

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°1683

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 Décembre 2009

Par

MARCHAND Cécile

Née le 02 Décembre 1980 à Paris

**Etude du rôle des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans les
phénomènes de restriction virale et d'édition observés sur l'orf vpr du
génomme du VIH-1.**

Membres du Jury

M. Michel CASTROVIEJO
M. Serge BENICHOU
M. Georges HERBEIN
M. Alejandro ARAYA

Directeur de recherche CNRS (Bordeaux 2)
Directeur de recherche CNRS (Institut Cochin)
PU-PH (Besançon)
Directeur de recherche CNRS (Bordeaux 2)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. L'édition dans différents organismes : découverte, répartition et caractéristiques.....	3
2. Edition des acides nucléiques chez l'Homme.....	5
2.1. Edition des ARN	6
2.1.1. Edition par conversion A-I	6
2.1.2. Edition par conversion C-U.....	7
2.1.3. APOBEC1	8
2.2. Edition des ADN	9
2.2.1. Les cytidines désaminases de la famille AID/APOBEC	9
2.2.1.1. Organisation génomique et fonction	9
o AID (Activation-induced cytidine deaminase)	11
o APOBEC2	11
o APOBEC3	11
o APOBEC4	12
2.2.1.2. Evolution de la famille AID/APOBEC	12
3. Restriction des virus et des rétroéléments endogènes par les protéines de la famille APOBEC3.....	14
3.1. Virus du VIH-1	14
3.1.1. Découverte du virus.....	15
3.1.2. Classification et organisation génomique	15
3.1.3. Cycle réplcatif	17
3.1.3.1. Phase précoce.....	18
3.1.3.2. Phase tardive	18
3.1.4. Lutte antirétrovirale : restriction par les APOBEC3.....	19
3.1.4.1. Restriction rétrovirale par APOBEC3G.....	19
3.1.4.2. Incorporation d'AOPBEC3G dans le virion	20
3.1.4.3. Dégredation d'APOBEC3G médiée par Vif	21
3.1.4.4. Restriction rétrovirale par APOBEC3B, 3DE et 3F.....	23
3.2. Autres virus	24
3.2.1. Virus de l'hépatite B (VHB).....	24
3.2.2. Papillomavirus.....	25
3.2.3. Virus de l'hépatite C (VHC).....	26
3.3. Rétroéléments endogènes	26
3.3.1. Classification.....	26
3.3.1.1. Rétroéléments LTR.....	27
3.3.1.2. Rétroéléments non LTR.....	27
3.3.2. Restriction de la rétrotransposition par les APOBEC3.....	27
3.4. Restriction par les APOBEC3, par un mécanisme autre que l'édition	28
4. Objectifs de l'étude.....	29
MATERIELS ET METHODES.....	31
MATERIELS	32
1. Souches bactériennes.....	32
2. Cellules humaines.....	32
2.1. Cellules en suspensions	32
2.2. Cellules adhérentes.....	32
2.3. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)	33
3. Plasmides.....	33
3.1. Le plasmide pGEM-T Easy.....	33
3.2. Le plasmide pcDNA3.....	34
3.3. Le plasmide pET32a.....	35
3.4. Le plasmide pG-KJE8	36

3.5.	Le plasmide pmaxGFP	36
3.6.	Le plasmide pcDNA6/TR.....	37
3.7.	Le plasmide pOG44	38
3.8.	Le plasmide pcDNA5/FRT/TO	38
METHODES.....		40
1. Cultures cellulaires et transformations		40
1.1.	Les bactéries.....	40
1.1.1.	Conditions de culture.....	40
1.1.2.	Transformation des bactéries.....	40
1.2.	Les cellules humaines.....	41
1.2.1.	Conditions de culture.....	41
1.2.2.	Nucléofection	41
1.2.3.	Quantification de la fluorescence par cytométrie de flux	42
1.2.4.	Infection des cellules H9 par le virus du VIH-1	42
2. Manipulation des acides nucléiques.....		43
2.1.	Purification de l'ADN plasmidique.....	43
2.2.	Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose	43
2.3.	Extraction des ARN totaux des cellules de mammifères.....	44
2.4.	Séquençage.....	44
2.5.	Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)	45
2.6.	Synthèse de cDNA	46
2.7.	PCR quantitative	47
3. Manipulation des protéines		49
3.1.	Expression et purification des protéines produites dans les bactéries	49
3.1.1.	Expression des APOBEC3	49
3.1.1.1.	Production en absence de protéines chaperonnes	49
3.1.1.2.	Production en présence de protéines chaperonnes	50
3.1.2.	Extraction des protéines	50
3.1.3.	Solubilisation des protéines à partir des corps d'inclusion.....	50
3.1.4.	Purification des protéines solubles sur colonne de nickel	51
3.2.	Expression et purification des protéines de cellules de mammifères	51
3.2.1.	Expression et extraction des protéines.....	51
3.2.2.	Purification des complexes protéiques par TAP-tag (FPLC)	52
3.2.	Dosage des protéines.....	52
3.3.	Gels de protéines et Western blot.....	52
3.3.1.	Séparation électrophorétique des protéines	52
3.3.2.	Coloration au bleu de Coomassie	53
3.3.3.	Coloration au nitrate d'argent.....	53
3.3.4.	Western blot	53
3.4.	Test Elisa.....	54
4. Tests <i>in vitro</i>		55
4.1.	Marquage et purification des oligonucléotides.....	55
4.2.	Test de désamination.....	55
4.2.1.	Test réalisé en présence d'UDG	55
4.2.2.	Test réalisé en présence de GAPDH.....	56
4.3.	Expérience de retard sur gel	56
RESULTATS ET DISCUSSION		57
Partie 1 :		58
1. Cytidines désaminases de la famille APOBEC3 et infection par le virus du VIH-1.....		59
1.1.	Cytidines désaminases de la famille APOBEC3 et infection chronique par le VIH-1	59
1.1.1.	Etude d'un effet antiviral potentiel des cytidines désaminases de famille APOBEC3 dans les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1	59
1.1.1.1.	Identification des cytidines désaminases exprimées dans les lignées lymphocytaires chroniquement infectées par le virus du VIH-1 ou non	62

1.1.1.2.	Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans les lignées lymphocytaires chroniquement infectées par le virus du VIH-1 ou non.....	63
a.	Mise au point de la RT-PCR quantitative	63
b.	Expression des différentes cytidines désaminases dans les cellules H9 et H9/LAI	69
1.1.2.	Etude d'un effet antiviral potentiel des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 chez des patients non progressseurs à long terme (NPLT)	70
1.1.2.1.	Analyse des séquences provirales correspondant à vpr chez les patients NPLT.....	71
1.1.2.2.	Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans des PBMC sains et du patient 4.....	74
1.2.	Etude de l'expression des apobec3 suite à l'infection de cellules par le virus du VIH-1	75
2.	Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans différents contextes viraux	78
2.1.	Virus de l'hépatite B (VHB)	78
2.2.	Virus du papillome humain (HPV)	80
2.3.	Virus de l'hépatite C (VHC)	81
Partie 2		85
Etude <i>in vitro</i> des APOBEC3.....		85
1.	Obtention des protéines APOBEC3.....	86
2.	Tests <i>in vitro</i>	92
2.1.	Choix du substrat.....	92
2.2.	Tests de désamination <i>in vitro</i>	93
2.2.1.	Principe du test de désamination	93
2.2.2.	Test de désamination	94
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		103
Partie 1		104
Partie 2		106
TRAVAUX EN COURS		108
1.	Mise en place d'un test de désamination <i>ex vivo</i>.....	109
1.1.	Principe du test.....	109
1.2.	Mise au point des conditions de transfection	109
1.3.	Obtention de populations clonales	110
1.4.	Sélection de la population clonale adéquate pour les tests <i>ex vivo</i>	111
1.5.	Etablissement de la lignée cellulaire contenant la séquence vpr intégrée de manière stable dans son génome.....	112
2.	Recherche des partenaires cellulaires potentiels des cytidines désaminases de la famille APOBEC3.....	113
2.1.	Principe de la technique	113
2.2.	Mise au point de la technique.....	115
2.3.	Purification et analyse des complexes protéiques	116
BIBLIOGRAPHIE		119

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Mécanisme de désamination A-I	6
Figure 2 : Mécanisme de désamination C-U	7
Figure 3 : Edition de l'ARNm d'ApoB	8
Figure 4 : Organisation des domaines des protéines AID/APOBEC humaines.....	10
Figure 5 : Localisation chromosomique des gènes de la famille AID/APOBEC	11
Figure 6: Représentation schématique du lien phylogénétique entre les membres de la famille AID/APOBEC et les vertébrés.....	13
Figure 7 : Organisation génomique de l'ADN du virus du VIH-1.....	16
Figure 8 : Cycle de réplication du virus du VIH-1.....	17
Figure 9 : Mécanisme de conversion C/T et GA.....	20
Figure 10 : Mécanisme de dégradation d'APOBEC3G médiée par Vif	22
Figure 11 : Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de <i>vpr</i> dans les cellules chroniquement infectées par le VIH-1.	60
Figure 12 : Détection des cytidines désaminases exprimées dans les lignées lymphocytaires saines H9, et chroniquement infectées par le virus du VIH-1, H9/LAI.	62
Figure 13 : Mesure de l'expression de la <i>gapdh</i>	63
Figure 14 : Mesure de l'expression de la <i>gapdh</i>	64
Figure 15 : Vérification de la spécificité des amorces pour l'amplification d' <i>apobec3F</i>	67
Figure 16 : Mesure de l'efficacité de la PCR	68
Figure 17: Expression des <i>apobec3</i> dans les cellules lymphocytaires saines (H9) et chroniquement infectées par le virus du VIH-1 (H9/LAI).	69
Figure 18: Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de <i>vpr</i> chez les patients NPLT 2 et 5.....	73
Figure 19: Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de <i>vpr</i> chez le patient NPLT 4. 73	73
Figure 20: Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 au cours des 48 heures suivant l'infection des cellules lymphocytaires H9 par le virus du VIH-1.	76
Figure 21: Expression des <i>apobec3</i> dans des cellules hépatiques contenant ou non le génome du VHB	79
Figure 22: Expression des <i>apobec3</i> dans les cellules présentant le génome du HPV-18 intégré dans leur génome.....	80
Figure 23: Organisation génomique du VHC	82
Figure 24: Expression des <i>apobec3</i> dans des cellules hépatiques contenant ou non, toute ou une partie du génome virale du VHC.....	82
Figure 25: Expression de la protéine APOBEC3G fusionnée à la thiorédoxine.....	87
Figure 26: Expression des APOBEC3 fusionnées à la thiorédoxine au sein de corps d'inclusion.....	88
Figure 27: Expression de la protéine APOBEC3G produite en présence des protéines chaperonnes groES-groEL, fusionnée ou non à la thiorédoxine.....	89
Figure 28: Expression des différentes APOBEC3 dans la fraction soluble grâce à la coexpression avec les protéines chaperonnes groES-groEL.	90
Figure 29: Chromatogrammes résultant de la purification sur colonne de nickel (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare) de la protéine APOBEC3G à partir de la fraction soluble de l'extrait bactérien.	91
Figure 30: Test ELISA effectué sur les différentes fractions obtenues lors de la purification d'APOBEC3G sur colonne de nickel.....	92

