieurs protéines virales comme Orf-A chez le VIF (Gemeniano et al. 2004) et Vpr chez le VIS (Fletcher et al. 1996), le VIH-1 et le VIH-2 (Jowett et al. 1995; Fletcher et al. 1996) induisent un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M, une phase où la traduction coiffe-dépendante est inhibée (voir section 1.3.3.3.2 et 1.4.2.2). Aussi, les protéases du Mo-MuLV et du VIS clivent eIF4GI et II et celles du VIH-1 et du VIH-2 clivent eIF4GI et PABP (Ventoso et al. 2001; Ohlmann et al. 2002; Prevot et al. 2003; Castello et al. 2009). Un doute existe quant à l'implication du clivage d'eIF4GI et de PABP par la protéase des rétrovirus dans l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante induite lors de la réplication du virus dans des cellules infectées. Le cas du VIH-1 sera discuté en détails dans la section 1.4.2.2.

Comme mentionné précédemment, le premier IRES identifié chez un rétrovirus est celui contenu dans la région 5'UTR du MuLV. Comme tous les rétrovirus, le génome du MuLV contient les gènes *gag*, *pol* et *env*. À partir de l'information contenue dans le gène *gag*, le MuLV synthétise le précurseur des protéines de structure, Pr65<sup>Gag</sup>, et la protéine Gag glycosylée présente à la surface des cellules infectées, Pr75<sup>glyco-Gag</sup> (aussi appelée *Gross cell-surface antigen*) (pour une revue, voir Corbin and Darlix 1996). Les séquences codantes de Pr65<sup>Gag</sup> et Pr75<sup>glyco-Gag</sup> sont situées dans le même cadre de lecture, mais la traduction de Pr65<sup>Gag</sup> débute à un codon AUG alors que celle de Pr75<sup>glyco-Gag</sup> débute à un codon CUG localisé en amont du codon initiateur de Pr65<sup>Gag</sup>. La région 5'UTR du MuLV est longue (environ 600 nt) et formée de plusieurs domaines indépendants très structurés. Berlioz et Darlix (1995) ont montré que les 280 premiers nt du F-MuLV contiennent un IRES qui permet la synthèse de Pr65<sup>Gag</sup> et de Pr75<sup>glyco-Gag</sup>. L'activité de cet IRES est plus élevée dans des cellules murines en culture que dans des cellules humaines, ce qui suggère qu'elle est stimulée par des ITAF spécifiques aux cellules murines. La même année, Vagner et al. (1995) ont montré que la région 5'UTR du Moloney-MuLV (Mo-MuLV) contient un IRES de 126 nt situé entre les codons d'initiation de Pr75<sup>glyco-Gag</sup> et de Pr65<sup>gag</sup>. Dans le cas de Mo-MuLV, Pr65<sup>Gag</sup> est synthétisé de façon IRES-dépendante alors que

Pr75<sup>glyco-Gag</sup> est synthétisé de façon coiffe-dépendante. L'activité de cet IRES requiert une interaction entre PTB et une région riche en pyrimidines contenue dans l'IRES.

Le VIF est un lentivirus qui infecte les chats et qui est utilisé comme modèle non-primate pour étudier le VIH-1 (pour des revues, voir Burkhard and Dean 2003; Elder et al. 2010). Le génome du VIF contient six séquences codantes soit *gag*, *pol*, *env*, *rev*, *vif* et *orf-a* (ou *orf-2*). La région 5'UTR du VIF est longue (environ 400 nt) et structurée (James and Sargueil 2008; Kenyon et al. 2008). Camerini et al. (2008) ont montré qu'elle contient un IRES dormant dont l'activité est très faible dans du RRL et dans des cellules félines en culture dans des conditions physiologiques. Cependant, elle augmente lorsque ces cellules en culture sont soumises à un choc thermique ou sont infectées par le VIF, mais non par le VIH-1. Le mécanisme de cette stimulation n'est pas connu, mais il implique des effets synergiques de gènes cellulaires et de gènes viraux, car l'expression des gènes du VIF individuellement ne stimule pas l'activité de cet IRES. Camerini et al. ont aussi observé que l'IRES du VIF permet l'expression de formes tronquées de Gag en initiant aussi la traduction à l'un des trois codons AUG présents dans la séquence codante. Cependant, le rôle de ces isoformes lors de la réplication du VIF n'est pas encore déterminé. Je mentionnerai plus loin un rôle proposé pour ce type d'isoformes chez le VISmac.

Le premier IRES identifié chez un lentivirus est celui du VIS du macaque (VISmac). Le génome du VISmac contient les gènes *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vif*, *nef*, *tat*, *rev* et *vpx* (Los Alamos National Laboratory 2011) et est similaire à celui du VIH-2. Comme le VIH-1, le VISmac exprime Gag sous forme d'un précurseur polyprotéique, Pr55<sup>Gag</sup>. La région 5'UTR du VISmac est longue (environ 530 nt) et hautement structurée. Ohlmann et al. (2000) ont montré qu'elle contient un IRES qui fonctionne dans du RRL et dans des cellules NIH-3T3 et COS en culture et qui permet la synthèse de Pr55<sup>Gag</sup>. L'activité de l'IRES du VISmac est augmentée par le clivage d'eIF4G dans du RRL et par un traitement à la rapamycine de cellules en culture. La rapamycine est un inhibiteur qui bloque la phosphorylation de 4E-BP, en interférant avec la voie de signalisation mTOR, et inhibe la traduction coiffe-dépendante en permettant la séquestration de eIF4E par 4E-BP (Beretta et al. 1996). Aussi, Nicholson et al. (2006) ont montré que le VISmac contient un autre IRES

localisé entièrement dans la séquence codante de Gag qui permet l'expression d'une isoforme tronquée de Gag appelée p43. La fonction principale de p43 serait d'empêcher le clivage prématuré de Pr55<sup>Gag</sup> par la protéase virale (Nicholson et al. 2007).

#### 1.3.3.3.4 La traduction IRES-dépendante chez le VIH-2

Bien que l'organisation génomique du VIH-1 et du VIH-2 soit similaire, le VIH-2 est plus proche du VIS. Le génome du VIH-2 contient les gènes *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vif*, *nef*, *tat*, *rev* et *vpx* (Los Alamos National Laboratory 2011). Lors de la traduction de son ARN, le VIH-2 produit le précurseur polyprotéique, Pr57<sup>Gag</sup>. Herbreteau et al. (2005) ont montré l'existence de deux isoformes de ce précurseur tronquées en N-terminale soit p50 et p44, dont la synthèse débute à des codons AUG distincts localisés en aval du codon de Pr57<sup>Gag</sup>. Ces deux isoformes peuvent s'associer à Pr57<sup>Gag</sup> et sont assemblées dans les particules virales en production. Lorsque ces deux isoformes ne sont pas produites, la réplication du VIH-2 est presque complètement abolie, ce qui démontre leur importance. Leur fonction précise n'est pas connue, mais on pourrait suggérer qu'elles jouent le même rôle que p43, l'isoforme tronquée du VIS<sub>mac</sub>.

Même si la région 5'UTR du VIH-2 est longue (environ 550 nt) et structurée, aucun IRES n'y a été identifié. Par contre, un IRES a été trouvé dans la séquence codante du VIH-2. Cet IRES permet de synthétiser les deux isoformes tronquées de Gag ainsi que l'isoforme pleine-longueur (voir plus loin). Ricci et al. (2008a) ont proposé que la séquence codante de Gag chez le VIH-2 contient trois différents IRES localisés dans la séquence codante pour Gag, chacun permettant d'initier à un AUG différent. D'autres groupes ont proposé plus récemment que le VIH-2 ne contient qu'un IRES capable d'initier à trois AUG différents en recrutant jusqu'à trois complexes d'initiation simultanément sur le même ARNm (Weill et al. 2010; Locker et al. 2011). Cette hypothèse est corroborée par d'autres études qui ont montré qu'il y a des IRES qui peuvent initier à différents codons d'initiation (Berlioz and Darlix 1995; Baril and Brakier-Gingras 2005). Nous favorisons donc cette seconde hypothèse.

L'IRES du VIH-2 est particulier puisqu'il peut initier à un codon AUG localisé en amont pour produire Pr57<sup>Gag</sup> en plus des deux isoformes tronquées (Weill et al. 2010; Locker et al. 2011). Le mécanisme de cette initiation IRES-dépendante particulière n'est pas connu. Une possibilité est que cette initiation implique un balayage inverse (direction 3' à 5') de l'ARNm, mais ce type de balayage n'a jamais été démontré expérimentalement. Une autre possibilité est que l'IRES peut positionner la 40S directement sur chaque codon d'initiation incluant celui présent en amont. En effet, même si ce codon d'initiation est localisé en amont de l'IRES dans la séquence primaire, il est probable que, dans la structure tertiaire, ce codon est correctement positionné pour que l'IRES puisse y déposer la 40S. Cependant, l'initiation IRES-dépendante à un codon situé en amont est un mécanisme compliqué et inefficace puisque l'IRES est défait lorsque le ribosome traduit la région correspondant à cet IRES.

Locker et al. (2011) ont montré que l'IRES du VIH-2 interagit directement avec la 40S et le facteur eIF3. Par la suite, le complexe eIF3/40S/IRES est distribué à chacun des AUG initiateur, dont celui localisé en amont de l'IRES. Le transfert du complexe eIF3/40S/IRES et l'initiation de la traduction qui s'ensuit nécessiteraient la participation de tous les facteurs d'initiation canoniques sauf eIF1 et eIF4E. Locker et al. ont observé que l'IRES de la séquence codante du VIH-1 peut aussi lier directement la 40S et eIF3, ce qui suggère que le mécanisme utilisé par l'IRES du VIH-2 est conservé chez le VIH-1. Ricci et al. (2008a) ont montré que Gag régule la traduction de ses isoformes en influençant l'utilisation des différents AUG selon sa concentration. L'initiation au premier AUG est inhibée par une faible concentration de Gag, alors que l'initiation au deuxième et au troisième AUG est inhibée seulement en présence d'une concentration élevée de Gag. Les auteurs proposent que les ribosomes initient d'abord au premier AUG pour produire le précurseur Gag pleine-longueur. Cette traduction pourrait être coiffe-dépendante ou IRES-dépendante. Pr57<sup>Gag</sup> se lierait ensuite à la région 5'UTR bloquant ainsi l'accessibilité de cette région par encombrement stérique. À ce moment, la traduction IRES-dépendante des isoformes tronquées dominerait. Lorsque la quantité de Gag est suffisamment grande, la traduction serait arrêtée par l'accumulation de Gag sur l'ARNm. Ce mécanisme permettrait

de déterminer la fin de la synthèse protéique de l'ARNm pleine-longueur et le début de l'encapsidation et de l'assemblage des particules virales (voir dans la section 1.4.1.1).

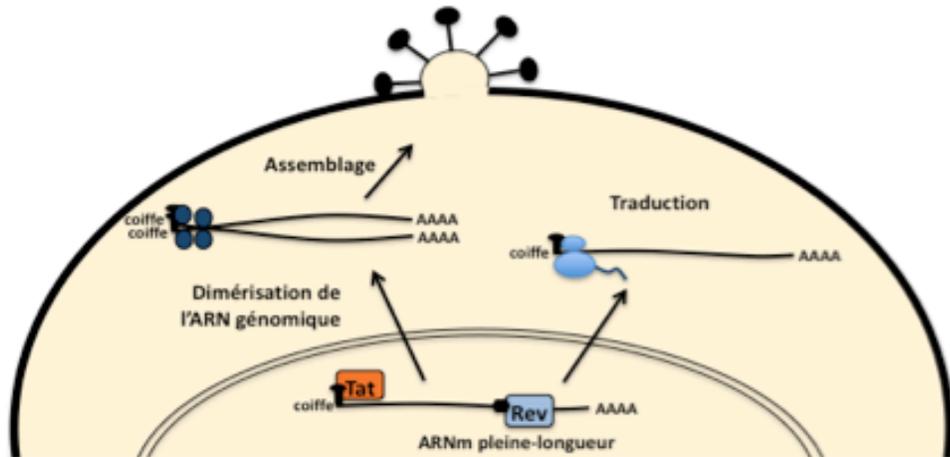
## **1.4 La traduction des protéines de structure et des enzymes du VIH-1**

### **1.4.1 L'ARN pleine-longueur du VIH-1 et sa région 5' non-traduite (région 5'UTR)**

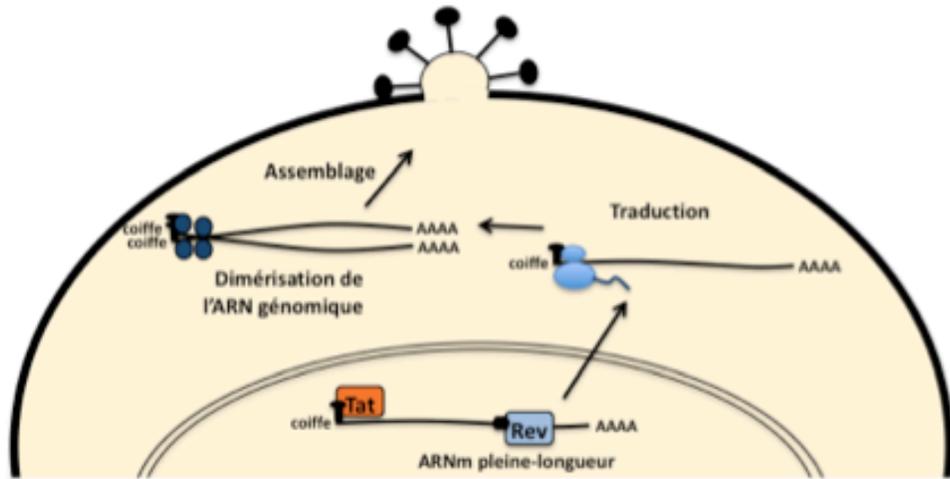
#### **1.4.1.1 L'ARN pleine-longueur du VIH-1**

L'ARN pleine-longueur du VIH-1 joue plusieurs rôles dans la réplication virale (pour une revue, voir Butsch and Boris-Lawrie 2002). Dans le noyau, cet ARNm sert de transcrit primaire qui peut être épissé par le spliceosome pour produire les différentes espèces d'ARNm du VIH-1 (Figure 1-4). Dans le cytoplasme, il sert à la fois d'ARNm pour traduire les protéines de structure et les enzymes du virus et d'ARN génomique encapsidé dans les nouvelles particules virales (pour des détails, voir la section 1.2.2). La relation entre ces deux fonctions de l'ARN pleine-longueur a été étudiée chez plusieurs rétrovirus (Figure 1-11). Chez MuLV, il semble qu'il existe deux pools indépendants d'ARN pleine-longueur, soit un pool spécialisé pour la traduction des précurseurs Gag et Gag-Pol et un pool spécialisé pour l'encapsidation (Levin et al. 1974; Levin and Rosenak 1976; Messer et al. 1981). Chez le VIH-2, l'ARN pleine-longueur encapsidé a obligatoirement été traduit. Kaye et Lever (1998) proposent que l'encapsidation se fait de façon co-traductionnelle alors que Ricci (2008a) suggèrent que l'encapsidation se fait suite à la traduction de l'ARNm pleine-longueur (voir plus haut la section 1.3.3.3.4). Chez le VIH-1, le même ARN pleine-longueur peut être traduit ou être encapsidé de façon interchangeable (Butsch and Boris-Lawrie 2000). L'utilisation d'inhibiteurs de la traduction (Butsch and Boris-Lawrie 2000) et d'ARN pleine-longueur incapable de synthétiser Pr55<sup>Gag</sup> (McBride et al. 1997) ont permis de montrer que, chez le VIH-1, l'ARN pleine-longueur peut être

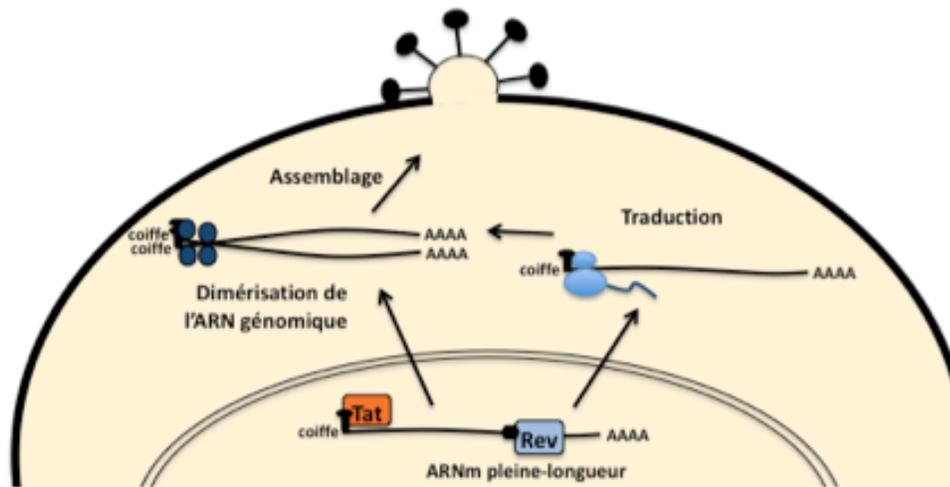
**Figure 1- 11 : Schéma de la relation entre la traduction et l'encapsidation de l'ARN pleine-longueur A) chez le MuLV, B) chez le VIH-2 et C) chez le VIH-1 (adapté de Butsch et Boris-Lawrie (2002)).** Chez MuLV, il existe deux pools indépendants d'ARN pleine-longueur, soit un pool spécialisé pour la traduction et un pool spécialisé pour l'encapsidation. Chez le VIH-2, l'ARN pleine-longueur encapsidé a obligatoirement été traduit. Chez le VIH-1, l'ARN pleine-longueur peut être encapsidé sans avoir été traduit préalablement, mais sa traduction favorise son encapsidation.



MuLV



VIH-2



VIH-1

encapsidé même s'il n'a pas été traduit. Cependant, il semble que la traduction de l'ARN pleine-longueur favorise grandement l'encapsidation de l'ARN pleine-longueur (Liang et al. 2002; Poon et al. 2002).

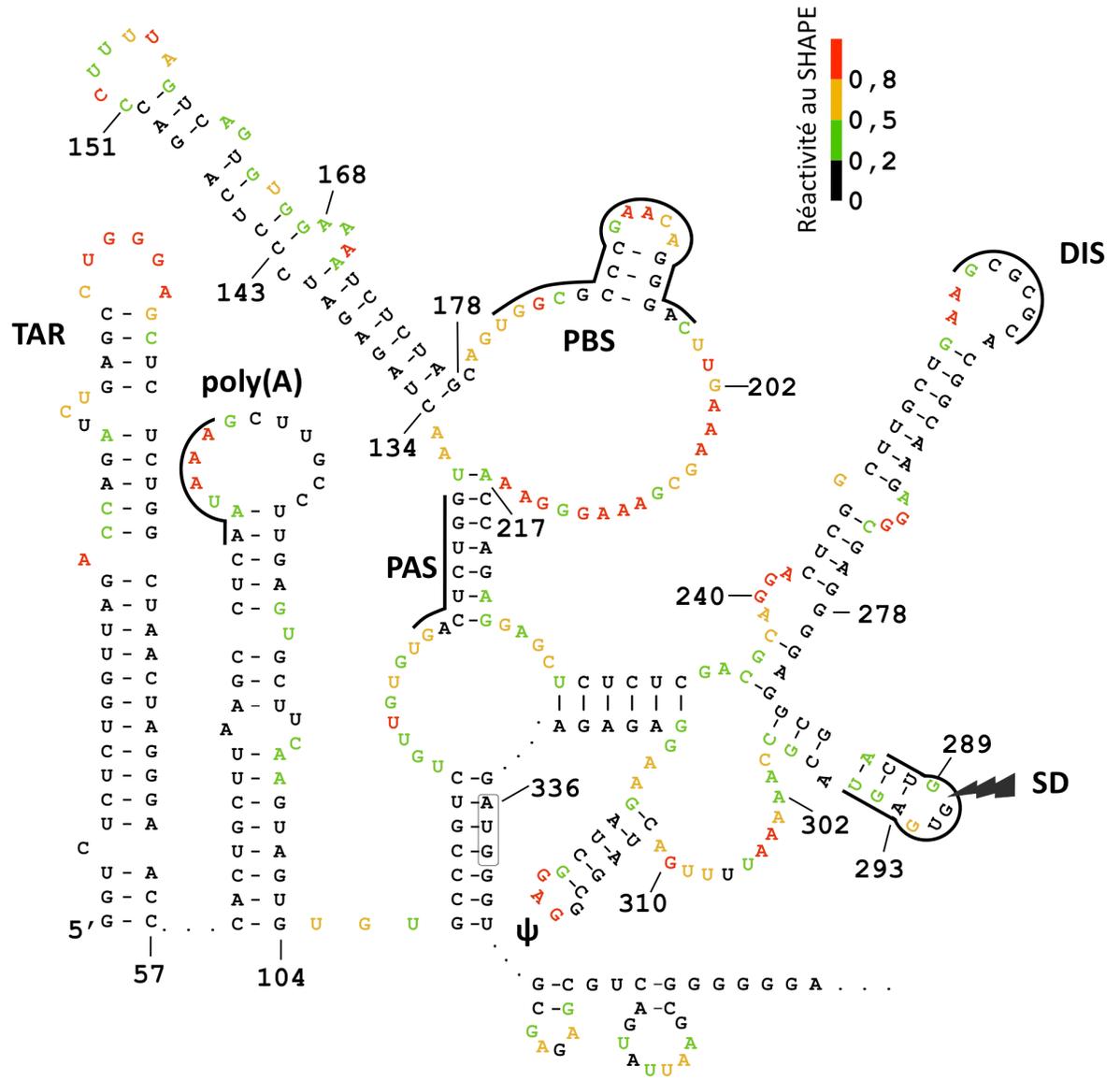
Une étude récente propose que la protéine cellulaire Staufen servirait d'interrupteur moléculaire pour arrêter la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 et favoriser son encapsidation (Abrahamyan et al. 2010). Au cours de l'infection, il se forme des particules spécifiques contenant l'ARN pleine-longueur, la protéine cellulaire Staufen et Gag (Abrahamyan et al. 2010). Ces particules, nommées SHRNP (*Staufen1 HIV-1-dependent ribonucleoprotein*), qui sont en équilibre avec les polysomes synthétisant Gag, seraient importantes pour l'encapsidation de l'ARN pleine-longueur et la formation subséquente des particules virales. La formation des SHRNP est favorisée lors d'un stress oxydatif, ce qui se produit lors de l'infection par le VIH-1.

#### **1.4.1.2 La région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1**

La région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 est la région la plus conservée de tout le génome du VIH-1 (pour une revue, voir Berkhout 1996). Comme le VIH-1 est un virus qui mute facilement, ce fait démontre l'importance de cette région pour la réplication virale. La région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur (335 nt) contient plusieurs structures impliquées dans différentes étapes de la réplication virale. La figure 1-12 montre ces structures dans la conformation de la région 5'UTR proposée par le groupe de Weeks (voir plus bas pour les détails sur cette conformation) (Wilkinson et al. 2008). Elle contient la structure TAR (nt 1 à 57), la tige-boucle poly(A) (nt 58 à 104), le signal d'activation de l'amorce PAS (nt 123 à 130), le site de liaison de l'amorce PBS (nt 182 à 199), le signal d'initiation de dimérisation DIS (nt 257 à 262), le site donneur majeur d'épissage SD (nt 287 à 295) et le signal d'encapsidation  $\psi$  (nt 312 à 325). Le codon d'initiation de Pr55<sup>Gag</sup> est localisé aux nt 336 à 338. Les nt correspondent à la localisation de ces régions dans la région 5'UTR du variant viral LAI qui est le variant que j'ai utilisé dans mes études. Notons que la structure TAR et la tige-boucle poly(A) sont aussi présentes à l'extrémité 3' de la région 3'UTR des transcrits viraux.

La structure TAR est une tige-boucle très stable de 57 nt coiffée par une boucle de six nt et portant une excroissance (ou *bulge*) de trois pyrimidines hautement conservées. TAR a été beaucoup étudiée puisqu'elle est essentielle pour le VIH-1. Des mutations affectant la séquence ou la structure de TAR présente à l'extrémité 5' ou à l'extrémité 3' des messagers diminuent grandement la réplication virale (Klaver and Berkhout 1994; Das et al. 1998). La fonction principale de TAR est sa participation à la transactivation de l'élongation de la transcription à partir du promoteur viral. Comme je l'ai indiqué plus haut, elle lie la protéine virale Tat et la protéine nucléaire cycline T1 (voir section 1.2.3.2.2) (pour une revue, voir Rana and Jeang 1999). L'excroissance de trois pyrimidines interagit directement avec Tat alors que la boucle de six nt permet la liaison de la cycline T1 de façon Tat-dépendante (Wei et al. 1998). En plus de stimuler la transcription, TAR affecte la traduction des messagers viraux (voir section 1.2.3.3) (Bannwarth and Gatignol 2005; Charbonneau et al. 2012) et produit des ARNm (Narayanan et al. 2011). Immédiatement en aval de TAR se trouve la tige-boucle poly(A) qui contient le signal de polyadénylation AAUAAA. Ce signal est inactif lorsque poly(A) est localisée en 5' et actif lorsqu'elle est localisée en 3'. La stabilisation ou la déstabilisation de cette tige-boucle entraîne de graves problèmes de réplication chez le VIH-1 (Das et al. 1997). Le PBS est le site sur lequel s'hybride l'amorce pour la transcription inverse soit l'ARNt<sup>Lys3</sup> cellulaire. Le motif PBS est exposé dans une grande boucle afin de permettre la liaison de l'amorce. Le PAS est important pour l'initiation de la transcription inverse et stimule l'usage de l'ARNt<sup>Lys3</sup> en tant qu'amorce (Beerens et al. 2001). Le DIS est une tige-boucle coiffée d'une boucle de six nt qui peut s'apparier avec la boucle du DIS d'une autre molécule d'ARN. Cette interaction boucle-boucle appelée *kissing-loop* initie la dimérisation de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 qui joue alors son rôle d'ARN génomique. Cette dimérisation est nécessaire pour qu'il y ait encapsidation. Le SD est un motif de neuf nt, CUG|GUGAGU, où la barre verticale indique le site de coupure. Il est localisé dans la partie supérieure d'une courte tige-boucle. Il s'agit du site donneur majeur d'épissage, ce qui signifie que tous les transcrits du VIH-1 sont clivés à cet endroit par le spliceosome sauf l'ARN pleine-longueur. Tous les transcrits du VIH-1 partagent donc les mêmes premiers 289 nt soit

**Figure 1- 12 : Schéma de la conformation de Weeks de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 adaptée de Wilkinson et al. (2008).** Les structures TAR, poly(A), PAS, PBS, DIS, SD et  $\psi$  ainsi que le codon initiateur AUG sont indiquées. La réactivité SHAPE est indiquée par un code de couleurs : noir = nt apparié pour former des structures secondaires d'ARN; jaune ou rouge = nt très réactif et donc exposé ; vert = nt faiblement réactif.



jusqu'au site de clivage contenu dans le SD. À partir de ce site, la région 5'UTR des transcrits viraux diffère. La tige-boucle  $\psi$  est requise pour encapsider l'ARN génomique dans les nouvelles particules virales via une interaction avec la portion NC du précurseur Gag. Le fait que  $\psi$  soit localisée en aval du SD permet de distinguer l'ARN génomique à encapsider des ARNm épissés qui ne possèdent pas cette tige-boucle. Enfin, le codon d'initiation est dissimulé dans une tige formée par une interaction longue distance entre des nt localisés en aval de la tige-boucle poly(A) et ce codon ainsi que les nt le précédant et le suivant.

Plusieurs modèles pour la structure de la région 5'UTR du VIH-1 avaient été proposés, à partir des données phylogénétiques, d'expériences de réactivités chimiques et d'études de mutagenèse (voir Wilkinson et al. 2008). Je parlerai brièvement des modèles proposés par Huthoff et Berkhout (2001b), par Damgaard et al. (2004) et par Watts et al. (2009) (Figure 1-13). En 2001, Huthoff et Berkhout ont étudié le repliement des 290 premiers nt formant la région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 par des analyses informatiques avec l'algorithme classique Mfold (Mathews et al. 1999; Zuker 2003) et des expériences de réactivités chimiques. Leurs analyses ont révélé l'existence de deux conformations de la région 5'UTR dans du RRL soit une conformation comportant plusieurs tige-boucles appelée BMH (*branched multiple hairpin*) et une conformation formée par des interactions entre des régions éloignées appelée LDI (*long-distance interaction*) (Huthoff and Berkhout 2001b). Ces deux conformations sont mutuellement exclusives et ne migrent pas à la même vitesse sur un gel d'électrophorèse non-dénaturant. Dans la conformation BMH, les différentes structures régulatrices de la région 5'UTR sont formées et exposées. La conformation LDI, thermodynamiquement plus stable, est formée par une interaction entre la région correspondant à la tige-boucle poly(A) et la région correspondant à la tige-boucle DIS. Les tiges-boucles poly(A), DIS, SD et  $\psi$  sont détruites dans cette conformation. Huthoff et Berkhout ont proposé que le changement de conformation de la région 5'UTR servirait d'interrupteur moléculaire (ou *switch*) lors de la réplication virale afin de contrôler les différents rôles que joue cette région. Cependant, la

conformation LDI n'a jamais été observée dans des cellules infectées ou dans des particules virales (Paillart et al. 2004; Wilkinson et al. 2008) et son existence dans le contexte de la réplication virale est actuellement mise en doute (voir plus loin). Damgaard et al. (2004) ont étudié le repliement d'un fragment contenant toute la région 5'UTR du VIH-1 et les 409 nt suivants faisant partie de la séquence codante pour Gag. Ils ont utilisé une combinaison d'approches bioinformatiques et d'expériences de clivage enzymatique, de migration sur gel d'électrophorèse et de pontage aux rayons UV. Leurs analyses informatiques du repliement de l'ARN ont été faites avec un nouvel algorithme appelé Pfold (Knudsen and Hein 2003). Cet algorithme utilise les informations phylogénétiques pour prédire les structures secondaires alors que l'algorithme Mfold ne tient compte que des données thermodynamiques. La prédiction de Pfold et les expériences de clivage enzymatique n'ont révélé qu'une seule conformation de la région 5'UTR qui correspond à la conformation BMH proposée par le groupe de Berkhout. Plus récemment, le groupe de Weeks a utilisé une technologie puissante appelée SHAPE (acylation sélective des groupements 2'hydroxyle analysée par extension d'amorces) afin de déterminer les structures secondaires contenues dans tout le génome du VIH-1, incluant la région 5'UTR (Watts et al. 2009). Ils ont observé que la région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur se présente sous une même et unique conformation à l'intérieur et à l'extérieur des particules virales (Wilkinson et al. 2008). Cette conformation, que j'appelle conformation de Weeks, a plusieurs similarités avec la conformation BMH proposée par le groupe de Berkhout et la conformation proposée par Damgaard et al. Il est intéressant de noter que la structure TAR influence la conformation de la région 5'UTR. En effet, la déstabilisation de TAR affecte le repliement des structures de la région 5'UTR parce que les nt non pairés de TAR peuvent interagir avec des portions localisées en aval de TAR (Huthoff and Berkhout 2001a; Vrolijk et al. 2008).

**Figure 1- 13 : Schéma comparatif des conformations proposées pour la région 5'UTR du VIH-1** A) Conformation de Weeks (Wilkinson et al. 2008) B) Conformation proposée par Damgaard et al. (2004) C) Conformation BMH et D) Conformation LDI, deux conformations proposées par Huthoff et Berkhout (2001b) (pour les détails, voir le texte)



## 1.4.2 La traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1

Comme mentionné précédemment, la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 produit le précurseur des protéines de structure Gag, Pr55<sup>Gag</sup>, et le précurseur des enzymes virales Gag-Pol, Pr160<sup>Gag-Pol</sup>. Elle produit aussi deux isoformes tronquées en N-terminale soit la forme tronquée de Gag, p40, et la forme tronquée de Gag-Pol, p145, cette dernière étant toutefois présente en quantités négligeables. Pr55<sup>Gag</sup> et p40 sont synthétisés par élongation conventionnelle de la traduction alors que Pr160<sup>Gag-Pol</sup> et p145 sont produits grâce à un *frameshift* ribosomique programmé -1. L'initiation de la traduction des précurseurs exprimés à partir de l'ARNm pleine-longueur est discutée dans les sections suivantes. L'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est muni d'une coiffe et polyadénylé et peut donc être traduit de façon coiffe-dépendante. Cependant, il possède aussi un IRES dans sa région 5'UTR (Brasey et al. 2003) et un IRES dans la séquence codante pour Gag (Buck et al. 2001). La traduction de l'ARNm pleine-longueur peut donc se faire de façon IRES-dépendante. L'ARNm pleine-longueur est traduit lors des étapes tardives de la réplication virale. Plusieurs observations suggèrent que la traduction coiffe-dépendante est inhibée lors des étapes tardives, ce qui conduirait à proposer que l'ARNm du VIH-1 est alors traduit selon le mode IRES-dépendant. Dans les paragraphes qui suivent, je ferai une revue de la littérature concernant la traduction coiffe-dépendante et IRES-dépendante de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1.

### 1.4.2.1 Le contrôle de la traduction de l'ARNm pleine-longueur par des protéines cellulaires et des protéines virales

Plusieurs protéines cellulaires et virales stimulent la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Par exemple, la protéine virale Tat et certaines protéines cellulaires comme l'autoantigène La, Staufen et TRBP contribuent à déstabiliser les structures de la région 5'UTR de l'ARN viral pleine-longueur directement ou indirectement pour favoriser l'initiation de la traduction (voir la section 1.2.3.3.1) (Parkin et al. 1988; Geballe and Gray 1992; Miele et al. 1996; Charbonneau et al. 2012; Ka et al. 2012). La protéine virale Tat

stimule aussi la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 par d'autres mécanismes décrits en détail dans la section 1.2.3.3. Je parlerai maintenant de l'effet de l'hélicase d'ARN cellulaire RHA, de la protéine virale Rev et du précurseur Gag.

Bolinger et al. (2010) ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 porte un élément de contrôle post-transcriptionnel (PCE), une structure qui recruterait la RHA pour dérouler la structure TAR et faciliter l'association des ribosomes (pour une revue sur le PCE, voir Bolinger and Boris-Lawrie 2009). D'autres études avaient déjà montré que la surexpression de la RHA entraînait une augmentation de la synthèse de gènes rapporteurs sous le contrôle du LTR du VIH-1 (Fujii et al. 2001; Sadler et al. 2009) ou une augmentation de la synthèse des protéines virales (Li et al. 1999). Outre qu'elle aide le ribosome à se lier à l'extrémité 5' du messenger, la RHA contribuerait aussi à aider le ribosome à balayer la région 5'UTR très structurée du messenger viral.

En plus de son rôle dans l'exportation nucléaire des transcrits viraux partiellement épissés et non-épissés, la protéine virale Rev joue aussi un rôle dans la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. En plus du RRE, un second site de liaison de Rev a été identifié sur l'ARNm pleine-longueur, dans la région 5'UTR du VIH-1. Ce site de liaison consiste en une excroissance très conservée localisée dans le bas de la tige-boucle DIS (nt 239 à 242 et les nt 278 à 279 qui leur font face) (Greatorex et al. 2002). Groom et al. (2009) ont montré que Rev stimule la traduction des ARNm du VIH-1 dans du RRL et dans des cellules COS en culture lorsqu'elle est présente en petites quantités. Cette stimulation est causée par l'interaction de Rev avec son site de liaison au bas de la tige-boucle DIS et non par sa liaison au RRE. Par contre, si elle est présente en grandes quantités, Rev inhibe la traduction des ARNm de façon non-spécifique, ce qui est probablement dû à sa capacité de lier non-spécifiquement des ARN. La signification de ces observations dans le contexte de la réplication virale n'a pas été étudiée en détail. Les mécanismes utilisés par Rev pour stimuler la traduction de l'ARNm pleine-longueur ne sont pas connus. Il a été proposé que Rev faciliterait la rencontre entre les ARNm du VIH-1 et l'appareil traductionnel (Ruhl et al. 1993), qu'elle régulerait la localisation subcellulaire des ARNm du VIH-1 (Kimura et al.

1996) ou qu'elle interagirait avec des protéines cellulaires associées à la traduction (Campbell et al. 1994). L'effet de Rev sur la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 se fait aussi via quatre de ses co-facteurs soit Sam68, eIF5A, hRIP (*human Rev-interacting protein*) et DDX3 (*Dead-box polypeptide 3*). Ces derniers stimulent tous la traduction coiffe-dépendante de cet ARNm (Liu et al. 2011a) selon des mécanismes non-identifiés, excepté pour DDX3, dont l'activité hélicase contribuerait à défaire les structures de la région 5'UTR (Liu et al. 2011a). Récemment, Yedavalli et Jeang (2010) ont montré que Rev recrute la méthyltransférase d'ARN PIMT sur les transcrits viraux qu'elle transporte hors du noyau (pour des détails, voir la section 1.2.2.3). Cette enzyme modifie la coiffe m<sup>7</sup>G des ARNm partiellement épissés et de l'ARNm pleine-longueur en une coiffe TMG, ce qui stimule spécifiquement leur expression.

Tout comme Rev, le précurseur Gag influence la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Anderson et Lever (2006) ont montré que de faibles quantités de Gag stimulent la traduction de cet ARNm alors que de grandes quantités l'inhibent. La stimulation de la traduction dépend de la portion MA de Gag. MA n'interagit pas directement avec l'ARN et Anderson et Lever suggèrent que MA stimulerait l'action d'un facteur d'initiation. Nous proposons qu'il pourrait s'agir d'un facteur spécifiquement requis pour la traduction de Gag. L'inhibition de la traduction par Gag dépend de la liaison directe entre la portion NC de Gag et la région 5'UTR. Les auteurs proposent que lorsque Gag recouvre tout l'ARN, la traduction est inhibée. Ils suggèrent que cet effet de Gag servirait d'interrupteur moléculaire pour passer de la traduction à l'encapsidation du messenger viral, come ce qui a été proposé pour le VIH-2 (voir plus haut section 1.3.3.3.4).

#### **1.4.2.2 Les barrières à la traduction coiffe-dépendante chez le VIH-1**

Lors de stress cellulaires comme l'infection virale, l'hypoxie, le stress oxydatif, l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, la traduction coiffe-dépendante est compromise (revue dans Holcik et al. 2000; Yilmaz et al. 2006). Plusieurs des virus qui utilisent uniquement la traduction IRES-dépendante comme les picornavirus induisent une inhibition globale, rapide et drastique de la traduction coiffe-dépendante. Lors d'une infection par le VIH-1, la synthèse protéique est diminuée, mais n'est pas complètement

abolie (Agy et al. 1990; Butsch and Boris-Lawrie 2000; Ventoso et al. 2001; Alvarez et al. 2006; pour des revues, voir Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2007). Je décrirai maintenant deux mécanismes utilisés par le VIH-1 pour diminuer la traduction coiffe-dépendante dans des cellules infectées soit l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M par la protéine accessoire Vpr et le clivage de facteurs d'initiation par la protéase virale. Comme je l'ai mentionné plus haut, il a été montré que la protéine accessoire Vif du VIH-1 peut induire un arrêt en G2/M, mais cet effet est restreint à une seule souche virale de laboratoire (NL4-3) (Wang et al. 2007; Izumi et al. 2010) et je n'en parlerai donc pas dans le cadre de cette thèse. Enfin, il est important de noter que d'autres stress induits par l'infection du VIH-1 entraînent une inhibition de la traduction coiffe-dépendante comme le stress oxydatif (MacCallum et al. 2006; Shenton et al. 2006) et l'apoptose (Graber and Holcik 2007).

La protéine accessoire Vpr (pour une revue sur Vpr, voir Andersen and Planelles 2005) induit l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M dans des cellules T CD4<sup>+</sup> en culture (He et al. 1995; Jowett et al. 1995; Re et al. 1995; Goh et al. 2004). L'initiation coiffe-dépendante est inhibée via la séquestration d'eIF4E à cette phase du cycle cellulaire (voir la section 1.3.3.3.2). Plusieurs études montrent que l'arrêt en G2/M induit par Vpr est dû à l'inhibition de l'activité de la kinase cycline-dépendante p34<sup>cdc2</sup> (He et al. 1995; Jowett et al. 1995; Re et al. 1995; Goh et al. 2004). Cette inhibition de p34<sup>cdc2</sup> dépend de l'activation de la protéine ATR, un senseur des dommages à l'ADN et de stress (Roshal et al. 2003; Andersen et al. 2005; Lai et al. 2005; Belzile et al. 2010). L'arrêt en G2/M est très important pour l'infection de cellules par le VIH-1 (Planelles et al. 1995; Stivahtis et al. 1997). Le VIH-1 est avantagé par l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, même si cela inhibe la traduction coiffe-dépendante. Goh et al. (1998) ont proposé un modèle pour le déroulement de l'infection des lymphocytes T activés par le VIH-1 afin d'expliquer la pertinence d'un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. Selon eux, le virus commencerait par s'établir dans la cellule-hôte. Ensuite, il produirait des nouvelles particules virales en rafale lorsque la cellule est arrêtée en G2/M du cycle cellulaire. Enfin, le virus induirait activement l'apoptose des lymphocytes T, entre autres grâce à Tat et Vpr, une fois que sa réplication est assurée. La manipulation du cycle cellulaire par Vpr stimulerait l'expression

des protéines virales via la stimulation de la transcription virale et de la traduction IRES-dépendante. En effet, la transcription via la région LTR du VIH-1 est très efficace dans la phase G2/M (Goh et al. 1998; Zhu et al. 2001). Aussi, l'arrêt en G2/M inhibe l'initiation coiffe-dépendante et favorise l'initiation IRES-dépendante et donc, favoriserait la traduction IRES-dépendante du VIH-1 au détriment de la traduction coiffe-dépendante des protéines cellulaires (voir la section suivante 1.4.3.1). Très récemment, le groupe de Boris-Lawrie (Sharma et al. 2012) a proposé une autre possibilité pour expliquer que les transcrits tardifs du VIH-1 sont traduits efficacement lors de l'arrêt en G2/M. Ces chercheurs ont montré que les transcrits tardifs du VIH-1 restent liés à CBP80, la protéine nucléaire 80 liant la coiffe. Normalement, CBP80 est remplacée par eIF4E dans le cytoplasme. En conservant leur liaison avec CBP80, les transcrits tardifs pourraient être traduits de façon coiffe-dépendante même lorsque eIF4E n'est pas disponible. Il est intéressant de noter qu'une autre étude récente a montré que les transcrits tardifs portent une coiffe TMG (Yedavalli and Jeang 2010) et que CBP80 a une très forte affinité pour la coiffe TMG. Cependant, le groupe de Boris-Lawrie ne prend pas en considération le fait que les transcrits tardifs pourraient être traduits via une initiation IRES-dépendante.