Figure 31: Choix des substrats utilisés pour les tests <i>in vitro</i> au sein de la séquence de <i>vpr</i> ...	93
Figure 32: Principe du test de désamination	94
Figure 33: Test de clivage à l'UDG	95
Figure 34: Tests de désamination.....	96
Figure 35: Localisation des sites de clivage observés sur <i>vprC</i> au cours du test de désamination réalisé avec la protéine APOBEC3G soluble ne possédant pas l'étiquette thiorédoxine.	97
Figure 36: Test de retard sur gel entre <i>VprC</i> et les APOBEC3.....	98
Figure 37: Test de retard sur gel entre <i>vprC</i> , APOBEC3G et la GAPDH	100
Figure 38: Test de l'activité UDG de la GAPDH sur le substrat <i>vprU</i>	101
Figure 39: Quantification par cytométrie de flux, de la fluorescence associée à la nucléofection du plasmide <i>pmaxGFP</i> , dans les cellules Jurkat.....	110
Figure 40: Quantification per cytométrie de flux de la fluorescence associée à la nucléofection d'un plasmide codant pour l'hMGFP, en présence et en absence de tétracycline, pour le clone B5A2.	112
Figure 41: Etiquettes utilisées pour la purification des complexes protéiques	113
Figure 42: Principe de la purification de complexes protéiques par TAP-tag	115
Figure 43: Expression de la protéine APOBEC3G fusionnée au TAP-tag.....	115
Figure 44: Chromatogrammes obtenus après élution à l'EGTA.....	116
Figure 45: Analyse des protéines co-purifiées avec la protéine APOBEC3G	117

TABLEAUX

Tableau 1: Répartition et caractéristiques de l'édition dans différents organismes.....	5
Tableau 2: Caractéristiques des différents patients NPLT intégrés à l'étude	71
Tableau 3: Analyse de la séquence de <i>vpr</i> chez les patients NPLT	72
Tableau 4: Expression des <i>apobec3</i> dans les PBMC sains et du patient 4.....	74

ABBREVIATIONS

A

aa	acides aminés
AAV	adenovirus associated viruses
ACF	APOBEC1 complementation factor
ADAR	adenosine deaminase acting on RNA
ADN	acide desoxyribonucléique
ADNc	acide desoxyribonucléique complémentaire
AID	activation-induced cytidine deaminase
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine 5'-triphosphate

B

BSA	bovine serum albumine
-----	-----------------------

C

CAPS	3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic-acid
Ci	curie
CMV	cytomégalovirus
CRF	circulating recombinant form
Ct	cycle threshold

D

DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	diméthyl sulfoxide
dNTP	desoxynucléosides triphosphates
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol

E

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay

F

FACS	fluorescence activated cell sorting
FPLC	fast protein liquid chromatography

G

GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase
GFP	green fluorescent protein

H

HEPES	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2éthanesulfonique
-------	---

HPV	human papilloma virus
HSP	heat-shock protein
HTLV	human T-cell leukemia/lymphoma virus

I

IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
------	--

K

KDa	kiloDalton
-----	------------

L

LAV	lymphadenopathy Associated Virus
LINE	long interspersed elements
LTR	long terminal repeat

M

mA	milliampère
MLV	murine leukemia virus
MOI	multiplicity of infection

N

NLS	nuclear localization signal
NPLT	non progresseur à long terme
nt	nucléotide

O

ORF	open reading frame
-----	--------------------

P

Pb	paire de bases
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	phosphate buffer solution
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
pol	polymérase

R

RNase	ribonucléase
RPM	rotation par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	reverse transcriptase

S

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SINE	short interspersed elements

SVF sérum de veau foetal

T

TBE Tris-borate-EDTA
TBS tris-buffered saline
TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TEV tobacco etch virus
Tris tris-hydroxyméthyl aminométhane

U

UDG uracile DNA glycosylase

V

V volts
VIH virus de l'immunodéficience humaine
VHB virus de l'hépatite B
VHC virus de l'hépatite C
VIF virion infectivity factor

W

W watts

X

X-Gal 5-bromo 4-chloro 3-indolyl β -galactosidase

INTRODUCTION

La modification des acides nucléiques est un processus qui caractérise la maturation de transcrits ou le conditionnement du matériel génétique. Les mécanismes les plus connus sont la coupure des chaînes polynucléotidiques aux extrémités des ARN (« trimming »), la polyadénylation en 3' et la formation de la coiffe en 5' (« capping »), l'épissage des ARN messagers ou la modification de base (méthylation, glycosylation) dans l'ADN (Gommers-Ampt & Borst, 1995). La maturation des ARN (« processing ») a pour but la production de molécules (ARNt, ARNr, ARNm entre autres) aptes à remplir leur fonction dans la synthèse de protéines. Au niveau de l'ADN, les modifications de base ont un rôle dans le contrôle épigénétique ou la protection (Meehan, 2003; Wolffe & Matzke, 1999). Ces différents mécanismes se caractérisent par la conservation du message génétique et sont doublés d'un contrôle strict afin d'empêcher de possibles altérations de l'information codée. Sur l'ADN, des mécanismes complexes de réparation sont mis en œuvre pour prévenir des mutations pouvant affecter les fonctions cellulaires (Bartek & Lukas, 2007). Au niveau de l'ARN, des mécanismes de dégradation des ARN présentant des défauts de codage assurent leur élimination avant la traduction (Fasken & Corbett, 2005). Il est alors surprenant de constater la présence de mécanismes qui ont comme fonction la modification spécifique du message génétique (Blanc *et al.*, 2002), ou qui ont une action potentiellement mutagène capable d'inhiber la mobilité d'un certain nombre de virus pathogènes ou de retrotransposons (Aguilar & Peterlin, 2008).

Historiquement, le processus d'édition a tout d'abord été mis en évidence sur les ARN. On définit par édition des ARN, l'ensemble des processus qui produisent des transcrits dont la séquence et l'information sont différentes de celles portées par le gène correspondant. Ces altérations peuvent être des insertions/délétions de bases ou des modifications de bases par désamination. Elles peuvent conduire à des changements d'acides aminés, la création de codons d'initiation ou de terminaison de la traduction, la création de nouveaux cadres de lecture. L'édition peut aussi influencer sur la maturation ou l'épissage des ARN. Cette découverte du processus d'édition des ARN a été fondamentale, dans la mesure où elle a remis en question le dogme selon lequel l'information contenue dans le génome est transmise de manière linéaire jusqu'aux protéines.

Ce n'est que très récemment que le processus d'édition a été mis en évidence sur les ADN. Chez l'homme, un groupe d'enzymes nommées APOBEC3, a la capacité de modifier l'ADN. Ce mécanisme par sa capacité mutagène, constitue un danger potentiel pour la cellule, semble

néanmoins être un mécanisme de défense cellulaire, empêchant l'invasion du génome par des gènes exogènes (Harris *et al.*, 2002; Liddament *et al.*, 2004; Petersen-Mahrt & Neuberger, 2003).

L'objectif du travail de cette thèse consiste principalement à étudier de tels mécanismes, en étudiant plus particulièrement les enzymes de la famille APOBEC3 impliquées dans les phénomènes de restriction virale et d'édition observés sur les génomes viraux du VIH-1, du papillomavirus, des hépatites B et C chez l'Homme.

1. L'édition dans différents organismes : découverte, répartition et caractéristiques

C'est en 1986 que le phénomène d'édition des ARN a été décrit pour la première fois, chez les trypanosomes. Ces organismes unicellulaires flagellés, qui font partie de la famille des *kinetoplastidae*, sont caractérisés par la présence d'une mitochondrie unique, appelée kinétoplaste. C'est par la description de résidus uridine, non codés mais présents dans l'ARNm de la sous-unité 2 de la cytochrome c oxydase (cox) mitochondriale chez *Trypanosoma brucei* que ce phénomène a été révélé (Benne *et al.*, 1986). Suite à cette découverte, il a été montré que des insertions et des délétions d'uridines étaient fréquentes dans les ARN mitochondriaux des trypanosomes (Estevez & Simpson, 1999). Le mécanisme de l'édition des ARN des trypanosomes a été élucidé et les facteurs impliqués dans ce processus ont été décrits (Golden & Hajduk, 2006; Simpson *et al.*, 2003).

Depuis la découverte de l'édition chez les trypanosomes, d'autres exemples de modifications de transcrits ont été décrits chez d'autres organismes (**Tableau 1**). Ces données montrent que l'édition est un processus plus général, et non une particularité des *kinetoplastidae*. En fonction des organismes, la nature des changements résultant d'un processus d'édition est différente. Ces modifications peuvent être classées en deux groupes : (a) insertions/délétions de base et (b) conversions de base.

A l'origine, le processus d'édition a été décrit dans la mitochondrie, mais rapidement la découverte de nouveaux événements d'édition dans le noyau ou le chloroplaste a permis de le mettre en évidence dans tous les compartiments cellulaires comportant du matériel génétique.