La protéase du VIH-1 clive des facteurs nécessaires à l'initiation coiffe-dépendante soit eIF4GI et PABP. Elle clive l'isoforme eIF4GI dans du RRL, dans des extraits de cellules HeLa, dans des cellules COS en culture transfectées avec un vecteur d'expression de la protéase et dans des cellules T CD4+ en culture infectées par le VIH-1 (Ventoso et al. 2001; Ohlmann et al. 2002; Alvarez et al. 2003; Perales et al. 2003; Castello et al. 2009). Le fait que la protéase du VIH-1 ne clive qu'une des deux isoformes d'eIF4G pourrait expliquer que l'inhibition de la traduction qu'elle induit est plus faible que celle induite par la protéase du poliovirus ou la L-protéase du virus de la fièvre aphteuse (FMDV *foot-and-mouth disease virus*). La protéase du VIH-1 clive aussi PABP dans du RRL supplémenté avec des extraits cellulaires et dans des cellules T CD4+ en culture infectées par le VIH-1 (Alvarez et al. 2006; Castello et al. 2009). Contrairement à la protéase du poliovirus et à la L-protéase du FMDV qui clivent eIF4G en un site, la protéase du VIH-1 clive eIF4GI en trois sites (Ventoso et al. 2001; Ohlmann et al. 2002). Ces clivages inhibent la traduction coiffe-dépendante, mais permettraient la traduction IRES-dépendante. Cependant, plusieurs

contradictions subsistent dans la littérature au sujet de l'action de la protéase du VIH-1 sur la traduction. Il a été observé que la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est résistante à la présence de la protéase du VIH-1 et qu'elle est même stimulée par la présence de cette protéase (Ventoso et al. 2001; Castello et al. 2009). Au contraire, d'autres chercheurs observent une diminution de la traduction dans ces conditions (Ohlmann et al. 2002; Perales et al. 2003). Les contradictions entre les résultats obtenus lors des différentes expériences proviennent probablement de variations dans les techniques utilisées. Il serait important d'étudier le clivage de ces facteurs d'initiation par la protéase virale dans des extraits cellulaires de patients infectés par le VIH-1. Ce clivage par la protéase virale ne peut se produire qu'à la tout fin du cycle de réplication du VIH-1 lorsque la protéase est traduite et activée. L'activation se produit essentiellement dans les virions immatures relâchés des cellules (section 1.2.2.3). Il est donc peu probable que le clivage de eIF4G1 et de PABP par la protéase joue un rôle important dans l'inhibition de l'initiation coiffe-dépendante lors de la réplication virale.

### **1.4.3 La traduction IRES-dépendante de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1**

L'ARNm pleine-longueur du VIH-1 peut être traduit de façon coiffe-dépendante, mais il y a plusieurs obstacles à ce mode de traduction (pour une revue, voir Yilmaz et al. 2006). D'un côté, la région 5'UTR longue et très structurée cause des blocages physiques qui nuisent à la liaison de la 40S sur les ARNm viraux et au balayage de ces ARNm par la 40S (voir la section 1.2.3.3.1). Cependant, le virus peut utiliser plusieurs protéines cellulaires ainsi que la protéine virale Tat pour corriger ce problème (voir la section 1.2.3.3.1). D'un autre côté, la traduction coiffe-dépendante est inhibée lors des étapes tardives du cycle de réplication par plusieurs mécanismes impliquant entre autres la protéine accessoire Vpr et peut-être la protéase virale. Même si le rôle de la protéase est discutable (voir la section 1.4.2.2), il est clair que dans les phases tardives, l'initiation coiffe-dépendante est compromise. Or, l'ARNm viral pleine-longueur est traduit lors des étapes tardives. Le VIH-1 aurait alors avantage à utiliser l'initiation IRES-dépendante pour

traduire ses protéines de structure et ses enzymes. Deux IRES ont été identifiés dans le génome du VIH-1 soit l'un dans la séquence codante pour Gag (Buck et al. 2001) et l'autre dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur (Brasey et al. 2003). Je parlerai brièvement de l'IRES de la séquence codante. Je détaillerai ensuite la littérature concernant l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur puisque c'est cet IRES que j'ai utilisé durant mes études doctorales.

#### 1.4.3.1 Description des IRES identifiés dans le génome du VIH-1

Buck et al. (2001) ont identifié la présence d'un IRES localisé entièrement dans la séquence codante de Gag. Ils ont utilisé un vecteur bicistronique contenant le gène de la CAT (chloramphénicol acétyltransférase) comme premier cistron suivi des 77 derniers nt de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 puis du gène *gag*, correspondant au deuxième cistron et ils ont transfecté des cellules HEK293T fréquemment utilisées en laboratoire. Ils ont montré que dans ces conditions, il y avait synthèse de Pr55<sup>Gag</sup> et aussi, quoiqu'en plus faibles quantités, d'une isoforme de Pr55<sup>Gag</sup> tronquée en N-terminale de 40 kDa appelée p40 dont la traduction débute à un codon AUG localisé à la fin de la portion CA (126<sup>e</sup> codon) (Figure 1-2). Buck et al. ont ensuite montré que la portion de la région 5'UTR présente dans leur construction n'est pas nécessaire pour qu'il y ait traduction de Gag et de son isoforme et ils ont conclu qu'il y a un IRES au début de la région codante de Gag, entre les codons 1 et 126. L'étude de Buck et al. a été faite à partir des séquences du gène *gag* du variant HXB2 du VIH-1 (Los Alamos National Laboratory 2011) et du provirus LAI (Peden et al. 1991). Buck et al. ont montré que l'isoforme p40 est présente dans des cellules en culture infectées par le VIH-1 et que l'absence de p40, obtenue en mutant le codon initiateur de cette protéine, ralentit la réplication du virus dans des cellules en culture. Le rôle de p40 n'est pas connu, mais on pourrait suggérer qu'il est similaire à celui de p43, l'isoforme de Gag tronquée du VISmac, c'est-à-dire que p40 pourrait empêcher le clivage prématuré de Pr55<sup>Gag</sup> par la protéase virale (voir la section 1.3.3.3.3). L'IRES mis en évidence par cette équipe s'apparente à l'IRES caractérisé chez le VIH-2 et pourrait positionner le ribosome à l'un de deux AUG initiateurs, l'un en aval de l'IRES initiant la traduction de p40 et l'autre en amont, conduisant à la synthèse de Pr55<sup>Gag</sup>.

Rappelons qu'une telle initiation IRES-dépendante, où le codon initiateur est en amont de l'IRES, a été aussi proposée pour l'IRES du VIH-2 (voir la section 1.3.3.4). Comme expliqué plus haut, le mécanisme d'une telle initiation n'a pas été caractérisé, mais il semble compliqué et inefficace. De plus, Buck et al. ont vérifié par immunobuvardage de type Northern qu'il n'y avait qu'une seule espèce d'ARN codant pour CAT et Gag dans leurs essais, une technique qui n'est pas très sensible comme je l'ai signalé dans la section 1.3.3.3. Il est donc possible que l'expression de Pr55<sup>Gag</sup> provienne d'un épissage alternatif ou d'un promoteur cryptique dans leurs conditions expérimentales. Même s'il y a une espèce d'ARN produite qui permettrait la synthèse de Pr55<sup>Gag</sup> par un mode coiffe-dépendant, nous pensons que l'étude de Buck et al. démontre l'existence d'un IRES dans la séquence codante de Gag qui serait utilisé par le virus pour traduire l'isoforme tronquée de Gag.

Alors que Buck et al. n'avaient pas identifié d'IRES dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, Brasey et al. ont identifié un IRES dans cette région en 2003. Ils ont utilisé un vecteur dual-luciférase, tel que décrit dans la section 1.3.3.3, dans lequel les gènes de la Rluc et de la Fluc sont séparés par la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Les séquences utilisées pour la région 5'UTR du VIH-1 proviennent du plasmide pNL4-3 (Adachi et al. 1986). Pour s'assurer que les cistrons sont traduits indépendamment, ils ont inséré, en amont de la région 5'UTR, une région d'ARN qui inhibe la réinitiation possible des ribosomes. Ils ont d'abord observé une faible activité IRES dans la région 5'UTR du VIH-1 dans du RRL supplémenté avec des extraits de cellules HeLa. Ils ont ensuite effectué une série de délétions en 5' et en 3' de la région 5'UTR afin de délimiter les frontières de l'IRES et déterminé que les nt 104 à 335 soit toute la région 5'UTR à l'exception des tiges-boucles TAR et poly(A) est suffisante pour l'activité IRES. Toutefois, l'activité IRES des nt 104 à 289 est presque aussi grande que celle contenue dans les nt 104 à 335. Comme la portion 104 à 289 est présente dans tous les transcrits du VIH-1, il est probable qu'ils puissent tous être traduits de façon IRES-dépendante. En accord avec cette déduction, Charnay et al. (2009) ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm de Tat, qui contient donc la portion 104 à 289 de l'IRES contenu dans

la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, permet une initiation IRES-dépendante de la traduction du messenger de Tat. Tout comme Brasey et al., ils ont observé que les tiges-boucles TAR et poly(A) ne sont pas nécessaires à l'activité de l'IRES.

Brasey et al. (2003) ont montré que l'activité de l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est stimulée dans des cellules HeLa artificiellement arrêtées en phase G2/M par un traitement au nocodazole ce qui diminue la synthèse protéique globale. L'activité de cet IRES serait donc accrue lorsque Vpr induit un arrêt en G2/M dans des cellules infectées par le VIH-1. Vallejos et al. (2011a) ont poursuivi la caractérisation de cet IRES en travaillant dans du RRL supplémenté avec différents types d'extraits de cellules HeLa soit des extraits de cellules non-synchronisées (NS), de cellules arrêtées en G1 ou de cellules arrêtées en G2/M. Ils ont utilisé un vecteur bicistronique similaire à celui utilisé par Brasey et al. (2003) soit un vecteur contenant les séquences codantes de la Rluc et de la Fluc séparées par la région 5'UTR du VIH-1 précédée d'une région structurée. Ils ont d'abord montré que l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1 est plus efficace dans du RRL supplémenté avec des extraits de cellules G2/M que supplémenté avec des extraits de cellules G1 ou NS. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Brasey et al. (2003). Aussi, Vallejos et al. ont observé que certaines portions de la région 5'UTR sont protégées des attaques chimiques spécifiquement en présence d'extraits de cellules G2/M ou NS. Cette protection peut résulter de la liaison de protéines cellulaires soit directement soit indirectement suite à un changement conformationnel de l'IRES causé par ces protéines. L'identification de ces protéines par *pull-down* et spectrométrie de masse montrent qu'elles diffèrent selon que les extraits proviennent de cellules NS ou G2/M. L'ensemble de ces résultats suggère que l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1 est régulé par différentes protéines qui interagissent spécifiquement avec la région 5'UTR pour stimuler ou inhiber la traduction IRES-dépendante selon l'étape du cycle cellulaire. Toutefois, les chercheurs n'ont pas encore identifié lesquelles des protéines qui se lient à l'IRES agissent effectivement comme ITAF. Vallejos et al. ont aussi montré que l'activité de cet IRES résiste à plusieurs mutations en détruisant des structures d'ARN qui le composent. L'IRES du VIH-1 est donc différent d'autres IRES viraux, par exemple celui du VHC, dont l'activité peut être abolie par une mutation ponctuelle qui altère leur

structure globale. Il est intéressant de noter que des mutations ponctuelles et des délétions chez plusieurs IRES cellulaires ont peu d'impact sur leur activité, ce qui suggère que la relation structure-fonction chez les IRES cellulaires est moins rigide que pour plusieurs IRES viraux (Fitzgerald and Semler 2009).

Des ITAF affectant l'activité de l'IRES contenu dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 ont été caractérisés. Rivas-Aravena et al. (2009) ont montré que la protéine ubiquitaire HuR (*human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like*), diminue l'activité de l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1 alors que d'autres avaient montré qu'elle stimule celui du VHC (Korf et al. 2005) et du facteur HIF-1 $\alpha$  (Galban et al. 2008). La répression de l'activité de l'IRES du VIH-1 par HuR ne nécessite pas d'interaction directe entre HuR et l'ARN de la région 5'UTR et pourrait résulter de la séquestration d'un ITAF positif de l'IRES du VIH-1 par HuR. Monette et al. (2009) ont montré que la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (hnRNP) A1 est un ITAF positif de l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1. La hnRNP A1 est une protéine nucléaire qui se lie à l'ARNm viral pleine-longueur dans le noyau où elle est entre autres impliquée dans la régulation de l'épissage (Caputi et al. 1999) et dans l'exportation nucléaire (Najera et al. 1999) des ARNm viraux. Monette et al. (2009) ont aussi montré que l'infection par le VIH-1 stimule l'expression de la hnRNP A1 et entraîne sa relocalisation et sa rétention dans le cytoplasme. Enfin, plus récemment, Liu et al. (2011a) ont montré que trois cofacteurs de Rev requis pour l'exportation nucléaire Rev-dépendante des ARNm soit eIF5A, hRIP et DDX3 agissent comme ITAF positif de cet IRES. Pour ce faire, ils ont transfecté des cellules HEK293T avec un vecteur dual-luciférase contenant l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1. Il faut noter que ces protéines stimulent à la fois la traduction coiffe-dépendante et la traduction via l'IRES du VIH-1. Deux équipes ont montré que l'autoantigène La interagit fortement avec la région 5'UTR du VIH-1, particulièrement avec la structure TAR (Chang et al. 1994; Waysbort et al. 2001). L'interaction entre TAR et La augmente la traduction coiffe-dépendante d'un ARNm CAT portant la structure TAR à son extrémité 5' (Svitkin et al. 1994). L'effet de La s'explique, nous l'avons vu dans la section 1.2.3.3.1, par une déstabilisation de la structure TAR. Par ailleurs, La a déjà été identifié comme ITAF

(Vagner et al. 2001) et il se pourrait aussi qu'il agisse comme ITAF positif de l'IRES de la région 5'UTR du VIH-1. Cependant, cela n'a jamais été démontré expérimentalement. Nous avons mentionné que Vallejos et al. (2011a) avaient identifié des protéines cellulaires liant l'IRES de la région 5'UTR. Aucune de ces protéines ne correspondaient à l'un des ITAF identifiés jusqu'à présent. D'autres études sont nécessaires pour déterminer lesquelles de ces protéines sont réellement des ITAF de cet IRES du VIH-1.

#### **1.4.3.2. Y a-t-il un doute sur l'utilisation de la traduction IRES-dépendante par le VIH-1?**

Certaines études avaient conclu que les ARNm du VIH-1 ne sont pas traduits de façon IRES-dépendante. D'abord, deux études ne sont pas parvenues à détecter l'IRES de la région 5'UTR (Miele et al. 1996; Buck et al. 2001). Miele et al. (1996) avaient transfecté des cellules COS ou HeLa avec un vecteur bicistronique contenant la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 entre les gènes de la Fluc et de la CAT. Puis, ils ont mesuré l'expression de la CAT par immunobuvardage de type Western. De la même façon, Buck et al. (2001) avaient transfecté des cellules COS avec un vecteur bicistronique contenant la région 5'UTR du VIH-1 entre le gène *env* et le gène *gag* et ils ont mesuré l'expression de Pr55<sup>Gag</sup> par immunobuvardage de type Western. Ces rapporteurs et les techniques utilisées n'étaient pas suffisamment sensibles pour détecter l'activité IRES de la région 5'UTR qui est faible dans des conditions physiologiques, comme cela a été démontré par la suite (Brasey et al. 2003; Ricci et al. 2008b; Vallejos et al. 2011a).

Si l'IRES de la région 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 existe bel et bien, on peut se demander quand le virus l'utilise dans son cycle de réplication. Ricci et al. (2008b) ont étudié la dynamique entre la traduction coiffe-dépendante et IRES-dépendante du VIH-1 dans du RRL. Lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée par la présence de la L-protéase du FMDV qui clive eIF4G ou par celle d'un analogue de la coiffe qui compétitionne pour les facteurs d'initiation, l'expression de Pr55<sup>Gag</sup> diminue alors que celle de p40, l'isoforme tronquée de Gag aussi observée par Buck et al., est augmentée. Ces résultats suggèrent que la synthèse de Pr55<sup>Gag</sup> chez le VIH-1 dépend principalement d'une initiation coiffe-dépendante dans du RRL, contrairement à ce qui est observé chez le VIH-2

et le VIS. Toutefois, les études faites dans du RRL ne représentent pas la situation réelle rencontrée par l'ARNm pleine-longueur dans des cellules infectées par le VIH-1.

Une étude récente par Berkhout et al. (2011) dans des cellules en culture a depuis confirmé les conclusions de Ricci et al. Ils ont en effet démontré que la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 nécessite le balayage de la région 5'UTR par les ribosomes et s'effectue donc suivant un mode coiffe-dépendant. Pour ce faire, les chercheurs ont transfecté des cellules C33A avec un vecteur rapporteur exprimant la Fluc sous le contrôle du promoteur du VIH-1 de façon telle que la région 5'UTR du messenger rapporteur est celle de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Ils ont inséré des codons AUG à différents endroits dans la région 5'UTR en amont de l'AUG initiateur authentique et ont montré que la présence de ces AUG diminue la traduction débutant à l'AUG initiateur authentique. Ce résultat prouve qu'il y a balayage et donc, initiation coiffe-dépendante puisque la traduction par un mode IRES-dépendant n'aurait pas été affectée par la présence d'AUG en amont de l'AUG initiateur authentique. La traduction coiffe-dépendante est donc prédominante dans leurs conditions expérimentales.

Cependant, dans des conditions où la traduction coiffe-dépendante est compromise, le mode IRES-dépendant pourrait être utilisé et favoriser l'expression des protéines du VIH-1. C'est ce dont je discuterai dans la section suivante.

#### **1.4.3.3 L'importance de la traduction IRES-dépendante pour la réplication du VIH-1**

La littérature montre que l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est efficacement traduit de façon coiffe-dépendante (Ricci et al. 2008b; Berkhout et al. 2011). L'ARNm pleine-longueur porte une structure coiffe en 5' et une queue poly(A) en 3' et ne contient pas d'AUG en amont du codon d'initiation authentique (Yilmaz et al. 2006). Par ailleurs, la région 5'UTR longue et structurée cause un blocage physique qui nuit à la liaison des ribosomes à l'extrémité 5' et à leur balayage et diminue l'efficacité de l'initiation coiffe-dépendante, mais des protéines cellulaires ainsi que la protéine virale Tat contrecarrent ce

blocage en déstabilisant directement ou indirectement ces structures (voir la section 1.2.3.3.1).

D'un autre côté, comme je l'ai mentionné précédemment, l'ARNm pleine-longueur est traduit à la fin des étapes tardives lorsque la traduction coiffe-dépendante est compromise par différents mécanismes (Yilmaz et al. 2006). La protéine virale Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (section 1.4.2.2), une phase où la traduction coiffe-dépendante est inhibée (Bonneau and Sonenberg 1987). La protéase virale, elle, clive eIF4GI et PABP, deux facteurs d'initiation essentiels à l'initiation coiffe-dépendante (Ventoso et al. 2001; Ohlmann et al. 2002; Alvarez et al. 2003; Perales et al. 2003; Castello et al. 2009), même si son rôle est discutable. D'autres stress induits par le VIH-1 comme le stress oxydatif et l'apoptose compromettent l'initiation coiffe-dépendante. Il est difficile d'imaginer que la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 puisse être coiffe-dépendante à ce moment de la réplication virale. Un IRES a été identifié dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 (Brasey et al. 2003), ce qui permet une initiation coiffe-indépendante de la traduction. Cet IRES est peu efficace dans du RRL ou dans des cellules en culture dans des conditions physiologiques. Cependant, l'activité de cet IRES est augmentée en cas de stress qui inhibent la traduction coiffe-dépendante comme lors d'un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Brasey et al. 2003; Vallejos et al. 2011a), lors d'un stress osmotique (Monette et al. 2009) ou en présence des protéines virales (Monette et al. 2009). Des IRES ont été trouvés dans la région 5'UTR du VIS (Ohlmann et al. 2000) et du VIF (Camerini et al. 2008), ce qui suggère que ce mode d'initiation est conservé chez les lentivirus. Malgré cela, l'importance de la traduction IRES-dépendante pour la réplication du VIH-1 dans le contexte d'une infection virale n'est cependant pas connue.

Une hypothèse attrayante est que le VIH-1 utilise de façon coordonnée les deux modes d'initiation pour favoriser l'expression de ses protéines. La traduction coiffe-dépendante est plus efficace que la traduction IRES-dépendante dans des conditions physiologiques. Lors de l'infection virale, la cellule subit différents stress qui interfèrent avec la traduction coiffe-dépendante. L'initiation IRES-dépendante devient alors avantageuse pour le virus, d'autant plus que l'IRES de la région 5'UTR est stimulé par

plusieurs stress cellulaires. La traduction IRES-dépendante permettrait donc de poursuivre l'expression des protéines virales, particulièrement des protéines de structure et des enzymes virales, même lorsque la traduction coiffe-dépendante est compromise lors des étapes tardives de la réplication virale. De plus, l'initiation par un IRES dont l'activité est modulable est une stratégie intéressante pour contrôler la production virale en réponse aux changements dans l'environnement cellulaire ou à la progression de l'infection (Yilmaz et al. 2006). En effet, une synthèse protéique trop vigoureuse pourrait être nuisible à la croissance et à la viabilité des cellules infectées (Yilmaz et al. 2006) et conduire à une augmentation de la réaction immunitaire contre le virus, ce qui nuirait à sa réplication (Yilmaz et al. 2006).

## 1.5 But de mon projet

Si la traduction via l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est essentielle à la réplication virale, cet IRES constituerait une cible intéressante pour développer de nouveaux agents anti-VIH-1. Il est donc important d'étudier cet IRES afin de comprendre son fonctionnement et sa contribution à la réplication du virus. Notre hypothèse est que l'IRES de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est nécessaire pour que le virus traduise ses protéines de structure et ses enzymes lors des étapes tardives du cycle de réplication.

Le but de mon projet était de caractériser l'IRES contenu dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 que j'appellerai IRES<sup>5'UTR</sup> pour la suite de cette thèse. L'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est faible dans des cellules dans des conditions physiologiques. J'ai étudié l'activité de cet IRES dans des cellules Jurkat T en culture, ces cellules étant dérivées de lymphocytes T, les cibles naturelles du VIH-1, pour mieux comprendre comment cette activité est modulée. Pour ce faire, j'ai utilisé un vecteur dual-luciférase contenant les séquences codantes pour la Rluc et la Fluc séparées par la région 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. J'ai fait les contrôles nécessaires pour m'assurer que la traduction de la Fluc dépend de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et non d'un promoteur cryptique ou d'un épissage alternatif.

Dans un premier temps, j'ai effectué une étude mutationnelle sur l'IRES<sup>5'UTR</sup> pour identifier des régions d'ARN importantes pour son fonctionnement. J'ai découvert une tige-boucle qui réprime l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> que nous avons nommée IRENE (*IRESE negative element*) et j'ai identifié trois régions qui stimulent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai aussi montré que le *switch* hypothétique entre deux conformations (LDI et BMH) de la région 5'UTR n'influence pas l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Comme la littérature suggère que l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est modulée par l'état de la cellule, j'ai également testé l'effet de différents stress sur son activité. J'ai découvert que le stress oxydatif stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> en contrecarrant l'effet répresseur d'IRENE.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'effet de la protéine virale Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai choisi Tat puisqu'elle stimule la traduction coiffe-dépendante et qu'elle est connue pour ses effets pléiotropiques dans la cellule comme la modulation de l'expression de plusieurs gènes. J'ai testé l'effet des trois isoformes de Tat, soit Tat86, Tat72 et Tat101, en différentes quantités sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai observé que les isoformes Tat72 et Tat86, mais non Tat101, stimulent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et que cet effet s'exerce que la structure TAR soit présente ou non. Comme certains des effets de Tat sont médiés par la kinase PKR, j'ai vérifié si l'effet de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> implique aussi PKR et j'ai observé qu'il est indépendant de PKR. Par contre, j'ai montré que PKR peut stimuler l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et que cet effet de PKR n'est pas relié à sa capacité de phosphoryler le facteur d'initiation eIF2 $\alpha$ .

## **Chapitre 2.**

**The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element**

Running title: Mutational analysis of the 5'UTR IRES of HIV-1

**The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element**

Karine Gendron<sup>1,2</sup>, Gerardo Ferbeyre<sup>1</sup>, Nikolaus Heveker<sup>1,2</sup> and Léa Brakier-Gingras<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

<sup>2</sup> Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

Corresponding author: Léa Brakier-Gingras, Département de biochimie, Université de Montréal, 2900, Blvd Édouard-Montpetit, D-353, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4,

Key words: HIV-1, IRES, 5'UTR, translation initiation, oxidative stress

## Abstract

Initiation of translation of the full-length messenger RNA of HIV-1, which generates the viral structural proteins and enzymes is cap-dependent but can also use an internal ribosome entry site (IRES) located in the 5'untranslated region. Our aim was to define, through a mutational analysis, regions of HIV-1 IRES that are important for its activity. A dual-luciferase reporter construct where the *Renilla* luciferase (Rluc) translation is cap-dependent while the firefly luciferase (Fluc) translation depends on HIV-1 IRES was used. The Fluc/Rluc ratio was measured in lysates of Jurkat T-cell transfected with the dual-luciferase plasmid bearing either the wild-type or a mutated IRES. Deletions or mutations in three regions decreased the IRES activity but deletion or mutations of a stem-loop preceding the primer binding site increased the IRES activity. The wild-type IRES activity, but not that of an IRES with a mutated stem-loop, was increased when cells were treated with agents that induce oxidative stress. Such stress is known to be caused by HIV-1 infection and we propose that this stem-loop is involved in a switch that stimulates the IRES activity in cells infected with HIV-1, supporting the suggestion that the IRES activity is upregulated in the course of HIV-1 replication cycle.

## Introduction

Initiation of translation of most eukaryotic cellular messenger RNAs (mRNAs) occurs by a cap-dependent mechanism that requires ribosomal scanning of their 5'UTR. The 40S ribosomal subunit bearing the initiator tRNA, Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>, interacts with the initiation factors bound at the cap (m<sup>7</sup>GpppG) at the 5' end of the mRNA, and then scans the mRNA in the 5'-3' direction until it encounters an initiation codon in an appropriate context. The 60S ribosomal subunit joins the 40S subunit and translation of the mRNA begins (reviewed in Pestova et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010). However, several groups of viruses and a minority of cellular mRNAs initiate translation in a cap-independent manner, using internal ribosome entry sites (IRESes) (reviewed in Jackson 2005; Lopez-Lastra et al. 2005; Doudna and Sarnow 2007; Martinez-Salas et al. 2008; Hellen 2009; Jackson et al. 2010). IRESes are structured RNA regions that are able to directly recruit the 40S ribosomal subunit at or near an initiation codon. This mode of initiation usually requires the participation of some canonical initiation factors and of host cell factors called IRES trans-acting factors (ITAFs). The structure, the molecular mechanism and the requirement for ITAFs of different IRESes vary greatly, reflecting their functional diversity (reviewed in Balvay et al. 2009; Filbin and Kieft 2009; Fitzgerald and Semler 2009). IRESes were first discovered in picornaviruses (Jang et al. 1988; Pelletier and Sonenberg 1988), and have since been found in several other groups of viruses, including retroviruses (reviewed in Bolinger and Boris-Lawrie 2009) such as simian immunodeficiency virus (Ohlmann et al. 2000; Nicholson et al. 2006), human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Buck et al. 2001; Brasey et al. 2003), human immunodeficiency virus type 2 (Herbreteau et al. 2005; Weill et al. 2010), murine leukemia virus (Berlioz and Darlix 1995; Vagner et al. 1995), Rous sarcoma virus (Deffaud and Darlix 2000), feline immunodeficiency virus (FIV) (Camerini et al. 2008) and mouse mammary tumor virus (Vallejos et al. 2010).

Translation of HIV-1 full-length mRNA produces the precursor of structural proteins, Gag (p55), and, through a programmed -1 ribosomal frameshift (reviewed in Brierley and Dos Ramos 2006; Brakier-Gingras and Dulude 2010), it produces the

precursor of viral enzymes, Gag-Pol (p220). This full-length RNA also serves as a genomic RNA that is encapsidated in viral particles as a dimer. The HIV-1 full-length mRNA is capped and polyadenylated, but the long structured 5'UTR of this mRNA could interfere with ribosomal scanning from the cap and decrease the efficiency of the cap-dependent translation initiation (reviewed in Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2007). Indeed, the 5'UTR of HIV-1 RNA contains several structural elements that are required for the replication cycle (reviewed in Berkhout 1996), such as the transactivation response domain (TAR), the poly(A) hairpin, the primer binding site (PBS), the dimerization initiation site (DIS), the major splicing donor site (SD) and the packaging signal ( $\psi$ ) (see Fig. 1A). Various models for the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA encompassing the IRES have been proposed, based on phylogenetic, chemical mapping and mutagenesis approaches (reviewed in Wilkinson et al. 2008). Among them, Huthoff and Berkhout (2001b) had described two mutually exclusive conformations for the 5'UTR of HIV-1 RNA, the branched multiple hairpin (BMH) and the long distance interaction (LDI). Recently, using the powerful SHAPE (selective 2'hydroxyl acylation analyzed by primer extension) technology, the Weeks group found that the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA exists inside and outside the virus particles in a single predominant conformation, which we refer to as the Weeks conformation (see Fig. 1), (Wilkinson et al. 2008; Watts et al. 2009). The BMH conformation has several similarities with the Weeks conformation, but the existence of the LDI conformation, which has never been detected in infected cells or in viral particles, has been challenged (Paillart et al. 2004; Wilkinson et al. 2008).

Translation studies in reticulocyte lysates showed that Gag (and implicitly Gag-Pol) can be expressed both by cap-dependent and IRES-dependent modes but that the cap-dependent mode is predominant (Ricci et al. 2008b). The full-length mRNA of HIV-1 group M subtype B, the group and type that predominate in infected patients of the Western World, contains an IRES in its 5'UTR (Brasey et al. 2003). This IRES generates Gag (p55), initiating translation at the same initiation codon as the classical cap-dependent initiation. Another IRES was also found in the Gag coding sequence (Buck et al. 2001; Weill et al. 2010), which generates, in addition to Gag, a shorter isoform of Gag (p40). Brasey et al.

(2003), using deletion mutants, delimited the boundaries of HIV-1 5'UTR IRES from nucleotides (nt) 104 to 336. They also showed that the portion encompassing nt 104 to 289 has an IRES activity very near that of the 104-336 segment. The 104-289 segment is present in all the RNA transcripts from HIV-1, suggesting that all these transcripts could be translated by an IRES-dependent mechanism in addition to the classical cap-dependent mechanism (see also Yilmaz et al. 2006). This is supported by recent studies from Charnay et al. (2009), showing that the mRNA coding for Tat can be translated by an IRES-dependent mechanism. Two proteins were found to modulate the activity of the 5'UTR IRES of HIV-1: the human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like protein HuR downregulates this IRES efficiency (Rivas-Aravena et al. 2009) whereas the heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 upregulates its efficiency (Monette et al. 2009). Interestingly, it was shown that infection with HIV-1 promotes relocalization of hnRNP A1 in the cytoplasm and enhances its expression, which then increases HIV-1 5'UTR IRES activity. It was also observed that the La autoantigen binds to the 5'UTR of HIV-1 full-length RNA (Chang et al. 1994; Waysbort et al. 2001) although a direct effect of La on the HIV-1 5'UTR IRES activity as an ITAF remains to be proven.

Although the use of the 5'UTR IRES of HIV-1 during viral infection is still questioned, several studies support the suggestion that this IRES benefits the virus during its replication in infected cells. The 5'UTR IRES is activated in cell extracts that were blocked in the G2/M phase of the cell cycle, a phase where cap-dependent translation is decreased (Brasey et al. 2003). The IRES-dependent translation of HIV-1 full-length mRNA could be useful to ensure viral replication when the viral protein Vpr induces G2 cell cycle arrest (Andersen and Planelles 2005; Davy and Doorbar 2007). Recently, Castello et al. (2009) showed that HIV-1 protease cleaves the canonical initiation factors eIF4GI and PABP, which inhibits cap-dependent translation in HeLa extracts, but not translation of HIV-1 full-length mRNA. Stimulation of a viral IRES by viral infection has also been described for FIV whose RNA contains a dormant IRES that is activated by FIV infection and by cellular stress (Camerini et al. 2008). It is well-known that infection of HIV-1 causes oxidative and endoplasmic reticulum stresses (Peruzzi 2006; Lindl et al.

2007; Pyo et al. 2008; Deshmane et al. 2009) and such stresses could influence the activity of the HIV-1 IRES.

In this study, we investigated the activity of the 5'UTR IRES of HIV-1, using site-directed mutagenesis. We also investigated the effect of various stress conditions on this IRES activity. We found that deleting an unstructured region downstream of the PBS (nt 202-217), mutating three nt (nt 240-242) in a four-nt bulge in the DIS hairpin or mutating a stretch of four A (nt 302-305) in loop I downstream of the SD hairpin, decrease the IRES activity. In contrast, deleting or mutating a stem-loop upstream of the PBS (nt 134-178) increases the IRES activity. A similar increase is observed when the activity of the wild-type IRES is assessed in cells treated with agents that induce oxidative stress. The relationship between the mutational analysis and the IRES activity is discussed. A model is proposed to account for the effect of the 134-178 stem-loop on the IRES activity in relationship with the oxidative stress caused by infection with HIV-1.

## Materials and Methods

*Plasmid construction.* To measure the IRES activity in the 5'UTR of HIV-1 group M subtype B full-length mRNA, we used a dual-luciferase reporter pFRT-dual-IRES-HIV. This plasmid is derived from pcDNA5FRT (Invitrogen) where the KpnI and BamHI restriction sites of the original polycloning site were deleted to facilitate subsequent cloning of mutant IRESes. Our reporter pFRT-dual-IRES-HIV contains the 5'UTR region of HIV-1 originating from pLAI, a vector expressing a molecular clone of HIV-1 group M subtype B proviral DNA (Peden et al. 1991), inserted between the coding sequences of the *Renilla* luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc). Expression of these genes is under control of a CMV promoter followed by a T7 promoter. The corresponding mRNA contains both the Rluc and the Fluc coding sequences. Rluc translation is cap-dependent and Fluc translation depends on HIV-1 5'UTR IRES. The initiation AUG codon for Fluc expression is within the IRES and the context of the AUG (30 nt from the Gag precursor) was included

in our constructs. Since the presence of these additional amino acids could affect Fluc activity, a sequence coding for a peptide linker (GGGSGGGGS) was inserted by PCR before the Fluc coding sequence. The mutant IRESes were made by PCR amplification with four primers (Ho et al. 1989). Mutants were named according to the position where the mutation/deletion starts in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA according to pLAI. The details and the primers used for all these cloning experiments are found in the Supplementary Materials and Methods section.

*Jurkat T cells transfection.* Jurkat T cells (CD4<sup>+</sup> T-cells) were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent). All transfections were made by electroporation, using the Neon<sup>TM</sup> transfection system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The conditions for electroporation were one pulse of 1150 volts for 40 ms. Transfections were performed in 24-well plates containing  $1.5 \times 10^5$  Jurkat T cells in 1 ml of complete medium without antibiotics. Briefly, 1  $\mu$ g of DNA was mixed with  $1.5 \times 10^5$  Jurkat T cells in 10  $\mu$ l of R buffer supplied by the manufacturer. For assays with shRNA, co-transfections with shRNA-encoding plasmids were performed in 6-well plates containing  $2.0 \times 10^6$  Jurkat T cells in 5 ml of complete medium without antibiotics. Two  $\mu$ g of dual-luciferase reporter were mixed with 2  $\mu$ g of the plasmid encoding either control shRNA (pBS-U6-ApaI) or shRNA targeting Rluc (pBS-U6-RLi), a gift from Ivan Shatsky. Each mix was added to  $2.0 \times 10^6$  Jurkat T cells in 100  $\mu$ l of R buffer. Transfections for treatments with chemical agents were performed in 6-well plates containing 2 ml of complete medium without antibiotics. Four  $\mu$ g of dual-luciferase reporter were mixed with  $1.0 \times 10^6$  Jurkat T cells in 10  $\mu$ l of R buffer. Twenty-four h post-transfection, transfected cells were pooled and splitted in 24-well plates (500  $\mu$ l per well) and the chemical agents ( $H_2O_2$  at final concentrations of 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, TBHQ at final concentrations of 150 nM and 300 nM, thapsigargin at a final concentration of 450 nM and DFX at final concentrations of 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M; control: DMSO 0.25%) were added in a final volume of 1 ml per well for 4 to 8 h, as indicated in the legend to Figure 3.

*Jurkat T cells harvesting and luciferase assays.* Transfected Jurkat T cells were harvested 24 h post-transfection, centrifuged at 200 g for 5 min, washed with PBS and

lysed in 100  $\mu$ l of Cell Passive Lysis Buffer (Promega). Cell lysates were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until being used. Prior to luciferase assays, cell lysates were thawed and centrifuged 2 min at 1300 g to remove cell debris. The Fluc and the Rluc activities were assayed using a Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega). The IRES activity was monitored as a Fluc/Rluc ratio where the Fluc activity is the readout for IRES-dependent translation while Rluc expression depends upon cap-dependent translation. Fluc and Rluc activities were measured as relative light units with a Triathler<sup>TM</sup> multilabel tester (Hidex Oy). One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Mac OS X.

*Metabolic labeling.* Briefly, Jurkat T-cells were transfected with pFRT-dual-IRES-HIV and were incubated with different stress-inducing agents for the appropriate amount of time, as described above. The medium was replaced with a methionine-free medium supplemented with 10% dialyzed FBS for 30 min, [<sup>35</sup>S]methionine (150–225  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 1Ci= 37 GBq) (Perkin-Elmer) was next added to the medium, and the cells were incubated for 15 min. Cells were collected by centrifugation, washed two times and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.0% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Radiolabeled proteins were isolated by trichloroacetic acid precipitation on Whatman 3 MM paper. The amount of radioactivity was determined by scintillation counting, and the counts were normalized to protein concentration, which had been determined, using the DC Protein Assay (Bio-Rad).

*Sequence alignment.* Ninety-seven 5'UTR regions of HIV-1 group M subtype B sequences were obtained for the 134-178 stem-loop, 129 5'UTR regions of HIV-1 group M subtype B sequences were obtained for the 202-217 region, 142 5'UTR regions of HIV-1 group M subtype B sequences were obtained for the 240-242 bulge and 149 5'UTR regions of HIV-1 group M subtype B sequences were obtained for the 302-305 segment. These sequences were aligned, using the HIV sequence database (QuickAlign) of the Los Alamos National Laboratory available at the following URL : <http://www.hiv.lanl.gov/>

## Results

### **The IRES located in the 5'UTR of HIV-1 RNA is functional in Jurkat T cells.**

To perform a mutational analysis of the IRES located in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, a standard dual-luciferase reporter system was used (Fig. 1B), where the *Renilla* luciferase (Rluc) translation is cap-dependent whereas the firefly luciferase (Fluc) translation depends on the HIV-1 5'UTR IRES. This reporter was similar to the reporter described by Brasey et al. (2003), who demonstrated the existence of the HIV-1 5'UTR IRES. The intercistronic region contains the complete 5'UTR, including the TAR and poly(A) stem-loops. It is well known that the presence of a thermodynamically stable stem-loop such as TAR interferes with readthrough, ribosomal scanning and reinitiation that could occur after Rluc termination of translation (Venkatesan et al. 2003; Charnay et al. 2009). Moreover, the Rluc coding sequence is terminated by three stop codons, which ensures efficient termination of translation. The initiation codon for Fluc is located within the HIV-1 5'UTR IRES. The 30 nt of HIV-1 RNA that follow this initiator codon and encode the beginning of the sequence of HIV-1 Gag were included in our construct, in order to maintain the integrity of the IRES. A sequence coding for a peptide linker was added between these 30 nt and the beginning of the Fluc coding sequence to avoid any interference of HIV-1 5'UTR with Fluc folding and activity. Jurkat T cells, a CD4+ T-cell line, were co-transfected with the dual-luciferase reporter and a reporter coding for a shRNA targeting the Rluc coding sequence (see Van Eden et al. 2004). In the presence of a shRNA targeting Rluc, but not of a control shRNA, Rluc and Fluc expressions were decreased proportionally by about 50%, confirming that Fluc is not expressed from a cryptic promoter or by spurious splicing (Fig.1C). The HIV-1 5'UTR IRES activity had been previously studied in HeLa cells (Brasey et al. 2003; Monette et al. 2009). We worked with Jurkat T cells since they are closely related to the natural target cells of HIV-1. We observed here that the HIV-1 IRES is functional in Jurkat T cells, being about five-fold more active than a control construct where the 5'UTR was inserted in the opposite direction between the Rluc and Fluc coding sequences, and than a control construct where there is no IRES between the Rluc and Fluc coding sequences (data not shown). However, HIV-1

5'UTR IRES is weakly active, being about five-fold less efficient than the well-characterized HCV IRES (data not shown), an IRES known to be very active in a variety of cell lines (Borman et al. 1997).

**Deleting two different regions has an opposite effect on the HIV-1 5'UTR IRES activity.** We investigated which are the regions of the 5'UTR of HIV-1 that are important for the IRES activity. Two deletion mutants were constructed. In mutant M1. $\Delta$ loop202-217, 16 nt in the unstructured loop portion following the PBS were deleted while in mutant M2. $\Delta$ SL134-178, the irregular stem-loop encompassing nt 134-178, which has no known function to date, was deleted. The IRES activity was decreased to  $39\pm 6\%$  of the wild-type IRES activity with M1. $\Delta$ loop202-217, but increased to  $160\pm 8\%$  with M2. $\Delta$ SL134-178 (Fig. 2A). These results suggest that the region encompassing nt 202-217 contains a positive determinant of the 5'UTR IRES activity. In contrast, the 134-178 stem-loop acts a negative determinant of this IRES activity and was named IRENE (for IRES negative element). Both regions are highly conserved among group M subtype B natural variants (see Supplementary Results and Supplementary Fig. 1A and B).

**Disruption of the upper portion of IRENE stimulates the HIV-1 5'UTR IRES activity.** To further investigate which portions of IRENE are involved in the control of HIV-1 5'UTR IRES activity, different mutations were made (described in Fig. 2B and C). IRENE is formed by two stems separated by a 3A internal bulge on one side and a C bulge on the other side. The upper stem is itself interrupted by an AG bulge. We first disrupted either the lower stem (M3.stem134) or the upper stem (M4.stem143). We also made two mutants of the upper stem, M5.stem143up and M6.stem143bot, where either the top or the bottom part of the upper stem was disrupted, (see details in Fig. 2). Finally, we deleted the 7-pyrimidine loop that caps this stem-loop (M7. $\Delta$ loop151) or substituted the pyrimidines of this capping loop with purines (M8.loop151). Mutating the lower stem of IRENE did not influence the IRES activity (see M3.stem134) while disruption of the upper stem increased the IRES activity, as seen with M4.stem143 ( $200\pm 15\%$ ) (Fig. 2B). An increase was also observed, although to a lesser extent, when only the top part of the upper stem was

disrupted (M5.stem143up,  $142\pm 7\%$ ), an effect similar to that obtained with M2. $\Delta$ SL134-178. Deleting or substituting the capping loop (M7. $\Delta$ loop151 and M8.loop151) had no effect. Therefore, our results suggest that the negative determinant for the 5'UTR IRES activity seems to be located in the upper part of IRENE, but that the capping loop is not involved in this effect. We also investigated whether the 3A bulge that separates the upper from the lower stem in IRENE has an effect on the 5'UTR IRES activity. The 3A were substituted with either 3C, 3G or 3U. It was found that when the bulge is made of pyrimidines, the IRES efficiency is significantly higher (M9.CCC: $147\pm 5\%$  and M11.UUU: $139\pm 5\%$ ) than when the bulge is formed by purines (WT with the 3A bulge :  $100\%\pm 8\%$  and M10.GGG: $114\pm 7\%$ ) (Fig. 2C). Sequence alignment showed that IRENE is highly conserved in group M subtype B natural variants as mentioned in the section above. Most of the differences are located in the upper 7-pyrimidine loop, which does not influence the IRES activity. Twenty-one of the 97 variants analyzed have mutations in the upper stem, but only five of these mutations disrupt a base-pair. The 3A bulge is conserved in all these variants except three (see details in Supplementary Results and Supplementary Fig. 1A).

**Oxidative stress increases the activity of wild-type HIV-1 5'UTR IRES, but not that of the M4.stem143 mutant.** We investigated whether the activity of the 5'UTR IRES could be altered by a treatment with chemical agents causing a variety of stresses. We used hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) to induce oxidative stress, thapsigargin to induce an endoplasmic reticulum (ER) stress and deferoxamine (DFX), which is a hypoxia mimetic (Fig. 3). We exposed to these agents either the wild-type IRES or the M4.stem143 mutant, where IRENE is altered and whose activity was increased compared to the wild-type. It is known that a treatment with these stress-inducing agents causes a decrease in cap-dependent initiation (reviewed in Holcik and Sonenberg 2005). This was verified in our assays, using a [ $^{35}$ S] methionine labeling and it was observed that global translation, that reflects cap-dependent translation, was decreased about two-fold under the different stress conditions investigated (Fig. 3A). We measured the Fluc/RLuc ratio under these conditions. RLuc cannot be used to assess transient changes in cap-

dependent initiation (see Loening et al. 2006) because of its stability (half-life superior to 50 h) and its activity remained unchanged when the cells were exposed to the various stresses (see Fig. 3B). We observed that wild-type HIV-1 IRES activity, but not that of the M4.stem143 mutant, was increased about two-fold in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TBHQ, which induce oxidative stress. No change in the IRES activity was seen with agents that induce either an ER stress or hypoxia. These results therefore suggest that the effect of mutating IRENE can be reproduced by an exposure of the wild-type IRES to oxidative stress.

**The HIV-1 5'UTR IRES activity is decreased by mutations located in the DIS hairpin or in loop I downstream of the SD hairpin.** To further characterize the regulation of the HIV-1 5'UTR IRES activity, we also investigated substitution mutations that were found by Abbink et al. (2005) to influence the BMH-LDI switch (see Introduction) (Fig. 4). Two of the six mutations investigated, M12.DIS240 and M16.loopI302, influenced the 5'UTR IRES activity, decreasing its value to approximately 60% of wild-type efficiency. These mutations consisted, respectively, of a substitution of three purines with pyrimidines in a four-nt bulge in the bottom part of the DIS hairpin and in a substitution of four A with pyrimidines in the beginning of loop I, downstream of the SD hairpin. When the purines directly opposite to the four-nt bulge in the DIS hairpin were substituted with pyrimidines (M13.DIS278), when the two purines located at the end of loop I were substituted with pyrimidines (M17.loopI310) or when the SD hairpin was mutated (M14.SD296 and M15.SD293), there was no effect on the IRES activity. It was also observed that, in M15.SD293, the sequence of the splicing donor site in the 5'UTR of HIV-1 RNA is mutated, but the expression of Fluc in this construct is not affected (data not shown), in line with the fact that Fluc expression results from a genuine IRES activity and not from a splicing event (see above). The four-nt bulge in the DIS hairpin is highly conserved, but the A stretch in loop I shows some variability among natural variants of HIV-1 group M subtype B (see Supplementary Results and Supplementary Fig. 1C and D).

M12 was shown by Abbink et al. (2005) to favor the BMH conformation whereas M16 favored the LDI conformation. Both mutants had a similar effect on the IRES activity,

which does not support an involvement of the proposed BMH-LDI switch in the IRES activity. Abbink et al. had already observed that such a switch did not influence translation of the HIV-1 full-length mRNA, using conditions where cap-dependent translation predominates. Our results indicate that this putative switch has also no impact on the IRES activity but they reveal two additional regions that can influence HIV-1 IRES activity.

## Discussion

Our aim was to obtain insights into the regulation of the activity of the IRES located in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA through a mutational analysis. In this study, we describe RNA regions important for the activity of the HIV-1 5'UTR IRES. We found three positive determinants (nt 202-217, nt 240-242 and nt 302-305) whose presence increases the IRES activity about two-fold and one negative determinant, a stem-loop encompassing nt 134-178 called IRENE, which decreases the IRES activity about two-fold. We also found that oxidative stress increases the wild-type IRES activity about two-fold but not that of the M4.stem143 mutant IRES with a mutated IRENE, whose activity is about two-fold that of the wild-type. This is the first study showing that oxidative stress activates the 5'UTR IRES of HIV-1.

Deleting the 202-217 portion of the PBS loop or mutating the 240-242 bulge of the DIS hairpin or the 302-305 portion of loop I could remove the binding site for an unknown cellular factor whose binding stimulates the IRES activity, or could result in a conformational change that promotes a less active IRES conformation. The mutated/deleted nt in all these three mutants are very reactive according to Wilkinson et al. (2008), which implies that they are well exposed and free to interact with a factor. We observed that mutating the nt opposite to the 240-242 bulge in the DIS hairpin or mutating the last two nt of loop I did not change the IRES activity. This suggests that the decrease in the IRES activity obtained when nt 240-242 or nt 302-305 are mutated rather results from an effect localized to a well-defined region of the IRES than from a conformational change in the DIS hairpin or in loop I. It thus favors the possibility that nt 240-242 and nt 302-305 could

be parts of the binding site for an ITAF. For the mutant with the deleted PBS loop, both a conformational change and the loss of the binding site for an ITAF could influence the IRES activity.

The effect of IRENE on the IRES activity is more complex. Our results show that the IRES activity is weaker in the presence of IRENE than in its absence, but that mutations in the upper stem of IRENE increase the IRES activity. Moreover, inducing oxidative stress increases the activity of the wild-type IRES but not that of the M4.stem143 mutant, which is more active than the wild-type. Figure 5 shows the secondary structure of wild-type and mutated IRENE, determined by the standard mfold algorithm. The secondary structure of IRENE is quasi-identical in the different structures that were proposed for the 5'UTR of HIV-1 full-length RNA (reviewed in Wilkinson et al. 2008) and the structure of IRENE determined by mfold is identical to that found in the Weeks conformation that we used throughout this study. The structure of IRENE for the M3.stem134, M6.stem143bot, M7.Δloop151 and M8.loop151 mutants is very similar to that of the wild-type (Fig. 5A and C), conserving the same orientation of the bend induced by the 3A bulge separating IRENE in two parts. These four mutants have an IRES activity comparable to that of the wild-type IRES and it could be suggested that the wild-type IRES and these mutants adopt a weakly active conformation, which could be stabilized by the binding of a negative factor. As to the mutants with an increased IRES activity due to either the deletion or a mutation in the upper stem of IRENE (M2.ΔSL134-178, M4.stem143, M5.stem143), they have a different conformation for IRENE, but this is consistent with the fact that a variety of IRES structures can recognize the ribosome (Jackson et al. 2010). Finally, substituting the 3A bulge with 3G in IRENE did not change the IRES activity while replacing the 3A with pyrimidines increased the IRES activity about 1.5 fold (see Fig. 2C). These 3A are poorly reactive according to Wilkinson et al. (2008) and could thus be involved in RNA-RNA contacts with other parts of the IRES, which could contribute to a weakly active conformation of the IRES. Such contacts would be maintained when the 3A are replaced by 3G but not by pyrimidines.

As mentioned in the Introduction, HIV-1 IRES is activated during viral infection (see Monette et al. 2009). Oxidative stress, one of the pleiotropic effects caused by HIV infection, increases the activity of the wild-type IRES but not of the M4.stem143 mutant. Since the effect of oxidative stress is not additive to that of the M4 mutation, this result strongly suggests that oxidative stress increases the IRES activity *via* an effect on IRENE. A model can be proposed to describe the role of IRENE and oxidative stress in the increase in HIV-1 IRES activity, which is illustrated in Figure 6. The IRES could initially adopt a weakly active conformation that is stabilized by the binding of a repressor cellular protein to IRENE, as suggested above. In the course of the viral infection, a decrease in global protein synthesis would decrease the level of repressor. This could make IRENE available for interacting with a stimulatory ITAF that could act as a chaperone and help the IRES to adopt a more active conformation, such as that we artificially induced by mutating the upper stem of IRENE (Fig. 5D). The ITAF could be a cellular protein which would be relocalized in the cytoplasm or whose expression would be induced by oxidative stress following viral infection. This hypothetical model thus suggests that IRENE controls the IRES activity through the conformation it adopts. Although this model is attractive, it is presently speculative and relies strongly on the structures of IRENE obtained with the folding algorithm. Further study of the effect of IRENE on HIV-1 IRES activity requires a characterization of the proteins that interact with this structure.

It could be argued that the effect of mutating IRENE or inducing oxidative stress is modest. It is however worth recalling that an increase of about two-fold in the IRES activity of the foot-and-mouth disease virus was related to its hypervirulence in BHK (baby hamster kidney) -21 cells (Martinez-Salas et al. 1993) and that an increase of about two-fold in the IRES activity of *c-myc*-RNA was linked to the occurrence of multiple myeloma (Chappell et al. 2000). Also, microRNAs have powerful physiological effects although their effects on translation of individual targets are often moderate, being in the range of 1.5 to two-fold (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008).

In conclusion, our results suggest that the control of the HIV-1 5'UTR IRES activity is a complex event that likely combines conformational changes and the effect of cellular

repressors and activators that bind to this IRES. Our results identified IRENE, a stem-loop that could play a role in the activation of this IRES upon viral infection in response to oxidative stress. More work is needed to understand the mechanism of stimulation of HIV-1 IRES by oxidative stress via IRENE and the regulation of this IRES during the virus replication cycle. The IRES-dependent translation of HIV-1 full-length mRNA must be tightly regulated during viral infection so as to favor viral replication. It will be important to characterize when this IRES is activated and utilized during the virus replication cycle and to identify the proteins which are involved in this utilization.

### **Funding**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.B.-G. , G.F. and N.H. K.G. acknowledges a studentship from CIHR. N.H. acknowledges a CIHR New Investigator fellowship and G.F. acknowledges a FRSQ Senior fellowship.

### **Acknowledgements**

We thank Ivan Shatsky from Moscow State University for the generous gift of pBS-U6-RLi and pBS-U6-Apa1 and we thank Johanie Charbonneau, Pascal Chartrand, Dominic Dulude, Alexey Karetnikov and Stephen Michnick for stimulating discussions and for critical reading of this manuscript.

## References

1. Pestova, T.V., Lorsh, J.R. and Hellen, C.U.T. (2007) In Mathews, M. B., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. B. (eds.), *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 87-128.
2. Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731-745.
3. Jackson, R.J., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 113-127.
4. Lopez-Lastra, M., Rivas, A. and Barria, M.I. (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res*, **38**, 121-146.
5. Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P. and Fernandez, N. (2008) New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol*, **89**, 611-626.
6. Jackson, R.J. (2005) Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1231-1241.
7. Doudna, J. and Sarnow, P. (2007) In Hershey, J. W., Mathews, M. B. and Sonenberg, N. (eds.), *Translational control in Biology and Medicine*. CSH Press, New York, pp. 297-318.
8. Hellen, C.U. (2009) IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 558-570.
9. Filbin, M.E. and Kieft, J.S. (2009) Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 267-276.
10. Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D. and Ohlmann, T. (2009) Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 542-557.

11. Fitzgerald, K.D. and Semler, B.L. (2009) Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 518-528.
12. Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*, **62**, 2636-2643.
13. Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, **334**, 320-325.
14. Bolinger, C. and Boris-Lawrie, K. (2009) Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology*, **6**, 8.
15. Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M. and Darlix, J.L. (2000) An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem*, **275**, 11899-11906.
16. Nicholson, M.G., Rue, S.M., Clements, J.E. and Barber, S.A. (2006) An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform. *Virology*, **349**, 325-334.
17. Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M. and Siliciano, R.F. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol*, **75**, 181-191.
18. Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L. and Sonenberg, N. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol*, **77**, 3939-3949.
19. Herbreteau, C.H., Weill, L., Decimo, D., Prevot, D., Darlix, J.L., Sargueil, B. and Ohlmann, T. (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1001-1007.

20. Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C.H., Ohlmann, T. and Sargueil, B. (2010) A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res*, **38**, 1367-1381.
21. Vagner, S., Waysbort, A., Marena, M., Gensac, M.C., Amalric, F. and Prats, A.C. (1995) Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem*, **270**, 20376-20383.
22. Berlioz, C. and Darlix, J.L. (1995) An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol*, **69**, 2214-2222.
23. Deffaud, C. and Darlix, J.L. (2000) Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol*, **74**, 11581-11588.
24. Camerini, V., Decimo, D., Balvay, L., Pistello, M., Bendinelli, M., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2008) A dormant internal ribosome entry site controls translation of feline immunodeficiency virus. *J Virol*, **82**, 3574-3583.
25. Vallejos, M., Ramdohr, P., Valiente-Echeverria, F., Tapia, K., Rodriguez, F.E., Lowy, F., Huidobro-Toro, J.P., Dangerfield, J.A. and Lopez-Lastra, M. (2010) The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res*, **38**, 618-632.
26. Brierley, I. and Dos Ramos, F.J. (2006) Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res*, **119**, 29-42.
27. Brakier-Gingras, L. and Dulude, D. (2010) In Atkins, J. and Gesteland, R. (eds.), *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*. Springer, New York, pp. 175-192.
28. Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2007) Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 128-140.
29. Yilmaz, A., Bolinger, C. and Boris-Lawrie, K. (2006) Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res*, **4**, 131-139.

30. Berkhout, B. (1996) Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **54**, 1-34.
31. Wilkinson, K.A., Gorelick, R.J., Vasa, S.M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D.H., Giddings, M.C. and Weeks, K.M. (2008) High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol*, **6**, e96.
32. Huthoff, H. and Berkhout, B. (2001) Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA*, **7**, 143-157.
33. Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C.L. and Weeks, K.M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, **460**, 711-716.
34. Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2004) First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem*, **279**, 48397-48403.
35. Ricci, E.P., Soto Rifo, R., Herbreteau, C.H., Decimo, D. and Ohlmann, T. (2008) Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans*, **36**, 690-693.
36. Charnay, N., Ivanyi-Nagy, R., Soto-Rifo, R., Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M. and Darlix, J.L. (2009) Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology*, **6**, 74.
37. Rivas-Aravena, A., Ramdohr, P., Vallejos, M., Valiente-Echeverria, F., Dormoy-Raclet, V., Rodriguez, F., Pino, K., Holzmann, C., Huidobro-Toro, J.P., Gallouzi, I.E. *et al.* (2009) The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology*, **392**, 178-185.
38. Monette, A., Ajamian, L., Lopez-Lastra, M. and Mouland, A.J. (2009) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. *J Biol Chem*, **284**, 31350-31362.

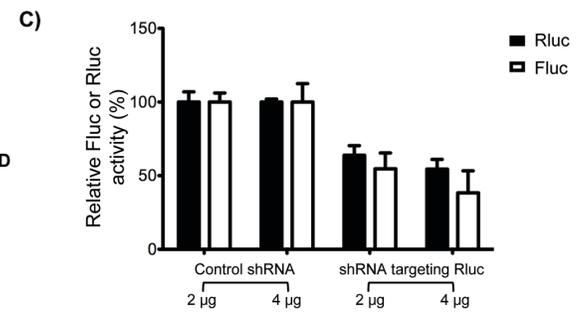
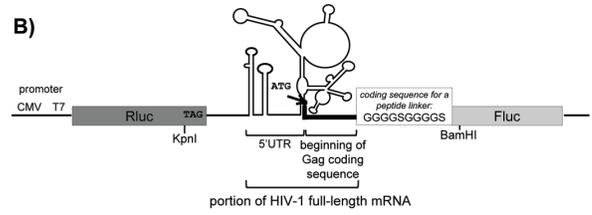
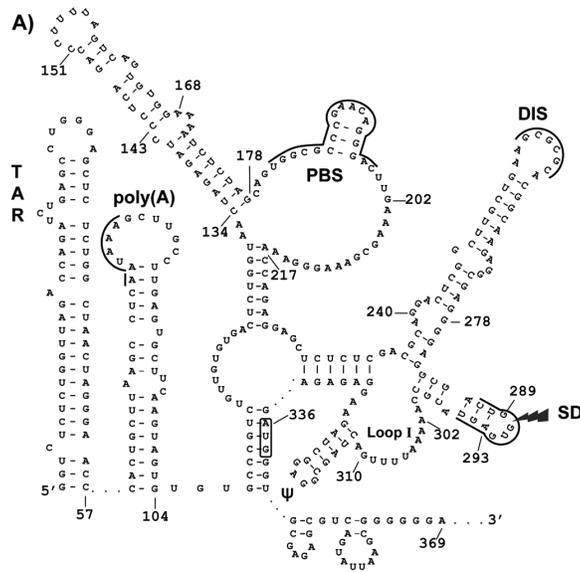
39. Waysbort, A., Bonnal, S., Audigier, S., Esteve, J.P. and Prats, A.C. (2001) Pyrimidine tract binding protein and La autoantigen interact differently with the 5' untranslated regions of lentiviruses and oncoretrovirus mRNAs. *FEBS Lett*, **490**, 54-58.
40. Chang, Y.N., Kenan, D.J., Keene, J.D., Gatignol, A. and Jeang, K.T. (1994) Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol*, **68**, 7008-7020.
41. Davy, C. and Doorbar, J. (2007) G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, **368**, 219-226.
42. Andersen, J.L. and Planelles, V. (2005) The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res*, **3**, 43-51.
43. Castello, A., Franco, D., Moral-Lopez, P., Berlanga, J.J., Alvarez, E., Wimmer, E. and Carrasco, L. (2009) HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One*, **4**, e7997.
44. Pyo, C.W., Lee, S.H. and Choi, S.Y. (2008) Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN-gamma activation signaling in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **377**, 1001-1006.
45. Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Fan, S., Del Valle, L., Michiels, C., Sweet, T., Rom, I., Khalili, K., Rappaport, J., Amini, S. *et al.* (2009) Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J Biol Chem*, **284**, 11364-11373.
46. Lindl, K.A., Akay, C., Wang, Y., White, M.G. and Jordan-Sciutto, K.L. (2007) Expression of the endoplasmic reticulum stress response marker, BiP, in the central nervous system of HIV-positive individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **33**, 658-669.
47. Peruzzi, F. (2006) The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci*, **11**, 708-717.
48. Peden, K., Emerman, M. and Montagnier, L. (1991) Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology*, **185**, 661-672.

49. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
50. Venkatesan, A., Sharma, R. and Dasgupta, A. (2003) Cell cycle regulation of hepatitis C and encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site-mediated translation in human embryonic kidney 293 cells. *Virus Res*, **94**, 85-95.
51. Van Eden, M.E., Byrd, M.P., Sherrill, K.W. and Lloyd, R.E. (2004) Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA*, **10**, 720-730.
52. Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M. and Kean, K.M. (1997) Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res*, **25**, 925-932.
53. Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 318-327.
54. Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M. and Gambhir, S.S. (2006) Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel*, **19**, 391-400.
55. Abbink, T.E., Ooms, M., Haasnoot, P.C. and Berkhout, B. (2005) The HIV-1 leader RNA conformational switch regulates RNA dimerization but does not regulate mRNA translation. *Biochemistry*, **44**, 9058-9066.
56. Martinez-Salas, E., Saiz, J.C., Davila, M., Belsham, G.J. and Domingo, E. (1993) A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol*, **67**, 3748-3755.
57. Chappell, S.A., LeQuesne, J.P., Paulin, F.E., deSchoolmeester, M.L., Stoneley, M., Soutar, R.L., Ralston, S.H., Helfrich, M.H. and Willis, A.E. (2000) A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene*, **19**, 4437-4440.

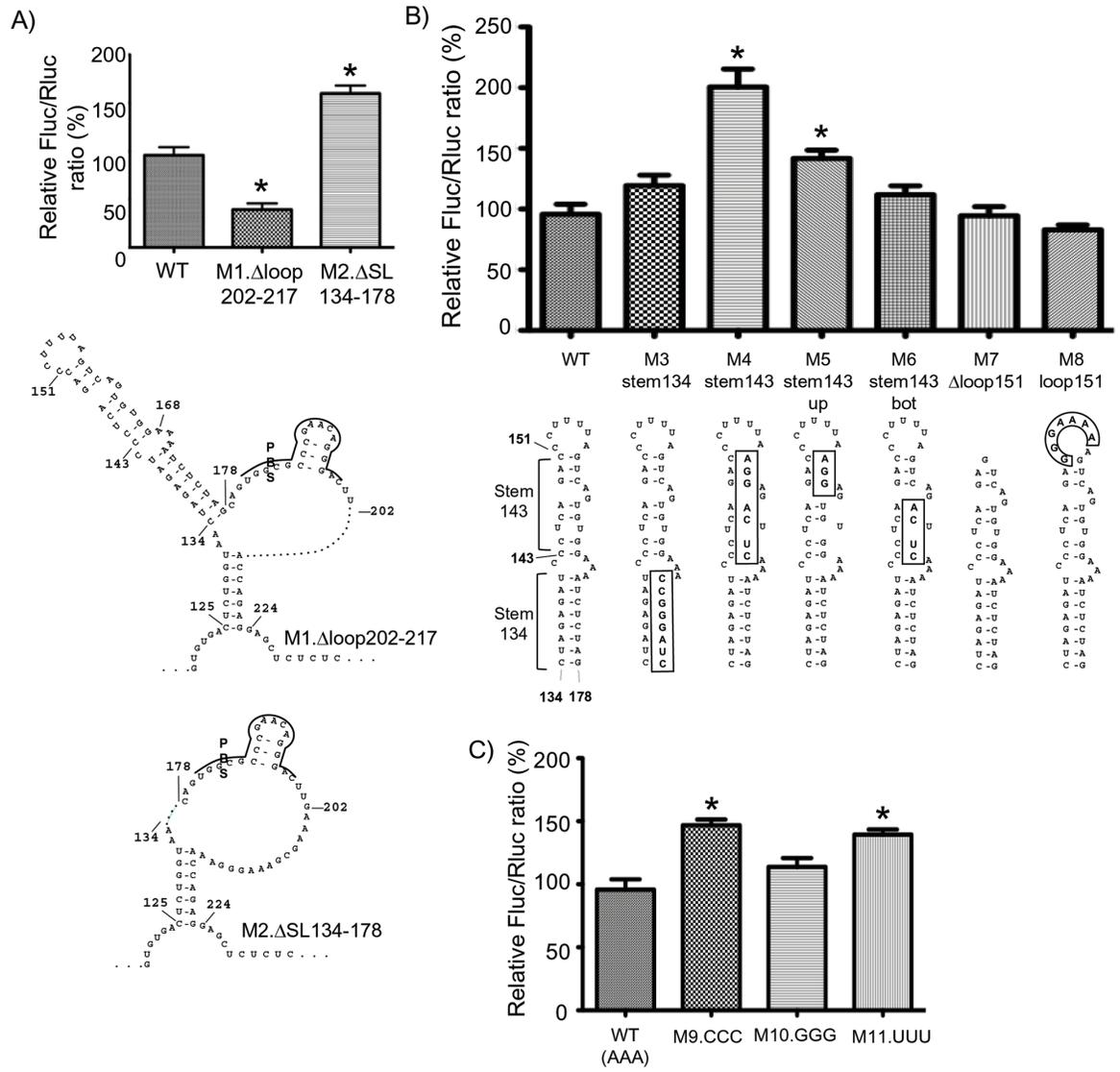
58. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. and Bartel, D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, **455**, 64-71.
59. Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, **455**, 58-63.
60. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-940.
61. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.



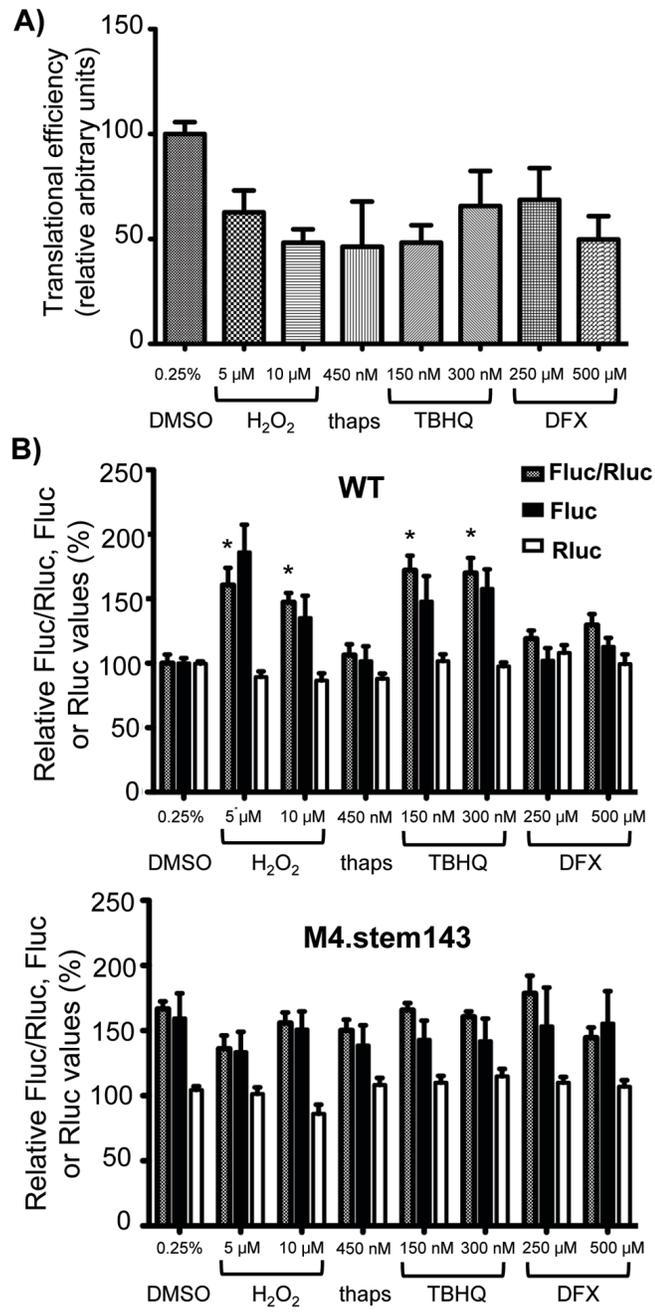
**Figure 2- 1 : Weeks conformation of the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA.** This representation is adapted from Wilkinson et al. (2008). The regulatory motifs are indicated: the TAR structure (nt 1-57), the polyadenylation signal (polyA), the primer binding site (PBS), the dimerization initiation site (DIS), the major splice donor site (SD) and the packaging signal ( $\psi$ ) (nt 312-325). The AUG initiator codon is boxed. (B) Representation of the dual-luciferase reporter, plasmid pFRT-dual-IRES-HIV. This plasmid contains the Rluc and the Fluc coding sequences, under control of a CMV and a T7 promoter, and separated by the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA (nt 1-369 based on pLAI). Translation of Rluc is cap-dependent while translation of Fluc depends on the 5'UTR IRES of HIV-1 RNA. The initiator codon for the Fluc coding sequence is within the 5'UTR IRES. An oligonucleotide coding for a peptide linker was inserted between the 30 nt from the Gag coding sequence that are present in the construct and the beginning of the Fluc coding sequence. (C) Effect of RNA interference against Rluc on the expression of Rluc and Fluc. Jurkat T-cells were cotransfected with the dual-luciferase reporter and either pBS-U6-RLi that expresses a shRNA targeting Rluc or pBS-U6-ApaI that expresses a control shRNA. Jurkat T-cell lysates were assayed for Fluc and Rluc activities 48h post-transfection and these activities were normalized for the protein content. A value of 100% is ascribed to the Rluc and Fluc activity with the control plasmid. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



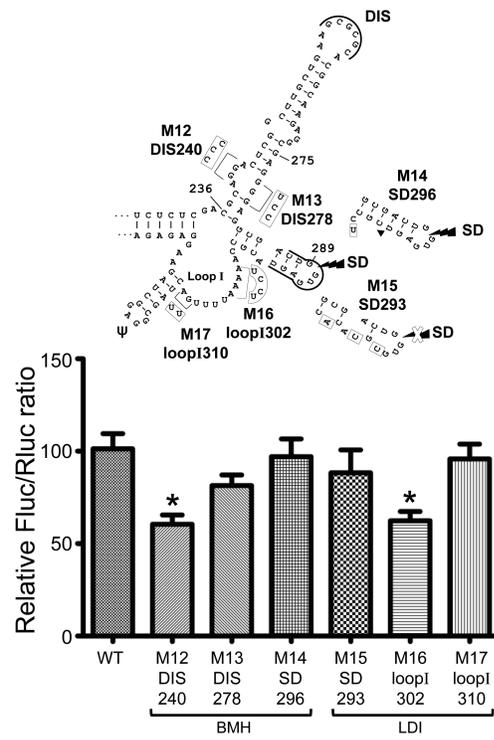
**Figure 2- 2 : HIV-1 5'UTR IRES activity is modulated by two RNA regions.** (A) Two deletion mutations, represented in the Weeks conformation were made in HIV-1 5'UTR IRES and their effect on the IRES activity is shown. (B) Mutations of the upper part of the stem-loop 134-178, named IRENE, increase the IRES activity. The mutations are indicated in boxes. Note that this figure describes the mutations that were introduced but not the structure adopted by the mutant stem-loops (see Fig. 5). (C) Replacement of the 3A bulge of IRENE by 3C or 3U but not by 3G increases the IRES efficiency. The IRES activities for the mutants were assessed in lysates from Jurkat T cells transfected with the corresponding dual-luciferase plasmids. The Fluc/Rluc ratio obtained with the wild-type pFRT-dual-IRES-HIV (WT) was arbitrarily set at 100%. Results are the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. The asterisk indicates mutants that were significantly different from WT ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2- 3 : HIV-1 5'UTR IRES activity is increased in presence of agents that induce oxidative stress.** Jurkat T cells were exposed to different agents (DMSO: control (6 h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide (4 h), thaps: thapsigargin (6 h), TBHQ: tert-butylhydroquinone (6 h) and DFX: deferoxamine (8 h)). (A) The cap-dependent translation is decreased following exposure to the different agents, as shown by metabolic labeling with [<sup>35</sup>S]methionine and measurement of the radioactivity incorporated into trichloroacetic acid-precipitable material. Radioactive counts were normalized for total protein content. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the control sample (DMSO). (B) The activity of WT and M4.stem143 mutant IRES was assessed in cell lysates as described in the legend to Figure 2. Results show the Fluc/Rluc ratio and the Fluc and Rluc activities. A value of 100% was arbitrarily ascribed to WT. Results are the mean ± SEM of three independent experiments. The asterisk indicates the treatments that significantly increase the activity of the WT IRES ( $p < 0.05$ ). The activity of the mutant IRES was not significantly altered by exposure to the different agents.

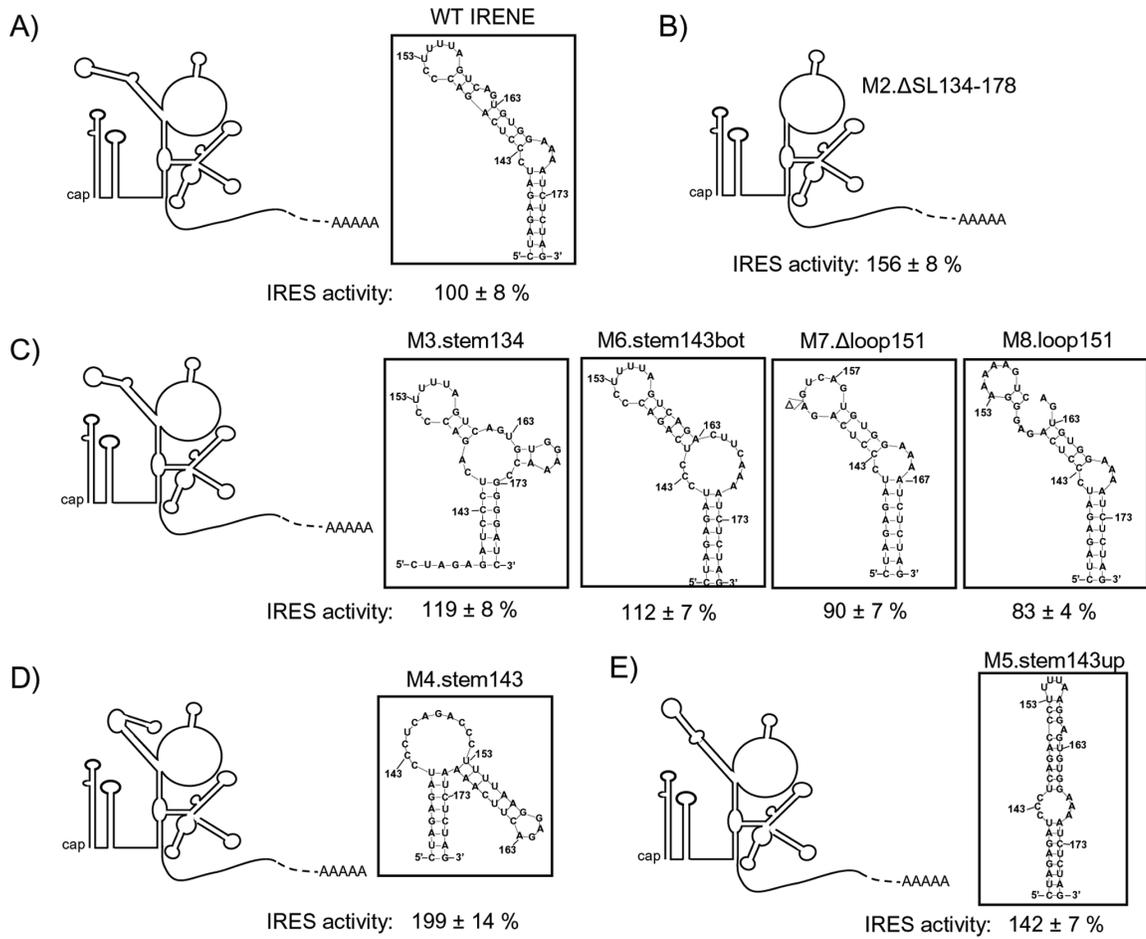


**Figure 2- 4 : HIV-1 5'UTR IRES activity is decreased when nt 240-242 or nt 302-305 are mutated.** The mutants studied here were previously found by Abbink et al. (2005) to favor the BMH or the LDI conformation of the HIV-1 5'UTR (see the text). Mutations (boxes) or a deletion (filled triangle) are represented in the Weeks conformation and the conformation they favor is indicated. The WT and mutant IRES efficiencies were assessed in lysates from Jurkat T cells as described in the legend to Figure 2.

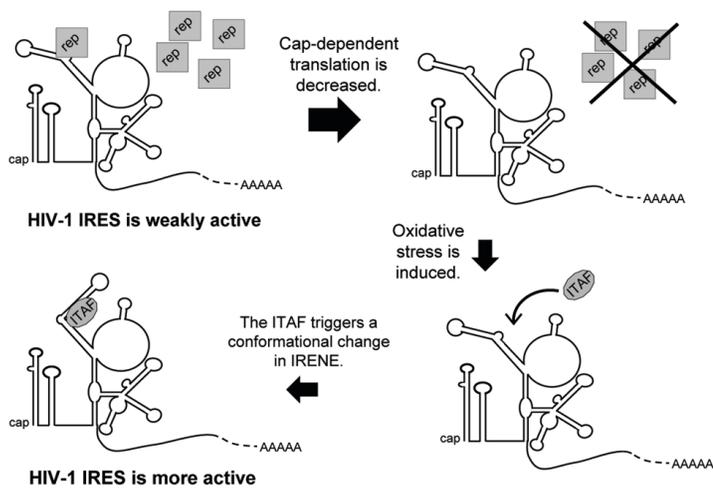


**Figure 2- 5 : The structure of IRENE influences the activity of HIV-1 5'UTR IRES.**

(A) The secondary structure (boxed) of WT IRENE. The presence of the 3A bulge causes a bend between the upper and the lower parts of this stem-loop. (B) In the absence of IRENE (M2. $\Delta$ SL134-178), the IRES activity is increased 1.5 fold. (C) With the M3.stem134, M6.stem143bot, M7 $\Delta$ loop151 and M8.loop151 mutants, the IRES activity is unchanged and the secondary structure of IRENE (boxed) is very similar to that of WT. (D) In the M4.stem143 mutant, the structure of IRENE is drastically changed and the IRES activity is increased two-fold. (E) The M5.stem143up mutation moderately changes the structure of IRENE (boxed), and the IRES activity is increased 1.5 fold. The secondary structure of WT or mutant IRENE was predicted by the mfold algorithm (version 3.2; <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) (Mathews et al. 1999; Zuker 2003).



**Figure 2- 6 : A hypothetical model that accounts for the effects of IRENE and oxidative stress on HIV-1 5'UTR IRES activity.** The model proposes that WT IRENE maintains the IRES in a weakly active conformation, which is stabilized by the binding of a repressor cellular protein (rep). In the course of HIV-1 infection, a decrease in global protein synthesis would decrease the level of this repressor. IRENE could then interact with a stimulatory ITAF, whose expression or relocalization was induced by oxidative stress. Binding of this ITAF causes a conformational change and promotes a more active IRES conformation (see the text).



## **Chapitre 3.**

**The Tat protein stimulates the IRES activity of HIV-1 in  
T cells**

Running title: Tat and HIV-1 IRES activity

**The Tat protein stimulates the IRES activity of HIV-1 in T cells**

Karine Gendron<sup>1,2</sup>, Johanie Charbonneau<sup>1</sup>, Alexandra Cadar<sup>1</sup>, Gerardo Ferbeyre<sup>1</sup> and Léa Brakier-Gingras<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

<sup>2</sup> Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

\*Corresponding author: Léa Brakier-Gingras, Département de biochimie, Université de Montréal, 2900, Blvd Édouard-Montpetit, D-353, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4, E-

Key words: HIV-1 IRES, translation initiation, Tat, PKR

## Abstract

The HIV-1 full-length mRNA expresses the structural proteins and enzymes of the virus. It is translated by the classical cap-dependent mode, but also contains an internal ribosome entry site (IRES) in its 5'untranslated region (UTR). The contribution of this IRES to HIV-1 replication remains undetermined. In this study, we investigated the effect of the Tat viral protein on the activity of HIV-1 IRES. Jurkat T cells were co-transfected with a dual-luciferase reporter containing the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA between the *Renilla* luciferase and the firefly luciferase genes, such that expression of the firefly luciferase depends upon the HIV-1 IRES, and with a plasmid expressing one isoform of Tat. Our results show that the wild-type 86-aminoacid isoform of Tat, but not mutants of this isoform altering its conformation, increases HIV-1 IRES activity. The 72-aminoacid isoform of Tat induces a smaller increase while the 101-aminoacid isoform of Tat does not affect the IRES activity. PKR is known to be involved in some effects of Tat on translation. We investigated whether it is also involved in the effect of Tat on the HIV-1 IRES activity. We observed that this effect of Tat was independent of PKR but, surprisingly, overexpression of wild-type PKR or of a mutant of PKR that does not phosphorylate eIF2 stimulates the HIV-1 IRES. This effect is not observed with a catalytically inactive mutant of PKR. Hypotheses are presented to account for the effect of Tat and PKR on the HIV-1 IRES activity.