Comme chez les trypanosomes, dans la mitochondrie végétale, l'édition a un rôle très important dans la biogenèse et la fonction de l'organelle. La quasi-totalité des ARNm sont édités (Brennicke *et al.*, 1999; Giege & Brennicke, 1999), et ce processus est nécessaire pour la production de protéines fonctionnelles (Hernould *et al.*, 1993). Différente des trypanosomes où l'édition se caractérise par l'insertion/délétion de U, l'édition chez la plante procède par modification de base de type C-U. Si l'enzyme responsable des changements C-U observés n'a toujours pas été identifiée, il a été montré qu'il s'agissait bien d'une désamination de cytosine (Blanc *et al.*, 1995) ; et dans la mitochondrie, des éléments *cis* pour l'édition ont été identifiés et sont localisés dans une région -16/+6 des C à éditer (Choury *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2001).

Si le mécanisme décrit dans la mitochondrie végétale peut être considéré comme un mécanisme contribuant à la diversification du potentiel génétique, les données obtenues ces dernières années proposent un autre rôle pour l'édition. En effet, avec la capacité d'édition de l'ADN décrite pour les APOBEC3, ce mécanisme peut alors être considéré comme un mécanisme de défense cellulaire, empêchant l'invasion du génome cellulaire par des gènes exogènes.

The different processes of RNA editing^f

Type ^a	Organism (genome)	Transcript(s) ^b	cis-acting element(s)	trans-acting factor(s)	Mechanism
<u>Insertion/deletion editing</u>					
U insertion/deletion	Kinetoplastids (mt)	mRNAs	Anchoring sequence	gRNAs, TUTase, RNA ligase, endonuclease, U exonuclease, other factors	Cleavage, TUTase or U exonuclease action, and ligation
Mostly C insertion; also U, UA, AA, CU, GU, and GC	<i>Physarum polycephalum</i> (mt)	mRNAs, tRNAs, rRNA	?	?	Linked to transcription
G insertion	Paramyxoviruses (v)	P mRNA	Slippery sequence	Viral polymerase	Pseudotemplated transcription
A insertion	Ebola viruses (v)	GP mRNA	Slippery sequence	Viral polymerase	Pseudotemplated transcription
<u>Modification editing</u>					
C to U	Land plants	mRNAs (mt, cp), tRNAs (mt), rRNAs (mt)	Flanking sequence -16/+6	C deaminase (unknown)	C deamination
	Mammals (n)	mRNAs, apoB (Gln → stop), NF1 (Arg → stop)	Mooring sequence, efficiency and AU-rich elements	C deaminase (APOBEC-1), other factors	C deamination
	<i>Physarum polycephalum</i> (mt)	cox1 mRNA	?	?	?
	Marsupials (mt)	tRNA (Gly → Asp anticodon)	?	?	?
U to C	Land plants (mt, cp)	mRNAs	Flanking sequence	?	U amination?
A to I	Mammals (n)	WT1 mRNA (Leu → Pro)	?	?	?
	Mammals (n)	mRNAs, GluR-B, -C, -D, -5, -6, 5-HT _{2C} R	dsRNA structure	dsRNA A deaminases (ADAR1 and -2)	A deamination
	Human hepatitis delta	Antigenome (stop → Trp)	dsRNA structure	ADAR1	A deamination

ADAR, a deaminase for RNA; apoB, apolipoprotein B; cox1, cytochrome *c* oxidase subunit 1; GluR, glutamate receptor; GP, glycoprotein; GPT, GlcNac-1-phosphate transferase; 5-HT_{2C}R, serotonin 2C receptor; NF1, neurofibromatosis type 1 gene; TATase, terminal uridylyltransferase; WT1, Wilms' susceptibility gene 1; cp, chloroplast; ds, double stranded; mt, mitochondrial; n, nuclear; nt, nucleotide; v, viral; ?, uncertain or unknown.

This (putative) editing event has been reported for the NIH/SW mouse strain. Whether it occurs in other strains and species is unknown.

Tableau 1: Répartition et caractéristiques de l'édition dans différents organismes.

Modifié d'après (Brennicke *et al.*, 1999)

2. Edition des acides nucléiques chez l'Homme

Chez l'Homme, un seul type de mécanisme pour l'édition des acides nucléiques a été identifié : la modification de base par désamination. Ce phénomène peut être observé aussi bien sur les ARN que sur les ADN.

2.1. Edition des ARN

2.1.1. Edition par conversion A-I

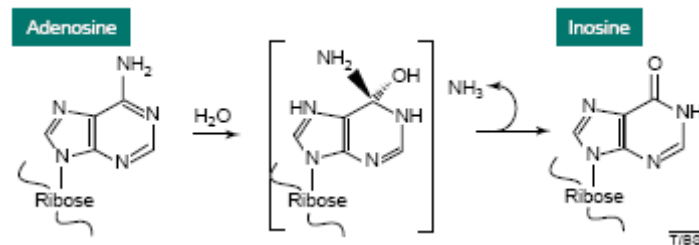


Figure 1 : Mécanisme de désamination A-I

Au cours de ce mécanisme, la base subit une attaque hydrolytique, ce qui entraîne la perte d'un groupement amine.

D'après (Gerber & Keller, 2001)

Décrite pour la première fois chez *Xenopus laevi*, l'enzyme responsable de ce processus est appelée ADAR, pour adenosine deaminase acting on RNA (Bass & Weintraub, 1987; Rebagliati & Melton, 1987). Elle est spécifique des ARN double brin, ces derniers étant composés d'un brin où se trouve le résidu A à éditer, et d'un brin complémentaire. La protéine ADAR est suffisante pour exercer le processus de désamination A-I. Par homologie de séquence, une famille de trois ADAR a été mise en évidence. ADAR-1 et -2 sont impliquées dans l'édition A-I, et sont exprimées dans de nombreux tissus. En revanche, ADAR-3 n'est exprimée que dans le cerveau et aucune cible ne lui a encore été attribuée.

Chez l'Homme, deux cas d'édition par conversion A-I ont fait l'objet de nombreuses études. Le premier concerne les canaux ioniques associés aux récepteurs de glutamate du système nerveux central. Les propriétés de ces canaux dépendent des sous-unités qui les composent, et en particulier de la nature d'un acide aminé localisé à une position précise dans un des domaines transmembranaires de ces sous-unités (Hume *et al.*, 1991). C'est l'édition de transcrits de certaines sous-unités qui est responsable de la nature de l'acide aminé en cette position (Sommer *et al.*, 1991), le codon glutamine (CAG) porté par le gène étant édité en codon arginine (CGG) (Melcher *et al.*, 1995; Rueter *et al.*, 1995). Le second, décrit en 1990, concerne le virus de l'Hépatite delta (Luo *et al.*, 1990). Ce pseudo-virus humain est

caractérisé par un génome ARN circulaire et simple brin possédant environ 70% de bases appariées, lui conférant une structure pseudo-double brin (Wang *et al.*, 1987). Il ne produit qu'une seule protéine, l'antigène δ (HDag), qui se trouve sous deux formes, P24 et P27, dans les cellules infectées ainsi que dans le virion. Cette dernière résulte de l'édition d'un codon Stop (UAG) en un codon Trp (UGG), conduisant à la synthèse d'une protéine plus longue.

2.1.2. Edition par conversion C-U

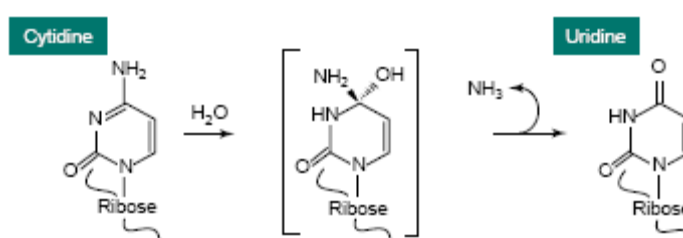


Figure 2 : Mécanisme de désamination C-U

Au cours de ce mécanisme, la base subit une attaque hydrolytique, ce qui entraîne la perte d'un groupement amine.

D'après (Gerber & Keller, 2001)

Les enzymes capables de désaminer la cytosine pour produire de l'uridine jouent un rôle très important dans de nombreuses voies métaboliques, depuis la bactérie jusqu'à l'homme. Les cytosines désaminases catalysent la conversion de C en U dans la voie de récupération (salvage pathway) des bases pyrimidiques chez les bactéries et les champignons (Ireton *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003). Chez les mammifères, cette réaction se fait au niveau du nucléoside par une cytidine désaminase (Weiner *et al.*, 1993). Une autre cytidine désaminase est la deoxycytidylate désaminase qui catalyse la désamination de dCMP en dUMP, qui est un substrat de la thymidylate synthase pour la production de nucléotides thymidine nécessaires pour la réplication de l'ADN (Weiner *et al.*, 1993). Ces protéines qui opèrent par un mécanisme semblable se caractérisent par un motif His-(Ala-Val)-Glu- X_{24-36} -Pro-Cys-X-X-Cys contenant un motif de fixation au Zn^{2+} . Cet ion est utilisé pour l'activation d'une molécule d' H_2O pour faciliter la libération du NH_3 du carbone C4 de la base (Smith *et al.*, 1994). Ce motif a été utilisé pour la découverte et la caractérisation de nouvelles cytidines

désaminases. Au cours des dix dernières années, plusieurs membres d'une famille appelée APOBEC ayant comme caractéristique la capacité de désaminer les résidus C sur des polynucléotides ARN ou ADN ont été identifiés.