## Introduction

Initiation of translation of most eukaryotic cellular messenger RNAs (mRNAs) occurs by a cap-dependent mechanism. This mode of initiation involves binding of a 40S ribosomal subunit and associated factors to the cap of the mRNA and subsequent scanning in the 3' direction until an AUG codon in an appropriate context is encountered (reviewed in Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010). Alternatively, some cellular and viral mRNAs use a structural RNA element, called internal ribosome entry site (IRES), to recruit a 40S ribosomal subunit close to or directly at an initiation codon (reviewed in Jackson 2005; Lopez-Lastra et al. 2005; Doudna and Sarnow 2007; Martinez-Salas et al. 2008; Hellen 2009). A functional IRES was found in the 5' untranslated region (5'UTR) of HIV-1 full-length mRNA (Brasey et al. 2003), which codes for Gag, the precursor of the virus structural proteins and Gag-Pol, the precursor of the viral enzymes. The presence of this IRES suggests that this mRNA can initiate protein synthesis not only through the canonical cap-dependent mode but also by the alternative IRES-dependent mode. All HIV-1 mRNAs contain a functional IRES in their 5'UTR, identical to the IRES present in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, except for the lack of 46 nt on the 3' side (see Yilmaz et al. 2006). The molecular mechanisms that control HIV-1 IRES activity are not clearly understood. Some cellular proteins acting as IRES trans-acting factors (ITAFs) were found to modulate this activity: the human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like protein HuR downregulates HIV-1 IRES efficiency (Rivas-Aravena et al. 2009) whereas the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (Monette et al. 2009), the initiation factor eIF5a, the human rev-interacting protein (hRIP) and the RNA helicase DDX3 (Liu et al. 2011b) upregulate its efficiency. Recently, Vallejos et al. (2011b) showed that the activity of HIV-1 IRES is modulated by ITAFs in a cell-cycle dependent manner. Translation studies in reticulocyte lysates showed that Gag (and implicitly Gag-Pol) can be expressed by both cap-dependent and IRES-dependent modes, but the cap-dependent mode is predominant (Ricci et al. 2008b). More recently, it was confirmed that cap-dependent

initiation was also predominant in cultured cells (Berkhout et al. 2011; Charbonneau et al. 2012). It is hypothesized that the IRES-dependent initiation could allow viral mRNAs to bypass the repression of global cellular translation that occurs during viral infection and targets cap-dependent initiation (reviewed in Balvay et al. 2007; 2009). This is supported by the fact that translation initiation with the HIV-1 IRES is stimulated in cultured cells that have been arrested in the G2/M phase of the cell cycle (Brasey et al. 2003), under which conditions global cellular cap-dependent initiation is greatly decreased (Pyronnet et al. 2001). The translation initiation with the HIV-1 IRES-dependent mode is also stimulated in cells exposed to oxidative stress (Gendron et al. 2011) or osmotic stress (Monette et al. 2009). It is therefore assumed that the IRES-dependent translation of HIV-1 mRNAs could ensure expression of the viral proteins when the viral protein Vpr induces G2 cell cycle arrest (Andersen and Planelles 2005; Davy and Doorbar 2007) and when eIF4G and poly(A) binding protein (PABP), both required for cap-dependent initiation, are targeted by the viral protease (Castello et al. 2009) during the late stages of the virus replication cycle.

In this study, we investigated the effect of the Tat viral protein on HIV-1 IRES activity. Tat is encoded by two exons and is expressed as a one-exon form (72 amino acids) and a two-exon form (101 amino acids). The 101-residue Tat (Tat101) is expressed predominantly during early stages of viral infection whereas the 72-residue Tat (Tat72), is expressed predominantly in the late stages of viral infection (Malim et al. 1988). In addition, in several laboratory strains of HIV-1, a C-terminal truncated version of Tat101 with 86 amino acid residues (Tat86), resulting from a mutation generating a premature stop codon, replaces Tat101 (Neuveut and Jeang 1996) and has been used in several studies investigating the role of Tat. Tat is separated in six regions on the basis of amino acid distribution in the sequence and each region is associated with specific functions (see details in Fig. 1C) (reviewed in Karn 2000; Marcello et al. 2001; Gibellini et al. 2005). Tat undergoes multiple post-translational modifications that regulate the dynamics of its interactions with RNA and host cell factors (reviewed in Hetzer et al. 2005). Structural data from NMR spectroscopy and crystallography revealed that Tat has a highly flexible structure and can adopt different conformations when bound to host factors (D'Orso and Frankel 2010a; Shojania et al. 2010; Tahirov et al. 2010). The major role of Tat is

transactivation of the transcription of HIV-1 mRNAs. This function, which is exerted by the three isoforms of Tat, requires the binding in the nucleus of Tat to TAR (the transactivation responsive element), a RNA stem-loop present at the 5' end of all HIV-1 mRNAs (reviewed in Karn 1999; Gatignol 2007). Tat also stimulates transcription of genes under control of heterologous promoters such as the CMV promoter, probably by stimulating the binding of transcription factors (Kim and Risser 1993). Moreover, Tat stimulates cap-dependent translation. First, it relieves the blockade of cap-dependent initiation caused by the presence of a structured 5'UTR in all HIV-1 mRNAs and depending mostly upon the TAR structure at the 5' end of these mRNAs (Cullen 1986; SenGupta et al. 1990; Geballe and Gray 1992; Yilmaz et al. 2006; Charbonneau et al. 2012). Second, Tat interacts with the cellular double-stranded (ds) RNA-dependent protein kinase PKR, a kinase that inhibits cap-dependent translation by phosphorylating the  $\alpha$  subunit of the initiation factor 2 (eIF2). The activation of PKR by autophosphorylation is induced under different conditions caused by the viral infection and activated PKR phosphorylates a variety of targets, eIF2- $\alpha$  being the best characterized (reviewed in Clerzius et al. 2011). It has been observed that both Tat72 and Tat86 compete with eIF2 for phosphorylation by PKR (Brand et al. 1997; Cai et al. 2000). However, one study showed that Tat72 but not Tat86 binds PKR and directly inhibits its activation by preventing its autophosphorylation. Accordingly, in this study, phosphorylation of Tat72 by PKR was not observed (McMillan et al. 1995). As to Tat101, there are no data in the literature concerning its interaction with PKR. In addition to its role in HIV-1 transcription and translation, Tat exerts multiple pleiotropic effects that affect several important biological activities in the infected cells (reviewed in Gibellini et al. 2005; Romani et al. 2010).

We show here that Tat86 and Tat72, although to a lower extent, increase HIV-1 IRES activity and that this effect is independent of the presence of TAR. Mutants of Tat failed to increase HIV-1 IRES activity. In contrast to Tat72 and 86, Tat101 does not affect the IRES activity. Because of the existing relationship between Tat and PKR, and also because PKR has been shown to stimulate the activity of the IRES of various viral and cellular mRNAs (Fernandez et al. 2002; Gerlitz et al. 2002; Rivas-Estilla et al. 2002), we

also investigated whether the effect of Tat on HIV-1 IRES activity was mediated through PKR. Our results show that this effect of Tat is independent of PKR. However, interestingly, we found that overexpression of wild-type PKR or a mutant PKR that does not phosphorylate eIF2, but not a PKR mutant that is catalytically inactive, increases HIV-1 IRES activity, relating the effect of PKR to the phosphorylation of a substrate other than eIF2. Furthermore, the effects of PKR and Tat on the IRES activity were not additive. Hypotheses are presented that explain the effect of Tat and PKR on HIV-1 IRES activity.

## Results

### **Description of the reporter used in this study to monitor HIV-1 IRES activity.**

To study the effect of Tat on the IRES located in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, a standard dual-luciferase reporter system was used (Fig. 1A), where the *Renilla* luciferase (Rluc) translation is cap-dependent whereas the firefly luciferase (Fluc) translation depends on the HIV-1 5'UTR IRES. This reporter was described and characterized in Gendron et al. (2011). We previously confirmed, using a shRNA targeting the Rluc coding sequence (see Van Eden et al. 2004), that Fluc is not expressed from a cryptic promoter or by spurious splicing (see details in Gendron et al. 2011). We decided to assess the activity of HIV-1 IRES in the presence of Tat in Jurkat T cells since they are related to the natural target cells of HIV-1.

**Different isoforms of Tat have different effects on the level of the reporter mRNA, on HIV-1 IRES activity and on cap-dependent translation.** We first investigated the effect of HIV-1 Tat protein on the activity of the IRES present in the 5'UTR of the full-length HIV-1 mRNA, using the dual-luciferase reporter and an expression vector that encodes Tat cDNA (Fig. 1B). The resulting Tat has an HA tag in its N-terminus. We used different isoforms of Tat (Fig. 1C): the two-exon form of Tat (Tat101), the C-terminal truncated form of Tat101 (Tat86) and the one-exon form of Tat (Tat72). The activity of HIV-1 IRES was monitored in Jurkat T cells in the presence of increasing amounts of each Tat isoform (from 0 to 4  $\mu$ g of the transfected Tat-expressing plasmid) (see Fig. 2). First, we confirmed by Western blot that the three isoforms were

expressed at a similar level in Jurkat T cells, as shown in Fig 2A. Since Tat can stimulate transcription of genes under control of the CMV promoter independently of the presence of TAR at the 5' end of the mRNA, we investigated whether the addition of each Tat isoform affects the level of the reporter mRNA (Fig. 2B). We next studied their effect on HIV-1 IRES activity (Fig. 2C) and on cap-dependent translation (Fig 2D). HIV-1 IRES activity is expressed as the ratio of the Fluc activity to the mRNA level to normalize for any variation in the level of the reporter mRNA. We did not use the ratio of the Fluc activity to the Rluc activity since Tat also affects cap-dependent translation (Charbonneau et al. 2012 and references therein). Our results show that Tat86 and Tat101, although to a lower extent, increase the level of the reporter mRNA, while Tat72 does not have this effect. Our results also show that addition of Tat86 greatly stimulates HIV-1 IRES activity. Upon increasing the expression of Tat, this activity reaches a peak of eight-fold its basal value followed by a slow decline to four-fold its basal value. Tat86 also increases cap-dependent translation, reaching a maximum of almost three-fold its basal value followed by a slow decline. Tat72 increases HIV-1 IRES activity and cap-dependent translation up to two-fold in a dose-dependent manner whereas Tat101 neither affects the IRES activity nor the cap-dependent translation. Altogether, these results show that the three Tat isoforms have different effects on the level of the reporter mRNA, on HIV-1 IRES activity and on cap-dependent translation. When a dual-luciferase reporter was used where the Fluc expression was dependent upon the hepatitis C virus (HCV) IRES, we also observed that the Tat isoforms influence HCV IRES activity in the same way they affect HIV-1 IRES activity (see Fig. 3). Tat86 being the isoform with the greatest impact on the IRES activity, we focused our following experiments on this isoform.

**The effect of Tat86 on HIV-1 IRES activity is independent of TAR but this effect disappears when C31, K41 or K51 is mutated.** Tat is known to strongly bind TAR in the nucleus whereas its binding to TAR in the cytoplasm has been questioned (Luo and Peterlin 1993; Stauber and Pavlakis 1998; Wei et al. 1998). We investigated whether the effect of Tat86 on the HIV-1 IRES activity is dependent on the presence of TAR (Fig. 4A) and found that Tat86 has the same effect on HIV-1 IRES activity whether TAR is absent or

present upstream of the IRES between the Rluc and the Fluc genes in our dual-luciferase construct. We next selected three mutants of Tat86 with an amino acid substitution in different regions of the protein and investigated their effect on HIV-1 IRES activity (Fig. 4B). We selected three mutants: Tat86-C31S in the cysteine-rich region (Campbell et al. 2007; Li et al. 2008), Tat86-K41A in the core region (Rice and Carlotti 1990; Jeang et al. 1999) and Tat86-K51A in the basic region (Bennasser et al. 2005; Qian et al. 2009). Each of these mutants affects a different function of Tat. The expression of these three mutants was comparable to that of the wild-type Tat86, as verified by Western blotting (Fig. 4C). However, none of the mutants increased HIV-1 IRES activity. Neither did they affect the cap-dependent translation (data not shown).

**PKR increases the HIV-1 IRES activity.** To address the possibility that the effect of Tat86 on HIV-1 IRES activity could be related to its effect on PKR, we investigated the effect of Tat86 on the HIV-1 IRES activity in the presence of wild-type PKR (PKR wt) or two PKR mutants, a catalytically inactive mutant (PKR K296R) and a mutant of PKR that cannot phosphorylate eIF2- $\alpha$  (PKR T487A). First, Jurkat T cells were co-transfected with the dual-luciferase reporter, a vector not expressing Tat and either a plasmid expressing PKR wt, PKR K296R, PKR T487A or a control protein ( $\beta$ -galactosidase) (left part of Figure 5). This experiment shows that overexpression of PKR wt or PKR T487A, but not PKR K296R, increases HIV-1 IRES activity about two-fold (column four vs column one and three). Then, Jurkat T cells were co-transfected with the dual-luciferase construct, a Tat86-expressing vector and either PKR wt, PKR K296R, PKR T487A or  $\beta$ -galactosidase (right part of Figure 5). When Tat86 is co-expressed with the control protein, HIV-1 IRES activity is increased about two and a half to three-fold (column four vs column eight). Interestingly, an increase of about three-fold in the IRES activity is observed when Tat86 is co-expressed with any form of PKR, wild-type or mutant (column four vs columns five, six or seven). This shows that the effect of Tat is not mediated by PKR since it is not affected by the presence of an inactive PKR. Also, the effect of Tat and PKR are not additive (column one versus column five), which suggests that they could act via the same pathway. As expected and likely related to the lack of phosphorylation of eIF2, the cap-dependent translation, monitored by the Rluc activity, is increased about two-fold when PKR K296R

or T487A was overexpressed, in presence or in absence of Tat86 (data not shown). Note that the stimulation of HIV-1 IRES activity by Tat86 is smaller in the assays presented in Figure 5, by comparison to the assays presented in Figure 2. This is likely due to differences in the experimental conditions, such as the cotransfection with three plasmids in the latter assays, which results in less ribosomes available for the IRES-dependent translation with the dual-luciferase construct.

## Discussion

In this study, we investigated the effect of Tat and PKR on HIV-1 IRES activity. We showed that Tat86 greatly increases HIV-1 IRES activity and this effect is independent of the presence of TAR. Introducing mutations in different locations of Tat86 prevents this increase. Also, Tat72 increases HIV-1 IRES activity, although to a lesser extent than Tat86, but Tat101 does not increase this activity. We also observed that overexpression of wild-type PKR or a mutant of PKR that cannot phosphorylate eIF2- $\alpha$  (PKR T487A) increases HIV-1 IRES activity, but not overexpression of a catalytically inactive mutant of PKR (PKR K296R). Interestingly, co-expression of Tat86 and wild-type PKR or PKR T487A did not induce a greater increase of HIV-1 IRES activity than that they cause separately.

We found that the three isoforms of Tat do not have the same effect on the level of the reporter mRNA, on the cap-dependent translation and on the IRES-dependent translation of our dual-luciferase reporter. As expected, Tat86 and Tat72 stimulate cap-dependent translation, an effect that can be ascribed to the competition of Tat with eIF2 for binding to PKR. Tat101 does not affect cap-dependent translation in our experiments, which suggests that this isoform does not bind to PKR or at least, does not to compete with the binding of eIF2. Differences in the activity of the Tat isoforms have already been reported (McMillan et al. 1995; Brand et al. 1997; Ott et al. 1997; Lopez-Huertas et al. 2010). Here, we show additional differences between these isoforms. In our experiments, Tat86 have the greatest impact on the reporter mRNA level, on cap-dependent translation and on HIV-1 IRES activity. This could explain its appearance in laboratory strains after

several passages in cultured cells since this isoform stimulates more efficiently the expression of HIV-1 proteins in cultured cells. However, the situation is not comparable when the virus replicates in living organisms, and, under these conditions, Tat101 is not replaced by Tat86 (Jeang et al. 1999). Altogether, our results stress the importance of using the appropriate isoforms of Tat when investigating its effects during the viral replication cycle

Our results also suggest that the conformation of Tat is important for its effect on HIV-1 IRES activity. The structure of the free Tat protein is very flexible and its conformation is mostly determined by host partners (D'Orso and Frankel 2010a; Shojania et al. 2010; Tahirov et al. 2010). We can hypothesize that the different isoforms of Tat used in this study most likely have different conformations, which might affect their capacity to interact with cellular proteins. For instance, it was shown that lysine 41 is implicated in intramolecular interactions that are important for the structural integrity of Tat (Tahirov et al. 2010). Also, lysine 50 and 51 are acetylation sites (Hetzer et al. 2005) and lysine 51 is also a methylation site (Pagans et al. 2010). Mutating residues that are post-translationally modified might affect the conformation of Tat. The differences observed in the effect of the isoforms of Tat could also be explained by a difference in their cellular localization although such a difference has not been observed in the literature. We also showed that the effect of Tat86, Tat72 and Tat101 is not specific to HIV-1 IRES since they affect HCV IRES activity in a similar way, although to a smaller extent. HIV-1 IRES and HCV IRES are not structurally related. This suggests that the effect of Tat86 and Tat72 on the IRES-dependent translation is in *trans*, although we cannot exclude the possibility that these isoforms directly bind to both these IRESes.

Based on our observations, we propose that the conformation of Tat86 allows it to interact efficiently with a specific cellular factor, which would then act as a positive ITAF and increase the IRES-dependent activity. The conformation adopted by Tat72 would allow it to interact with the same ITAF although less efficiently than Tat86, while the conformation of Tat101 would not favor this interaction. Alternatively, the specific factor interacting with Tat72 and Tat86 could also be a transcription factor that increases the expression of a positive ITAF of the IRES. Such a case has already been monitored since

Tat upregulates the RNA helicase DDX3 (Yedavalli et al. 2004) that was recently shown to stimulate HIV-1 IRES-dependent translation (Liu et al. 2011b). It is also possible that Tat simultaneously upregulates the expression of an ITAF and stimulates its activity. An attractive hypothesis for the effect of Tat is suggested by the fact that it activates the transcription factor NF- $\kappa$ B (Demarchi et al. 1996; 1999) that has already been shown to stimulate the IRES-dependent translation of the Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (Zhou et al. 2004). Interestingly, NF- $\kappa$ B is also activated by oxidative stress (Ma et al. 2003; Gloire et al. 2006) and we previously showed that oxidative stress stimulates HIV-1 IRES activity (Gendron et al. 2011). As to PKR, since its kinase activity is required to increase HIV-1 IRES activity, but not its capacity to phosphorylate eIF2- $\alpha$ , we hypothesize that phosphorylation by PKR is important to either activate a positive ITAF or upregulate the transcription of a positive ITAF by activating a transcription factor. To account for the fact that the effects of Tat and PKR on HIV-1 IRES activity are not additive, it could be suggested that Tat and PKR stimulate the same ITAF or upregulate the expression of the same ITAF. Interestingly, it is known that PKR can also activate NF- $\kappa$ B (Gil et al. 2000; 2001).

The effect of Tat on HIV-1 IRES activity can be explained in relation with the virus replication cycle. In late stages of viral infection, cap-dependent initiation is decreased by various mechanisms (see Introduction). The presence of Tat would then stimulate the IRES-dependent translation of HIV-1 mRNAs. Interestingly, Tat72 predominates at a late stage of viral replication, when the cap-dependent initiation is compromised, while Tat101 predominates at early stages of viral replication (Malim et al. 1988). The presence of Tat72 could thus stimulate the IRES activity when needed by the virus.

As to PKR, its effect on HIV-1 IRES activity is somewhat surprising since PKR is an antiviral protein. Interestingly, Xiong et al. (2006) showed that the stimulation of IRES-mediated translation of unconventional antigens by the interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) enhances the immune response. Thus, the stimulation of IRES-dependent translation by activated PKR in response to IFN- $\alpha$  could be important to elicit a strong immune response against the virus. Besides, we can suggest that the virus evolved to exploit this antiviral defence to its

advantage. Evolving an IRES allowed the virus to bypass the PKR-dependent inhibition of translation. Indeed, in the beginning of the replication cycle, PKR is activated by double-stranded RNA structures such as the TAR structure present at the 5' end of all HIV-1 mRNAs. Activated PKR, while decreasing global cap-dependent initiation, stimulates HIV-1 IRES-dependent translation according to our results. This could be important to stimulate the translation of early transcripts such as Tat mRNA, where the TAR structure at the 5' end blocks cap-dependent translation, which needs Tat to relieve that blockade. This mRNA, like all HIV-1 mRNAs, contains an IRES that is identical to the IRES present in HIV-1 full-length mRNA except for the absence of a small portion (see the Introduction and Charnay et al. 2000). Tat is absolutely required for an efficient transcription of HIV-1 mRNAs and, thus, a stimulation of the IRES-dependent translation of its mRNA by PKR would be critical in the early phases of infection. Eventually, in HIV-1 infected cells, PKR is inhibited but the presence of Tat would then contribute to stimulate the IRES-dependent translation of HIV-1 mRNAs in the late phases of the replication cycle.

## Materials and Methods

*Plasmid Construction.* To measure the IRES activity in the 5'UTR of HIV-1 group M subtype B full-length mRNA, we used a dual-luciferase reporter, pFRT-dual-IRES-HIV, as described in Gendron et al. (2011). This plasmid is derived from pcDNA5FRT (Invitrogen) and contains the 5'UTR region of the HIV-1 full-length mRNA inserted between the coding sequences of the *Renilla* luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc). The 5'UTR region originates from pLAI, a vector expressing a molecular clone of HIV-1 group M subtype B proviral DNA (Peden et al. 1991). Expression of the luciferase genes is under control of a CMV promoter. The corresponding mRNA contains both the Rluc and the Fluc coding sequences. Rluc translation is cap-dependent and Fluc translation depends on HIV-1 5'UTR IRES. The initiation AUG codon for Fluc expression is within the IRES and the context of the AUG (30 nt from the Gag precursor) was included in our constructs. Since the presence of these additional amino acids could affect Fluc activity, a sequence coding for a peptide linker (GGGGSGGGGS) was inserted before the Fluc coding

sequence. A plasmid derived from pFRT-dual-IRES-HIV, where the TAR region is deleted (pFRT-dual-IRES $\Delta$ TAR-HIV), was made by PCR amplification with four primers (Ext-Kpn+, deltaTAR-, deltaTAR+ and Ext-BamHI-) (Ho et al. 1989). The resulting PCR product was cloned in the KpnI and BamHI site of pFRT-dual-IRES-HIV previously digested by these restriction enzymes. Plasmid pFRT-dual-IRES-HCV, where the HCV IRES is inserted between the coding sequence of the Rluc and the Fluc, was also constructed. The HCV IRES (genotype 1a) is followed by 21 nt of the coding sequence for HCV polyprotein. The peptide linker was added between the end of the HCV sequence and the beginning of the Fluc coding sequence. The HCV IRES was amplified from pHCV-447-LUC(+1)IRES (Baril and Brakier-Gingras 2005), using primers HCV-KpnI(+) and HCV-BamHI(-) that were designed to insert the first half of the linker. The rest of the linker was inserted with another PCR amplification using primers Linker-HCV-KpnI(+) and Linker-HCV-BamHI(-). The PCR products were inserted into the KpnI and BamHI restriction sites of pFRT-dual-IRES-HIV linearized with these restriction enzymes, generating pFRT-dual-IRES-HCV.

Different mutants of the Tat protein were used. Plasmid pFRT-Tat86 expresses Tat86, an isoform present in several laboratory strains of HIV-1, while plasmids pFRT-Tat86-C31S, pFRT-Tat86-K41A and pFRT-Tat86-K51A express mutants of this isoform. Wild-type Tat86 and mutants contain a HA tag at their N-terminus. Plasmids pFRT-Tat86 was derived from pCMV1-Tat (a gift from A. Gatignol, Lady Davis Institute, Montreal (Gatignol et al. 1991)) and plasmid pFRT-Tat86-K51A was derived from pEV0506 (a gift from M. Ott, Gladstone Institute of Virology and Immunology, USA (Pagans et al. 2010)). To construct the Tat-expressing plasmids, wild-type Tat86 was amplified by PCR using oligonucleotides Tat/Kpn+ and Tat/Bam-. The PCR fragment was subcloned into the KpnI and BamHI restriction sites of pcDNA5FRT (Invitrogen). The Tat86-C31S, Tat86-K41A and Tat86-K51A mutants were made by PCR amplification on pFRT-Tat86 with four primers. The oligonucleotides used were Tat/Kpn+ and Tat/Bam- as external primers and respectively MutTatC31S+ and MutTatC31S- or MutTatK41A+ and MutTatK41A- or MutTatK51A+ and MutTatK51A-. Plasmid pFRT-Tat101 was derived from pEV0280 (a

gift from M. Ott, Gladstone Institute of Virology and Immunology (Pagans et al. 2010)). A two- oligonucleotide PCR was performed on pFRT-Tat86 using oligonucleotides Tat/Kpn+ and intTat101- to generate a fragment with the KpnI restriction site, the HA-tag and the beginning of Tat coding sequence (nt 1 to 183). Another two-oligonucleotide PCR was performed on pEV0280 with oligonucleotides intTat101+ and extTat101/Bam- to generate a fragment with the end of Tat coding sequence (nt 142 to 309) and a BamHI restriction site. These two fragments were annealed and a PCR amplification was performed using oligonucleotides Tat/Kpn+ and extTat101/Bam- to obtain a new fragment containing the whole Tat101 flanked by a KpnI and a BamHI restriction site with a HA-tag in N-terminus. This fragment was cloned in the KpnI and BamHI restrictions sites of pcDNA5FRT, generating pFRT-Tat101. Plasmid pFRT-Tat72 was obtained by a PCR amplification on pFRT-Tat86, using oligos Tat/Kpn+ and Tat72/Bam-, which inserts a stop codon immediately after the codon coding for the 72th amino acid and a BamHI restriction site. Finally, different plasmids were used to express wild-type PKR and two mutants (a gift of A. Sadler, CCR, MIMR, Monash University, Australia (Sadler et al. 2009)). Plasmid PKR/wt expresses the wild-type PKR, plasmid PKR/K296R, where the lysine at position 296 is mutated for an arginine, expresses a dominant-negative mutant of PKR and plasmid PKR/T487A, where the threonine at position 487 is mutated for an alanine, expresses a mutant of PKR that is catalytically active but cannot phosphorylate eIF2 $\alpha$ . The primers used for all these cloning experiments are found in the Supplementary Materials and Methods section.

*Jurkat T Cells Transfection.* Jurkat T cells (CD4<sup>+</sup> T cells) were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent). All transfections were made by electroporation, using the Neon<sup>TM</sup> transfection system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfections were performed in 6-well plates containing  $4.0 \times 10^6$  Jurkat T cells in 4 ml of complete medium without antibiotics. Briefly, 1  $\mu$ g of dual-luciferase reporter and various amounts of Tat-expressing plasmids (wild-type or mutant) were mixed with  $2.0 \times 10^6$  Jurkat T cells in 10  $\mu$ l of R buffer supplied by the manufacturer. The conditions for electroporation were one pulse of 1150 volts for 40 ms.

Two independent electroporations were performed for each well. An empty plasmid, pcDNA5FRT (Invitrogen), was added when required to maintain an equivalent DNA input.

*Jurkat T Cells Harvesting and Luciferase Assays.* Transfected Jurkat T cells were harvested 24 h post-transfection, centrifuged at 200 g for 5 min, washed with PBS and lysed in 100  $\mu$ l of Cell Passive Lysis Buffer (Promega). Cell lysates were frozen at -80°C until being used. Prior to luciferase assays, cell lysates were thawed and centrifuged 2 min at 1300 g to remove cell debris. The Fluc and the Rluc activities were assayed using a Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega). The IRES activity was monitored as a Fluc activity/mRNA level ratio and the cap-dependent translation as a Rluc activity/mRNA level ratio. Fluc and Rluc activities were measured as relative light units with a Triathler<sup>TM</sup> multilabel tester (Hidex Oy). One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Mac OS X.

*Measurement of the Amount of mRNA by Quantitative RT-PCR.* To measure the relative reporter mRNA expression, total RNA was isolated from CD4+ Jurkat-T cells transfected with the different plasmids, using the Trizol reagent (Invitrogen Corporation), following the manufacturer's protocol. DNase I (Fermentas) was used, following the manufacturer's protocol, to remove DNA from the extract. cDNA was generated using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with 1  $\mu$ g of RNA. Real-time analysis was performed on a Light Cycler 480 multi-well plate 96 (Roche Diagnostics) in a final volume of 10  $\mu$ L. The reaction sample contained SYBR Green Supermix (BioRad) 2X, 0.125  $\mu$ M of each of the gene-specific primers (Rluc-fwd and Rluc-rev) or GAPDH (GAPDH-fwd and GAPDH-rev) and 2.5  $\mu$ l of 1:5 dilution of cDNA as template. All primer sets were tested prior to use in this work in order to ensure that they produce a single product by amplification. The optimum thermal cycling parameters included a pre-incubation at 95 °C for 5 min; 50 cycles of amplification at 95 °C for 10 s, 65 °C for 15 s and 72 °C for 20 s; melting curve analysis at 95 °C for 5 s (segment 1), 65 °C/1 min (segment 2) and 95 °C/0 s (segment 3). Values were normalized to GAPDH mRNA. The relative expression levels of the reporter mRNA were determined by comparison to the value in the absence of Tat, that was arbitrarily set at 100%, as indicated

in the figure legend for each experiment. Controls lacking reverse transcriptase demonstrated no significant amplification. The primers used for the qPCR are found in the Supplementary Materials and Methods section.

*Analysis of the Expression of Wild-type and Mutant Tat by Western Blotting.* Jurkat T cells transfected with wild-type and mutant Tat, as described above, were harvested 24 h after transfection, washed in PBS and lysed in 100 µl of Ripa-Doc (final concentration: 140mM NaCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.05% sodium dodecyl sulfate), containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Equal amounts of proteins (10 µg) were separated on a 12% SDS–PAGE gel, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with a mouse anti-HA to detect Tat (a gift from L. Desgroseillers, Université de Montréal) diluted 1/10 000 and a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Amersham) diluted 1/2000. After detection of the antigen–antibody complexes, the membrane was washed with 20 ml of medium stripping buffer (final concentration: 1.5% glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.01% (v/v) Tween 20, pH 2.2) for twice 10 min. The stripped membrane was immunoblotted with a mouse anti-tubulin monoclonal antibody (clone B-5-1-2 ; Sigma) diluted 1/5000 and a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody diluted 1/1500. Antigen–antibody complexes were detected with an enhanced chemiluminescence (ECL) system (Bio-Rad).

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant (HOP-86864) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Johanie Charbonneau and Karine Gendron acknowledge a studentship from CIHR and Alexandra Cadar acknowledges a studentship from the GRUM (Groupe de Recherche sur le Médicament de l'Université de Montréal). Gerardo Ferbeyre acknowledges FRSQ senior fellowship. We thank Luc Desgroseillers, Dominic Dulude and Alexey Karetnikov for critical reading of this manuscript and for stimulating discussions and numerous advices and we thank Nikolaus Heveker for his interest in this work. We are grateful to Anne Gatignol and Melanie Ott for the gift of plasmids expressing Tat and mutants of Tat, to Anthony Sadler for the gift of plasmid expressing PKR and mutants of

PKR and to Luc Desgroseillers for the gift of a mouse anti-HA antibody for the detection of Tat.

## References

- Andersen, J.L. and Planelles, V. 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* **3**(1): 43-51.
- Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 128-140.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 542-557.
- Baril, M. and Brakier-Gingras, L. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* **33**(5): 1474-1486.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M., and Jeang, K.T. 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* **22**(5): 607-619.
- Berkhout, B., Arts, K., and Abbink, T.E. 2011. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* **39**(12): 5232-5244.
- Brand, S.R., Kobayashi, R., and Mathews, M.B. 1997. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **272**(13): 8388-8395.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L., and Sonenberg, N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* **77**(7): 3939-3949.
- Cai, R., Carpick, B., Chun, R.F., Jeang, K.T., and Williams, B.R. 2000. HIV-I TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* **373**(2): 361-367.

- Campbell, G.R., Watkins, J.D., Singh, K.K., Loret, E.P., and Spector, S.A. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *J Virol* **81**(11): 5919-5928.
- Castello, A., Franco, D., Moral-Lopez, P., Berlanga, J.J., Alvarez, E., Wimmer, E., and Carrasco, L. 2009. HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* **4**(11): e7997.
- Charbonneau, J., Gendron, K., Ferbeyre, G., and Brakier-Gingras, L. 2012. The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *RNA* **18**(3): 519-529.
- Charnay, N., Ivanyi-Nagy, R., Soto-Rifo, R., Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., and Darlix, J.L. 2009. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* **6**: 74.
- Clerzius, G., Gelinias, J.F., and Gatignol, A. 2011. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* **21**(1): 42-53.
- Cullen, B.R. 1986. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* **46**(7): 973-982.
- D'Orso, I. and Frankel, A.D. 2010. HIV-1 Tat: Its Dependence on Host Factors is Crystal Clear. *Viruses*(2): 2226-2234.
- Davy, C. and Doorbar, J. 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* **368**(2): 219-226.
- Demarchi, F., d'Adda di Fagagna, F., Falaschi, A., and Giacca, M. 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**(7): 4427-4437.
- Demarchi, F., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol* **73**(8): 7080-7086.

- Doudna, J. and Sarnow, P. 2007. Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. J.W. Hershey, M.B. Mathews, and N. Sonenberg), pp. 297-318. CSH Press, New York.
- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M.D., and Hatzoglou, M. 2002. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *J Biol Chem* **277**(21): 19198-19205.
- Gatignol, A. 2007. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* **55**: 137-159.
- Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K.T. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* **251**(5001): 1597-1600.
- Geballe, A.P. and Gray, M.K. 1992. Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res* **20**(16): 4291-4297.
- Gendron, K., Ferbeyre, G., Heveker, N., and Brakier-Gingras, L. 2011. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res*.
- Gerlitz, G., Jagus, R., and Elroy-Stein, O. 2002. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* **269**(11): 2810-2819.
- Gibellini, D., Vitone, F., Schiavone, P., and Re, M.C. 2005. HIV-1 tat protein and cell proliferation and survival: a brief review. *New Microbiol* **28**(2): 95-109.
- Gil, J., Alcamí, J., and Esteban, M. 2000. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* **19**(11): 1369-1378.
- Gil, J., Rullas, J., Garcia, M.A., Alcamí, J., and Esteban, M. 2001. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* **20**(3): 385-394.
- Gloire, G., Charlier, E., Rahmouni, S., Volanti, C., Chariot, A., Erneux, C., and Piette, J. 2006. Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF-kappaB

- activation pathway and cellular survival upon oxidative stress. *Oncogene* **25**(40): 5485-5494.
- Hellen, C.U. 2009. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 558-570.
- Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnolzer, M., and Ott, M. 2005. Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect* **7**(13): 1364-1369.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1): 51-59.
- Jackson, R.J. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1231-1241.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127.
- Jeang, K.T., Xiao, H., and Rich, E.A. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* **274**(41): 28837-28840.
- Karn, J. 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**(2): 235-254.
- Karn, J. 2001. Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency. In *HIV Sequence Compendium 2000*, (ed. C. Kuiken, F. McCutchan, B. Foley, J. Mellors, B. Hahn, J. Mullins, P. Marx, and S. Wolinsky), pp. 2-18. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos.
- Kim, Y.S. and Risser, R. 1993. TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter by the Tat protein. *J Virol* **67**(1): 239-248.
- Li, W., Huang, Y., Reid, R., Steiner, J., Malpica-Llanos, T., Darden, T.A., Shankar, S.K., Mahadevan, A., Satishchandra, P., and Nath, A. 2008. NMDA receptor activation by HIV-Tat protein is clade dependent. *J Neurosci* **28**(47): 12190-12198.

- Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., and He, J.J. 2011. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Lopez-Huertas, M.R., Callejas, S., Abia, D., Mateos, E., Dopazo, A., Alcami, J., and Coiras, M. 2010. Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res* **38**(10): 3287-3307.
- Lopez-Lastra, M., Rivas, A., and Barria, M.I. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* **38**(2-3): 121-146.
- Luo, Y. and Peterlin, B.M. 1993. Juxtaposition between activation and basic domains of human immunodeficiency virus type 1 Tat is required for optimal interactions between Tat and TAR. *J Virol* **67**(6): 3441-3445.
- Ma, Q., Kinneer, K., Ye, J., and Chen, B.J. 2003. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol Pharmacol* **64**(2): 211-219.
- Malim, M.H., Hauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B.R. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**(6186): 181-183.
- Marcello, A., Zoppe, M., and Giacca, M. 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* **51**(3): 175-181.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., and Fernandez, N. 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**(Pt 3): 611-626.
- McMillan, N.A., Chun, R.F., Siderovski, D.P., Galabru, J., Toone, W.M., Samuel, C.E., Mak, T.W., Hovanessian, A.G., Jeang, K.T., and Williams, B.R. 1995. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* **213**(2): 413-424.

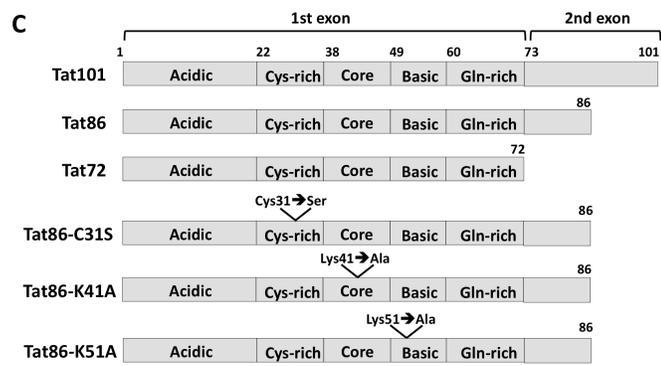
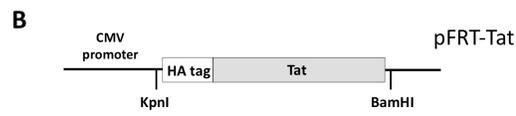
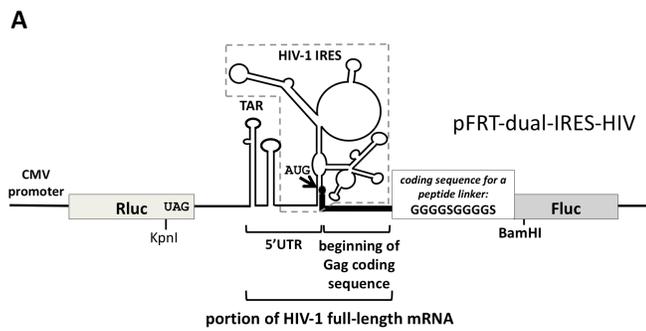
- Monette, A., Ajamian, L., Lopez-Lastra, M., and Mouland, A.J. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. *J Biol Chem* **284**(45): 31350-31362.
- Neuveut, C. and Jeang, K.T. 1996. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol* **70**(8): 5572-5581.
- Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S., and Verdin, E. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* **275**(5305): 1481-1485.
- Pagans, S., Kauder, S.E., Kaehlcke, K., Sakane, N., Schroeder, S., Dormeyer, W., Trievel, R.C., Verdin, E., Schnolzer, M., and Ott, M. 2010. The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* **7**(3): 234-244.
- Peden, K., Emerman, M., and Montagnier, L. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology* **185**(2): 661-672.
- Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* **15**(16): 2083-2093.
- Qian, S., Zhong, X., Yu, L., Ding, B., de Haan, P., and Boris-Lawrie, K. 2009. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 605-610.
- Ricci, E.P., Soto Rifo, R., Herbreteau, C.H., Decimo, D., and Ohlmann, T. 2008. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 4): 690-693.
- Rice, A.P. and Carlotti, F. 1990. Mutational analysis of the conserved cysteine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol* **64**(4): 1864-1868.
- Rivas-Aravena, A., Ramdohr, P., Vallejos, M., Valiente-Echeverria, F., Dormoy-Raclet, V., Rodriguez, F., Pino, K., Holzmann, C., Huidobro-Toro, J.P., Gallouzi, I.E. et al.

2009. The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology* **392**(2): 178-185.
- Rivas-Estilla, A.M., Svitkin, Y., Lopez Lastra, M., Hatzoglou, M., Sherker, A., and Koromilas, A.E. 2002. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* **76**(21): 10637-10653.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. 2010. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**(Pt 1): 1-12.
- Sadler, A.J., Latchoumanin, O., Hawkes, D., Mak, J., and Williams, B.R. 2009. An antiviral response directed by PKR phosphorylation of the RNA helicase A. *PLoS Pathog* **5**(2): e1000311.
- SenGupta, D.N., Berkhout, B., Gagnon, A., Zhou, A.M., and Silverman, R.H. 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7492-7496.
- Shojania, S., Henry, G.D., Chen, V.C., Vo, T.N., Perreault, H., and O'Neil, J.D. 2010. High yield expression and purification of HIV-1 Tat1-72 for structural studies. *J Virol Methods* **164**(1-2): 35-42.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**(4): 731-745.
- Stauber, R.H. and Pavlakis, G.N. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* **252**(1): 126-136.
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* **465**(7299): 747-751.
- Vallejos, M., Deforges, J., Plank, T.D., Letelier, A., Ramdohr, P., Abraham, C.G., Valiente-Echeverria, F., Kieft, J.S., Sargueil, B., and Lopez-Lastra, M. 2011. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.*

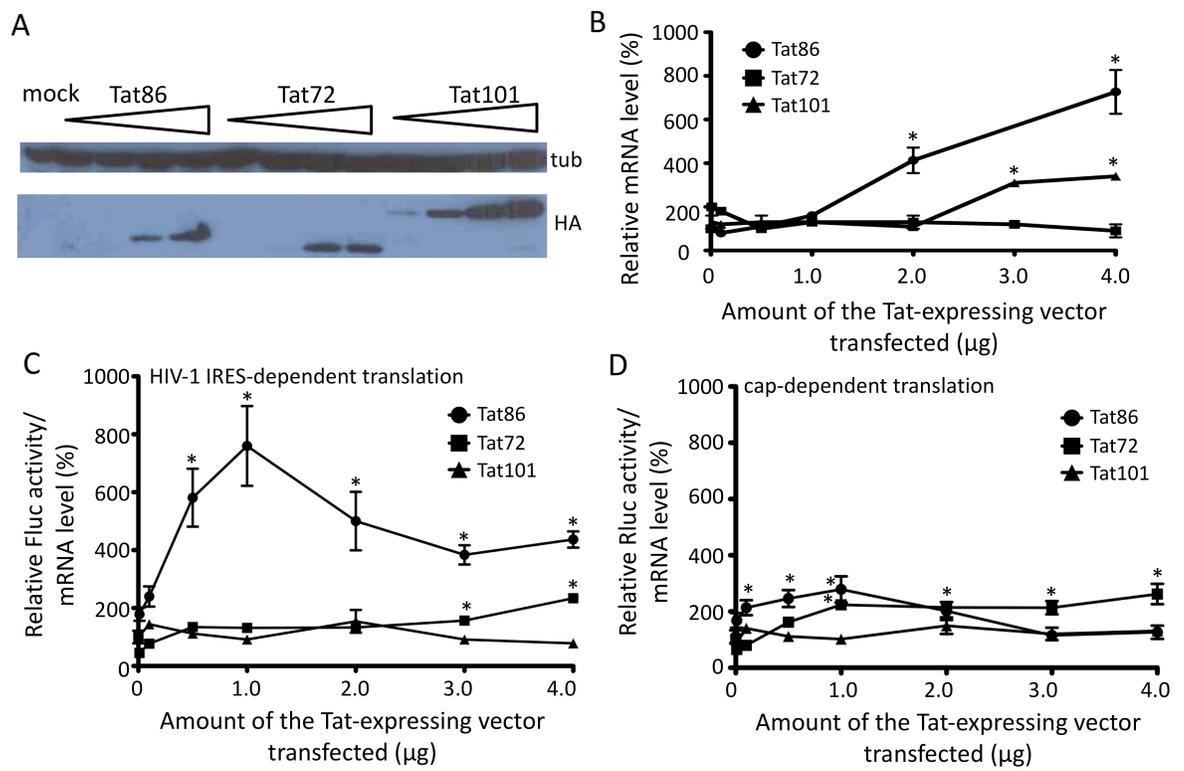
- Van Eden, M.E., Byrd, M.P., Sherrill, K.W., and Lloyd, R.E. 2004. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA* **10**(4): 720-730.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4): 451-462.
- Xiong, Z., Liu, E., Yan, Y., Silver, R.T., Yang, F., Chen, I.H., Chen, Y., Verstovsek, S., Wang, H., Prchal, J. et al. 2006. An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J Immunol* **177**(7): 4907-4916.
- Yedavalli, V.S., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L., and Jeang, K.T. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**(3): 381-392.
- Yilmaz, A., Bolinger, C., and Boris-Lawrie, K. 2006. Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* **4**(2): 131-139.
- Zhou, J., Callapina, M., Goodall, G.J., and Brune, B. 2004. Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* **64**(24): 9041-9048.