2.1.3. APOBEC1

L'exemple le plus connu d'édition d'ARNm chez les mammifères concerne l'apolipoprotéine B (ApoB). C'est en 1987 que le mécanisme d'édition de cet ARNm permettant la synthèse de deux protéines ApoB100 (512 kDa) et ApoB48 (241 kDa) à partir d'un même gène est mis en évidence (Chen *et al.*, 1987; Powell *et al.*, 1987). ApoB joue un rôle central dans le métabolisme des lipides. La forme ApoB100, présente dans le foie, permet la synthèse et la sécrétion des VLDL (very low density lipoprotein). La forme ApoB48, présente dans l'intestin grêle, permet l'assemblage des chylomicrons. Elle est le résultat de l'édition spécifique d'une cytidine en position 6666, qui se traduit par le changement d'un codon glutamine (CAA) en un codon stop (UAA) (Chester *et al.*, 2000). (**Figure 3**)

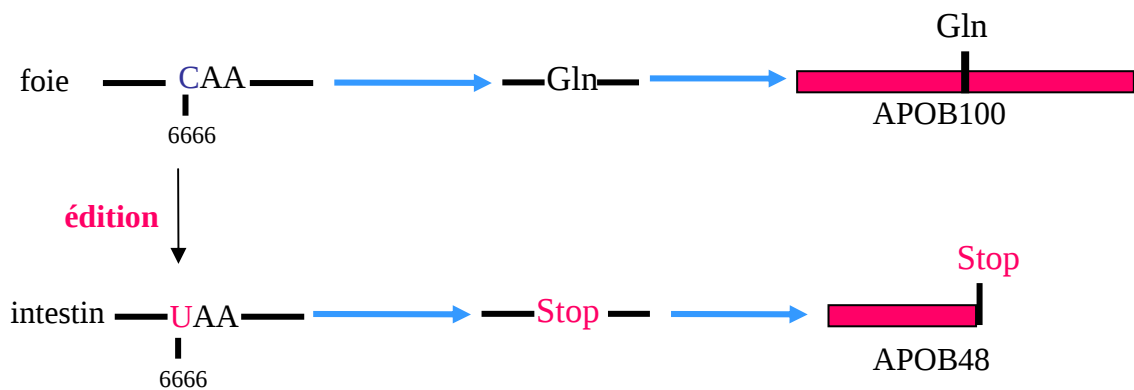


Figure 3 : Edition de l'ARNm d'ApoB

Chez l'Homme, l'édition a lieu spécifiquement dans l'intestin. Ainsi, deux protéines sont produites par le même transcrit : APOB100 dans le foie et APOB48 dans l'intestin suite à l'édition du résidu C en position 6666.

Chez l'Homme, cette protéine est exprimée spécifiquement au niveau de l'intestin (Hadjiagapiou *et al.*, 1994). Si APOBEC1 est indispensable, elle n'est cependant pas

suffisante pour catalyser seule la réaction d'édition (Navaratnam *et al.*, 1995; Teng & Davidson, 1992). Au moins une autre protéine connue sous le nom d'ACF, pour APOBEC1 complementation factor, interagit avec APOBEC1 (Lellek *et al.*, 2000; Mehta *et al.*, 2000). Cette protéine se lie au transcrit ApoB, sur une région qui encadre le site d'édition, et dirige la sous-unité catalytique d'APOBEC1 sur le site à éditer. Toutefois, il semble probable que d'autres protéines soient impliquées dans ce mécanisme, l'ensemble formant un complexe appelé éditosome.

Une étude récente a montré que la protéine APOBEC1 murine est capable d'hypermuter l'ARN et l'ADN simple brin *in vivo* (Petit *et al.*, 2008). L'ajout du cofacteur ACF murin, bloque cette capacité d'hypermutation, ce qui suggère qu'APOBEC1 est intégrée au sein de l'éditosome et retrouve son activité principale. Ainsi, une surexpression d'APOBEC1 conduirait à un excès de protéines qui ne pourraient pas être incorporées au sein de ce complexe, les protéines libres pourraient alors hypermuter l'ARN et l'ADN simple brin, ce qui représente un danger pour la cellule.

2.2. Edition des ADN

2.2.1. Les cytidines désaminases de la famille AID/APOBEC

2.2.1.1. Organisation génomique et fonction

Par similarité de séquence avec APOBEC1, plusieurs protéines susceptibles de posséder une activité cytidine désaminase ont été décrites chez l'Homme : AID, APOBEC2, la famille APOBEC3 et APOBEC4 (Holmes *et al.*, 2007b; Jarmuz *et al.*, 2002). (**Figure 4**)

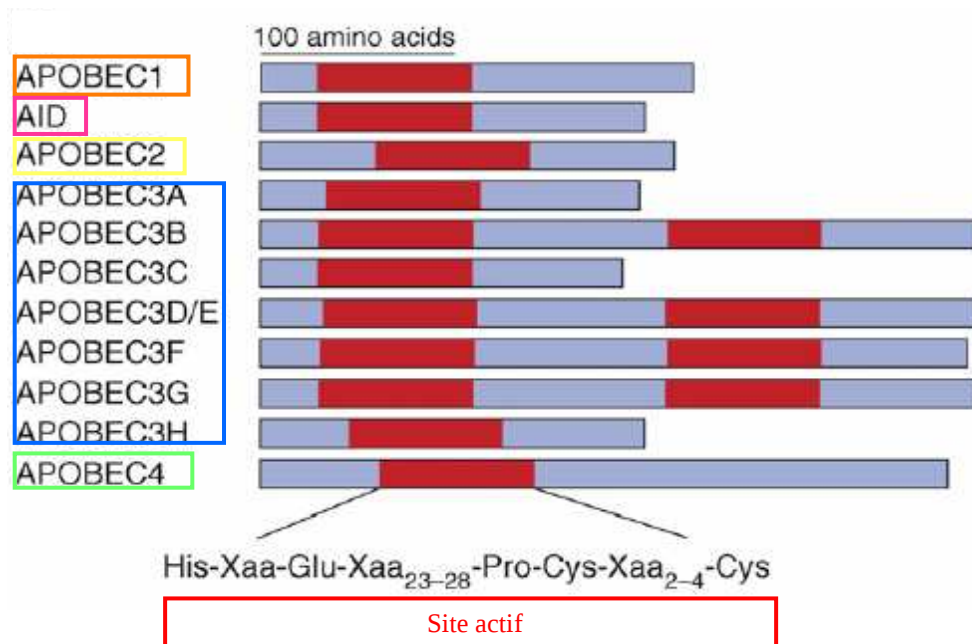


Figure 4 : Organisation des domaines des protéines AID/APOBEC humaines.

Les parties rouges représentent les motifs cytidines désaminases.

La séquence consensus est indiquée dessous.

D'après (Holmes *et al.*, 2007b).

Toutes les protéines de la famille AID/APOBEC contiennent 1 ou 2 copies du site actif His-Xaa-Glu-Xaa₂₃₋₂₈-Pro-Cys-Xaa₂₋₄-Cys, caractéristique de toutes les cytidines désaminases. Les résidus Cystéine et Histidine permettent la liaison du zinc, et le résidu Glutamate est impliqué dans le transfert de proton lors de la désamination (Holmes *et al.*, 2007b).

Les gènes *apobec1* et *AID* sont localisés sur le chromosome 12, le gène *apobec2* sur le chromosome 6, et les gènes *apobec3* sont organisés en tandem sur le chromosome 22 (Harris & Liddament, 2004). (**Figure 5**)

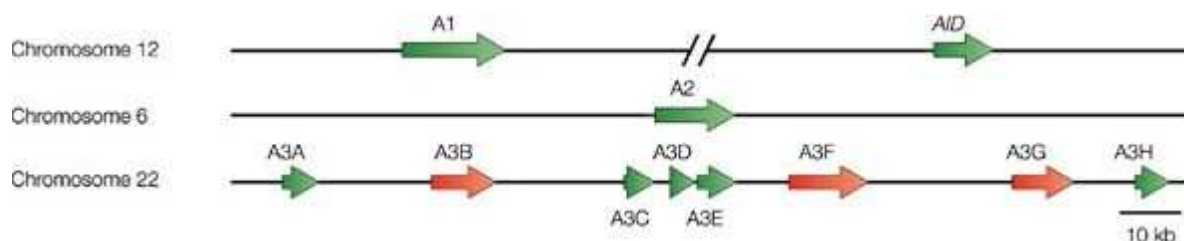


Figure 5 : Localisation chromosomique des gènes de la famille AID/APOBEC

D'après (Harris & Liddament, 2004)

o AID (*Activation-induced cytidine deaminase*)

Découverte en 1999 lors d'un test d'hybridation soustractive, cette protéine 24 kDa est exprimée spécifiquement dans les lymphocytes B (Muramatsu *et al.*, 1999). Si sa mécanistique est encore mal connue, il est établi qu'elle exerce son activité sur un substrat ADN simple brin et est impliquée dans la diversification des immunoglobulines, par commutation isotypique et hypermutation somatique (Honjo *et al.*, 2004; Longerich *et al.*, 2006; Neuberger *et al.*, 2003).

o APOBEC2

Cette protéine est exprimée spécifiquement dans le muscle squelettique et cardiaque (Liao *et al.*, 1999). Son rôle physiologique est inconnu, car jusqu'à présent aucune activité d'édition n'a été mise en évidence. La protéine APOBEC2 ne présente pas d'activité cytosine désaminase ni sur l'ADN ni sur le nucléotide libre. Aucun effet phénotypique sur l'état général ou la fertilité n'est détecté pour les souris K.O pour APOBEC2. De plus, la morphologie des muscles squelettiques et cardiaques est normale (Mikl *et al.*, 2005). La structure tridimensionnelle d'APOBEC2 a été déterminée. Si le monomère semble adopter un repliement proche des cytidines désaminases (CDA), certains éléments de la structure quaternaire (tétramère) affectent la coordination du zinc, ce qui pourrait expliquer l'absence d'activité cytidine désaminase *in vitro* (Prochnow *et al.*, 2007).

o APOBEC3

Le génome humain possède 7 gènes codant pour des protéines de la famille APOBEC3 (A à H). Les protéines APOBEC3B, 3DE, 3F et 3G contiennent 2 copies du site actif alors que les protéines APOBEC3A, 3C et 3H n'en contiennent qu'une seule, ce qui suggère que certains gènes ont connu des duplications. Elles sont exprimées dans de nombreux tissus, y compris les tissus tumoraux (Jarmuz *et al.*, 2002). Ces protéines sont surtout décrites pour

leurs propriétés de restriction virale sur le VIH (Bishop *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2006; Doehle *et al.*, 2005; Liddament *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005; Wiegand *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004), le MLV (Bishop *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004; Mangeat *et al.*, 2003), le EIAV (Mangeat *et al.*, 2003) et les « foamy virus » (Delebecque *et al.*, 2006; Lochelt *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que certaines protéines pouvaient inhiber différents rétrotransposons (Bogerd *et al.*, 2006a; Bogerd *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2006; Esnault *et al.*, 2005; Esnault *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2005; Stenglein & Harris, 2006), le VHB (Lei *et al.*, 2006; Noguchi *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2005; Suspene *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006; Turelli *et al.*, 2004), et le parvovirus AAV (Chen *et al.*, 2006).

o APOBEC4

Il s'agit d'une protéine qui a été prédite par analyse informatique (Rogozin *et al.*, 2005). Le domaine actif et la structure secondaire sont conservés ce qui laisse penser que cette protéine pourrait posséder une activité cytidine désaminase. Chez les mammifères, APOBEC4 serait exprimée spécifiquement dans les testicules, ce qui suggère qu'elle pourrait être impliquée dans l'édition des ARNm au cours de la spermatogenèse.