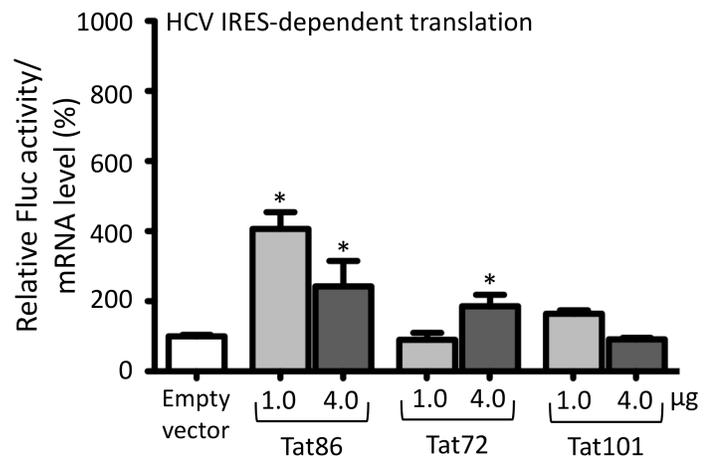
**Figure 3- 1 : Plasmids used in this study.** (A) Representation of the dual-luciferase reporter, plasmid pFRT-dual-IRES-HIV, used to monitor HIV-1 IRES activity. This plasmid contains the Rluc and the Fluc coding sequences, under control of a CMV promoter, separated by the 5'UTR region of HIV-1 full-length RNA plus the initiator codon for Fluc plus 30 nt from the Gag sequence (nt 1-368 based on pLAI). Translation of Rluc is cap-dependent while translation of Fluc depends on the HIV-1 5'UTR IRES. An oligonucleotide coding for a peptide linker was inserted between the 30 nt from the Gag coding sequence that are present in the construct and the beginning of the Fluc coding sequence. (B) Representation of the plasmid pFRT-Tat that contains the coding sequence for wild-type or mutant Tat under control of a CMV promoter. Tat expressed from this plasmid is fused to a HA-tag in its N-terminus. (C) Representation of the three isoforms of Tat and of the mutants of Tat used in this study. The different regions of Tat are indicated as well as the nature and the location of the selected mutations of Tat investigated in this study. The highly conserved first exon contains a N-terminal acidic domain (aa 1-21), a cysteine rich domain (aa 22-37) and a core region (aa 38-48) that constitute the activation domain. There is also a basic domain (aa 49-59) that is involved in RNA binding and nuclear localization and an arginine/glutamine rich domain (aa 60-72). The second exon contains the C-terminal domain of Tat (aa 73-101) and contributes to non-transcriptional effects of Tat.



**Figure 3- 2 : Effect of the Tat isoforms on the level of dual-luciferase reporter mRNA, on HIV-1 IRES activity and on the efficiency of the cap-dependent translation.** The effect of increasing amounts of the different isoforms of Tat (Tat72, Tat86 and Tat101) on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu$ g of the dual-luciferase reporter pFRT-dual-IRES-HIV and a Tat-expressing vector (pFRT-Tat72, pFRT-Tat86 or pFRT-Tat101). (A) Expression of the Tat isoforms. Equal amounts of proteins from lysates of Jurkat T cells transiently transfected with the Tat-expressing vectors at 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0  $\mu$ g were separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with an anti-HA monoclonal antibody. Anti-tubulin (tub) blotting was used as an internal control for loading. (B) Variations in the levels of the dual-luciferase reporter mRNA, as analyzed by quantitative real-time PCR. The mRNA expression levels in presence of increasing amounts of Tat are compared to their levels in cells transfected with the dual-luciferase reporter in absence of Tat. (C) The HIV-1 IRES activity in presence of increasing amounts of Tat is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. (D) The efficiency of cap-dependent translation in presence of increasing amount of Tat is represented by the Rluc activity normalized by the mRNA level analyzed by qPCR. In B, C and D, a value of 100% was arbitrarily ascribed to the values obtained in absence of Tat. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The asterisks indicate values that were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the value in absence of Tat.

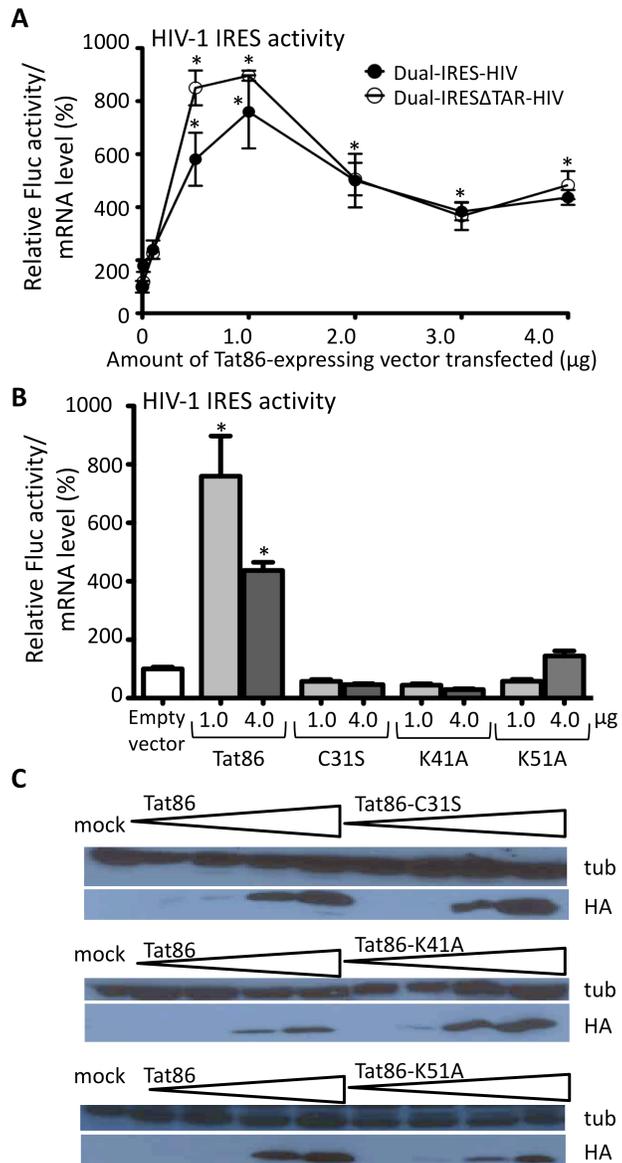


**Figure 3- 3 : Effect of the Tat isoforms on HCV IRES activity.** The effect of different isoforms of Tat (Tat72, Tat86 and Tat101) on HCV IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0 µg of the dual-luciferase reporter pFRT-dual-IRES-HCV and 1.0 or 4.0 µg of the Tat-expressing vectors. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the value obtained in absence of Tat. Results are the mean ± SEM of three independent experiments. The asterisks indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the IRES activity obtained in absence of Tat.

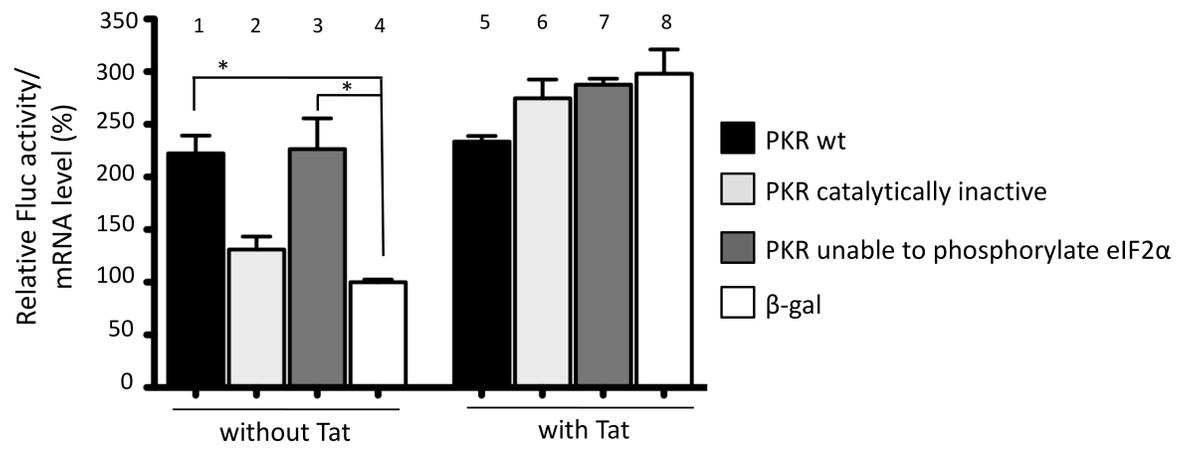


**Figure 3- 4 : Mutating C31, K41 or K51 in Tat86 prevents Tat from stimulating HIV-1 IRES activity while eliminating TAR does not interfere with this effect of Tat.** (A)

The effect of Tat86 on the HIV-1 IRES activity in absence of the TAR structure in the 5'UTR inserted between the Rluc and the Fluc genes was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu$ g of pFRT-dual-IRES-HIV or pFRT-dual-IRES $\Delta$ TAR-HIV, that is devoid of the TAR structure, and with increasing amounts of the Tat86-expressing vector. The asterisks indicate IRES activities that were significantly different ( $p < 0.05$ ) from the activity in absence of Tat. (B) The effect of wild-type Tat86 or its mutants on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with pFRT-dual-IRES-HIV and 1.0 or of 4.0  $\mu$ g of the different Tat86-expressing vector. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the IRES activity in absence of Tat. The asterisks indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the IRES activity obtained in absence of Tat. (C) Expression of the mutants of Tat86 was assessed by Western blot as described in Fig. 2B.



**Figure 3- 5 : Wild-type PKR increases HIV-1 IRES activity.** The effect of PKR on HIV-1 IRES activity was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with 1.0  $\mu\text{g}$  of pFRT-dual-IRES-HIV, 2.0  $\mu\text{g}$  of Tat86-expressing vector or an identical vector except for the absence of Tat coding sequence and 2.0  $\mu\text{g}$  of the different PKR-expressing vector or of a vector expressing the control protein,  $\beta$ -galactosidase. The IRES activity is represented by the Fluc activity normalized to the mRNA level analyzed by qPCR. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the result obtained in presence of the  $\beta$ -galactosidase and in the absence of Tat. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The asterisks in the left part of the graph indicate IRES activities that were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the IRES activity in absence of Tat and in presence of the  $\beta$ -galactosidase (column 4). In the right part of the graph, no IRES activities were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the IRES activity obtained with Tat86 in presence of  $\beta$ -galactosidase (column 8).



## Chapitre 4. Discussion

### 4.1 Rappel de la problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est le rétrovirus qui cause le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Il est responsable d'une pandémie qui a tué plus de 30 millions de personnes depuis son apparition. Le traitement antiviral hautement actif (HAART), utilisé actuellement pour traiter les personnes infectées par le VIH-1, est basé sur l'emploi de plusieurs classes d'inhibiteurs ciblant l'entrée du virus, la protéase virale, l'intégrase virale et la transcriptase inverse virale. Cependant, des souches virales résistantes à ces inhibiteurs apparaissent rapidement lors du traitement. Il est donc important d'approfondir notre compréhension des différentes étapes du cycle de réplication virale pour découvrir des cibles qui pourront conduire au développement de nouveaux agents anti-VIH-1.

La traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 produit les protéines de structure et les enzymes du virus. Cette étape essentielle à la réplication du VIH-1 se déroule à la fin des étapes tardives du cycle de réplication. Dans les cellules, l'initiation de la traduction des ARNm peut se faire de façon coiffe-dépendante ou de façon IRES-dépendante. Le mode coiffe-dépendant est le mode d'initiation utilisé par la majorité des ARNm cellulaires. L'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est muni d'une structure coiffe en 5' et peut donc être traduit de façon coiffe-dépendante. Cependant, lors des étapes tardives de la réplication du VIH-1, l'initiation coiffe-dépendante est compromise. En effet, la protéine virale Vpr bloque le cycle cellulaire à la transition G2/M, une phase où la traduction coiffe-dépendante est inhibée. D'autres stress cellulaires induits notamment par Tat comme le stress oxydatif et l'apoptose affectent aussi la traduction coiffe-dépendante (MacCallum et al. 2006; Shenton et al. 2006; Graber and Holcik 2007; Gendron et al. 2010). Un IRES a été identifié dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 (IRES<sup>5'UTR</sup>), ce qui suggère que cet ARNm pourrait aussi utiliser le mode d'initiation IRES-dépendant. Ce mode permet de traduire les protéines même lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée. L'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est faible dans un RRL et dans des

cellules en culture dans des conditions physiologiques. Elle est stimulée lorsque le cycle cellulaire est arrêté en G2/M, lorsque la cellule subit un stress osmotique ou lorsque la cellule est transfectée par l'ADN proviral du VIH-1.

Certaines publications montrent que la traduction coiffe-dépendante de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est le mode prédominant dans les conditions physiologiques. Cependant, d'autres publications montrent que la traduction de cet ARNm ne peut se faire de façon coiffe-dépendante lors des étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1 et suggèrent que cet ARNm peut alors être traduit de façon IRES-dépendante. Une hypothèse intéressante est que le VIH-1 utilise les deux modes d'initiation de façon successive selon les conditions cellulaires afin de favoriser l'expression de ses protéines. L'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 serait nécessaire pour que le virus traduise ses protéines de structure et ses enzymes lors des étapes tardives du cycle de réplication. Cependant, l'importance de l'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 dans le contexte d'une infection virale n'est pas connue. Si l'initiation via l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 est absolument nécessaire à la réplication virale, cela pourrait mener au développement d'une nouvelle classe d'agents contre ce virus. Il est donc important de caractériser cet IRES afin de comprendre son fonctionnement et son rôle lors de la réplication du virus.

Le but de mon projet de doctorat était de caractériser l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. Pour ce faire, j'ai étudié l'activité de cet IRES dans des cellules Jurkat T en culture. J'ai construit un vecteur dual-luciférase classique contenant les séquences codantes pour la Rluc et la Fluc séparées par la région 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 (Figure 2-1 et 3-1). Cette construction est telle que la traduction de la Rluc est coiffe-dépendante alors que la traduction de la Fluc dépend de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. La région 5'UTR provient de pLAI, un vecteur exprimant l'ADN proviral d'un clone moléculaire du sous-type B du groupe M du VIH-1. J'ai choisi d'insérer entre la Rluc et la Fluc la région 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, incluant les tiges-boucles TAR et poly(A), plutôt que seulement la portion correspondant à l'IRES. La présence de TAR et poly(A) interfèrent avec le balayage de l'ARNm qui pourrait se produire si des ribosomes avaient

réinitié la traduction après avoir terminé la traduction de la Rluc. De plus, l'absence de TAR et poly(A) pourrait influencer le repliement de la région 5'UTR. Comme précaution supplémentaire, pour éviter que des ribosomes traduisent la Fluc parce qu'ils auraient lu le codon de terminaison de la Rluc comme un codon sens (*readthrough*), j'ai inséré trois codons de terminaison supplémentaires en aval du codon de terminaison authentique. Dans ma construction dual-luciférase, le codon initiateur AUG de la Fluc est localisé dans l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Pour conserver le contexte entourant ce codon initiateur, j'ai inclus les 30 premiers nt de Gag juste après l'AUG initiateur dans ma construction. Enfin, pour m'assurer que le repliement et l'activité de la Fluc ne sont pas affectés par ces acides aminés supplémentaires, j'ai inséré une séquence codant pour un espaceur peptidique classique entre les dix premiers acides aminés de Gag et la Fluc. J'ai aussi effectué les expériences contrôles afin de m'assurer que l'expression de la Fluc dépend bien de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et non de la présence d'un promoteur cryptique ou encore d'un épissage alternatif générant un ARNm monocistronique codant pour la Fluc (voir le chapitre 2 et la figure 2-1).

Dans un premier temps, j'ai fait une analyse mutationnelle de l'IRES<sup>5'UTR</sup> pour identifier des régions importantes pour son fonctionnement (voir le chapitre 2). La littérature contient peu d'informations sur le rôle des structures de la région 5'UTR du VIH-1 dans l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai fait différentes délétions et substitutions dans la région 5'UTR du vecteur contenant l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage. J'ai sélectionné des portions de la région 5'UTR qui ne contiennent pas d'éléments essentiels pour la réplication virale déjà identifiés et qui semblent exposées de façon à pouvoir potentiellement recruter le ribosome. J'ai aussi voulu déterminer si les conformations de la région 5'UTR appelées LDI et BMH observées dans un RRL par Huthoff et Berkhout (2001b) (voir la Figure 1-13) influencent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. La conformation BMH est compacte et formée de plusieurs tiges-boucles alors que la conformation LDI est déployée et formée principalement d'une longue tige. Notons que ces conformations ont été observées uniquement avec la région 5'UTR isolée et non avec l'ARNm pleine-longueur complet. Pour évaluer l'activité des IRES<sup>5'UTR</sup> mutants, j'ai mesuré les activités Fluc et Rluc contenues dans les lysats des cellules Jurkat T préalablement transfectées avec les vecteurs dual-luciférase sauvage ou mutants et j'ai

ensuite comparé les rapports Fluc/Rluc obtenus. En parallèle, j'ai utilisé l'algorithme classique Mfold (Zuker 2003) pour déterminer la structure secondaire de certains des mutants de l'IRES<sup>5'UTR</sup> que j'ai testés. J'ai aussi étudié si l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est affectée par des stress cellulaires dont le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique en exposant les cellules transfectées à des agents qui induisent ces stress. On sait en effet que le VIH-1 induit un stress oxydatif et un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules infectées (Olinski et al. 2002; Lindl et al. 2007; Pyo et al. 2008; Deshmane et al. 2009). Aussi, l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est stimulée lors de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Brasey et al. 2003; Vallejos et al. 2011a) et lors d'un stress osmotique (Monette et al. 2009). Il est donc possible que d'autres stress affectent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Ces expériences m'ont permis de proposer un modèle pour la modulation de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans des cellules infectées par le VIH-1.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié le rôle de la protéine virale Tat dans l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> (voir le chapitre 3). J'ai choisi la protéine Tat parce qu'elle influence l'expression de nombreux gènes cellulaires dans les cellules infectées et on peut suggérer qu'elle pourrait affecter l'expression d'un ITAF positif ou négatif de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Pour mon étude, j'ai testé l'effet des trois isoformes de Tat, soit Tat86, Tat72 et Tat101 sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai mesuré les activités Fluc et Rluc et les niveaux d'ARNm portant la Rluc et la Fluc dans les lysats des cellules Jurkat T préalablement co-transfectées avec le vecteur dual-luciférase sauvage et un vecteur d'expression pour les différentes isoformes de Tat. Comme Tat affecte la transcription des ARNm et la traduction coiffe-dépendante, l'activité Rluc ne peut être utilisée pour normaliser l'activité Fluc. J'ai donc comparé les rapports entre l'activité Fluc et la quantité d'ARNm Rluc-Fluc mesurée par RT-qPCR pour évaluer le niveau de traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> ainsi que les rapports entre l'activité Rluc et la quantité d'ARNm Rluc-Fluc pour évaluer cette fois le niveau de traduction coiffe-dépendante. Pour tenter d'élucider le mécanisme utilisé par Tat, j'ai testé l'effet de quelques mutants de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai aussi examiné si l'effet de Tat est dépendant ou non de la présence de TAR en amont de l'IRES et j'ai voulu savoir si cet effet est spécifique pour l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. Finalement, on sait que Tat affecte la traduction

coiffe-dépendante des ARNm viraux et que cet effet dépend entre autres de la kinase PKR. J'ai donc voulu déterminer si l'effet de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> implique aussi PKR.

L'ensemble de mes résultats nous a permis de raffiner le modèle concernant le rôle de la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> lors de la réplication du VIH-1 dans des cellules infectées. Nous proposons que l'IRES<sup>5'UTR</sup> est important pour la réplication virale à la fois à la fin des étapes tardives, comme il est généralement suggéré, et aussi au début des étapes précoces.

## 4.2 Analyse mutationnelle de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1

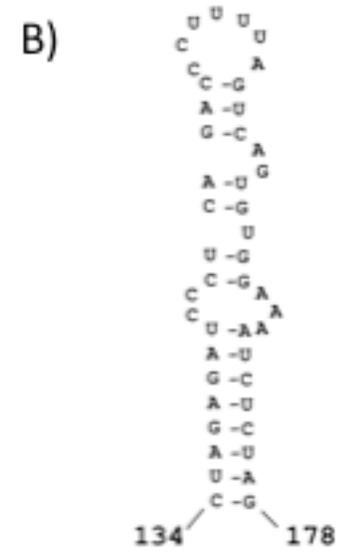
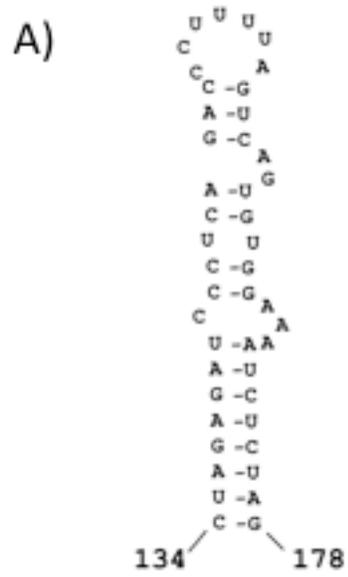
L'analyse mutationnelle m'a permis d'identifier trois régions d'ARN (nt 202-217, nt 240-242 et nt 302-305) où des mutations/délétions diminuent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> d'un facteur deux (Figure 2-1 et 2-4). La délétion des nt 202-217 dans la boucle PBS, la mutation des nt 240-242 dans la tige-boucle DIS ou la mutation des nt 302-305 dans ce que nous nommons la boucle I à proximité du SD (voir la figure 2-1) pourrait soit supprimer le site de liaison d'un ITAF positif soit induire un changement de conformation qui défavorise l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Les résultats de Wilkinson et al. (2008) et de Vallejos et al. (2011a) montrent que les nt 202-217, les nt 240-242 et les nt 302-305 ne sont pas appariés dans un RRL. Ces nt sont donc accessibles pour interagir avec des facteurs cellulaires. Vallejos et al. ont d'ailleurs observé que les nt 240-242 sont protégés lorsque leur réactivité est mesurée dans un RRL supplémenté par des extraits de cellules HeLa non-synchronisées (NS). De même, ils ont observé que la réactivité des nt 302-305 est plus faible en présence qu'en absence d'extraits cellulaires. Enfin, la mutation des nt 278-280 directement opposés aux nt 240-242 dans la tige-boucle DIS ou la mutation des nt 310 et 311 localisés dans la boucle I comme les nt 302-305 n'affectent pas l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, supportant la suggestion que l'influence des nt 240-242 et des nt 302-305 sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dépend de la liaison d'un ITAF. Si les mutations de ces nt avaient causé un changement conformationnel, les nt voisins auraient vraisemblablement été impliqués dans un tel changement.

### 4.2.1 Identification de la tige-boucle IRENE qui réprime l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1

L'analyse mutationnelle m'a aussi permis d'identifier une tige-boucle d'ARN (nt 134-178) précédant la boucle PBS dont la présence diminue l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> d'un facteur deux (Figure 2-1 et 2-2). Nous avons nommé cette tige-boucle IRENE (*IRE negative element*). Elle est formée de deux tiges principales, celle du haut et celle du bas, séparée par une excroissance (*bulge*) de trois A d'un côté et d'une C de l'autre. La tige du haut est elle-même interrompue par un *bulge* AG et par deux U non appariées de part et d'autre de la tige et elle est coiffée par une boucle de sept nucléotides. Il est intéressant de noter que les nt 134-178 forment une tige-boucle dans toutes les conformations proposées pour la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du sous-type B du groupe M que j'ai présentées dans l'Introduction de cette thèse (Figure 1-13) (Huthoff and Berkhout 2001b; Damgaard et al. 2004; Paillart et al. 2004; Wilkinson et al. 2008). De plus, cette tige-boucle est repliée de façon quasi identique dans toutes ces conformations, la seule différence étant essentiellement que le *bulge* de trois A séparant la tige du haut de la tige du bas fait face à une ou deux C (Figure 4-1).

Afin de mieux caractériser l'effet d'IRENE sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, j'ai construit différents mutants qui déstabilisent la tige du haut ou la tige du bas ou qui supprime/mute la boucle qui coiffe IRENE. Ces mutants nous ont montré que la déstabilisation de la tige du haut est suffisante pour stimuler l'activité de l'IRES d'un facteur deux (voir les mutants M4.stem143 et M5.stem143up dans la figure 2-2). L'analyse des structures secondaires des IRENE mutantes par Mfold a montré que la conformation d'IRENE pour tous les mutants est très similaire à celle d'IRENE sauvage, sauf dans le cas des mutants M4 et M5 (Figure 2-5). En effet, à part M4 et M5, les structures d'IRENE ont toutes la même inclinaison entre la tige du haut et celle du bas, induite par le *bulge* de trois A d'un côté et d'une C de l'autre. Chez M4, la tige du haut est inclinée dans le sens opposé au sens observé chez IRENE non-mutée et chez M5, il n'y a aucune inclinaison entre la tige du haut et du bas. Vallejos et al. (2012) ont récemment étudié l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> chez

**Figure 4- 1 : Repliement d'IRENE dans les différentes conformations proposées pour la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1** A) Le *bulge* de trois A séparant la tige du haut de celle du bas fait face à une C dans la conformation de Wilkinson et al. (2008). B) Le *bulge* séparant la tige du haut de celle du bas fait face à deux C dans les conformations de Huthoff et Berkhout (2001b), de Paillart et al. (2004) et de Damgaard et al. (2004).



des variants naturels du virus présents dans des échantillons cliniques provenant de personnes infectées par le VIH-1. Trois des variants étudiés possèdent plusieurs mutations dans la région correspondant à IRENE et l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est augmentée d'un facteur deux à quatre. J'ai examiné la structure de ces mutants par Mfold et observé plusieurs différences par rapport à IRENE non-mutée. Chez un des variants étudié par Vallejos et al., la tige du haut de IRENE est déstabilisée alors que chez les deux autres variants, il n'y a pas d'inclinaison entre la tige du haut et la tige du bas tout comme chez notre mutant M5. L'examen des variants de Vallejos et al. appuie entièrement notre suggestion qu'IRENE exerce un effet répresseur sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

Pour expliquer l'effet répresseur d'IRENE, notre hypothèse est que sa présence induit une conformation peu active de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, qui serait maintenue par un facteur cellulaire agissant comme ITAF négatif. La délétion de IRENE et les mutations M4 et M5 induiraient une conformation différente de l'IRES qui favoriserait son activité. Les interactions d'une tige-boucle avec des protéines se font souvent via la boucle qui la coiffe ou les bulges qu'elle contient. Dans le cas d'IRENE, les mutations ou la délétion de la boucle qui la coiffe n'affectent pas l'activité de l'IRES. J'ai donc testé des mutants du *bulge* de trois A qui cause l'inclinaison caractéristique dans IRENE non-mutée (Figure 2-2). La substitution de la boucle de trois A par des pyrimidines stimule aussi l'initiation par l'IRES<sup>5'UTR</sup> d'un facteur 1,5 par rapport à l'IRES sauvage. Il est intéressant de noter que Vallejos et al. (2011a) ont montré que les trois A sont protégées dans du RRL supplémenté par des extraits de cellules HeLa qu'elles soient non-synchronisées (NS), arrêtées en G1 ou arrêtées en G2/M. Cette protection peut résulter de la liaison d'une protéine directement au niveau des trois A ou d'interactions ARN-ARN entre les trois A et d'autres nt contenus dans l'IRES. Nous favorisons l'hypothèse que, dans les extraits de cellules NS et arrêtées en G1, ces trois A seraient impliquées dans des interactions ARN-ARN avec d'autres portions de l'IRES afin de le maintenir dans une conformation peu active, possiblement grâce à l'intervention de protéines. Ces interactions seraient maintenues lorsque les A sont remplacées par des G puisque les paires A-U sont alors remplacées par des paires G-U. Par

contre, les appariements ne peuvent être conservés lorsque les A sont remplacées par des pyrimidines, ce qui expliquerait la stimulation de l'IRES observée dans ce cas. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les trois A pourraient interagir directement avec un facteur cellulaire, mais il est moins probable que les interactions entre l'ARN et une protéine soient maintenues quand les A sont remplacées par des G. Il faut remarquer que le *bulge* de trois A est aussi protégé dans un RRL supplémenté avec des extraits de cellules HeLa arrêtées en phase G2/M. Or, dans ces conditions, l'IRES<sup>5'UTR</sup> est stimulé, tel que montré par Brasey et al. (2003). Nous suggérons que les trois A pourraient alors être impliquées dans une nouvelle interaction ARN-ARN suite à un changement de conformation induite par la liaison d'une protéine, ce qui se refléterait aussi par une protection de ces bases, ou par une interaction directe avec une protéine.

Selon notre modèle, IRENE servirait d'interrupteur moléculaire pour activer la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> (Figure 2-6). La présence d'IRENE induirait une conformation peu active de l'IRES, possiblement stabilisée par ITAF négatif. Le *bulge* de trois A serait impliqué dans le maintien de cette conformation peu active. Lors des étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1 dans des cellules, la traduction coiffe-dépendante est inhibée, ce qui diminuerait l'expression de l'ITAF négatif hypothétique. IRENE serait alors libre pour interagir avec un ITAF positif qui modifierait sa conformation, comme le font artificiellement les mutants M4 et M5, de façon à activer l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai montré que l'effet répresseur d'IRENE est éliminé lors d'un stress oxydatif (discuté plus loin dans la section 4.3). Notre hypothèse est que l'ITAF positif qui interagit avec IRENE est exprimé ou relocalisé lors d'un stress comme le stress oxydatif. Il serait intéressant d'identifier les protéines cellulaires qui interagissent directement avec IRENE en conditions physiologiques et en conditions de stress oxydatif afin de mieux comprendre le rôle régulateur d'IRENE sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

L'effet d'IRENE et du stress oxydatif peut sembler modeste. Cependant, il faut mentionner qu'une augmentation d'un facteur deux de l'activité de l'IRES du FMDV est liée à l'hypermultiplication de ce virus dans des cellules en culture BHK-21 (Martinez-Salas et al. 1993). Aussi, une augmentation d'un facteur deux de l'activité de l'IRES de *c-myc* entraîne

l'apparition de myélomes multiples (Chappell et al. 2000). Enfin, les ARNm ont des effets physiologiques puissants, même s'ils répriment la traduction de leurs ARNm cibles d'environ un facteur deux (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008).

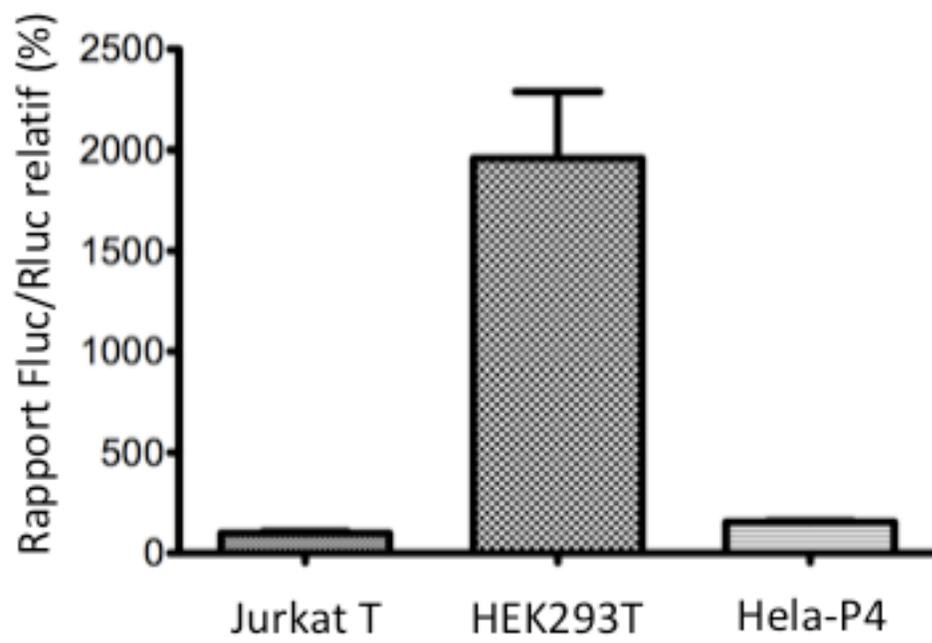
#### **4.2.2 Effet des conformations LDI et BMH proposées pour la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>**

Huthoff et Berkhout (2001b) avaient trouvé que la région 5'UTR de l'ARNm pleine longueur du VIH-1 peut adopter deux conformations mutuellement exclusives soit LDI et BMH dans un RRL (Figure 1-13). Une hypothèse intéressante est que le passage d'une conformation à l'autre détermine si l'ARN pleine-longueur va être traduit ou encapsidé pour former des virions. Abbink et al. (2005) ont montré que la conformation BMH, où le signal d'initiation de la dimérisation est exposé, alors qu'il ne l'est pas dans la conformation LDI, favorise l'encapsidation de l'ARN génomique. Ils ont suggéré que la conformation LDI pourrait par contre favoriser la traduction de l'ARNm pleine-longueur, mais ont observé que l'adoption de l'une ou l'autre conformation n'influence pas la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Cependant, ils ont travaillé dans des conditions expérimentales où la traduction coiffe-dépendante prédomine. Il serait donc possible que la traduction IRES-dépendante, mais non la traduction coiffe-dépendante, soit favorisée par la conformation LDI et que ces auteurs n'aient pu le détecter. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai testé quelques-uns des mutants qu'ils ont caractérisés et qui favorisent soit la conformation LDI soit la conformation BMH (Figure 2-4). Nos résultats montrent que ni l'une ni l'autre de ces conformations ne favorisent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et ils ne supportent pas l'existence de la conformation LDI. Aussi, j'ai trouvé un mutant favorisant la conformation BMH et un mutant favorisant la conformation LDI qui diminuent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Rappelons ici que l'existence de la conformation LDI dans des cellules infectées est actuellement mise en doute comme discuté dans la section 1.4.1.2.

### 4.2.3 Analyse des résultats préliminaires de l'étude mutationnelle de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans des cellules HeLa-P4

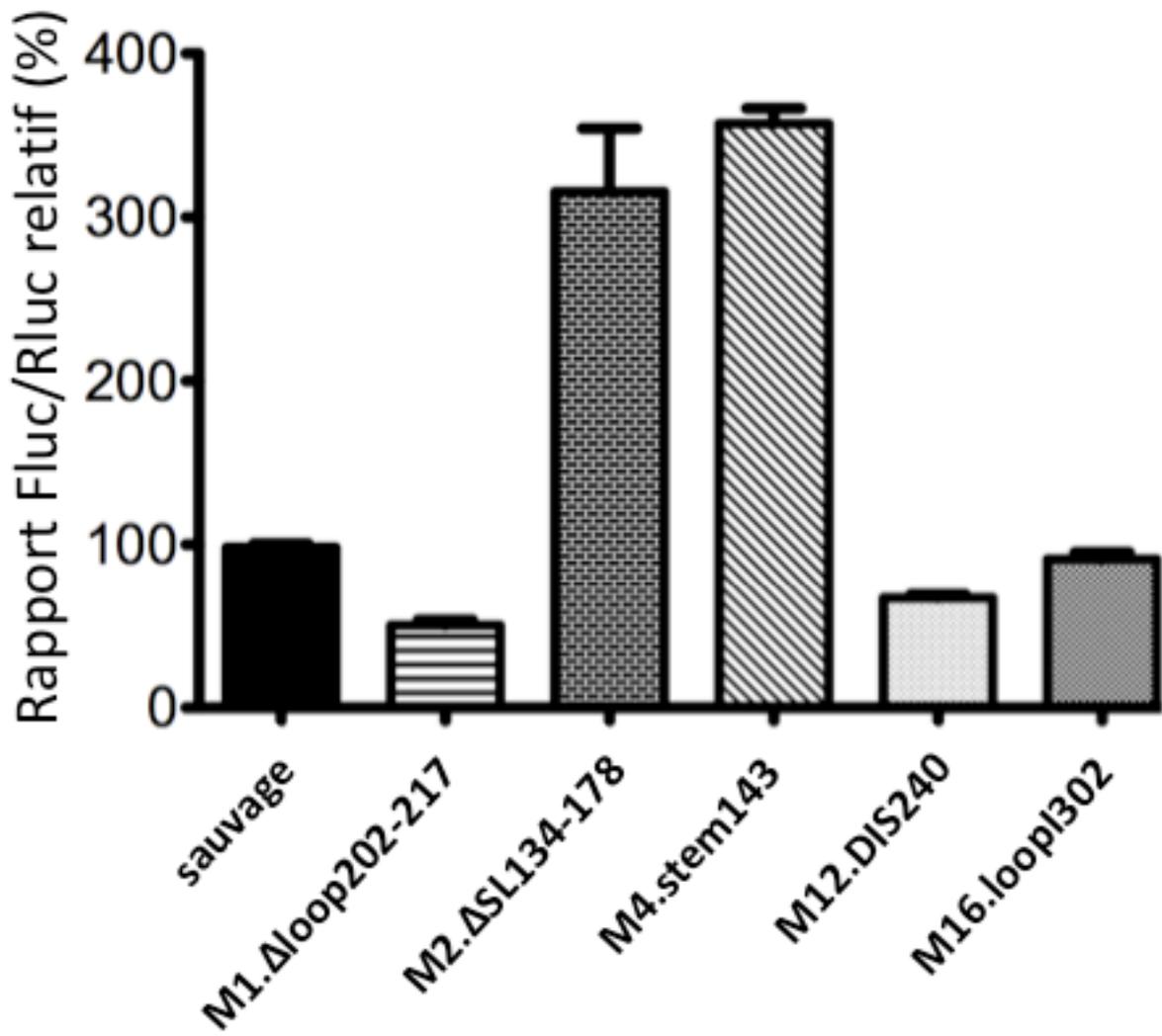
L'étude que j'ai présentée dans le chapitre 2 sur les mutations dans l'IRES<sup>5'UTR</sup> a été réalisée dans des cellules Jurkat T. J'ai voulu examiner la situation dans des cellules HeLa-P4, des cellules humaines qui permettent la réplication du VIH-1 parce qu'elles ont été modifiées pour exprimer des récepteurs CD4. J'ai observé que l'efficacité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans les cellules HeLa-P4 est similaire à celle obtenue dans les cellules Jurkat T, mais non à celle obtenue dans les HEK293T (Figure 4-2) (discuté plus loin dans la section 4.4). J'ai testé l'effet de certains de mes mutants sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans des cellules HeLa-P4 afin de voir si l'effet de la délétion ou de mutations dans IRENE, l'effet de la délétion des nt 202-217 et l'effet de mutations dans les nt 240-242 et les nt 302-305 sont spécifiques aux cellules Jurkat T ou si, au contraire, ces effets s'observent dans un autre type de cellules (Figure 4-3). Nos résultats montrent que la délétion d'IRENE ou la mutation de la tige du haut d'IRENE (mutant M4) stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> d'un facteur trois dans les cellules HeLa-P4. L'effet d'IRENE s'applique donc dans les cellules HeLa-P4 et il est même un peu plus fort que dans les cellules Jurkat T. Cela pourrait dépendre d'une différence dans les facteurs exprimés par ces deux types cellulaires. Nous avons aussi observé que la délétion des nt 202-217 et la mutation des nt 240-242 ont le même effet dans ces deux types cellulaires, c'est-à-dire qu'elles diminuent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Cependant, la mutation des nt 302-305 n'a aucun effet sur cette activité dans les HeLa-P4 alors qu'elle la diminuait dans les cellules Jurkat T. Ce résultat suggère que l'effet des nt 302-305 pourrait dépendre d'un facteur spécifique aux cellules Jurkat T absent des cellules HeLa-P4. Notons que Vallejos et al. (2011a) ont également étudié l'effet de la mutation des nt 240-242 et des nt 302-305 sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans des cellules HeLa et n'ont observé aucun changement de cette activité dans ces conditions. Ces résultats coïncident avec les nôtres pour les nt 302-305, mais non pour les nt 240-242. Une hypothèse pour expliquer cette divergence est que les cellules HeLa-P4 que j'ai utilisées exprime un ITAF de l'IRES<sup>5'UTR</sup> qui n'est pas exprimé dans les cellules HeLa utilisées par Vallejos et al.