2.2.1.2. Evolution de la famille AID/APOBEC

Les membres de la famille AID/APOBEC sont retrouvés tout au long de la lignée des vertébrés. (**Figure 6**)

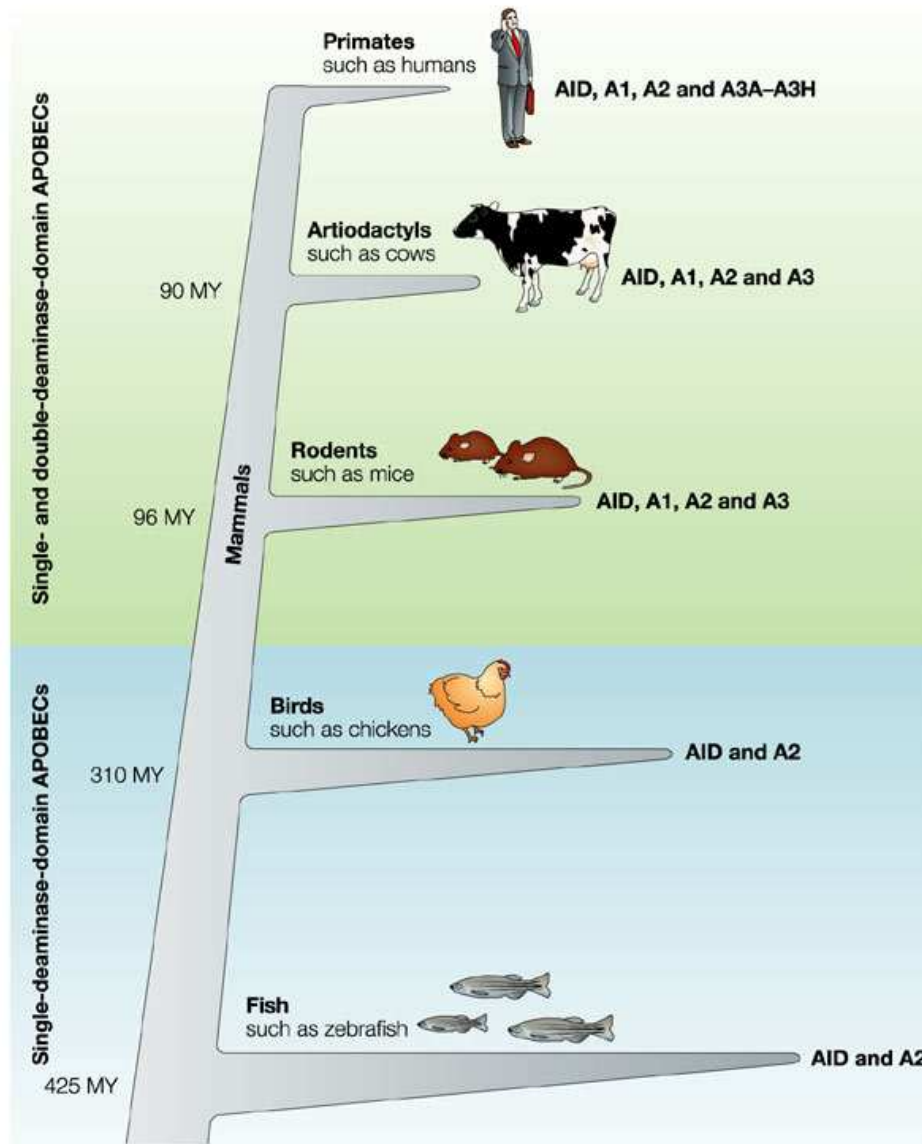


Figure 6: Représentation schématique du lien phylogénétique entre les membres de la famille AID/APOBEC et les vertébrés.

D'après (Harris & Liddament, 2004)

Les plus anciens membres de la famille AID/APOBEC sont AID et APOBEC2. Des analyses phylogénétiques suggèrent que les gènes *apobec1* et 3 sont issus de la duplication du locus *AID* (Conticello *et al.*, 2005). Les protéines APOBEC1 et 3 sont restreintes aux mammifères. Pour APOBEC3, contrairement aux souris et aux autres mammifères non primates, le locus chez les humains et les primates a connu une expansion, résultant en l'acquisition de 7 gènes. Le mécanisme et la pression de sélection qui ont conduit à cette expansion ne sont toujours

pas clairs. Toutefois, une hypothèse suggère qu'il pourrait s'agir d'un moyen mis en place pour prévenir l'instabilité génomique due aux rétrotransposons et aux rétrovirus humains. Cette idée est supportée par de nombreuses études qui ont montré la capacité de certaines de ces protéines à inhiber différents rétrotransposons (Bogerd *et al.*, 2006a; Bogerd *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2006; Esnault *et al.*, 2005; Esnault *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2005; Stenglein & Harris, 2006) et rétrovirus (Bishop *et al.*, 2004; Delebecque *et al.*, 2006; Liddament *et al.*, 2004; Lochelt *et al.*, 2005; Mangeat *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2005; Zennou & Bieniasz, 2006).

3. Restriction des virus et des rétroéléments endogènes par les protéines de la famille APOBEC3

Suite à la découverte de la capacité d'édition de l'ADN décrite pour les APOBEC3, un nouveau rôle a été proposé pour l'édition. Ce dernier peut en effet être considéré comme un mécanisme de défense cellulaire, empêchant l'invasion du génome cellulaire par des gènes exogènes. Avec la découverte de phénomènes d'édition sur le génome du VIH-1, de nombreux travaux se sont portés sur l'édition des acides nucléiques viraux et des rétroéléments chez l'Homme.

3.1. Virus du VIH-1

Depuis sa découverte en 1983, le VIH-1 fait l'objet de nombreuses études et des publications voient régulièrement le jour. L'isolement et la conception des molécules capables de bloquer les différentes étapes du cycle de réplication du virus ne sont possibles que grâce à une meilleure connaissance de ce dernier. Les autorités sanitaires ont approuvé la mise sur le marché de plusieurs molécules. Si celles-ci ne permettent pas de guérir de la maladie, elles ont considérablement amélioré la qualité et l'espérance de vie des malades. Ces dernières années, la découverte des APOBEC3 a soulevé de nouveaux espoirs, et de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre le mécanisme de restriction antivirale que ces protéines possèdent.

3.1.1. Découverte du virus

En 1980, le docteur Michael Gottlieb soigne un homosexuel qui présente des signes cliniques d'amaigrissement, de mycose, de fièvre, de pneumonie et de candidose buccale. C'est une quantité anormalement basse de lymphocytes T4 dans le sang de ce patient qui attire son attention. Deux autres malades, homosexuels eux aussi, présentent les mêmes symptômes. L'épidémie est découverte en 1981 par le CDC (Centers for Disease Control) aux Etats-Unis après l'annonce d'une recrudescence de sarcomes de Kaposi et pneumonies à *pneumocystis carinii*, deux maladies qui ont la particularité d'infecter les personnes immunodéprimées. Mais très rapidement, des toxicomanes et des hémophiles sont infectés. Les américains décident d'appeler ce syndrome AIDS (pour Acquired Immuno Deficiency Syndrome), qui sera traduit SIDA en France. C'est en 1983 que l'agent pathogène est isolé par une équipe française à l'Institut Pasteur à partir de cellules lymphoïdes ganglionnaires d'un patient (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Il est alors appelé LAV pour Lymphadenopathy Associated Virus. En 1984, deux autres virus sont identifiés et nommés HTLV-III, pour Human T-cell Leukemia/lymphoma Virus type III (Popovic *et al.*, 1984), et ARV pour Aids-Related Virus (Levy *et al.*, 1984). En 1985, ces trois virus sont montrés identiques. Et c'est finalement en 1986 que la communauté scientifique adopte le nom de HIV-1 (pour Human Immunodeficiency Virus), VIH-1 en France. Cette même année, le VIH-2 est découvert (Clavel *et al.*, 1986).

3.1.2. Classification et organisation génomique

Le VIH appartient au genre lentivirus, famille des *retroviridae*. Les virus de cette famille sont caractérisés par un génome ARN simple brin dimérique capable de se répliquer à l'aide d'un intermédiaire ADN qui s'intègre au sein du génome de la cellule hôte.