**Figure 4- 2 : Comparaison de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage du VIH-1 dans des cellules Jurkat T, dans des cellules HEK293T et dans des cellules HeLa-P4.** L'activité de l'IRES sauvage a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T, HEK293T ou HeLa-P4 transfectées avec le vecteur dual-luciférase sauvage. Le rapport Fluc/Rluc obtenu à partir du lysat de cellules Jurkat T a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM) de trois expériences indépendantes. La description du vecteur dual-luciférase utilisé se trouve dans le chapitre 2.



**Figure 4- 3 : Effet de la délétion des nt 202-217, de la mutation des nt 240-242 et des nt 302-305 ainsi que de la délétion et des mutations de la tige-boucle IRENE (nt 134-178) sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans les cellules HeLa-P4.** L'activité des IRES a été mesurée dans des lysats de cellules HeLa-P4 transfectées avec le vecteur dual-luciférase sauvage ou mutant. Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de six expériences indépendantes. Les détails sur les vecteurs utilisés se trouvent dans le chapitre 2. Rappelons en bref que les nt 202 à 217 sont délétés chez le mutant M1 $\Delta$ loop202-217, que IRENE est délétée chez le mutant M2 $\Delta$ SL134-178, que la tige du haut d'IRENE est muté chez le mutant M4.stem143, que les nt 240-242 sont mutés chez le mutant M12.DIS240 et que les nt 302-305 sont mutés chez le mutant M16.loopI302.

Dans des cellules Hela-P4:



#### 4.2.4 Comparaison des séquences de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur des sous-types B, A et C du groupe M du VIH-1

J'ai aussi effectué une comparaison des séquences de la région 5'UTR entre les trois sous-types prédominants du groupe M du VIH-1 soit les sous-types B, A et C. J'ai utilisé les séquences disponibles sur la base de données de Los Alamos (2011). J'ai ainsi pu déterminer une séquence consensus pour la région 5'UTR des sous-types A et C et proposer une conformation pour cette région, en m'inspirant de la structure obtenue par Wilkinson et al. (2008) pour la région 5'UTR du sous-type B (voir section 1.4.1.2) (Figure 4-4). Chez les sous-types A et C, la séquence d'IRENE est très similaire à celle du sous-type B. Quelques nt seulement sont substitués dans la boucle qui coiffe IRENE et dans la tige du haut. J'ai utilisé l'algorithme Mfold pour déterminer les structures secondaires de IRENE chez les sous-types A et C (Figure 4-5). Chez le sous-type A, il n'y a pas d'inclinaison entre la tige du haut et la tige du bas, ce qui correspond à la structure obtenue pour le mutant M5 du sous-type B, qui a, rappelons-le, un IRES<sup>5'UTR</sup> plus actif que l'IREN<sup>5'UTR</sup> sauvage. Mes résultats permettent donc de supposer que l'IREN<sup>5'UTR</sup> du sous-type A est plus efficace que celui du sous-type B dans des conditions physiologiques. Chez le sous-type C, l'inclinaison entre la tige du haut et la tige du bas, causée par le *bulge* de trois A, est la même que chez le sous-type B. Par contre, la tige du haut est elle-même séparée en deux parties par un *bulge* qui induit une inclinaison entre ces deux parties. Il est donc difficile de prédire comment IRENE influence l'activité de l'IREN<sup>5'UTR</sup> du sous-type C. Il est intéressant de constater que le *bulge* de trois A dans IRENE et les nt 240-242 sont hautement conservés entre ces sous-types, ce qui suggère qu'ils sont importants pour la réplication virale. De même, la région 202-217 est bien conservée, car les sous-types A et C ont seulement quelques substitutions entre les nt 213 et 217 situés à la toute fin de la boucle PBS. Selon notre étude, leur importance est liée à leur effet sur la traduction, via un contrôle de l'activité de l'IREN<sup>5'UTR</sup>. Enfin, la région 302-305, composée de quatre A, est hautement conservée chez le sous-type A alors que les nt 303-305 sont substitués par des U chez le sous-type C.

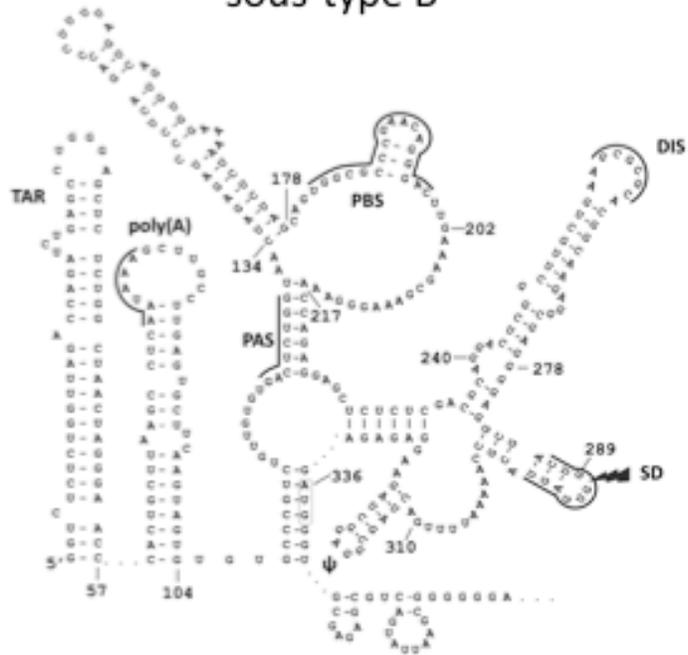
Actuellement, il n'existe aucune donnée sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> des sous-types A et C et il serait intéressant d'étudier cette activité. Cela permettrait de déterminer des régions importantes pour l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et des mécanismes de régulation de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> qui seraient conservés entre les sous-types. Ce type d'études pourrait mener au développement d'agents anti-VIH-1 ciblant l'IRES<sup>5'UTR</sup> qui affecteraient la réplication de plusieurs sous-types du groupe M.

### **4.3 Analyse de l'effet de stress cellulaires sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1**

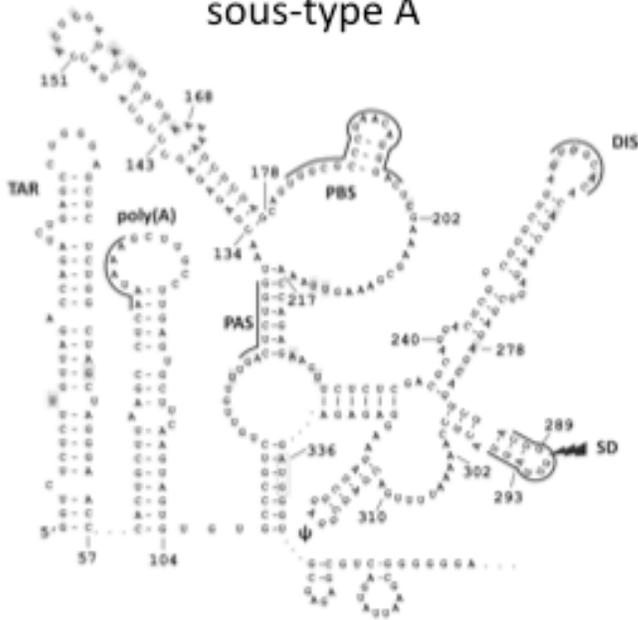
Le VIH-1 cause différents stress dans les cellules infectées dont un stress oxydatif et un stress du réticulum endoplasmique (Olinski et al. 2002; Lindl et al. 2007; Pyo et al. 2008; Deshmane et al. 2009). J'ai décidé d'examiner l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> en présence de différents inhibiteurs qui causent soit un stress oxydatif, soit un stress du réticulum endoplasmique ou soit un stress imitant l'hypoxie (Figure 2-3). Un marquage métabolique à la [<sup>35</sup>S]-méthionine a permis de montrer que la traduction coiffe-dépendante est diminuée d'un facteur deux en présence de ces inhibiteurs dans nos conditions expérimentales. Au contraire, l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage est stimulée d'environ un facteur deux en présence d'un stress oxydatif induit soit avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou avec du *tert*-butylhydroquinone (TBHQ). Il est intéressant de noter que le stress oxydatif peut aussi stimuler la traduction de l'IRES du VHC (MacCallum et al. 2006; Jack and Chan 2011). Par contre, les autres stress que j'ai étudiés n'ont pas d'effet sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage. Ces stress ont en commun la capacité d'inhiber l'initiation de la traduction coiffe-dépendante et nos résultats impliquent donc qu'il n'est pas suffisant d'inhiber l'initiation coiffe-dépendante pour stimuler l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Une autre remarque, à partir de nos résultats, concerne le fait que la thapsigargine, l'agent que nous avons utilisé pour induire un stress du réticulum endoplasmique, entraîne la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Nos résultats montrent donc que l'IRES<sup>5'UTR</sup> fonctionne même lorsque eIF2 $\alpha$  est phosphorylé, ce qui implique que comme

**Figure 4- 4 : Conformation de la région 5'UTR des sous-types B, A et C du groupe M du VIH-1.** Les conformations des régions 5'UTR des sous-types A et C sont basées sur la conformation de Weeks, proposée par Wilkinson et al. (2008) pour la région 5'UTR du sous-type B. Les séquences consensus pour les sous-types A et C ont été déterminées à partir des séquences disponibles sur la base de données de Los Alamos (2011).

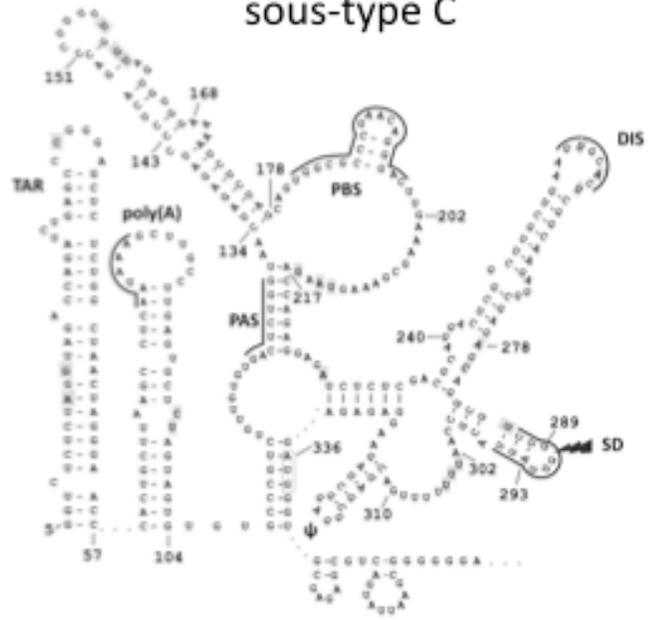
sous-type B



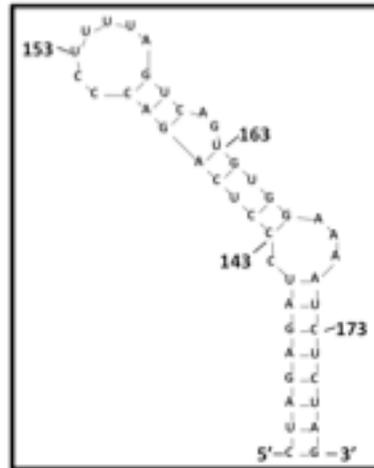
sous-type A



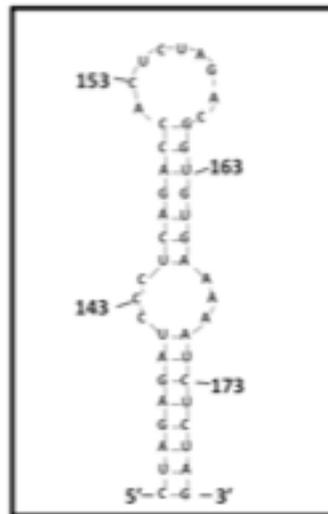
sous-type C



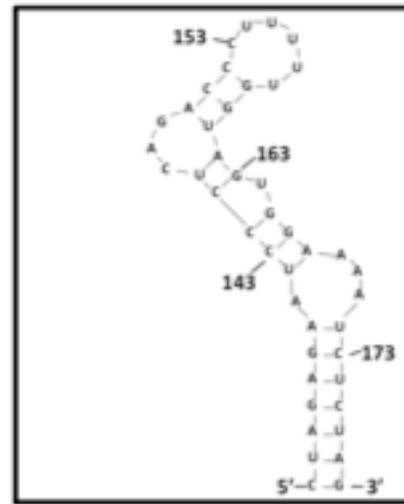
**Figure 4- 5 : La structure secondaire d'IRENE du sous-type B, A et C du groupe M du VIH-1.** La structure secondaire d'IRENE du sous-type B contient un *bulge* de trois A qui induit une inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas de cette tige-boucle. La structure secondaire d'IRENE du sous-type A ne possède pas d'inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas. La structure secondaire d'IRENE du sous-type C contient un *bulge* de trois A qui induit une inclinaison entre la partie du haut et la partie du bas et un autre *bulge* de trois nt, CAG, qui induit une seconde inclinaison dans la tige du haut. La structure secondaire de IRENE a été prédite par l'algorithme classique Mfold (version 3.2; <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) (Mathews et al. 1999; Zuker 2003).



IRENE du sous-type B



IRENE du sous-type A



IRENE du sous-type C

plusieurs IRES viraux et cellulaires, il peut utiliser un autre facteur que eIF2 pour apporter l'ARNt initiateur chargé de méthionine à la 40S (voir section 1.3.3.3.2 dans l'Introduction). J'ai aussi examiné l'effet des stress cellulaires sur l'activité d'un mutant de l'IRES<sup>5'UTR</sup> (M4.stem143), où la tige-boucle IRENE est mutée et dont l'activité est stimulée de deux fois par rapport à l'IRES non-muté. J'ai observé que l'activité de ce mutant n'est augmentée ni en présence d'un stress oxydatif ni en présence des autres stress. Notre interprétation de nos résultats est que le stress oxydatif induirait l'expression ou la relocalisation d'un ITAF qui interagirait avec l'IRES<sup>5'UTR</sup> et modifierait la conformation d'IRENE, rendant l'IRES plus actif (voir plus haut, section 4.2.1). Dans le mutant M4, ce changement de conformation a déjà été induit artificiellement et le stress oxydatif n'a plus d'effet.

L'expression des protéines virales est susceptible de créer des stress dans les cellules infectées. Selon la littérature et nos résultats, ces stress stimulent la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Selon notre hypothèse de départ, la traduction IRES-dépendante serait nécessaire vers la fin de la réplication virale lorsque le virus a induit plusieurs stress cellulaires qui compromettent la traduction coiffe-dépendante. Il serait donc important d'étudier l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> lors de la réplication du virus dans des cellules chroniquement infectées par le VIH-1. Des expériences sur la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en présence des protéines virales ont déjà été faites. Monette et al. (2009) ont co-transfecté des cellules HeLa avec un vecteur dual-luciférase construit pour mesurer l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et un vecteur contenant l'ADN proviral du VIH-1 pour exprimer les protéines virales. Ils ont observé une augmentation d'environ 75% de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans ces conditions. Même si l'augmentation observée est modeste, ce résultat concorde avec l'idée que les stress induits lors de l'infection par le VIH-1 stimulent l'efficacité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Par contre, Berkhout et al. (2011) ont suggéré que la traduction de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 est coiffe-dépendante même en présence des protéines du VIH-1. Ils ont observé que la région 5'UTR est balayée par les ribosomes dans des cellules C33A en culture, ce qui reflète une initiation coiffe-dépendante, même lorsque les

protéines virales sont exprimées. Il faut se rappeler toutefois que, lorsque les deux modes d'initiation sont disponibles pour un même messager, il choisit le mode coiffe-dépendant de préférence au mode IRES-dépendant. Nous supposons que, dans les conditions utilisées par Berkhout et al., le mode coiffe-dépendant était encore suffisamment efficace pour être préféré au mode IRES-dépendant. Quoiqu'il en soit, nous pensons que les expériences de Monette et al. et de Berkhout et al. ne permettent pas de déterminer l'importance de l'IRES<sup>5'UTR</sup> pour la réplication du VIH-1 dans des cellules infectées. En effet, ce sont des expériences de transfections transitoires de cellules en culture qui ne représentent pas les conditions de stress cellulaires induits lors d'une infection virale réelle. Pour caractériser le rôle et l'importance de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, il faudrait évaluer son activité à différents stades d'une infection virale. Il serait particulièrement intéressant d'étudier la dynamique entre les deux modes d'initiation au fur et à mesure que l'infection par le VIH-1 progresse.

#### **4.4 Comparaison de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dans différents types cellulaires**

J'ai comparé l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans différents types cellulaires soit dans des cellules Jurkat T, dans des cellules HeLa-P4, souvent utilisées pour étudier le VIH-1, et dans des cellules HEK293T, une lignée cellulaire fréquemment utilisée en laboratoire (Figure 4-2). L'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est similaire dans les cellules Jurkat T et les cellules HeLa-P4. Cependant, elle est augmentée d'environ un facteur 20 dans les cellules HEK293T, des cellules reconnues comme étant particulièrement stressées par rapport à d'autres types cellulaires. En effet, d'autres équipes et nous avons remarqué que plusieurs voies de stress sont activées dans cette lignée cellulaire entraînant entre autres la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (données non publiées). Mes résultats montrent que l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est beaucoup plus grande dans des cellules très stressées que dans des cellules moins stressées. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes cellulaires qui stimulent la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans les cellules HEK293T. Cela pourrait aider à comprendre les mécanismes d'activation de la traduction IRES-dépendante dans des cellules infectées par le VIH-1.

## 4.5 Analyse des résultats préliminaires sur l'effet de TAR sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1

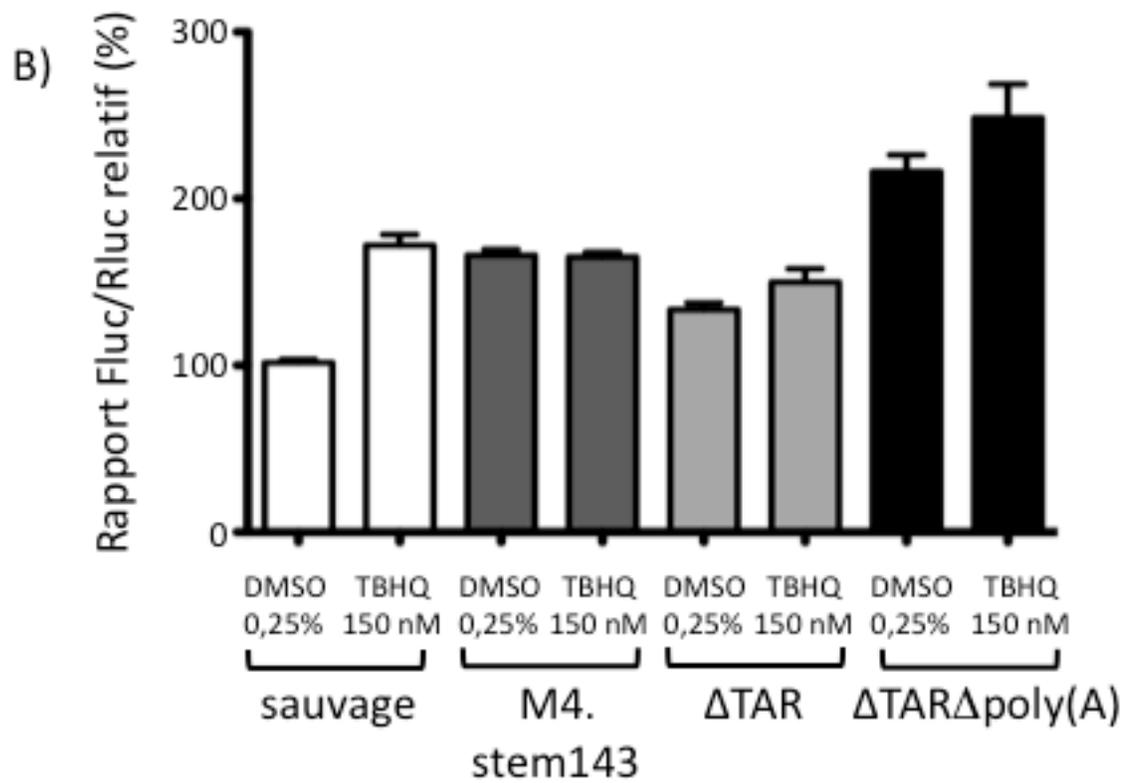
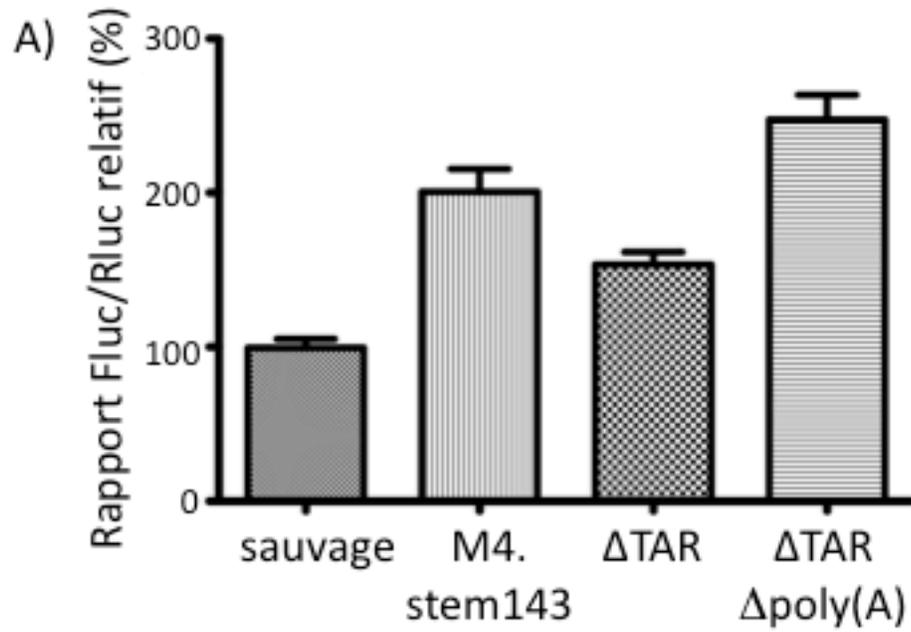
Le groupe de Berkhout a montré que la structure TAR influence la conformation de la région 5'UTR (Huthoff and Berkhout 2001a). Pour mes études sur cet IRES, j'ai toujours utilisé la région 5'UTR complète pour conserver un contexte le plus proche possible de la réalité. Cependant, j'ai voulu examiner si la présence de TAR affecte l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans les cellules Jurkat T (Figure 4-6 A). Précédemment, Brasey et al. (2003) avaient montré que la présence des structures TAR et poly(A) n'est pas nécessaire pour que l'IRES<sup>5'UTR</sup> soit actif dans des cellules HeLa en culture. J'ai donc construit un dérivé de mon vecteur dual-luciférase en enlevant soit la structure TAR ( $\Delta$ TAR) soit la région TAR-poly(A) ( $\Delta$ TAR $\Delta$ poly(A)) de la région 5'UTR insérée entre les séquences codantes de la Rluc et la Fluc. Mes résultats montrent que la délétion de TAR augmente l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> d'environ un facteur 1,5. Cette augmentation est plus grande, soit environ un facteur 2,5, lorsque TAR et poly(A) sont délétées (Figure 4-6 A). La présence de la région TAR-poly(A) diminue donc l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> comme c'est le cas en présence de IRENE (voir le chapitre 2). Puisqu'il a été montré que la région TAR-poly(A) affecte la conformation globale de la région 5'UTR, nous pouvons proposer que TAR-poly(A) participerait au maintien d'une conformation peu active de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai aussi testé l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>  $\Delta$ TAR et  $\Delta$ TAR $\Delta$ poly(A) en présence du TBHQ qui induit un stress oxydatif (Figure 4-6 B). Nous avons vu que l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage est augmentée d'un facteur deux suite à ce traitement (voir aussi la figure 2-3). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de l'activité des IRES  $\Delta$ TAR et  $\Delta$ TAR $\Delta$ poly(A), dont l'activité est déjà supérieure à celle de l'IRES<sup>5'UTR</sup> sauvage, lors d'un stress oxydatif. La même observation avait été faite avec le mutant M4.stem143, où la tige supérieure d'IRENE est déstabilisée (Figure 2-3). Une interprétation de ce résultat est que IRENE pourrait interagir avec la région TAR-poly(A), ce qui induirait une conformation peu active de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Cette interaction pourrait impliquer le *bulge* de trois A, tel que discuté dans la section 4.2.1, ou d'autres régions dans la tige du haut de IRENE. Suite au stress oxydatif, un ITAF positif

de l'IRES<sup>5'UTR</sup> serait exprimé ou relocalisé. Cet ITAF interagirait avec la région 5'UTR de façon à détruire l'interaction entre IRENE et TAR-poly(A). Cela induirait un changement de conformation global de l'IRES qui stimule son activité. Toutefois, cette hypothèse est actuellement purement spéculative et nous n'excluons pas que l'effet de la région TAR-poly(A) puisse être indépendant d'IRENE. Notons que, lors d'une infection par le VIH-1, la protéine virale Tat ainsi que différentes protéines cellulaires dont l'expression augmente ou qui sont relocalisées contribuent à déstabiliser directement ou indirectement la structure TAR (voir la section 1.2.3.3.1) dans le cytoplasme. Il est donc probable que l'effet répresseur de TAR sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> diminue lors des étapes tardives de la réplication dans des cellules infectées.

#### **4.6 Analyse de l'effet de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1**

La protéine virale Tat exerce, nous l'avons vu, des effets multiples influençant la réplication du VIH-1 (voir section 1.2.3). J'ai décidé d'examiner si la protéine Tat affecte aussi l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. Mes résultats, présentés dans le chapitre 3, ont montré que les isoformes Tat86 et Tat72, mais non Tat101, augmentent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> et que l'effet de Tat86 est plus grand que celui de Tat72 (Figure 3-2). J'ai observé que Tat86 et Tat72 augmentent aussi l'activité de l'IRES du VHC (Figure 3-3), un IRES structurellement dissemblable de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Ce résultat suggère que l'effet de Tat se fait en *trans* bien que nous ne puissions totalement exclure la possibilité que Tat puisse lier ces deux IRES directement. Enfin, j'ai testé l'effet de trois mutants de Tat86 soit Tat86-C31S, Tat86-K41A et Tat86-K51A où les mutations sont localisées dans différentes régions de Tat et affectent différentes fonctions de Tat (voir plus loin). J'ai observé qu'aucun de ces mutants ne stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> (Figure 3-4). À partir de ces résultats, j'ai effectué différentes expériences pour tenter d'élucider le mécanisme de l'effet de Tat sur l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

**Figure 4- 6 : Effet de la délétion de TAR et de la région TAR-poly(A) sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en conditions physiologiques ou en conditions de stress oxydatif.** (A) L'activité des IRES a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T transfectées avec l'un des différents vecteurs dual-luciférase examinés, soit le vecteur dual-luciférase contenant la région 5'UTR complète (IRES sauvage), le vecteur contenant la région 5'UTR amputée des nt 1 à 57 ( $\Delta$ TAR), le vecteur contenant la région 5'UTR amputée des nt 1 à 104 ( $\Delta$ TAR $\Delta$ poly(A)) et, à titre de comparaison, le vecteur contenant un mutant de l'IRES où la tige supérieure d'IRENE est déstabilisée (M4.stem143) (voir le chapitre 2 pour ce dernier). Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage a été établi arbitrairement à 100%. (B) Les cellules Jurkat ont été transfectées avec les vecteurs dual-luciférase décrits en A et ont été exposées pendant 6 h au DMSO (contrôle) ou au TBHQ (*tert*-butylhydroquinone) qui induit un stress oxydatif. L'activité des IRES a ensuite été mesurée dans des lysats de ces cellules. Le rapport Fluc/Rluc obtenu avec le vecteur dual-luciférase contenant l'IRES sauvage et exposé au DMSO a été établi arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de trois expériences indépendantes.



Comme mentionné dans la section 1.2.3.3, Tat affecte la traduction coiffe-dépendante en déstabilisant indirectement TAR et en compétitionnant avec eIF2 $\alpha$  pour la liaison à PKR. J'ai observé que la présence de TAR influence l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. J'ai voulu savoir si l'effet de Tat sur la traduction IRES-dépendante dépend de la présence de TAR ou de l'activité de PKR. Mes résultats ont montré que Tat stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> que la structure TAR soit présente ou absente de la région 5'UTR. L'effet de Tat sur la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> est donc TAR-indépendant. Mes résultats montrent aussi que l'effet de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> ne nécessite pas l'activité kinase de PKR ni la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , puisqu'il se produit en présence d'un mutant de PKR incapable de phosphoryler eIF2 $\alpha$  ou d'un mutant de PKR dominant-négatif catalytiquement inactif (Figure 3-5). Finalement, j'ai aussi voulu savoir si l'effet stimulateur de Tat est relié à IRENE. J'ai testé l'effet de Tat sur le mutant M4.stem143, où, nous l'avons dit, la tige supérieure d'IRENE est mutée, ce qui augmente l'activité de l'IRES. J'ai observé que Tat a le même effet stimulateur sur l'IRES mutant M4.stem143 que sur l'IRES sauvage (données non-présentées). L'effet de Tat n'est donc pas relié à IRENE.

#### **4.6.1 Effet du stress oxydatif induit par Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1**

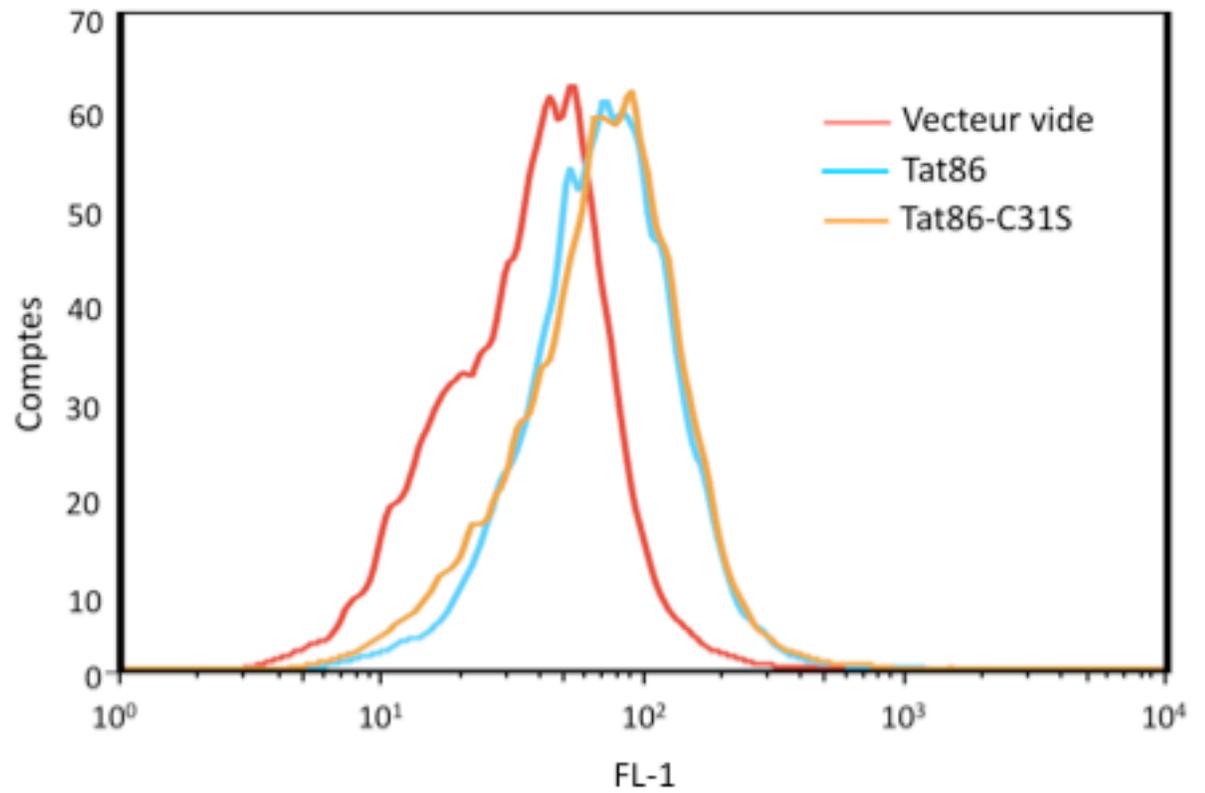
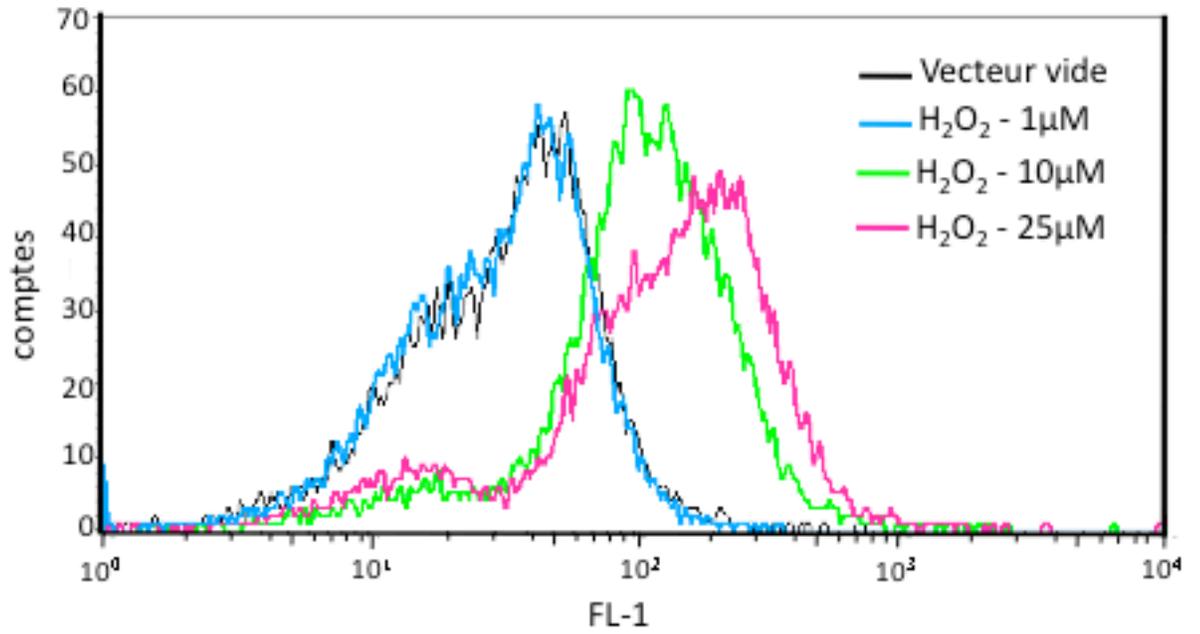
Tat induit un stress oxydatif dans les cellules infectées (voir la section 1.2.3.4.3). Nous avons montré que le stress oxydatif stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Il serait donc possible que l'effet de Tat sur l'IRES<sup>5'UTR</sup> s'exerce via le stress oxydatif qu'elle cause. J'ai donc décidé d'examiner l'effet du mutant Tat86-C31S sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, un mutant qui induit un stress oxydatif moindre que Tat sauvage dans les neurones (Mishra et al. 2008). La cystéine 31 est la seule cystéine de la région riche en cystéines de Tat qui peut être mutée sans affecter la transactivation de la transcription par Tat et la mutation C31S est naturellement présente chez les virus du sous-type C du groupe M.. J'ai d'abord vérifié comment ce mutant affecte le stress oxydatif dans des cellules Jurkat T par comparaison à Tat sauvage dans mes conditions expérimentales (Figure 4-7) en mesurant les niveaux d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) produites dans les cellules Jurkat T transfectées avec

un vecteur vide ou avec un vecteur d'expression de Tat86 sauvage ou de Tat86-C31S. Pour ce faire, j'ai employé la cytométrie en flux et la méthode de coloration au DCFH-DA (diacétate de dichlorodihydrofluoresceine) qui fluoresce à la longueur d'ondes d'émission FL-1 (530/30 nm) en présence de ROS. Mes résultats montrent que la présence de Tat86 ou de Tat86-C31S entraîne une augmentation similaire des niveaux de ROS (Figure 4-7 B). Il semble donc que l'effet de la mutation C31S soit spécifique aux cellules neuronales. Étant donné que Tat86, mais non Tat86-C31S, stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, nous concluons que cette stimulation ne dépend pas du stress oxydatif induit par Tat, dans nos conditions expérimentales. Nous discuterons plus loin qu'il pourrait dépendre de la conformation de Tat. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'à plus long terme, le stress oxydatif induit par Tat permette de moduler l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Il est intéressant de noter que Tat est sensible à l'état redox de la cellule. En effet, deux groupes ont montré que l'activité transcriptionnelle de Tat est augmentée lors d'un stress oxydatif (Kalantari et al. 2008; Washington et al. 2010). Cette augmentation est probablement due à la formation de lien disulfure entre les cystéines de sa région riche en cystéines qui se produit dans des conditions oxydantes. Il est possible que d'autres effets de Tat, particulièrement ceux impliquant la région riche en cystéines, soient stimulés par le stress oxydatif dans des conditions expérimentales différentes de celles que nous avons utilisées.

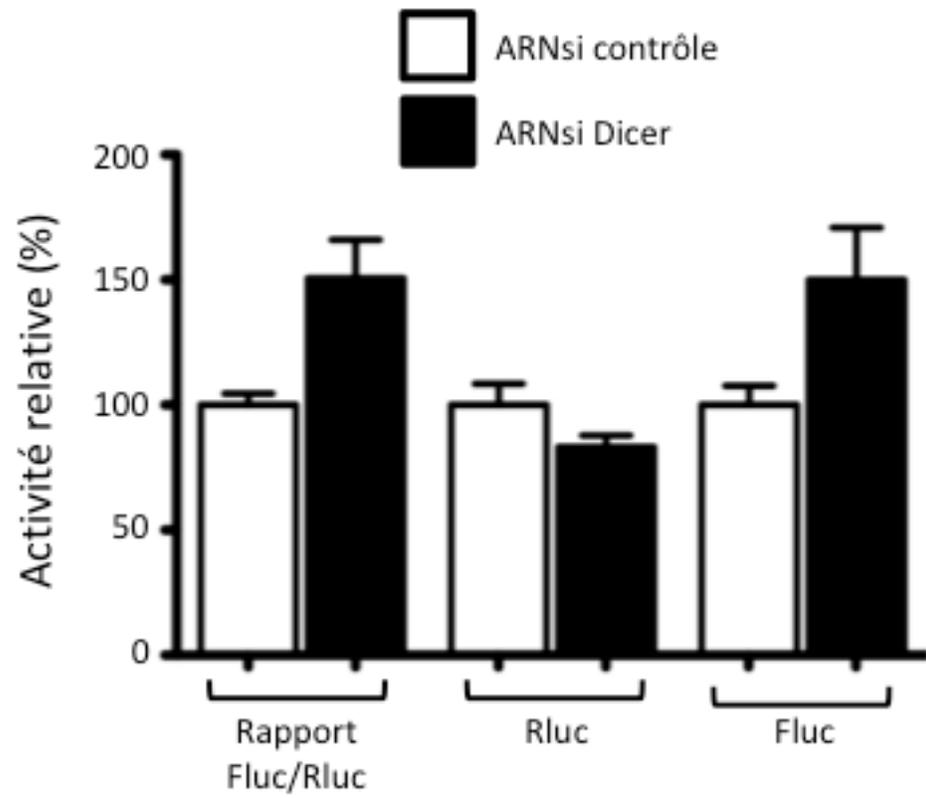
#### **4.6.2 Effet de l'inhibition de l'interférence par l'ARN sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1**

L'interférence par l'ARN permet de contrôler l'expression de plusieurs gènes dans les cellules. Des études ont montré que Tat inhibe cette interférence via une activité dite suppresseuse de l'interférence par l'ARN (RSS) (voir la section 1.2.3.4.4). Cette inhibition permet l'expression de certaines protéines pouvant servir d'ITAF positif de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

**Figure 4- 7 : Mesure des espèces réactives à l'oxygène (ROS) produites en présence de Tat86 ou de Tat86-C31S.** Les niveaux de ROS intracellulaires dans les cellules Jurkat T exposées à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (A) ou préalablement transfectées avec 4,0  $\mu g$  d'un vecteur vide ou d'un vecteur exprimant Tat86 ou Tat86-C31S (B) ont été mesurés par coloration au DCFH-DA (diacétate de dichlorodihydrofluoresceine ; Sigma). L'intensité du marquage a été mesurée par cytométrie en flux. Les données ont été recueillies à la longueur d'ondes d'émission FL-1 (530/30 nm). La courbe se déplace vers la droite du graphique plus le stress oxydatif est fort (concentration croissante de  $H_2O_2$ ), ce qui montre que la technique fonctionne.



**Figure 4- 8: Effet de la diminution de l'expression de Dicer sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.** L'activité de l'IRES a été mesurée dans des lysats de cellules Jurkat T transfectées d'abord avec des ARNsi contrôles (*SignalSilence® control siRNA*) ou des ARNsi dirigés contre Dicer (*SignalSilence® Dicer siRNA I* (Cell Signaling Technology)), puis re-transfectées 24 h plus tard avec le vecteur dual-luciférase sauvage. Le rapport Fluc/Rluc, l'activité Fluc et l'activité Rluc obtenus avec le vecteur dual-luciférase sauvage en présence des ARNsi contrôle ont été établis arbitrairement à 100%. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  ESM de trois expériences indépendantes. Le vecteur sauvage est décrit dans le chapitre 2.



J'ai observé que le mutant Tat86-K51A qui ne possède pas d'activité RSS ne stimule pas l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Cependant, les mutants K41A et C31S ne stimulent pas non plus l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> (Figure 3-4) même si leur RSS est fonctionnel (données non présentées). Ces résultats montrent que l'absence d'effet du mutant K51A sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> ne dépend pas de son RSS muté. Comme mentionné plus haut, nous discuterons plus loin le fait qu'il pourrait dépendre de la conformation de Tat. En parallèle, j'ai testé l'effet de l'inhibition directe de l'interférence par l'ARN sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> en utilisant des ARNsi dirigés contre Dicer, une enzyme participant à la maturation des ARN interférents. Lorsque l'expression de Dicer est diminuée de 50%, tel que vérifié par immunobuvardage de type Western, le rapport Fluc/Rluc et l'activité Fluc sont augmentés d'un facteur 1,5 alors que l'activité Rluc n'est pas affectée (Figure 4-8). L'inhibition de l'interférence par l'ARN favorise la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Il serait intéressant d'approfondir cette étude préliminaire afin de déterminer s'il y a des ITAF positifs de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 dont l'expression est contrôlée par interférence par l'ARN.

#### **4.6.3 Présentation d'un modèle expliquant la stimulation de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 par Tat**

En se basant sur l'ensemble de mes résultats et les données de la littérature, il semble que la conformation de Tat soit importante pour l'effet qu'elle exerce sur l'IRES<sup>5'UTR</sup>. En effet, la structure de Tat est très flexible. Sa conformation dépend des protéines avec lesquelles elle interagit et des modifications post-traductionnelles qu'elle a subies. Nous pouvons supposer que les différentes isoformes (Tat86, Tat72 et Tat101) et mutants de Tat (Tat86-C31S, Tat86-K41A et Tat86-K51A) utilisés dans mon étude ont des conformations différentes et n'interagissent pas de la même façon avec les protéines cellulaires. Par exemple, la lysine 41 est importante pour l'intégrité structurale de Tat (Tahirov et al. 2010) et la lysine 51 est un site d'acétylation (Hetzer et al. 2005) et de méthylation (Pagans et al. 2010). Aussi, des différences dans l'activité des différentes

isoformes de Tat ont déjà été montrées (McMillan et al. 1995; Brand et al. 1997; Ott et al. 1997; Lopez-Huertas et al. 2010).

Notre hypothèse pour expliquer le mécanisme d'action de Tat sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est que la conformation de Tat86 lui permet d'interagir avec un facteur cellulaire spécifique dont elle modulerait l'activité. Ce facteur pourrait agir comme ITAF positif et stimuler l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> ou pourrait être un facteur de transcription qui stimule l'expression d'un ITAF positif de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Les deux possibilités peuvent aussi coexister, c'est-à-dire qu'il pourrait y avoir simultanément stimulation de l'expression d'un ITAF positif et de son activité par Tat86. La conformation de Tat72 lui permettrait aussi d'interagir avec ce facteur hypothétique, mais moins efficacement, alors que la conformation de Tat101 et celle des mutants de Tat testés ne leur permettraient pas d'interagir avec ce facteur. Une possibilité intéressante, quoique qu'actuellement purement spéculative, est que l'effet de Tat soit relié à l'activation du facteur de transcription NF-κB ou à l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. En effet, Tat active NF-κB par différents mécanismes (voir la section 1.2.3.2.3) et augmente directement l'expression de Bcl-2. Il a été montré que l'activation de NF-κB et l'expression de Bcl-2 stimulent la traduction IRES-dépendante du facteur inductible à l'hypoxie 1α (HIF-1α), mais le mécanisme moléculaire de cette stimulation n'est pas connu (Zhou et al. 2004). Nous pouvons supposer que la situation serait semblable pour l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. Il est intéressant de noter que dans les cellules Jurkat T, Tat86 augmente indirectement l'expression de Bcl-2 via NF-κB et directement via une interaction entre son domaine d'activation et le promoteur du gène de Bcl-2 (Wang et al. 1999). Plusieurs mutations ponctuelles de Tat86 dont la substitution de la lysine 41 par une alanine abolissent l'augmentation de l'expression de Bcl-2 par Tat86 et j'ai observé que le mutant TatK41A n'active pas l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Une première étape intéressante pour vérifier la possibilité que NF-κB et/ou Bcl-2 soit impliqué dans l'action de Tat sur l'IRES<sup>5'UTR</sup> consisterait à examiner l'effet de Tat en présence d'inhibiteurs de NF-κB, comme la sulfasalazine (Zhou et al. 2004), et de Bcl-2, comme ABT-737 (Vogler et al. 2009).

#### 4.6.4 Comparaison de l'effet des trois isoformes de Tat sur la transcription et la traduction coiffe-dépendante

Dans notre étude, les trois isoformes de Tat affectent différemment la transcription de notre vecteur rapporteur qui est sous le contrôle d'un promoteur CMV. La transactivation de la transcription de notre messenger rapporteur se fait de façon TAR-indépendante dans nos conditions expérimentales, car TAR n'est pas présent immédiatement à l'extrémité du transcrit. On sait que cette transactivation implique des facteurs de transcription cellulaires dont NF- $\kappa$ B (voir la section 1.2.3.2.3). L'isoforme Tat86 augmente graduellement les niveaux d'ARNm Rluc-Fluc atteignant une augmentation d'un facteur sept pour la plus grande quantité de Tat utilisée (Figure 2-2). L'isoforme Tat72 n'affecte pas les niveaux d'ARNm rapporteur et l'isoforme Tat101 entraîne une augmentation plus faible des niveaux d'ARNm que Tat86 et seulement lorsqu'elle est présente en grandes quantités. Les isoformes Tat72 et Tat101 transactivent donc beaucoup moins la transcription du rapporteur que Tat86, ce qui suggère qu'elles activent peu efficacement des facteurs de transcription cellulaires dans nos conditions expérimentales. J'ai aussi examiné l'effet de ces trois isoformes sur la traduction coiffe-dépendante de la Rluc. Nous observons que Tat72 et Tat86, mais non Tat101 stimulent ce mode de traduction. La stimulation de la traduction coiffe-dépendante par Tat86 et Tat72 est probablement attribuable au fait que ces isoformes compétitionnent eIF2 $\alpha$  pour la liaison de PKR, empêchant ainsi l'inhibition de la traduction induite par PKR. L'effet de Tat86 sur la traduction coiffe-dépendante est bien moindre que son effet sur la traduction dépendante de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. À notre connaissance, l'effet de Tat101 sur la traduction en lien avec PKR n'est pas connu. Notre étude suggère que Tat101 ne peut lier PKR ou ne peut compétitionner avec eIF2 $\alpha$  pour la liaison de PKR.

#### 4.6.5 Effet de PKR sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1

J'ai décidé d'étudier aussi l'effet de PKR sur l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, tout d'abord pour voir si PKR jouait un rôle dans la stimulation de l'IRES<sup>5'UTR</sup> par Tat. PKR est une protéine antivirale qui joue un rôle dans le contrôle de la traduction coiffe-dépendante (voir la section 1.3.3.2.1 dans l'Introduction). De plus, il a été montré que PKR stimule l'IRES

de plusieurs messagers viraux et cellulaires (Fernandez et al. 2002; Gerlitz et al. 2002; Rivas-Estilla et al. 2002). Mes résultats ont montré que PKR stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 en absence de Tat (voir le chapitre 3). L'activité kinase de PKR est nécessaire pour cet effet, mais non la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par PKR. Aussi, l'effet de PKR est observé que TAR soit présente ou non (donnée non présentée). L'effet qu'exerce PKR sur la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> est donc entièrement différent de son rôle dans la traduction coiffe-dépendante. Une hypothèse attrayante est que PKR pourrait activer un ITAF positif de l'IRES<sup>5'UTR</sup> par phosphorylation. Nous avons aussi observé que, lorsque l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est mesurée en présence de Tat86 et de PKR, l'effet de Tat est le même qu'il soit en présence de PKR sauvage ou d'un mutant catalytiquement inactif de PKR, ce qui montre clairement que l'effet de Tat sur PKR s'exerce indépendamment de PKR. Enfin, nous avons montré que les effets de Tat86 et de PKR ne sont pas additifs. Une explication possible pour ce résultat est que Tat86 inhibe directement l'activité de PKR, ce qui empêcherait PKR de phosphoryler un ITAF positif pour l'activer. Une autre explication possible serait que Tat86 et PKR agissent sur le même ITAF. Comme Tat86 ne semble pas inhiber directement PKR (voir la section 1.2.3.3.2), nous favorisons la seconde explication. La phosphorylation par PKR pourrait activer le même ITAF ou le même facteur de transcription que Tat86. Il est intéressant de noter que PKR active NF- $\kappa$ B via la phosphorylation de son inhibiteur I $\kappa$ B- $\alpha$  (Kumar et al. 1994), ce qui appuie notre hypothèse concernant l'implication de NF- $\kappa$ B dans la stimulation de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

Rivas-Estilla et al. (2002) qui ont montré que l'IRES du VHC est stimulé par PKR ont proposé l'analyse suivante de la situation. Au début de l'infection, PKR est activée par la présence d'ARNdb viral. Cette activation faciliterait la traduction des protéines virales en augmentant l'activité de l'IRES du VHC. Vers la fin de l'infection, lorsque des quantités suffisantes de protéines virales ont été produites, PKR est inhibée par des protéines du VHC qui interagissent directement avec PKR, probablement pour éviter l'apoptose qui aurait été induite par l'activation prolongée de PKR.

## 4.7 Raffinement du modèle concernant le rôle de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 lors de la réplication virale en tenant compte des effets de Tat et de PKR

En résumé, notre étude montre que Tat86 et Tat72, mais non Tat101, stimulent l'initiation de la traduction utilisant l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. Notre hypothèse est que cette stimulation serait utile au virus pour favoriser la traduction de ses protéines de structure et de ses enzymes lors des étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1, lorsque la traduction coiffe-dépendante est compromise. On sait que l'isoforme Tat72 est prédominante lors des étapes tardives du cycle de réplication alors que l'isoforme Tat101 est prédominante lors des étapes précoces (Malim et al. 1988). Tat72 stimulerait donc la traduction IRES-dépendante au moment où cela répond aux besoins du virus. La concentration de Tat dans les lymphocytes T infectés n'est pas connue. Des chercheurs ont mesuré des concentrations picomolaires de Tat extracellulaire dans le sérum de patients séropositifs (Westendorp et al. 1995; Huang et al. 1998), mais chez les patients séropositifs, le virus est en latence. On ignore quelle est la concentration de Tat chez les patients où le virus se réplique activement. De plus, les mesures concernent la concentration de Tat extracellulaire et il est probable que la concentration de Tat à l'intérieur des lymphocytes T infectés varie grandement suivant le stade de l'infection. Nous ne savons donc pas laquelle des concentrations de Tat que nous avons utilisées correspond à la situation rencontrée par l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 lorsqu'il est traduit lors des étapes tardives. Cependant, nous avons montré qu'une gamme de concentrations de Tat peuvent stimuler l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

L'IRES<sup>5'UTR</sup> serait donc stimulé dans les étapes tardives de la réplication virale, comme il est généralement suggéré. Cependant, l'analyse de l'effet de PKR suggère que la stimulation du mode de traduction IRES-dépendant serait aussi importante au début de l'infection pour traduire les transcrits précoces du VIH-1. Rappelons tout d'abord que la région 5'UTR de tous les ARNm du VIH-1 contient une grande portion de l'IRES<sup>5'UTR</sup> contenu dans l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, portion que nous appellerons IRES<sup>5'UTR</sup> commun (IRES<sup>5'UTRc</sup>). L'activité de l'IRES<sup>5'UTRc</sup> est semblable à celle de l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

comme l'ont montré Brasey et al. (2003) et il a notamment été montré que la traduction de Tat, dont l'ARNm contient l'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup>, peut être coiffe-dépendante ou IRES-dépendante (Charnay et al. 2009) (voir la section 1.4.3.1). Nous avons montré que PKR stimule l'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. L'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup> étant presque identique à l'IRES<sup>5'UTR</sup>, dont il diffère par l'absence de 46 nt du côté 3', nous pouvons donc suggérer que PKR stimule aussi l'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup>. Nous proposons alors une analyse similaire à celle de Rivas-Estilla et al. (2002) pour expliquer le rôle de la stimulation de l'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup> par PKR dans le cadre de la réplication du VIH-1. Au début de l'infection par le VIH-1, PKR est activée par la présence d'ARNdb viral comme, par exemple, la structure TAR. Suite à son activation, PKR inhibe la traduction coiffe-dépendante et pourrait stimuler l'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup>. Une telle stimulation serait particulièrement utile pour traduire les ARNm précoces comme l'ARNm de Tat qui est essentielle pour une infection productive. Le virus a besoin de Tat pour que l'ADN proviral soit transcrit efficacement et aussi pour que la traduction coiffe-dépendante des ARNm viraux soit efficace (voir la section 1.2.3). En effet, nous avons vu dans l'Introduction que la traduction coiffe-dépendante des ARNm du VIH-1 est initialement peu efficace à cause du blocage imposé par les structures TAR-poly(A) positionnées au début de ces ARNm. En plus de l'effet que nous proposons sur la traduction de Tat, PKR activée phosphoryle Tat, ce qui augmente son affinité pour TAR et stimule la transactivation de la transcription par Tat. Au cours de l'infection, PKR sera inactivée par différents mécanismes, notamment par la présence d'ARNdb en grandes quantités (voir la section 1.3.3.2.1), ce qui évite les effets d'une activation prolongée de PKR. En effet, une activation prolongée nuirait à la réplication du VIH-1 (Clerzius et al. 2011) et à la survie cellulaire (Scheuner et al. 2006). La présence de Tat qui a alors pu être synthétisée en grandes quantités permettrait de stimuler la traduction coiffe-dépendante des ARNm du VIH-1, puis finalement la traduction IRES-dépendante, lorsque la traduction coiffe-dépendante globale est compromise.

Le fait que PKR stimulerait l'IRES<sup>5'UTR<sub>c</sub></sup> des différents ARNm du VIH-1 est surprenant, à première vue, puisqu'il s'agit d'une protéine antivirale. Cependant, il est profitable pour le virus de détourner l'activation de la protéine antivirale PKR à son

avantage. Les virus utilisent différentes stratégies complexes pour détourner la défense antivirale de l'hôte de façon à favoriser leur survie et leur propagation (Iannello et al. 2006; Bolinger and Boris-Lawrie 2009; Adhya and Basu 2010). En effet, ils ont co-évolué avec leurs hôtes. Cette co-évolution a permis à la fois aux hôtes de développer des mécanismes antiviraux pour nuire à la réplication virale et aux virus de s'ajuster à ces mécanismes pour exploiter leur hôte et favoriser leur réplication. L'activation de PKR est avantageuse pour le virus puisque PKR activée stimulerait l'IRES<sup>5'UTRc</sup> des messagers viraux pour permettre au VIH-1 d'exprimer ses protéines au début de l'infection lorsqu'il y a peu de Tat et que la cellule met en action ses défenses antivirales. En parallèle, cette stimulation peut aussi être avantageuse pour l'hôte en favorisant une réponse immunitaire forte au début de l'infection. En effet, Xiong et al. (2006) ont montré que la stimulation de la traduction IRES-dépendante de certains antigènes non-conventionnels permet de stimuler la réponse immunitaire.

Vallejos et al. (2011a) ont décrit l'IRES<sup>5'UTR</sup> comme un IRES viral atypique qui partage plusieurs caractéristiques des IRES cellulaires. Par exemple, la relation structure-fonction est moins rigide pour l'IRES<sup>5'UTR</sup> que pour la plupart des IRES viraux. En effet, Vallejos et al. (2011a) et nous-mêmes (voir chapitre 2) avons montré que plusieurs mutations et délétions n'altèrent pas l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, contrairement à ce qui est observé avec les IRES viraux typiques. Aussi, l'IRES<sup>5'UTR</sup> est activé par des stress cellulaires, comme c'est le cas des IRES cellulaires. Cette activation permet à la cellule d'exprimer des protéines requises spécifiquement lors d'un stress cellulaire particulier qui inhibe la traduction coiffe-dépendante comme lors de la mitose, de l'apoptose ou de l'hypoxie. La co-évolution du VIH-1 avec son hôte lui aurait permis de développer un IRES présentant des caractéristiques similaires à celles des IRES cellulaires afin de favoriser l'expression de ses protéines même lorsque les cellules sont stressées par l'infection virale. Cette perception de l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1 comme imitant un IRES cellulaire plutôt que comme un IRES viral typique est importante pour comprendre son mécanisme d'action et pour diriger les études sur son rôle et son importance lors de l'infection. Entre autres, cela affecte la façon de délimiter les frontières de l'IRES<sup>5'UTR</sup> puisque les IRES cellulaires sont constitués de plusieurs modules plutôt que d'une structure

rigide comme dans le cas des IRES viraux typiques (voir la section 1.3.3.3). Il est donc probable que le module principal de l'IRES<sup>5'UTR</sup> est contenu entre les nt 104 et 289, la portion commune à tous les ARNm du VIH-1, et que les nt suivants, qui diffèrent selon les ARNm, contiennent d'autres modules qu'on pourrait qualifier de secondaires étant donné qu'ils ne seraient pas essentiels au fonctionnement de cet IRES. Comme la convention actuelle est encore d'utiliser les limites fixées initialement par Brasey et al., nous avons continué à employer le terme IRES<sup>5'UTR</sup> pour nommer l'IRES contenu entre les nt 104 et 335 de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1.

## 4.8 Conclusions et Perspectives

Durant mes études de doctorat, j'ai étudié l'IRES<sup>5'UTR</sup> du VIH-1. J'ai identifié trois régions (nt 202-217, nt 240-242 et nt 302-305) dont la présence stimule son activité et une tige-boucle (nt 134-178), que nous avons nommée IRENE (*IREs negative element*), dont la présence diminue son activité. J'ai montré que l'effet répresseur d'IRENE est contrecarré lors d'un stress oxydatif. Aussi, j'ai montré que les isoformes Tat86 et Tat72, mais non Tat101, stimulent l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> de façon dose-dépendante. Cette stimulation est indépendante de TAR et de PKR. Enfin, j'ai montré que PKR stimule l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>, et par extension, de l'IRES<sup>5'UTRc</sup> commun à tous les ARNm du VIH-1, et que cette activation est indépendante de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Ensemble, ces études m'ont permis de présenter un modèle expliquant le rôle et le contrôle de l'IRES contenu dans la région 5'UTR de tous les ARNm viraux, lors d'une infection par le VIH-1. Il a été observé que lors de l'infection par le VIH-1, la traduction coiffe-dépendante est prédominante lorsqu'elle est fonctionnelle. L'IRES<sup>5'UTR</sup>, et par extension, l'IRES<sup>5'UTRc</sup>, seraient alors dans une conformation peu active grâce à la présence d'IRENE et cette conformation pourrait être stabilisée par un ITAF négatif. La traduction via l'IRES<sup>5'UTRc</sup> serait utilisée au tout début du cycle de réplication virale lorsque la traduction coiffe-dépendante des ARNm viraux est inefficace et la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> de l'ARN pleine-longueur serait utilisée à la fin des étapes tardives lorsque la traduction coiffe-

dépendante globale est compromise dû à l'accumulation de stress cellulaires liés à l'infection. Au tout début du cycle de réplication, c'est PKR qui contribuerait à induire un conformation active de l'IRES<sup>5'UTRc</sup>, probablement en stimulant indirectement l'expression d'un ITAF positif qui modifierait la conformation de cet IRES ou en activant directement par phosphorylation un tel ITAF. Durant les étapes tardives, ce sont les stress cellulaires qui induiraient l'expression et/ou la relocalisation d'un ou plusieurs ITAF positifs qui modifieraient la conformation de l'IRES<sup>5'UTR</sup> de façon à l'activer.

À court terme, plusieurs expériences seraient intéressantes à effectuer pour valider notre modèle. D'abord, il faudrait identifier les différents facteurs cellulaires qui interagissent avec l'IRES<sup>5'UTR</sup> (ou IRES<sup>5'UTRc</sup>) particulièrement avec IRENE, en conditions physiologiques et en conditions de stress cellulaires. Cette étude permettrait d'identifier les facteurs cellulaires négatifs qui maintiennent l'IRES<sup>5'UTR</sup> dans une conformation peu active ainsi que les ITAF positifs qui modifient la conformation de l'IRES<sup>5'UTR</sup> pour l'activer. Vallejos et al. ont déjà identifié des facteurs cellulaires provenant de cellules HeLa qui lient la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en fonction de la phase du cycle cellulaire. Il sera important de faire ce type d'expérience avec des cellules Jurkat T. Parmi les protéines liées à la région 5'UTR, il faudra ensuite caractériser celles qui agissent sur l'activité de l'IRES et aussi, en utilisant des techniques de pontage, définir leur site de liaison. La caractérisation de l'effet de ces protéines sur l'activité de l'IRES permettra de comprendre la modulation de son activité en fonction du cycle cellulaire. En parallèle, il faudra faire ce type d'études avec des extraits de cellules Jurkat T exposées à un stress oxydatif, afin d'identifier les protéines impliquées dans l'activation de l'IRES dans ces conditions. Il serait aussi important d'approfondir le mécanisme d'action de Tat sur la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Comme mentionné précédemment, nous favorisons l'hypothèse que l'effet de Tat sur l'IRES<sup>5'UTR</sup> est médié par NF-κB ou par Bcl-2. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions mesurer l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> en présence de Tat et d'un inhibiteur spécifique de NF-κB ou de Bcl-2. Une approche plus globale sera d'identifier spécifiquement les protéines qui se lient à l'IRES<sup>5'UTR</sup> en présence de Tat, puis de caractériser lesquelles, parmi ces protéines, affectent l'activité de l'IRES, ce qui fournira des informations précieuses sur le mécanisme qui permet à Tat de stimuler cet IRES. Enfin,

dans la même ligne d'études, il serait important de caractériser l'effet de PKR en utilisant une approche similaire pour identifier les protéines impliquées dans la stimulation de l'IRES. Ensuite, il faudrait aussi mieux comprendre la régulation de l'IRES<sup>5'UTR</sup> en étudiant l'effet de protéines virales susceptibles de se lier à la région 5'UTR ou l'effet d'autres stress cellulaires induits lors d'une infection par le VIH-1 sur son activité. Par exemple, nous pourrions examiner l'effet du précurseur Gag ou de la protéine Rev qui interagissent avec la région 5'UTR. Aussi, nous pourrions étudier l'effet de l'induction de l'apoptose sur l'efficacité de l'IRES<sup>5'UTR</sup>. Plusieurs IRES cellulaires sont stimulés lors de l'apoptose tandis que la traduction coiffe-dépendante est inhibée. Il est donc probable qu'il en est de même pour l'IRES<sup>5'UTR</sup>.

En conclusion, d'autres études sont nécessaires pour comprendre la modulation de l'activité de l'IRES<sup>5'UTR</sup> (IRES<sup>5'UTRc</sup>) en fonction de la progression de l'infection par le VIH-1 et pour analyser son importance dans le contexte d'une infection virale. Il faudrait entre autres étudier l'activité de cet IRES dans des cellules infectées à différents stades de l'infection et pouvoir découvrir des conditions expérimentales où seule la traduction via l'IRES<sup>5'UTR</sup> est affectée. Il est cependant difficile de faire des mutations qui inactivent l'IRES<sup>5'UTR</sup>, sans, de surcroît, affecter les éléments nécessaires à la réplication virale que la région 5'UTR contient. Une meilleure compréhension du fonctionnement et de la modulation de cet IRES pourra fournir des pistes pour permettre de l'inactiver sélectivement et pour poursuivre l'étude de son activité dans le contexte d'une infection virale. Nos travaux proposent que l'IRES contenu dans la région 5'UTR des ARNm du VIH-1 est important au début des étapes précoces et à la fin des étapes tardives et nous suggérons qu'il pourra constituer une nouvelle cible intéressante pour développer des agents anti-VIH-1.

## Bibliographie

Abbink, T.E., Ooms, M., Haasnoot, P.C., and Berkhout, B. 2005. The HIV-1 leader RNA conformational switch regulates RNA dimerization but does not regulate mRNA translation. *Biochemistry* **44**(25): 9058-9066.

Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clement, J.F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M. et al. 2010. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci* **123**(Pt 3): 369-383.

Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M.A. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**(2): 284-291.

Adhya, D. and Basu, A. 2010. Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. *J Biosci* **35**(4): 647-663.

Agy, M.B., Wambach, M., Foy, K., and Katze, M.G. 1990. Expression of cellular genes in CD4 positive lymphoid cells infected by the human immunodeficiency virus, HIV-1: evidence for a host protein synthesis shut-off induced by cellular mRNA degradation. *Virology* **177**(1): 251-258.

AIDSinfo. 2012. Drug Database.

Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. 2006. HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* **396**(2): 219-226.

Alvarez, E., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* **77**(23): 12392-12400.

Andersen, J.L. and Planelles, V. 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* **3**(1): 43-51.

- Andersen, J.L., Zimmerman, E.S., DeHart, J.L., Murala, S., Ardon, O., Blackett, J., Chen, J., and Planelles, V. 2005. ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **12**(4): 326-334.
- Anderson, E.C. and Lever, A.M. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol* **80**(21): 10478-10486.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**(7209): 64-71.
- Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 128-140.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 542-557.
- Bannwarth, S. and Gatignol, A. 2005. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* **3**(1): 61-71.
- Barboric, M. and Peterlin, B.M. 2005. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol* **3**(2): e76.
- Baril, M. and Brakier-Gingras, L. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* **33**(5): 1474-1486.
- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**(2): 215-233.
- Beerens, N., Groot, F., and Berkhout, B. 2001. Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J Biol Chem* **276**(33): 31247-31256.
- Belzile, J.P., Richard, J., Rougeau, N., Xiao, Y., and Cohen, E.A. 2010. HIV-1 Vpr induces the K48-linked polyubiquitination and proteasomal degradation of target cellular proteins to activate ATR and promote G2 arrest. *J Virol* **84**(7): 3320-3330.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M., and Jeang, K.T. 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* **22**(5): 607-619.

- Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N., and Sonenberg, N. 1996. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* **15**(3): 658-664.
- Berkhout, B. 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**: 1-34.
- Berkhout, B., Arts, K., and Abbink, T.E. 2011. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* **39**(12): 5232-5244.
- Berlioz, C. and Darlix, J.L. 1995. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* **69**(4): 2214-2222.
- Bolinger, C. and Boris-Lawrie, K. 2009. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology* **6**: 8.
- Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourenco, L., and Vagner, S. 2003. IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 427-428.
- Bonneau, A.M. and Sonenberg, N. 1987. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* **262**(23): 11134-11139.
- Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M., and Kean, K.M. 1997. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res* **25**(5): 925-932.
- Brakier-Gingras, L. and Dulude, D. 2010. Programmed -1 Ribosomal Frameshift in the Human Immunodeficiency Virus of Type 1. In *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*, (ed. J. Atkins and R. Gesteland), pp. 175-192. Springer, New York.
- Brand, S.R., Kobayashi, R., and Mathews, M.B. 1997. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **272**(13): 8388-8395.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L., and Sonenberg, N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* **77**(7): 3939-3949.

- Brierley, I. and Dos Ramos, F.J. 2006. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res* **119**(1): 29-42.
- Briggs, J.A. and Krausslich, H.G. 2011. The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* **410**(4): 491-500.
- Brocard, M., Paulous, S., Komarova, A.V., Deveaux, V., and Kean, K.M. 2007. Evidence that PTB does not stimulate HCV IRES-driven translation. *Virus Genes* **35**(1): 5-15.
- Broder, S. 2010. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* **85**(1): 1-18.
- Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M., and Siliciano, R.F. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* **75**(1): 181-191.
- Bukrinsky, M. 2006. SNFing HIV transcription. *Retrovirology* **3**: 49.
- Butsch, M. and Boris-Lawrie, K. 2000. Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol* **74**(24): 11531-11537.
- . 2002. Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion? *J Virol* **76**(7): 3089-3094.
- Cai, R., Carpick, B., Chun, R.F., Jeang, K.T., and Williams, B.R. 2000. HIV-I TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* **373**(2): 361-367.
- Camerini, V., Decimo, D., Balvay, L., Pistello, M., Bendinelli, M., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. 2008. A dormant internal ribosome entry site controls translation of feline immunodeficiency virus. *J Virol* **82**(7): 3574-3583.
- Campbell, G.R., Pasquier, E., Watkins, J., Bourgarel-Rey, V., Peyrot, V., Esquieu, D., Barbier, P., de Mareuil, J., Braguer, D., Kaleebu, P. et al. 2004. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem* **279**(46): 48197-48204.
- Campbell, G.R., Watkins, J.D., Singh, K.K., Loret, E.P., and Spector, S.A. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and

- induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *J Virol* **81**(11): 5919-5928.
- Campbell, L.H., Borg, K.T., Haines, J.K., Moon, R.T., Schoenberg, D.R., and Arrigo, S.J. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs. *J Virol* **68**(9): 5433-5438.
- Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A.R., and Zahler, A.M. 1999. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J* **18**(14): 4060-4067.
- Castello, A., Franco, D., Moral-Lopez, P., Berlanga, J.J., Alvarez, E., Wimmer, E., and Carrasco, L. 2009. HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* **4**(11): e7997.
- Chang, H.K., Gallo, R.C., and Ensoli, B. 1995. Regulation of Cellular Gene Expression and Function by the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein. *J Biomed Sci* **2**(3): 189-202.
- Chang, Y.N., Kenan, D.J., Keene, J.D., Gatignol, A., and Jeang, K.T. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol* **68**(11): 7008-7020.
- Chappell, S.A., LeQuesne, J.P., Paulin, F.E., deSchoolmeester, M.L., Stoneley, M., Soutar, R.L., Ralston, S.H., Helfrich, M.H., and Willis, A.E. 2000. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **19**(38): 4437-4440.
- Charbonneau, J., Gendron, K., Ferbeyre, G., and Brakier-Gingras, L. 2012. The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *RNA* **18**(3): 519-529.
- Charnay, N., Ivanyi-Nagy, R., Soto-Rifo, R., Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., and Darlix, J.L. 2009. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* **6**: 74.
- Chiu, H.C., Wang, F.D., Chen, Y.M., and Wang, C.T. 2006. Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6\* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 2041-2046.

- Clerzius, G., Gelinas, J.F., and Gatignol, A. 2011. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* **21**(1): 42-53.
- Corbin, A. and Darlix, J.L. 1996. Functions of the 5' leader of murine leukemia virus genomic RNA in virion structure, viral replication and pathogenesis, and MLV-derived vectors. *Biochimie* **78**(7): 632-638.
- Costantino, D.A., Pfingsten, J.S., Rambo, R.P., and Kieft, J.S. 2008. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 57-64.
- Cullen, B.R. 1986. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* **46**(7): 973-982.
- D'Orso, I. and Frankel, A.D. 2010a. HIV-1 Tat: Its Dependence on Host Factors is Crystal Clear. *Viruses*(2): 2226-2234.
- . 2010b. RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat Struct Mol Biol* **17**(7): 815-821.
- D'Souza, V. and Summers, M.F. 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**(8): 643-655.
- Damgaard, C.K., Andersen, E.S., Knudsen, B., Gorodkin, J., and Kjems, J. 2004. RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *J Mol Biol* **336**(2): 369-379.
- Das, A.T., Klaver, B., Klasens, B.I., van Wamel, J.L., and Berkhout, B. 1997. A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol* **71**(3): 2346-2356.
- Davy, C. and Doorbar, J. 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* **368**(2): 219-226.
- Deffaud, C. and Darlix, J.L. 2000. Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol* **74**(24): 11581-11588.
- Demarchi, F., d'Adda di Fagagna, F., Falaschi, A., and Giacca, M. 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**(7): 4427-4437.

- Demarchi, F., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol* **73**(8): 7080-7086.
- Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Fan, S., Del Valle, L., Michiels, C., Sweet, T., Rom, I., Khalili, K., Rappaport, J., Amini, S. et al. 2009. Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J Biol Chem* **284**(17): 11364-11373.
- Dever, T.E., Dar, A.C., and Sicheri, F. 2007. The eIF2alpha kinases. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E., Ivanov, P.A., Dunaevsky, J.E., Merrick, W.C., and Shatsky, I.N. 2010. GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* **285**(35): 26779-26787.
- Dobrikov, M., Dobrikova, E., Shveygert, M., and Gromeier, M. 2011. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C{alpha} regulates eIF4G1 binding to Mnk1. *Mol Cell Biol* **31**(14): 2947-2959.
- Dorin, D., Bonnet, M.C., Bannwarth, S., Gatignol, A., Meurs, E.F., and Vaquero, C. 2003. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* **278**(7): 4440-4448.
- Doudna, J. and Sarnow, P. 2007. Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. J.W. Hershey, M.B. Mathews, and N. Sonenberg), pp. 297-318. CSH Press, New York.
- Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**(15): 4797-4812.
- Endo-Munoz, L., Warby, T., Harrich, D., and McMillan, N.A. 2005. Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription. *Virol J* **2**: 17.

- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M.D., and Hatzoglou, M. 2002. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *J Biol Chem* **277**(21): 19198-19205.
- Filbin, M.E. and Kieft, J.S. 2009. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* **19**(3): 267-276.
- Fitzgerald, K.D. and Semler, B.L. 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 518-528.
- Fletcher, T.M., 3rd, Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M.A., Stivahtis, G., Sharp, P.M., Emerman, M., Hahn, B.H., and Stevenson, M. 1996. Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *EMBO J* **15**(22): 6155-6165.
- Fraser, C.S. and Doudna, J.A. 2007. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* **5**(1): 29-38.
- Freed, E.O. 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**(1-6): 13-33.
- Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Martindale, J.L., Kim, H.H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J.O. et al. 2008. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* **28**(1): 93-107.
- Gatignol, A. 2007. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* **55**: 137-159.
- Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K.T. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* **251**(5001): 1597-1600.
- Gaynor, R. 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**(4): 347-363.
- Geballe, A.P. and Gray, M.K. 1992. Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res* **20**(16): 4291-4297.

Gendron, K., Ferbeyre, G., Heveker, N., and Brakier-Gingras, L. 2010. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res.*

Gerlitz, G., Jagus, R., and Elroy-Stein, O. 2002. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* **269**(11): 2810-2819.

Gibellini, D., Re, M.C., La Placa, M., and Zauli, G. 2002. Differentially expressed genes in HIV-1 tat-expressing CD4(+) T-cell line. *Virus Res* **90**(1-2): 337-345.

Gibellini, D., Vitone, F., Schiavone, P., and Re, M.C. 2005. HIV-1 tat protein and cell proliferation and survival: a brief review. *New Microbiol* **28**(2): 95-109.

Gil, J., Alcami, J., and Esteban, M. 2000. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* **19**(11): 1369-1378.

Gil, J., Rullas, J., Garcia, M.A., Alcami, J., and Esteban, M. 2001. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* **20**(3): 385-394.

Gloire, G., Charlier, E., Rahmouni, S., Volanti, C., Chariot, A., Erneux, C., and Piette, J. 2006. Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF-kappaB activation pathway and cellular survival upon oxidative stress. *Oncogene* **25**(40): 5485-5494.

Goh, W.C., Manel, N., and Emerman, M. 2004. The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology* **318**(1): 337-349.

Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H., and Emerman, M. 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* **4**(1): 65-71.

Graber, T.E. and Holcik, M. 2007. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst* **3**(12): 825-834.

Gradi, A., Svitkin, Y.V., Imataka, H., and Sonenberg, N. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff

- of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11089-11094.
- Greatorex, J., Gallego, J., Varani, G., and Lever, A. 2002. Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. *J Mol Biol* **322**(3): 543-557.
- Groom, H.C., Anderson, E.C., Dangerfield, J.A., and Lever, A.M. 2009. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Gen Virol* **90**(Pt 5): 1141-1147.
- Hager, G.L., McNally, J.G., and Misteli, T. 2009. Transcription dynamics. *Mol Cell* **35**(6): 741-753.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**(5453): 607-614.
- Hakre, S., Chavez, L., Shirakawa, K., and Verdin, E. 2011. Epigenetic regulation of HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS* **6**(1): 19-24.
- Hann, S.R. 1994. Regulation and function of non-AUG-initiated proto-oncogenes. *Biochimie* **76**(9): 880-886.
- Hanson, P.J., Zhang, H.M., Hemida, M.G., Ye, X., Qiu, Y., and Yang, D. 2012. IRES-Dependent Translational Control during Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Front Microbiol* **3**: 92.
- Hayes, A.M., Qian, S., Yu, L., and Boris-Lawrie, K. 2011. Tat RNA silencing suppressor activity contributes to perturbation of lymphocyte miRNA by HIV-1. *Retrovirology* **8**: 36.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., and Landau, N.R. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**(11): 6705-6711.
- Heinicke, L.A., Nallagatla, S.R., Hull, C.M., and Bevilacqua, P.C. 2011. RNA helical imperfections regulate activation of the protein kinase PKR: effects of bulge position, size, and geometry. *RNA* **17**(5): 957-966.

- Hellen, C.U. 2009. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 558-570.
- Herbreteau, C.H., Weill, L., Decimo, D., Prevot, D., Darlix, J.L., Sargueil, B., and Ohlmann, T. 2005. HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol* **12**(11): 1001-1007.
- Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnolzer, M., and Ott, M. 2005. Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect* **7**(13): 1364-1369.
- Hillis, D.M. 2000. AIDS. Origins of HIV. *Science* **288**(5472): 1757-1759.
- Hinnebusch, A.G. 2005. eIF2alpha kinases provide a new solution to the puzzle of substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* **12**(10): 835-838.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1): 51-59.
- Holcik, M. and Sonenberg, N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 318-327.
- Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R.G. 2000. Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* **16**(10): 469-473.
- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., and Zhang, H. 2007. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* **13**(10): 1241-1247.
- Huang, L., Bosch, I., Hofmann, W., Sodroski, J., and Pardee, A.B. 1998. Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J Virol* **72**(11): 8952-8960.
- Huthoff, H. and Berkhout, B. 2001a. Mutations in the TAR hairpin affect the equilibrium between alternative conformations of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acids Res* **29**(12): 2594-2600.
- . 2001b. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **7**(1): 143-157.

- Iannello, A., Debbeche, O., Martin, E., Attalah, L.H., Samarani, S., and Ahmad, A. 2006. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J Leukoc Biol* **79**(1): 16-35.
- Israel, N. and Gougerot-Pocidallo, M.A. 1997. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell Mol Life Sci* **53**(11-12): 864-870.
- Izumi, T., Io, K., Matsui, M., Shirakawa, K., Shinohara, M., Nagai, Y., Kawahara, M., Kobayashi, M., Kondoh, H., Misawa, N. et al. 2010. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(48): 20798-20803.
- Jack, S.C. and Chan, S.W. 2011. The role of PERK and GCN2 in basal and hydrogen peroxide-regulated translation from the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Genes* **43**(2): 208-214.
- Jackson, R.J. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1231-1241.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127.
- Jackson, R.J., Kaminski, A., and Pöyry, T.A.A. 2007. Coupled Termination-Reinitiation Events. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey), pp. 197-223. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**(8): 2636-2643.
- Jeang, K.T., Xiao, H., and Rich, E.A. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* **274**(41): 28837-28840.
- Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K., and Singh, S.K. 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* **11**(3): 269-283.

- Jowett, J.B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.L., and Chen, I.S. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**(10): 6304-6313.
- Ka, W.H., Jeong, Y.Y., and You, J.C. 2012. Identification of the HIV-1 packaging RNA sequence (Psi) as a major determinant for the translation inhibition conferred by the HIV-1 5' UTR. *Biochem Biophys Res Commun* **417**(1): 501-507.
- Kalantari, P., Narayan, V., Natarajan, S.K., Muralidhar, K., Gandhi, U.H., Vunta, H., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. 2008. Thioredoxin reductase-1 negatively regulates HIV-1 transactivating protein Tat-dependent transcription in human macrophages. *J Biol Chem* **283**(48): 33183-33190.
- Karn, J. 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**(2): 235-254.
- . 2000. Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency. In *HIV Sequence Compendium 2000*, (ed. C. Kuiken, F. McCutchan, B. Foley, J. Mellors, B. Hahn, J. Mullins, P. Marx, and S. Wolinsky), pp. 2-18. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos.
- . 2011. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr Opin HIV AIDS* **6**(1): 4-11.
- Karn, J. and Stoltzfus, C.M. 2012. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(2): a006916.
- Kaye, J.F. and Lever, A.M. 1998. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol* **72**(7): 5877-5885.
- Kim, I., Liu, C.W., and Puglisi, J.D. 2006. Specific recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA binding domains (dsRBD1-dsRBD2) of PKR. *J Mol Biol* **358**(2): 430-442.
- Kim, Y.S. and Risser, R. 1993. TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter by the Tat protein. *J Virol* **67**(1): 239-248.
- Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M., and Fujisawa, J.I. 1996. A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. *Biochimie* **78**(11-12): 1075-1080.

- Knudsen, B. and Hein, J. 2003. Pfold: RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3423-3428.
- Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. 2003. Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *Mol Cell Biol* **23**(2): 687-698.
- Komar, A.A. and Hatzoglou, M. 2011. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* **10**(2): 229-240.
- Konicek, B.W., Stephens, J.R., McNulty, A.M., Robichaud, N., Peery, R.B., Dumstorf, C.A., Dowless, M.S., Iversen, P.W., Parsons, S., Ellis, K.E. et al. 2011. Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. *Cancer Res* **71**(5): 1849-1857.
- Korf, M., Jarczak, D., Beger, C., Manns, M.P., and Kruger, M. 2005. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. *J Hepatol* **43**(2): 225-234.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J., and Williams, B.R. 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6288-6292.
- Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A., and Chinnadurai, G. 1989. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3551-3561.
- Lai, M., Zimmerman, E.S., Planelles, V., and Chen, J. 2005. Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo. *J Virol* **79**(24): 15443-15451.
- Lever, A.M. and Jeang, K.T. 2011. Insights into cellular factors that regulate HIV-1 replication in human cells. *Biochemistry* **50**(6): 920-931.