Le génome du VIH-1 est composé de deux molécules d'ARN simple brin identiques, d'environ 9000 nucléotides, liées de manière non covalente et qui sont encadrées de séquences répétées R et des régions U5 en 5' et U3 en 3'. Cet ARN possède les

caractéristiques d'un ARN messager eucaryote, c'est-à-dire : une coiffe en 5' (m7GpppGm) et une queue polyadénylée en 3'. Dans la cellule, l'ARN est rétrotranscrit en ADN proviral double brin. Aux extrémités de ce dernier se trouvent des séquences répétées non codantes appelées LTR, pour « Long Terminal Repeat ». Ces extrémités contiennent des éléments essentiels au bon déroulement de l'intégration rétrovirale et à la transcription virale effectuée par l'ARN polymérase II cellulaire. Les deux extrémités LTR encadrent les 9 cadres ouverts de lecture des 3 gènes principaux *gag*, *pol*, *env*, et des 6 gènes codant les protéines accessoires Tat, Rev, Vpr, Vif, Nef et Vpu. (**Figure 7**)

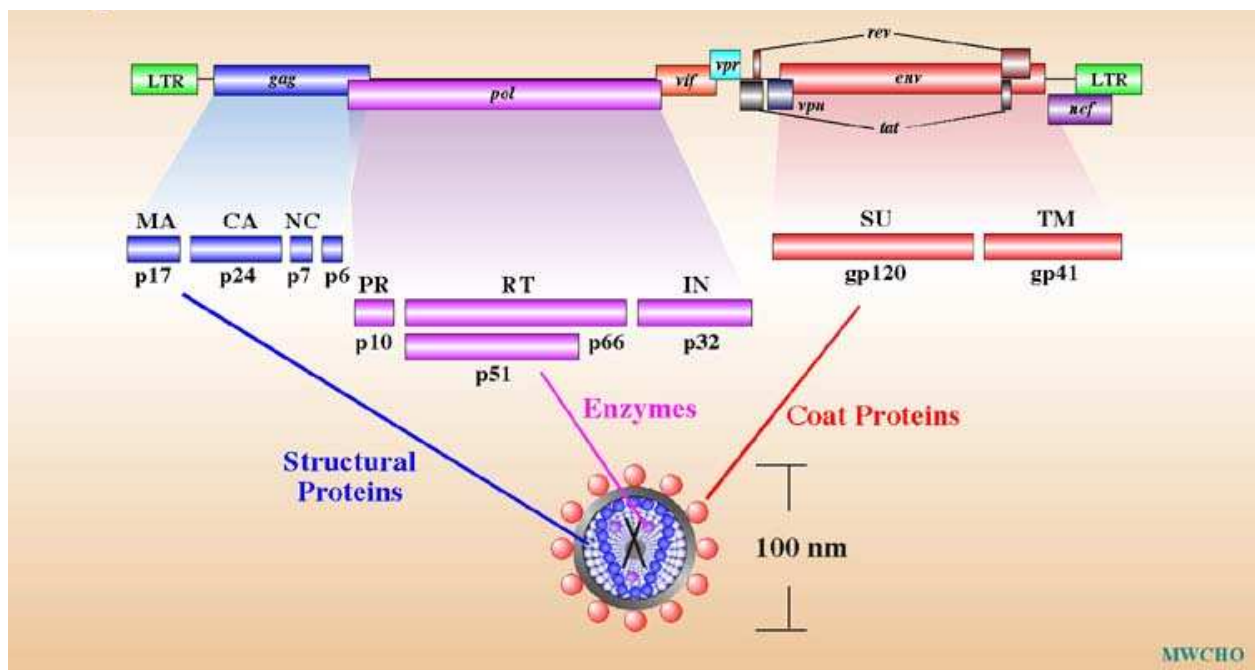


Figure 7 : Organisation génomique de l'ADN du virus du VIH-1

<http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>

Le gène *gag* code les protéines de structure du virus, comme la capside et la nucléocapside. Le gène *env* donne les protéines gp120 et gp41 qui constituent les spicules du virus, et qui sont impliquées dans les phénomènes d'entrée du virus dans la cellule cible. Le gène *pol* code les 3 enzymes virales : la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase qui sont présentes au sein de la capside virale.

Le VIH-1 code pour 6 protéines accessoires (Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpu et Vif) jouant un rôle dans la régulation du cycle viral. La protéine transactivatrice Tat sert à stimuler l'expression des gènes viraux et Rev commande la transition de l'état de latence vers la réplication. Vpu joue un rôle important dans l'augmentation du bourgeonnement des virions et dans la dégradation des récepteurs CD4. Ces trois protéines ne sont pas incorporées dans le virion, contrairement aux protéines Vpr, Nef et Vif. Ces dernières années, Vif est surtout décrite pour sa capacité à se lier à des protéines de la famille APOBEC3 (Conticello *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2003; Stopak *et al.*, 2003). Ce point sera plus amplement détaillé par la suite, dans le paragraphe « lutte antirétrovirale : restriction par les APOBEC3 ».

3.1.3. Cycle réplcatif

Le cycle de réplication du VIH-1 est composé de 2 phases : une phase dite précoce, qui aboutit à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule cible, et une phase dite tardive qui conduit à la formation de nouveaux virions. (**Figure 8**)

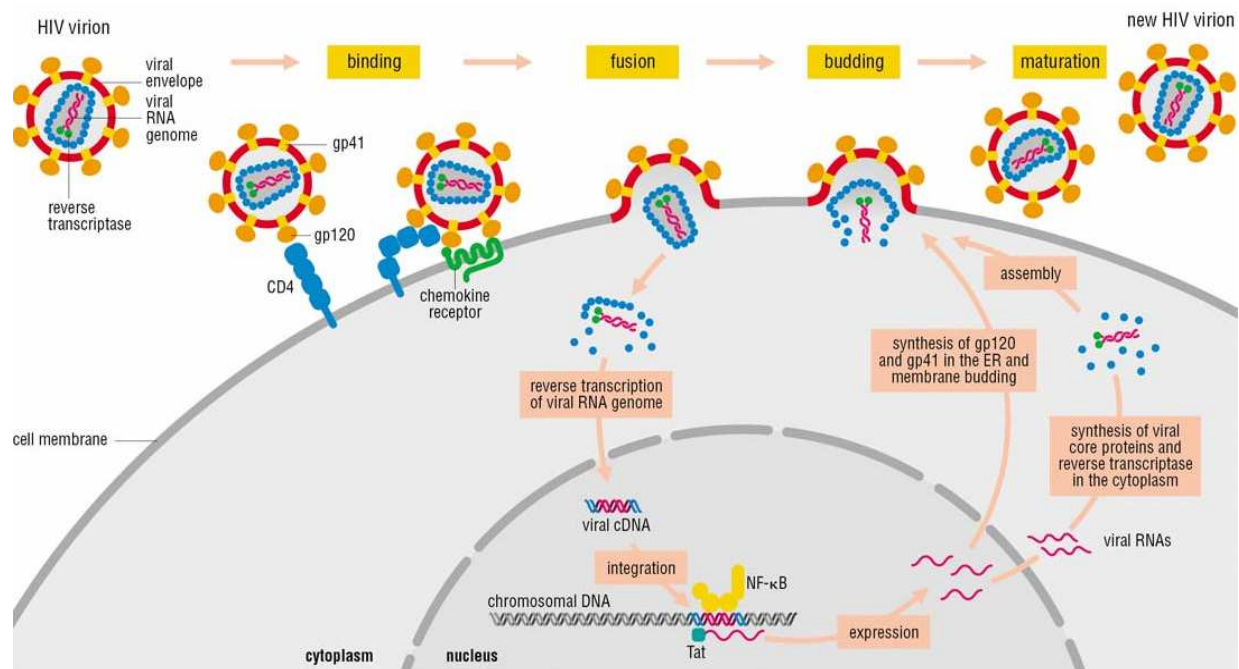


Figure 8 : Cycle de réplication du virus du VIH-1

3.1.3.1.Phase précoce

Elle débute par la reconnaissance spécifique entre des récepteurs cellulaires (CD4) et les glycoprotéines de surface du virus. Cette interaction permet la fusion des membranes virales et cellulaires, ce qui conduit à la libération de la capside virale dans le cytoplasme de la cellule où elle sera décapsidée. L'ARN viral est ensuite transcrit en une première molécule d'ADN brin (-). Au cours de cette étape, le brin d'ARN qui sert de matrice est dégradé par l'activité RNase H de l'enzyme. La synthèse du brin (+) peut ensuite être réalisée, le brin (-) servant de matrice. Il résulte de ces différents processus une molécule d'ADN viral double-brin qui est transportée vers le noyau de la cellule hôte, et insérée dans le génome cellulaire via l'intégrase. Le virus est alors sous sa forme de provirus.

3.1.3.2.Phase tardive

C'est à partir du promoteur viral situé en 5' du LTR que l'ADN proviral est transcrit en ARNm, grâce à l'ARN polymérase II cellulaire et aux interactions coordonnées de la protéine Tat et de facteurs de transcription NF- κ B. La transcription produit l'ARN du génome viral ainsi que les ARN messagers correspondant aux protéines du virus. Dans une cellule infectée par le VIH-1, on distingue trois classes d'ARNm : l'ARN génomique non épissé, les ARNm partiellement épissés et les ARNm complètement épissés. Les transcrits partiellement épissés et non épissés, en raison de la présence d'introns, sont exportés vers le cytoplasme par un mécanisme de transport unique et dirigé par la protéine virale Rev. Une fois dans le cytoplasme, les transcrits non épissés sont dimérisés pour constituer ultérieurement l'ARN génomique, les transcrits mono ou partiellement épissés sont traduits pour donner les protéines accessoires, de structure et les enzymes virales, qui sont maturées au niveau de l'appareil de Golgi. Les protéines de structure, sous forme de polyprotéines, sont transportées à la membrane où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires. Les ARN viraux rejoignent les protéines virales. Les protéines de structures s'assemblent pour former la capside et la matrice, englobant cet ensemble. En sortant de la cellule infectée, la capside arrache une partie de la membrane cellulaire. Après cette étape de bourgeonnement doit encore intervenir une étape de maturation au sein du virion. Les protéines de structure qui sont toujours sous forme de polyprotéines vont être clivées par la protéase virale, ce qui permet aux virions d'être infectieux.

Lors de leur formation, les particules virales incorporent des protéines cellulaires. Certaines d'entre elles ont pu être identifiées, comme par exemple le facteur d'élongation eEF1A (EF1- α) (Ott *et al.*, 2000), la protéine Staufen (Mouland *et al.*, 2000), la protéine chaperonne Hsp70 (Gurer *et al.*, 2002), une thioltransférase (Davis *et al.*, 1997), les propyl isomérases Pin1, Cyclophilin A (CypA) et FK506-binding protein 12 (Briggs *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 2000; Ott *et al.*, 1995; Thali *et al.*, 1994), l'uracile DNA glycosylase 2 (UNG2) (Priest *et al.*, 2003), la glyceraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase (GAPDH) (Ott *et al.*, 2000), la lysyl-tRNA synthétase (Kleiman & Cen, 2004), des protéines membres de la voie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Ott *et al.*, 1998; Strack *et al.*, 2003; Stuchell *et al.*, 2004; von Schwedler *et al.*, 2003), des protéines de la famille APOBEC3 (Cen *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004).

3.1.4. Lutte antirétrovirale : restriction par les APOBEC3

La réplication du virus du VIH-1 n'est possible que dans certaines cellules, qui sont dites permissives. Toutefois, certaines deviennent non permissives face à des virus déficients pour la protéine Vif (Δ Vif). A l'aide d'expériences de fusion de cellules, il a été montré que le phénotype non permissif des cellules était dominant, ce qui suggère que les cellules non permissives produisent un facteur qui est supprimé par Vif (Simon *et al.*, 1998). Par la suite, ce facteur a été identifié comme étant APOBEC3G (Sheehy *et al.*, 2002).

3.1.4.1. Restriction rétrovirale par APOBEC3G

Depuis la découverte de cette protéine et du phénotype qu'elle confère aux cellules dans lesquelles elle est exprimée, de nombreuses études ont été menées afin d'élucider ce mécanisme antiviral. Les données majeures sur ce processus ont été apportées grâce au séquençage des cDNA rétroviraux issus de cellules infectées avec des virus Δ Vif qui étaient produits en présence d'APOBEC3G (Harris *et al.*, 2003; Lecossier *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Sur le brin (+) viral, de nombreuses transitions G-A ont pu être observées comparativement aux rétrovirus produits en absence d'APOBEC3G. Ces résultats suggèrent qu'APOBEC3G peut accéder au virion et que lors de l'infection d'une nouvelle cellule, elle va exercer son activité de désamination de cytidines sur le cDNA viral neo-synthétisé au cours de l'étape de reverse transcription. Les transitions G-A ne seraient alors

que le reflet de la désamination des C sur le brin complémentaire (**Figure 9**). Les mutations sont alors fixées au niveau de la séquence virale et peuvent affecter la viabilité du virus.

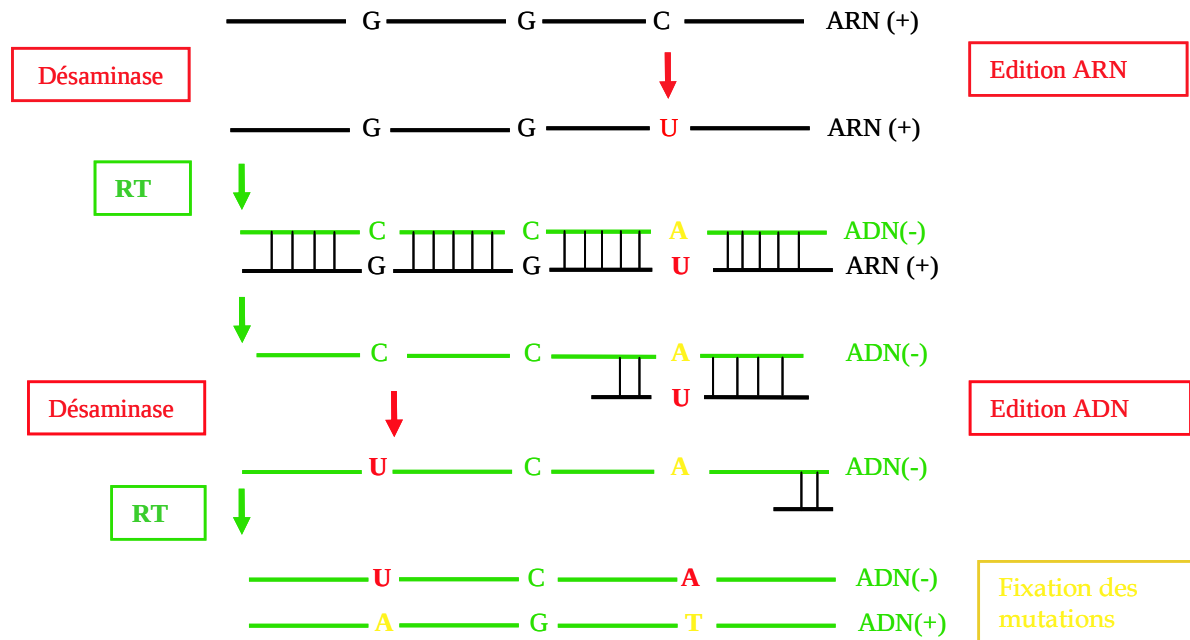


Figure 9 : Mécanisme de conversion C/T et GA

La protéine APOBEC3G contient deux sites catalytiques. La modification d'acides aminés conservés au sein de ce motif réduit la capacité de restriction rétrovirale de la protéine (Mangeat *et al.*, 2003; Shindo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Toutefois, le rôle de chacun de ces motifs n'est pas clairement élucidé à ce jour. Il semblerait en effet, que seulement un des deux domaines (en N ou C-terminal) de la protéine est nécessaire pour maintenir une activité anti-VIH-1, mais seul le domaine en position C-terminale est essentiel pour l'activité de désamination (Newman *et al.*, 2005). Il semble donc que les deux domaines catalytiques d'APOBEC3G ne sont pas équivalents, et que seul le domaine situé en position C-terminale est catalytiquement actif.

3.1.4.2. Incorporation d'AOPBEC3G dans le virion

Le fait que le brin (+) viral présente de nombreuses transitions G-A, comparativement aux virus produits en absence d'APOBEC3G, suggère que cette dernière pourrait accéder au virion et ainsi exercer son activité lors de l'infection d'une nouvelle cellule, au cours de l'étape de reverse transcription. Plusieurs études ont été menées et de nombreux groupes ont confirmé la présence d'APOBEC3G dans les particules virales (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Sheehy *et al.*, 2002), mais la façon dont elle est incorporée n'est pas encore claire. Plusieurs explications sont en effet possibles. Premièrement, de part sa localisation cytoplasmique (Marin *et al.*, 2003; Stopak *et al.*, 2003; Svarovskaia *et al.*, 2004), il est possible que la protéine soit simplement incorporée au moment du bourgeonnement de la particule virale. Deuxièmement, il se peut que comme APOBEC1, APOBEC3G nécessite la présence d'au moins une autre protéine cellulaire pour atteindre sa cible. Il se pourrait ainsi que son incorporation dans le virion soit facilitée par cette protéine cellulaire. Troisièmement, APOBEC3G pourrait se lier à un composant du virus. Ce dernier point a fait l'objet de plusieurs études (Alce & Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004).

Par des études de co-immunoprécipitation, il a été montré que la protéine Gag du virus pouvait interagir avec APOBEC3G. Il en résulte toutefois des résultats contradictoires. En effet si certains ont identifié une séquence de Gag nécessaire pour l'interaction (Alce & Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004), d'autres ont montré que cette même séquence n'était pas indispensable pour l'incorporation dans les particules virales (Svarovskaia *et al.*, 2004). Un autre point de désaccord porte sur la sensibilité de cette interaction à la RNaseA. Toutefois, il a été montré que les protéines Gag et APOBEC3G pouvaient se lier à l'ARN (Berkowitz *et al.*, 1995; Jarmuz *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Il est donc possible que l'interaction entre ces deux protéines se fasse par l'intermédiaire d'un ARN ou d'un complexe contenant de l'ARN. Récemment, Bogerd et Cullen (2008) ont montré que l'interaction entre le domaine NC de Gag et APOBEC3G nécessite *in vitro* la présence d'ARN simple brin de petite taille riche en G ou de régions simples brins situées au sein d'ARN structurés tels que les ARN Y et ARN 7SL.

3.1.4.3. Dégradation d'APOBEC3G médiée par Vif

L'effet d'APOBEC3G est clairement visible en absence de la protéine virale Vif. En revanche, son incorporation dans les virions est fortement inhibée en présence de Vif (Conticello *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2003; Sheehy *et al.*, 2003; Stopak *et*

al., 2003). La quantité de protéine est fortement réduite en présence de Vif, ce qui suggère que Vif pourrait compromettre la stabilité de la protéine APOBEC3G. De nombreuses études ont montré que Vif pouvait interagir avec APOBEC3G et permettre le recrutement de différentes protéines cellulaires telles que elonginB, elonginC, Cullin5 (CUL5) et Ring-box 1 (RBX1) (Yu *et al.*, 2003). La formation de ce complexe entraîne la polyubiquitylation d'APOBEC3G et ainsi sa dégradation par la voie du protéasome (Sheehy *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). (**Figure 10**)

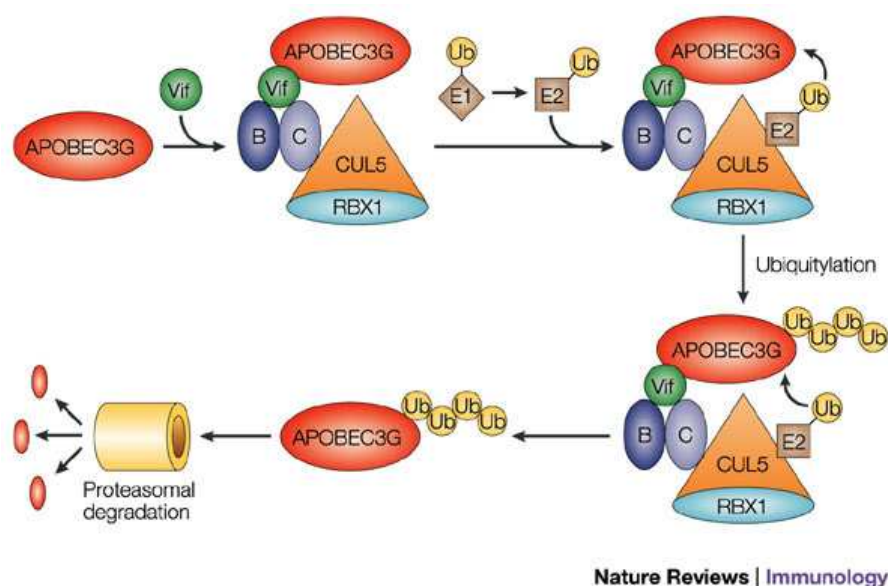


Figure 10 : Mécanisme de dégradation d'APOBEC3G médiée par Vif

La protéine Vif se lie à APOBEC3G et recrute les protéines cellulaires Elongin B et C, qui permettent l'ajout d'ubiquitine par CUL5 et RBX1. La protéine APOBEC3G polyubiquitynilée est ensuite dégradée par le protéasome.