- Li, W., Huang, Y., Reid, R., Steiner, J., Malpica-Llanos, T., Darden, T.A., Shankar, S.K., Mahadevan, A., Satishchandra, P., and Nath, A. 2008. NMDA receptor activation by HIV-Tat protein is clade dependent. *J Neurosci* **28**(47): 12190-12198.
- Liljas, A. 1999. Function is structure. *Science* **285**(5436): 2077-2078.
- Lin, J. and Cullen, B.R. 2007. Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* **81**(22): 12218-12226.
- Lindl, K.A., Akay, C., Wang, Y., White, M.G., and Jordan-Sciutto, K.L. 2007. Expression of the endoplasmic reticulum stress response marker, BiP, in the central nervous system of HIV-positive individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(6): 658-669.
- Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., and He, J.J. 2011a. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol* **6**(2): 308-321.
- . 2011b. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Locker, N., Chamond, N., and Sargueil, B. 2011. A conserved structure within the HIV gag open reading frame that controls translation initiation directly recruits the 40S subunit and eIF3. *Nucleic Acids Res* **39**(6): 2367-2377.
- Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. 2006. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**(9): 391-400.
- Lopez-Huertas, M.R., Callejas, S., Abia, D., Mateos, E., Dopazo, A., Alcami, J., and Coiras, M. 2010. Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res* **38**(10): 3287-3307.
- Lopez-Lastra, M., Rivas, A., and Barria, M.I. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* **38**(2-3): 121-146.
- Los Alamos National Laboratory. 2011. HIV sequence database.
- Lukavsky, P.J. 2009. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* **139**(2): 166-171.

- Luo, Y. and Peterlin, B.M. 1993. Juxtaposition between activation and basic domains of human immunodeficiency virus type 1 Tat is required for optimal interactions between Tat and TAR. *J Virol* **67**(6): 3441-3445.
- Ma, Q., Kinneer, K., Ye, J., and Chen, B.J. 2003. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol Pharmacol* **64**(2): 211-219.
- MacCallum, P.R., Jack, S.C., Egan, P.A., McDermott, B.T., Elliott, R.M., and Chan, S.W. 2006. Cap-dependent and hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation are modulated by phosphorylation of eIF2alpha under oxidative stress. *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3251-3262.
- Mahlknecht, U., Dichamp, I., Varin, A., Van Lint, C., and Herbein, G. 2008. NF-kappaB-dependent control of HIV-1 transcription by the second coding exon of Tat in T cells. *J Leukoc Biol* **83**(3): 718-727.
- Malim, M.H., Hauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B.R. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**(6186): 181-183.
- Malys, N. and McCarthy, J.E. 2011. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell Mol Life Sci* **68**(6): 991-1003.
- Marcello, A., Lusic, M., Pegoraro, G., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. 2004. Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* **326**: 1-11.
- Marcello, A., Zoppe, M., and Giacca, M. 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* **51**(3): 175-181.
- Martinez-Salas, E. 2008. The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol* **16**(5): 230-237.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., and Fernandez, N. 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**(Pt 3): 611-626.

- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E., and Lopez de Quinto, S. 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**(Pt 5): 973-984.
- Martinez-Salas, E., Saiz, J.C., Davila, M., Belsham, G.J., and Domingo, E. 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* **67**(7): 3748-3755.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**(5): 911-940.
- McBride, M.S., Schwartz, M.D., and Panganiban, A.T. 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. *J Virol* **71**(6): 4544-4554.
- McMillan, N.A., Chun, R.F., Siderovski, D.P., Galabru, J., Toone, W.M., Samuel, C.E., Mak, T.W., Hovanessian, A.G., Jeang, K.T., and Williams, B.R. 1995. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* **213**(2): 413-424.
- Miele, G., Mouland, A., Harrison, G.P., Cohen, E., and Lever, A.M. 1996. The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J Virol* **70**(2): 944-951.
- Miller, W.A., Wang, Z., and Treder, K. 2007. The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 6): 1629-1633.
- Mishra, M., Vetrivel, S., Siddappa, N.B., Ranga, U., and Seth, P. 2008. Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif. *Ann Neurol* **63**(3): 366-376.
- Mokrejs, M., Masek, T., Vopalensky, V., Hlubucek, P., Delbos, P., and Pospisek, M. 2010. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D131-136.
- Monette, A., Ajamian, L., Lopez-Lastra, M., and Mouland, A.J. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous

- nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. *J Biol Chem* **284**(45): 31350-31362.
- Najera, I., Krieg, M., and Karn, J. 1999. Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J Mol Biol* **285**(5): 1951-1964.
- Narayanan, A., Kehn-Hall, K., Bailey, C., and Kashanchi, F. 2011. Analysis of the roles of HIV-derived microRNAs. *Expert Opin Biol Ther* **11**(1): 17-29.
- Neuveut, C. and Jeang, K.T. 1996. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol* **70**(8): 5572-5581.
- Nicholson, M.G., Barber, S.A., and Clements, J.E. 2007. The SIVmac239 Pr55Gag isoform, SIV p43, suppresses proteolytic cleavage of Pr55Gag. *Virology* **360**(1): 84-91.
- Nicholson, M.G., Rue, S.M., Clements, J.E., and Barber, S.A. 2006. An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform. *Virology* **349**(2): 325-334.
- Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., and Darlix, J.L. 2000. An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem* **275**(16): 11899-11906.
- Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S.J., and Darlix, J.L. 2002. In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol* **318**(1): 9-20.
- Olinski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Roszkowski, K., and Jaruga, P. 2002. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* **33**(2): 192-200.
- Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S., and Verdin, E. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* **275**(5305): 1481-1485.
- Ott, M., Geyer, M., and Zhou, Q. 2011. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* **10**(5): 426-435.

- Pacheco, A. and Martinez-Salas, E. 2010. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 458927.
- Pagans, S., Kauder, S.E., Kaehlcke, K., Sakane, N., Schroeder, S., Dormeyer, W., Trievel, R.C., Verdin, E., Schnolzer, M., and Ott, M. 2010. The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* **7**(3): 234-244.
- Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. 2004. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem* **279**(46): 48397-48403.
- Parkin, N.T., Cohen, E.A., Darveau, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sonenberg, N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* **7**(9): 2831-2837.
- Peden, K., Emerman, M., and Montagnier, L. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology* **185**(2): 661-672.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**(6180): 320-325.
- Perales, C., Carrasco, L., and Ventoso, I. 2003. Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett* **533**(1-3): 89-94.
- Peruzzi, F. 2006. The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci* **11**: 708-717.
- Pestova, T.V., Lorsh, J.R., and Hellen, C.U.T. 2007. The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Pisarev, A.V., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**(2): 286-299.
- Planelles, V., Bachelerie, F., Jowett, J.B., Haislip, A., Xie, Y., Banooni, P., Masuda, T., and Chen, I.S. 1995. Fate of the human immunodeficiency virus type 1 provirus in infected cells: a role for vpr. *J Virol* **69**(9): 5883-5889.

- Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**(8): 871-872.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C.H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. 2003. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO J* **22**(8): 1909-1921.
- Proud, C.G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* **269**(22): 5338-5349.
- Ptak, R.G., Fu, W., Sanders-Bear, B.E., Dickerson, J.E., Pinney, J.W., Robertson, D.L., Rozanov, M.N., Katz, K.S., Maglott, D.R., Pruitt, K.D. et al. 2008. Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**(12): 1497-1502.
- Pugliese, A., Vidotto, V., Beltramo, T., Petrini, S., and Torre, D. 2005. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochem Funct* **23**(4): 223-227.
- Pyo, C.W., Lee, S.H., and Choi, S.Y. 2008. Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN-gamma activation signaling in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **377**(3): 1001-1006.
- Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* **15**(16): 2083-2093.
- Qian, S., Zhong, X., Yu, L., Ding, B., de Haan, P., and Boris-Lawrie, K. 2009. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 605-610.
- Rana, T.M. and Jeang, K.T. 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* **365**(2): 175-185.
- Raught, B. and Gingras, A.-C. 2007. Signaling to Translation Initiation. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* **69**(11): 6859-6864.

- Requejo, H.I. 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* **40**(2): 331-345.
- Ricci, E.P., Herbreteau, C.H., Decimo, D., Schaupp, A., Datta, S.A., Rein, A., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. 2008a. In vitro expression of the HIV-2 genomic RNA is controlled by three distinct internal ribosome entry segments that are regulated by the HIV protease and the Gag polyprotein. *RNA* **14**(7): 1443-1455.
- Ricci, E.P., Soto Rifo, R., Herbreteau, C.H., Decimo, D., and Ohlmann, T. 2008b. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 4): 690-693.
- Rice, A.P. and Carlotti, F. 1990. Mutational analysis of the conserved cysteine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol* **64**(4): 1864-1868.
- Rivas-Aravena, A., Ramdohr, P., Vallejos, M., Valiente-Echeverria, F., Dormoy-Raclet, V., Rodriguez, F., Pino, K., Holzmann, C., Huidobro-Toro, J.P., Gallouzi, I.E. et al. 2009. The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology* **392**(2): 178-185.
- Rivas-Estilla, A.M., Svitkin, Y., Lopez Lastra, M., Hatzoglou, M., Sherker, A., and Koromilas, A.E. 2002. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* **76**(21): 10637-10653.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. 2010. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**(Pt 1): 1-12.
- Romero, V., Fellows, E., Jenne, D.E., and Andrade, F. 2009. Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *Cell Death Differ* **16**(2): 340-348.
- Ron, D. and Harding, H.P. 2007. eIF2alpha Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Roshal, M., Kim, B., Zhu, Y., Nghiem, P., and Planelles, V. 2003. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem* **278**(28): 25879-25886.

- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G.K., Probst, H., Bevec, D. et al. 1993. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1309-1320.
- Sachs, A.B. 2000. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* **101**(3): 243-245.
- Sadler, A.J., Latchoumanin, O., Hawkes, D., Mak, J., and Williams, B.R. 2009. An antiviral response directed by PKR phosphorylation of the RNA helicase A. *PLoS Pathog* **5**(2): e1000311.
- Sanghvi, V.R. and Steel, L.F. 2011. A re-examination of global suppression of RNA interference by HIV-1. *PLoS One* **6**(2): e17246.
- Scherer, L., Rossi, J.J., and Weinberg, M.S. 2007. Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther* **14**(14): 1057-1064.
- Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., Nilsson, A., Karin, M., and Kaufman, R.J. 2006. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **281**(30): 21458-21468.
- Schopman, N.C., Willemsen, M., Liu, Y.P., Bradley, T., van Kampen, A., Baas, F., Berkhout, B., and Haasnoot, J. 2012. Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Res* **40**(1): 414-427.
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M.E., Ghedin, E., Pumfery, A. et al. 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* **9**: 2388-2413.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**(7209): 58-63.
- SenGupta, D.N., Berkhout, B., Gatignol, A., Zhou, A.M., and Silverman, R.H. 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7492-7496.

- Sharma, A., Yilmaz, A., Marsh, K., Cochrane, A., and Boris-Lawrie, K. 2012. Thriving under stress: selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS Pathog* **8**(3): e1002612.
- Sharp, P.M. and Hahn, B.H. 2010. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1552): 2487-2494.
- Shatsky, I.N., Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., and Andreev, D.E. 2010. Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* **30**(4): 285-293.
- Shenton, D., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Carroll, K., Hubbard, S.J., Pavitt, G.D., Ashe, M.P., and Grant, C.M. 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem* **281**(39): 29011-29021.
- Shojania, S., Henry, G.D., Chen, V.C., Vo, T.N., Perreault, H., and O'Neil, J.D. 2010. High yield expression and purification of HIV-1 Tat1-72 for structural studies. *J Virol Methods* **164**(1-2): 35-42.
- Shojania, S. and O'Neil, J.D. 2006. HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **281**(13): 8347-8356.
- Siliciano, R.F. and Greene, W.C. 2012. HIV Latency. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**(1): a007096.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**(4): 731-745.
- Spriggs, K.A., Stoneley, M., Bushell, M., and Willis, A.E. 2008. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**(1): 27-38.
- Stauber, R.H. and Pavlakis, G.N. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* **252**(1): 126-136.
- Stebbing, J. and Moyle, G. 2003. The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* **5**(4): 205-213.

- Stivahtis, G.L., Soares, M.A., Vodicka, M.A., Hahn, B.H., and Emerman, M. 1997. Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *J Virol* **71**(6): 4331-4338.
- Suzuki, Y., Ishihara, D., Sasaki, M., Nakagawa, H., Hata, H., Tsunoda, T., Watanabe, M., Komatsu, T., Ota, T., Isogai, T. et al. 2000. Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics* **64**(3): 286-297.
- Svitkin, Y.V., Pause, A., and Sonenberg, N. 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* **68**(11): 7001-7007.
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* **465**(7299): 747-751.
- Tazi, J., Bakkour, N., Marchand, V., Ayadi, L., Aboufirassi, A., and Branlant, C. 2010. Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J* **277**(4): 867-876.
- Terenin, I.M., Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., and Shatsky, I.N. 2008. Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(8): 836-841.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V. et al. 2007. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* **315**(5818): 1579-1582.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**(3): 1476-1483.
- UNAIDS. 2011. UNAIDS: The Joint United Nations Program on HIV/AIDS.
- Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* **2**(10): 893-898.
- Vagner, S., Waysbort, A., Marena, M., Gensac, M.C., Amalric, F., and Prats, A.C. 1995. Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled

- by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem* **270**(35): 20376-20383.
- Vallejos, M., Carvajal, F., Pino, K., Navarrete, C., Ferres, M., Huidobro-Toro, J.P., Sargueil, B., and Lopez-Lastra, M. 2012. Functional and Structural Analysis of the Internal Ribosome Entry Site Present in the mRNA of Natural Variants of the HIV-1. *PLoS One* **7**(4): e35031.
- Vallejos, M., Deforges, J., Plank, T.D., Letelier, A., Ramdohr, P., Abraham, C.G., Valiente-Echeverria, F., Kieft, J.S., Sargueil, B., and Lopez-Lastra, M. 2011a. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res* **39**(14): 6186-6200.
- Vallejos, M., Ramdohr, P., Valiente-Echeverria, F., Tapia, K., Rodriguez, F.E., Lowy, F., Huidobro-Toro, J.P., Dangerfield, J.A., and Lopez-Lastra, M. 2010. The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res* **38**(2): 618-632.
- Van Duyne, R., Kehn-Hall, K., Carpio, L., and Kashanchi, F. 2009. Cell-type-specific proteome and interactome: using HIV-1 Tat as a test case. *Expert Rev Proteomics* **6**(5): 515-526.
- Van Eden, M.E., Byrd, M.P., Sherrill, K.W., and Lloyd, R.E. 2004. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA* **10**(4): 720-730.
- Van Vaerenbergh, K. 2001. Study of the impact of HIV genotypic drug resistance testing on therapy efficacy. *Verh K Acad Geneesk Belg* **63**(5): 447-473.
- Venkatesan, A., Sharma, R., and Dasgupta, A. 2003. Cell cycle regulation of hepatitis C and encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site-mediated translation in human embryonic kidney 293 cells. *Virus Res* **94**(2): 85-95.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. 2001. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 12966-12971.

- Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. 2009. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* **16**(7): 1030-1039.
- Wang, J., Shackelford, J.M., Casella, C.R., Shivers, D.K., Rapaport, E.L., Liu, B., Yu, X.F., and Finkel, T.H. 2007. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology* **359**(2): 243-252.
- Wang, Z., Morris, G.F., Reed, J.C., Kelly, G.D., and Morris, C.B. 1999. Activation of Bcl-2 promoter-directed gene expression by the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein. *Virology* **257**(2): 502-510.
- Washington, A.T., Singh, G., and Aiyar, A. 2010. Diametrically opposed effects of hypoxia and oxidative stress on two viral transactivators. *Virology* **407**: 93.
- Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C.L., and Weeks, K.M. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **460**(7256): 711-716.
- Waysbort, A., Bonnal, S., Audigier, S., Esteve, J.P., and Prats, A.C. 2001. Pyrimidine tract binding protein and La autoantigen interact differently with the 5' untranslated regions of lentiviruses and oncoretrovirus mRNAs. *FEBS Lett* **490**(1-2): 54-58.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4): 451-462.
- Weichhart, T. 2012. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. *Methods Mol Biol* **821**: 1-14.
- Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C.H., Ohlmann, T., and Sargueil, B. 2010. A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **38**(4): 1367-1381.
- Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**(6531): 497-500.

- Wilkinson, K.A., Gorelick, R.J., Vasa, S.M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D.H., Giddings, M.C., and Weeks, K.M. 2008. High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol* **6**(4): e96.
- Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E., and Sarnow, P. 2000. Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* **20**(14): 4990-4999.
- Xiong, Z., Liu, E., Yan, Y., Silver, R.T., Yang, F., Chen, I.H., Chen, Y., Verstovsek, S., Wang, H., Prchal, J. et al. 2006. An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J Immunol* **177**(7): 4907-4916.
- Yedavalli, V.S. and Jeang, K.T. 2010. Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(33): 14787-14792.
- Yedavalli, V.S., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L., and Jeang, K.T. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**(3): 381-392.
- Yeung, M.L., Bennasser, Y., Myers, T.G., Jiang, G., Benkirane, M., and Jeang, K.T. 2005. Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells. *Retrovirology* **2**: 81.
- Yilmaz, A., Bolinger, C., and Boris-Lawrie, K. 2006. Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* **4**(2): 131-139.
- Zhang, B., Wang, Q., and Pan, X. 2007. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol* **210**(2): 279-289.
- Zhou, J., Callapina, M., Goodall, G.J., and Brune, B. 2004. Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* **64**(24): 9041-9048.

- Zhu, Y., Gelbard, H.A., Roshal, M., Pursell, S., Jamieson, B.D., and Planelles, V. 2001. Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J Virol* **75**(8): 3791-3801.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3406-3415.



## **Annexe I : Données supplémentaires du chapitre 2**

## **Supplementary Material and Methods**

*Plasmid construction.* The reporter pFRT-IRES-HIV was derived from pDual-HIV(-1) (1) that contains the Rluc and Fluc coding sequences separated by HIV-1 frameshift region. Replacement of the frameshift region by the 5'UTR of HIV-1 was made in several steps. First, the AflIII restriction site located near the T7 sequence of pDual-HIV(-1) was deleted to facilitate subsequent cloning. A PCR fragment was amplified using the  $\Delta$ AflIII-SpeI(+) and  $\Delta$ AflIII-HindIII(-) primers, which were inserted in the SpeI and HindIII sites of pDual-HIV(-1) to produce pDual-HIV(-1) $\Delta$ AflIII. Next, the beginning of the HIV-1 5'UTR contained in pTAR (2) was amplified by PCR using the TAR-Kpn-uag(+) and TAR-Kpn(-) primers and cloned in the KpnI restriction site of pDual-HIV(-1) $\Delta$ AflIII located between Rluc and Fluc coding sequences. This PCR introduced three stop codons to terminate the Rluc coding sequence. The rest of the 5'UTR was amplified directly from a proviral molecular clone of HIV-1 group M subtype B (pLAI) (4). The initiation codon for Fluc expression is located within the 5'UTR IRES and the context of the AUG encompassing 30 nt from the Gag sequence was included. A peptide linker (GGGGSGGGGS) was inserted by PCR immediately upstream of the Fluc coding sequence. The first half of the linker was inserted using PCR amplification on pLAI with the 5'UTR-AflIII(+) and 5'UTR-BamHI(-) primers and the second half of the linker with the 5'UTR(+) and Linker-BamHI(-) primers. The linker was cloned in the AflIII and BamHI restriction sites of pDual-HIV(-1) $\Delta$ AflIII-TAR to generate pDual-IRES-HIV. This last step removed the frameshift region originally present in pDual-HIV(-1). Finally, we cut the fragment containing the Rluc coding

sequence, the 5'UTR region of HIV-1 RNA and the Fluc coding sequence, using PmeI and ApaI restriction sites. This fragment was inserted into pcDNA5FRT (Invitrogen) previously linearized with SciI and ApaI to produce pFRT-IRES-HIV. Prior to this last cloning step, the KpnI and BamHI restriction sites from pcDNA5FRT were eliminated to facilitate subsequent cloning of mutant IRESes. To this end, an oligonucleotide cassette formed by the K7ΔKpnIΔBamHI(+) and K7ΔKpnIΔBamHI(-) primers was inserted in the HindIII and EcoRV restriction sites of pcDNA5FRT. The different mutants of HIV-1 IRES were made by PCR amplification with four primers. The external primers were Ext-KpnI(+) et Ext-BamHI(-). The details for all the primers used can be found in Supplementary Table 1. The resulting PCR products were cloned in the KpnI and BamHI restriction sites of pFRT-dual-IRES-HIV.

## Supplementary Table I:

## Names and Sequences of the Oligonucleotide Primers Used in this Study

Primer Name	Primer Sequence
$\Delta$ AflIII-SpeI (+)	5' GACCCGGGGTACCAAGCTTGAGTTTAAACGCTAGCCAGC' 3
$\Delta$ AflIII-HindIII (-)	5' GCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGG' 3
TAR-Kpn-uag (+)	5' GCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCCTAGGGTCTCTCTGGTTAGAC CAG' 3
TAR-Kpn (-)	5' CGAGCTCGGTACCAAGCTTTATTGAGGC' 3
5' UTR-AflIII (+)	5' GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC' 3
5' UTR-BamHI (-)	5' AAAAAAGGATCCGCTTCCGCCTCCGCCGGTGGCTCTAGCGCTCCC CCCGCTTAATACTGACGCTCTCGCACCCATCTCTCTCCC' 3
Linker-BamHI (-)	5' TTTTTTGGATCCTGCTTCCGCCTCCGCCGCTTCCGCCTCCGCCGG TGGCTCTAGCGCTCCC' 3
K7 $\Delta$ KpnI $\Delta$ BamHI (+)	5' AGCTTGGTAGCGAGCTCGCATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTC GCAGAT' 3
K7 $\Delta$ KpnI $\Delta$ BamHI (-)	5' ATCTGCAGAATTCACCACACTGGACTAGTGGATGCGAGCTCGCT ACCA' 3
Ext-KpnI (+)	5' GAGCTTCGTGGAGAGAGTGCTG' 3
Ext-BamHI (-)	5' CGTCTTCTTGGATCCTGGTGCTTCCGCCTC' 3
M1- $\Delta$ loop202-217(+)	5' GCCCGAACAGGGACTTCCAGAGGAGCTCTCTCGACGC' 3
M1- $\Delta$ loop202-217(-)	5' GAGAGAGCTCCTCTGGAAGTCCCTGTTCTGGGCGCC' 3
M2- $\Delta$ SL134-178(+)	5' GCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACAGTGGCGCCCGAACAGGG ' 3
M2- $\Delta$ SL134-178(-)	5' CCCTGTTCTGGGCGCCACTGTTACCAGAGTCACACAACAGAC GGGC' 3
M3-stem134(+)	5' CCCTTTTAGTCAGTGTGGAAACCGGGATCCAGTGGCGCCCGAAC GGG' 3
M3-stem134(-)	5' CCCTGTTCTGGGCGCCACTGGATCCCGGTTCCACACTGACTAAAA GGG' 3

<b>M4-stem143(+)</b>	5' GATCCCTCAGACCCTTTTAAGGAGACTTCAAAATCTCTAGCAGTG GCGCCCG' 3
<b>M4-stem143(-)</b>	5' CCACTGCTAGAGATTTTCCACACTCCTTAAAAGGGTCTGAGGGAT CTCTAGTTACC' 3
<b>M5-stem143bot(+)</b>	5' GATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGACTTCAAAATCTCTAGCAGTG GCGCCCG' 3
<b>M5-stem143bot (-)</b>	5' CCACTGCTAGAGATTTTGAAGTCTGACTAAAAGGGTCTGAGGGAT CTCTAGTTACC' 3
<b>M6-stem143up(+)</b>	5' GATCCCTCAGACCCTTTTAAGGAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTG GCGCCCG' 3
<b>M6-stem143up(-)</b>	5' CCACTGCTAGAGATTTTCCACACTCCTTAAAAGGGTCTGAGGGAT CTCTAGTTACC' 3
<b>M7-Δloop151(+)</b>	5' CTAGAGATCCCTCAGAAGTCAGTGTGGAAAATCTCTCTAGC' 3
<b>M7-Δloop151(-)</b>	5' GATTTTCCACACTGACTTCTGAGGGATCTCTAGTTACC' 3
<b>M8-loop151(+)</b>	5' CTAGAGATCCCTCAGAGGGAAAAAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAG C' 3
<b>M8-loop151(-)</b>	5' GATTTTCCACACTGACTTTTTTCCCTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AG' 3
<b>M9-AAA-CCC(+)</b>	5' CCCTTTTAGTCAGTGTGGCCCATCTCTAGCAGTGGCGCC' 3
<b>M9-AAA-CCC(-)</b>	5' GCGCCACTGCTAGAGATGGCCCACTGACTAAAAGGG' 3
<b>M10-AAA-GGG(+)</b>	5' CCCTTTTAGTCAGTGTGGGGGATCTCTAGCAGTGGCGCC' 3
<b>M10-AAA-GGG(-)</b>	5' GCGCCACTGCTAGAGATCCCCCACTGACTAAAAGGG' 3
<b>M11-AAA-UUU(+)</b>	5' CCCTTTTAGTCAGTGTGGTTTATCTCTAGCAGTGGCGCC' 3
<b>M11-AAA-UUU(-)</b>	5' GCGCCACTGCTAGAGATAAACCACACTGACTAAAAGGG' 3
<b>M12-BMH(+)</b>	5' GAGCTCTCTCGACGCACCCCTCGGCTTGCTGAAGCGC' 3
<b>M12-BMH (-)</b>	5' GCTTCAGCAAGCCGAGGGGTGCGTCGAGAGAGCTCCTC' 3
<b>M13-BMH(+)</b>	5' GCACGGCAAGAGGCGAGTCCAGGCGACTGGTGAGTACG' 3
<b>M13-BMH (-)</b>	5' CGTACTCACCAGTCGCCTGGACTCGCCTCTTGCCGTGC' 3
<b>M14-BMH(+)</b>	5' GGGAGGCGACTGGTGAGTCGCCTAAAATTTTGACTAGCGGAGGCT AG' 3
<b>M14-BMH(-)</b>	5' CTAGCCTCCGCTAGTCAAAATTTTAGGCGACTCACCAGTCGCCTC CC' 3

<b>M15-LDI(+)</b>	5' CGAGGGGAGGCGACTGGTGCACCCAAAAATTTTGACTAGC' 3
<b>M15-LDI(-)</b>	5' GCTAGTCAAAATTTTGGGTGCGCACCAGTCGCCTCCCCTCG' 3
<b>M16-LDI(+)</b>	5' CGACTGGTGAGTACGCCATCCTTTTTGACTAGCGGAGGC' 3
<b>M16-LDI(-)</b>	5' GCCTCCGCTAGTCAAAAAGGATGGCGTACTCACCAGTCG' 3
<b>M17-LDI(+)</b>	5' GGTGAGTACGCCAAAAATTTTTTCTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG ' 3
<b>M17-LDI(-)</b>	5' CTCTCCTTCTAGCCTCCGCTAGAAAAATTTTTGGCGTACTCACC ' 3

## **Supplementary Results**

**The 134-178 stem-loop, the 202-217 region and the four-nt bulge in the DIS hairpin, but not the A stretch in loop I, are highly conserved among natural variants of HIV-1 group M subtype B.** The 5'UTR region of HIV-1 is the most conserved region in the HIV-1 genome (3). The HIV-1 5'UTR region used in this study originates from pLAI. We examined the conservation of the different regions which we found to influence the 5'UTR IRES activity among group M subtype B natural variants. These regions of pLAI were aligned with the corresponding regions of HIV-1 group M subtype B variants available in the HIV sequence database of the Los Alamos National Laboratory available at the following URL : <http://www.hiv.lanl.gov/>. When the 134-178 stem-loop (IRENE) from pLAI was aligned with the corresponding region of 97 available variants, we found that it is highly conserved (Supp. Fig. 1). Most of the differences are located in the upper 7-pyrimidine loop, which did not influence the 5'UTR IRES activity. Twenty-one variants have mutations in the upper stem, but only five of these mutations disrupt a base-pair. The 3A bulge is conserved in all these variants except three. When nt 200-219 of pLAI were aligned with the corresponding region of 129 available variants (Supp. Fig. 2), this unstructured region was also found to be highly conserved except for the four nt at the 3' end. When nt 236-246 of pLAI were aligned with the corresponding region of 142 available variants, we observed that the four-nt bulge at the beginning of the DIS hairpin (Supp. Fig. 3) is highly conserved since only four variants differ from pLAI. Finally, nt 301-305 of pLAI, a stretch of five A in the beginning of loop I, were aligned with the corresponding

region of 149 available variants (Supp. Fig. 4). The five A are conserved in 60 variants. However, 62 variants have deletions and/or mutations in this region. Therefore, while the 301-305 segment shows some variability, IRENE, the 202-217 region and the 239-242 bulge are highly conserved.

### **Supplementary References**

1. Dulude, D., Berchiche, Y.A., Gendron, K., Brakier-Gingras, L. and Heveker, N. (2006) Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **345**, 127-136.
2. Gendron, K., Charbonneau, J., Dulude, D., Heveker, N., Ferbeyre, G. and Brakier-Gingras, L. (2008) The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res*, **36**, 30-40.
3. Berkhout, B. (1996) Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **54**, 1-34.
4. Peden, K., Emerman, M. and Montagnier, L. (1991) Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology*, **185**, 661-672.

### **Supplementary Figure Legends**

#### Supplementary FIGURE 1

(A) Sequence alignment of the 134-178 stem-loop. These sequences originated from pLAI and the corresponding regions of HIV-1 group M subtype B variants retrieved from HIV-1 database from Los Alamos National Laboratory. Lines indicate identical bases, R represents A or G; Y represents C or U; B represents C, G or U; N represents any nt. When the region of interest of a variant is identical to pLAI, its name is in bold. (B) Sequence alignment of the unstructured 202-217 segment. (C) Sequence alignment of the four-nt bulge in the DIS hairpin (nt 239-242). (D) Sequence alignment of the beginning of loop I (nt 302-305). In (B), (C) and (D), the region of interest is in gray.







## D) The stretch of A in loop I (nt 301-305)

	pLAI	AAAAA	.....	UUUUGA				
B.FR.83.XEB2_LAI_IIIB_BRU_K03455	-----	.....	.....	UUUUGA	-----	Δ	.....	U
B.AU.86.MBC200.AF042100	-----	A.....	.....	U	-----	ΔΔ	.....	UU
B.AU.87.MBC925.AF042101	-----	A.....	.....	U	-----	ΔΔΔ	.....	U
B.AU.95.MBCC54.AF042103	-----	Δ	.....	U	-----	Δ	.....	C
B.AU.96.MBCC98.AF042104	-----	.....	.....	U	-----	ΔΔ	.....	U
B.AU.96.MBCC36.AF042105	-----	.....	.....	U	-----	Δ	.....	U
B.AU.x.1181.AF538302	-----	Δ	.....	UU	-----	G	.....	U
B.AU.x.2870718.AY857022	-----	G	.....	U	-----	A.....	.....	UU
B.AU.x.8634991.AY857144	-----	AUAAA	..AA	.....	-----	Δ	.....	UU
B.AU.x.9125091.AY857165	-----	Δ	.....	U	-----	UAAAA	.....	U
B.AU.x.C24.AF538304	-----	ΔΔ	.....	UA	-----	ΔΔΔ	.....	UU
B.AU.x.C42.AF538305	-----	.....	.....	U	-----	Δ	.....	C
B.AU.x.C76.AF538306	-----	.....	.....	U	-----	Δ	.....	U
B.AU.x.C92.AF538307	-----	.....	.....	U	-----	ΔΔΔΔ	.....	UUUU G
B.AU.x.V8.AF146728	-----	.....	.....	U	-----	G	.....	Δ
B.BR.02.02BR008.DQ358808	-----	ΔΔΔΔ	.....	UU	-----	Δ	.....	UU
B.BR.02.02BR011.DQ358809	-----	C	UAAAA	.....	-----	Δ	.....	UU
B.BR.02.02BR013.DQ358810	-----	UAAAA	.....	U	-----	Δ	.....	U
B.BR.03.BREPM1023.EF637057	-----	Δ	.....	U	-----	Δ	.....	C
B.BR.03.BREPM1024.EF637056	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.03.BREPM1027.EF637054	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.03.BREPM1028.EF637053	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.03.BREPM1032.EF637051	-----	A.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.03.BREPM1033.EF637050	-----	ΔΔΔΔ	.....	UU	-----	U	.....	C
B.BR.03.BREPM1035.EF637049	-----	ΔΔΔ	.....	UUUA	-----	Δ	.....	U
B.BR.03.BREPM1038.EF637048	-----	Δ	.....	U	-----	Δ	.....	U
B.BR.03.BREPM1040.EF637047	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.03.BREPM2012.EF637046	-----	U	A.....	.....	-----	U	.....	U
B.BR.04.BREPM1066.FJ195090	-----	U	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.04.BREPM1070.FJ195086	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.05.BREPM1081.FJ195091	-----	AUAAA	..AAA	.....	-----	U	.....	U
B.BR.05.BREPM1084.FJ195088	-----	UAAAA	.....	UU	-----	G	.....	U
B.BR.05.BREPM1093.FJ195089	-----	UAAAA	.....	U	-----	U	.....	U
B.BR.89.BE167.AY173956	-----	U	Δ	.....	-----	U	.....	U
B.CA.96.WC10C_4.AY314056	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.CA.97.CANN3PULL.AY779553	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.CA.x.HDN003V01.DQ322227	-----	Δ	.....	C	-----	U	.....	C
B.CN.01.CNH24.AY180905	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.CN.02.02NHsc11.DQ007903	-----	A.....	.....	U	-----	G	.....	U
B.CN.05.05CNH_bhp3.DQ990880	-----	ΔΔΔΔ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.CN.x.HL42.U71182	-----	ΔΔΔ	.....	Δ	-----	U	.....	U
B.CU.99.Cu19.AY586542	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.CU.99.Cu43.AY586543	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.86.D31.U43096	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.86.HAN.U43141	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_016.EF514704	-----	G	Δ	.....	U	G	.....	U
B.DE.01.CTL_017.EF514705	-----	G	U	Δ	.....	U	.....	U
B.DE.01.CTL_018.EF514706	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_023.EF514707	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_030.EF514708	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_033.EF514709	-----	G	Δ	.....	U	U	.....	U
B.DE.01.CTL_035.EF514710	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_041.EF514711	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.01.CTL_043.EF514712	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_012.EF514699	-----	U	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_013.EF514700	-----	Δ	.....	C	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_018.EF514697	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_025.EF514702	-----	U	.....	U	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_027.EF514698	-----	Δ	A.....	.....	U	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_039.EF514703	-----	C	.....	UU	-----	U	.....	U
B.DE.04.PMVL_049.EF514701	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.05.ES.EU786672	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.06.ES.EU786674	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.ES.06.ES.EU786675	-----	U	Δ	.....	-----	U	.....	U
B.ES.06.ES.EU786676	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.06.ES.EU786677	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.07.ES.EU786678	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.07.ES.EU786679	-----	A.....	.....	UU	-----	U	.....	U
B.ES.07.ES.EU786680	-----	G	.....	U	-----	U	.....	U
B.ES.89.U61.DQ854716	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.GA.88.OYI.M26727	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.GB.83.CAN1.D10112	-----	ΔΔΔΔ	.....	UUUA	-----	G	.....	U
B.GB.86.GB8.AJ271445	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.GB.x.MANC.U23487	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.HK.x.HK003.FJ460500	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.HK.x.HK004.FJ460501	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.IX.x.11807.EF694037	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.IT.05.SG1.DQ672623	-----	ΔΔ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.JP.00.DR2508.AB289588	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.JP.01.DR388.AB289590	-----	Δ	.....	C	-----	U	.....	U
B.JP.04.04JPDR6075B.AB221125	-----	ΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.JP.04.DR6089.AB286955	-----	G	.....	U	-----	U	.....	U
B.JP.05.DR6538.AB287363	-----	A.....	.....	UU	-----	U	.....	U
B.JP.05.DR6737.AB287364	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.JP.05.DR7060.AB287366	-----	UAAAA	.....	U	-----	U	.....	U
B.JP.05.DR7065.AB287368	-----	ΔΔΔ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.JP.99.DR1348.AB287370	-----	Δ	.....	C	-----	U	.....	U
B.KR.04.04KRHS.DQ295193	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.KR.04.04LHS6.AY839827	-----	ΔΔΔΔ	.....	UUUU G	-----	U	.....	U
B.KR.04.04LSK7.DQ295192	-----	G	Δ	.....	UU	-----	.....	U
B.KR.04.04MK7_HIV_1_wk.DQ295194	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.KR.05.05CSR3.DQ837381	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.MH.99.mSTD101.AB097870	-----	U	.....	C	-----	U	.....	U
B.NL.00.671_00736.AY423387	-----	U	A.....	.....	U	.....	.....	U
B.NL.86.3202A21.U34604	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.NL.96.H434_42_A1.AY970948	-----	N	A.....	.....	U	.....	.....	U
B.RU.04.04RU128005.AY682547	-----	.....	A.....	.....	UUUU	-----	.....	U
B.RU.04.04RU129005.AY751406	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.RU.04.04RU139089.AY751407	-----	.....	UAAAA	.....	U	-----	.....	C
B.RU.04.04RU139095.AY819715	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.TH.90.HK132.AY173951	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.TW.94.TWCYS.AF086817	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.00.14294_1.DQ853436	-----	U	Δ	.....	U	-----	.....	U
B.US.00.ES1_20.EF363123	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.04.ES10_53.EF363127	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.04.ES4_24.EF363124	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.04.ES8_43.EF363126	-----	G	Δ	.....	U	-----	.....	U
B.US.83.5018_83.AY835777	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.83.5157_83.AY835781	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.83.RF.M17451	-----	G	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.83.SP2.K02007	-----	ΔΔΔ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.84.5019_84.AY835779	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.84.MMCO.M17449	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	C
B.US.84.NYSCG.M38431	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.84.SF33.AY352275	-----	A.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.85.5077_85.AY835769	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.85.Ba_1.AB221005	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.5084_86.AY835775	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.5096_86.AY835749	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.5127_86.AY835774	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.AD87.AF004394	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.JRPL.U63632	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.86.YU_2.M93258	-----	A.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.87.5113_87.AY835758	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.87.BC.L02317	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.88.5160_88.AY835763	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.88.WR27.AF286365	-----	U	Δ	.....	UU	-----	.....	U
B.US.89.P896.U39362	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.US.90.US1.AY173952	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.90.US2.AY173953	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.90.US3.AY173954	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.90.US4.AY173955	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.90.WCIPR.U69591	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.90.WEAU160.U21135	-----	G	Δ	.....	U	-----	.....	U
B.US.91.5048_91.AY835761	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.91.DH12_3.AF069140	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.93.WCD32P0793.DQ487188	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.93.WCM32P0793.DQ487190	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.94.5082_94.AY835773	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.95.5073_95.AY835768	-----	.....	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.96.5155_96.AY835753	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.97.ARES2.AB078005	-----	C	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.98.15384_1.DQ853463	-----	U	Δ	.....	U	-----	.....	U
B.US.98.98USHVTN1925e1.AY560107	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.98.98USHVTN3605c9.AY560108	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.98.98USHVTN8229e6.AY560109	-----	Δ	.....	UU	-----	U	.....	U
B.US.98.98USHVTN941e1.AY560110	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U
B.US.98.WC3_0498_4.EF175212	-----	G	.....	U	-----	U	.....	U
B.ZA.03.03ZAP8045MB2.DQ396398	-----	Δ	.....	U	-----	U	.....	U

## **Annexe II : Données supplémentaires du chapitre 3**

**Supplementary Table I:****Names and sequences of oligonucleotides used in this study**

Name	Sequence
HCV-KpnI+	5' GCTAGCGTTTAAACTTAGGTACCGTACCCTCCACCGCGGTG' 3
HCV-BamHI-	5' TTTTTTGGATCCGCTTCCGCCTCCGCCGGTGGCTCTAGCGCTTTGAGGTTTAGGATTCGTGCTCATGGTGCACGGTCTACGAGACC' 3
Linker-HCV-KpnI+	5' GCTGAAGACGAGCAGGGGGTACCTGCAGCCTCCGGGACC' 3
Linker-HCV-BamHI-	5' TTTTTTGGATCCTGGTGCTTCCGCCTCCGCCGGTGGCTCTAGCGC' 3
Ext-KpnI+	5' GAGCTTCGTGGAGAGAGTGCTG' 3
Ext-BamHI-	5' CGTCTTCTTGGATCCTGGTGCTTCCGCCTC' 3
deltaTAR+	5' GCTGAAGAACGAGCAGGGGGTACCCTACACTGCttaGCCTCAATAAAGC' 3
deltaTAR-	5' GCTTTATTGAGGCTTAAGCAGTGTAGGGTACCCCTGCTCGTTCTTCAGC' 3
Tat/Kpn+	5' CCTCTTCGGCCAGCGCCTGGTACCAGCGCGTATGGCTTC' 3
Tat/Bam-	5' AAGAACAATCAAGGGTCCCCAACTCACCTGAAGTTCTC' 3
MutTatC31S+	5' CCAATTGCTATTGTA AAAAGTGTAGCTTTTCATTGCCAAGTTTGT TTC' 3
MutTatC31S-	5' GAAACAACTTGGCAATGAAAGCTACACTTTTTACAATAGCAATTGG' 3
MutTatK41A+	5' GCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTG3'
MutTatK41A-	5' CAACTTGGCAATGAAAAGCACACTTTTTACAATAGC3'
MutTatK51A+	5' CTCCTATGGCAGGAAGGCGCGGAGACAGCGACGAAGACC' 3
MutTatK51A-	5' GGTCTTCGTGCTGTCTCCGCGCCTTCCTGCCATAGGAG' 3
intTat101+	5' GGCAGGAAGaaGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC' 3
intTat101-	5' GCCTTGAGGAGGTCTTCGTGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCC' 3
extTat101/Bam-	5' GCTTCTACTTGTCATCGTCGTCGGATCCCTAGCCTCCATCGAATGGATCTG' 3
Tat72/Bam-	5' GGGTCCCCTCGGGATTGGGATCCCTATTGCTTTGATAGAGAACTTGATGAGTC' 3
Rluc-fwd	5' -GCTGCCAGCAAGATCATGAGAAA-3'
Rluc-rev	5' -GCTCTCAGGTAGGCGTTGTAGTTT-3'

GAPDH-fwd	5' -ACATCGCTCAGACACCATG-3'
GAPDH-rev	5' -TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'