D'après (Harris & Liddament, 2004)

Récemment, des travaux ont mis en évidence une interaction entre APOBEC3G et la protéine kinase A (PKA) (Shirakawa *et al.*, 2008). Cette dernière est capable de phosphoryler spécifiquement la Thréonine 32 d'APOBEC3G, ce qui entraîne une diminution de la liaison à Vif, et par conséquent une diminution de la dégradation d'APOBEC3G par le protéasome. Des études, grâce à des modélisations structurales et à des mutants, ont permis de montrer que l'interaction entre les résidus Arg24 et Thr32 d'APOBEC3G était cruciale pour l'interaction

avec Vif. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation d'APOBEC3G par la PKA peut réguler l'interaction APOBEC3G-Vif.

3.1.4.4. Restriction rétrovirale par APOBEC3B, 3DE et 3F

Une large majorité des travaux réalisés à ce jour a eu pour sujet d'étude la protéine APOBEC3G. Toutefois, le génome humain code pour d'autres protéines qui présentent de fortes similitudes avec APOBEC3G (Jarmuz *et al.*, 2002). Ces protéines pourraient être capable d'interférer elles aussi avec la réplication du VIH-1. Il a ainsi été montré que les protéines APOBEC3B, 3DE et 3F sont capables d'inhiber efficacement l'infection par le VIH-1 (Bishop *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2006; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004).

La protéine APOBEC3B présente environ 50% de similarité avec 3G (Jarmuz *et al.*, 2002). Elle présente une activité antirétrovirale contre le VIH-1 qui n'est pas affectée par Vif (Bishop *et al.*, 2004). La protéine exerce son activité dans un contexte dinucléotidique préférentiel 5'-TC.

Le gène *apobec3F* est localisé à côté du gène *apobec3G* sur le chromosome 22 (Jarmuz *et al.*, 2002), ces deux gènes présentent plus de 90% d'identité dans la région promotrice (Jarmuz *et al.*, 2002; Liddament *et al.*, 2004). Comme pour APOBEC3G, 3F a montré une forte activité d'édition de l'ADN au cours de tests de mutation effectués chez *E. coli* (Liddament *et al.*, 2004). Cependant, APOBEC3F diffère d'APOBEC3G à 2 niveaux. Premièrement, le contexte dinucléotidique pour son activité de désamination (5'-TC) (Bishop *et al.*, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004) est différent de celui d'APOBEC3G (5'-CC) (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Deuxièmement, APOBEC3F est résistante à la dégradation par Vif, mais d'une façon moindre qu'APOBEC3B (Liddament *et al.*, 2004).

La protéine APOBEC3DE a été montrée comme étant encapsidée dans les virions produits en absence de la protéine Vif. Le contexte nucléotidique de cette protéine pour son activité de désamination est 5'TC. Comme pour APOBEC3G, Vif est capable de se lier sur APOBEC3DE entraînant ainsi sa dégradation par la voie du protéasome (Dang *et al.*, 2006).

Tout ceci est en accord avec le fait que 3B, 3DE et 3F sont plus importantes que 3G *in vivo* pour la restriction du virus du VIH-1. En effet, les mutations GA en AA sont trouvées plus fréquemment que les GG en AG dans les séquences provirales issues de patients (Janini *et al.*, 2001). La résistance à Vif d'APOBEC3B et 3F peut être expliquée par la séquence en acides aminés correspondant à la région d'interaction APOBEC3-Vif définie par Asp128. Pour la protéine APOBEC3G, cet acide aminé fait partie d'un motif Trp-Asp128-Pro-Asp, alors que le résidu Glu27 correspondant pour 3B et 3F se trouve au sein d'un motif Trp-Glu127-Arg-Asp. Il est probable que la charge positive de l'arginine neutralise la charge totale de cette région, ce qui rendrait la protéine résistante à Vif. Toutefois, ce facteur n'est pas le seul qui soit impliqué dans l'interaction APOBEC3-Vif. En effet, APOBEC3B est complètement résistante à Vif (Bishop *et al.*, 2004), alors que 3F n'est que partiellement résistant (Liddament *et al.*, 2004). La résistance totale d'APOBEC3B à la dégradation médiée par Vif peut aussi s'expliquer par sa localisation nucléaire (Stenglein & Harris, 2006).

3.2. Autres virus

Suite à la découverte de modifications résultant de la désamination de cytosines sur le génome du VIH-1, conduisant à un phénomène de restriction virale, de nombreuses études ont été menées afin de savoir si ce mécanisme et ses conséquences pouvaient être retrouvés pour d'autres virus humains.

3.2.1. Virus de l'hépatite B (VHB)

Peu de temps après la découverte de la restriction de la réplication du VIH-1 par APOBEC3G, il a été montré que les protéines APOBEC3G, 3B, 3C et 3F pouvaient inhiber la réplication du VHB (Baumert *et al.*, 2007; Bonvin *et al.*, 2006; Bonvin & Greeve, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Rosler *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2004; Turelli *et al.*, 2004), virus à ADN double brin qui possède dans son cycle de réplication, une activité de reverse transcription. Une première étude a montré que l'analyse des séquences ADN issues des nucléocapsides produites dans des cellules hépatiques Huh7 exprimant APOBEC3G présentent un faible niveau d'hypermutations G-A, qui est augmenté de 5 fois quand cette expérience est réalisée

dans les cellules hépatiques HepG2 (Rosler *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que l'édition de l'ADN du VHB médiée par APOBEC3G est dépendante de la lignée cellulaire. Mais une deuxième étude a montré que les protéines APOBEC3G, 3F, 3B et 3C sont capables d'éditer massivement l'ADN viral dans les cellules Huh7 (Suspene *et al.*, 2005). Si ce point doit encore être éclairci, il a toutefois été montré que des virus présentant des transitions G-A peuvent être trouvés chez les patients infectés par le VHB (Noguchi *et al.*, 2005).

L'absence d'hypermutations G-A constatée dans un premier temps (Turelli *et al.*, 2004), a suggéré que l'inhibition de la réplication du virus par APOBEC3G pouvait se faire indépendamment du mécanisme d'édition. Ceci a été confirmé grâce à des mutations au sein du domaine catalytique situé en position C-terminale qui bloquent l'activité de désamination de la protéine, et qui n'ont aucun effet sur l'inhibition de la réplication du VHB (Turelli *et al.*, 2004). D'autres travaux ont pu montrer qu'APOBEC3G jouait sur l'empaquetage de l'ARN génomique dans les nouveaux virions en le rendant sensible aux nucléases (Rosler *et al.*, 2005).

3.2.2. Papillomavirus

En partant de l'hypothèse que le génome des papillomavirus humains pouvait être sujet à la désamination par les APOBEC3 qui ont une localisation nucléaire, une étude a dernièrement pu mettre en évidence la présence d'hypermutations au niveau de l'ADN des virus (Vartanian *et al.*, 2008). Ces virus à ADN bicaténaire circulaire, non enveloppés, possèdent un petit génome, ayant un fort pouvoir oncogène. Les analyses se sont portées sur des verrues plantaires causées par le HPV1a et des biopsies cervicales précancéreuses causées par le HPV16. Pour les deux virus, des transitions G-A et C-T ont pu être mises en évidence, ce qui suggère des phénomènes d'édition sur les deux brins d'ADN. Comme pour le HPV1, le contexte nucléotidique préférentiel pour l'édition pour le HPV16 est 5'TC et 5'CC , ce qui suggère qu'APOBEC3A, 3C et 3H pourraient être responsables des phénomènes d'édition observés. Ces résultats suggèrent que les virus à ADN double brin pourraient aussi être des cibles pour les protéines de la famille APOBEC3.

3.2.3. Virus de l'hépatite C (VHC)

Récemment, des travaux ont été menés afin d'étudier l'expression de la protéine APOBEC3G chez les patients chroniquement infectés par le VHC, et non traités à l'interféron (Komohara *et al.*, 2006). Le virus du VHC est un virus à ARN (+) monocaténaire linéaire, flanqué de deux régions non traduites. Il a ainsi été montré que l'expression d'APOBEC3G était augmentée chez les patients infectés, comparativement aux patients non infectés. Ces résultats suggèrent que le VHC induit une augmentation de l'expression de cette protéine dans les hépatocytes. Des études complémentaires ont permis de montrer que parmi les protéines virales non structurales, seule la protéine NS5A était responsable de l'augmentation de l'expression observée. Si des phénomènes d'hypermutation sur le génome du VHC n'ont pas encore été décrits, il semble toutefois que ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'infection chronique par le VHC.

3.3. Rétroéléments endogènes

Les protéines de la famille APOBEC3 ont aussi été montrées comme agissant sur les rétroéléments endogènes (Bogerd *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006; Dutko *et al.*, 2005; Esnault *et al.*, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; Muckenfuss *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2005; Schumann, 2007; Stenglein & Harris, 2006). Les rétroéléments sont des séquences ADN mobiles qui s'intègrent dans le génome cellulaire et se répliquent via des transcrits ARN qui sont copiés en ADN double brin par une reverse transcriptase.

3.3.1. Classification

Les rétroéléments peuvent être classés en au moins 3 groupes : les rétrovirus exogènes, les rétrotransposons qui contiennent des LTR, et les rétrotransposons sans LTR. Chez les mammifères, la plupart des éléments mobiles génétiques sont des rétrotransposons qui représentent plus de 45% de l'ADN génomique humain et murin (Deininger *et al.*, 2003;

Holmes *et al.*, 2007b; Kazazian, 2004; Kazazian & Goodier, 2002; Kazazian & Moran, 1998; Lander *et al.*, 2001; Prak & Kazazian, 2000).

3.3.1.1. Rétroéléments LTR

Les rétroéléments LTR comprennent aussi les rétrovirus endogènes, comme l'HERV, les éléments murins MusD et IAP, ainsi que les éléments Ty1 de la levure. Les rétrotransposons LTR actifs contiennent un gène *pol* fonctionnel qui code pour une reverse transcriptase et une intégrase ; ce qui permet la répllication autonome. De plus, ils possèdent un gène *gag* qui code pour une protéine structurale qui permet la formation de particules virus-like.

3.3.1.2. Rétroéléments non LTR

Les rétrotransposons non-LTR peuvent être classés en deux familles : LINE (long interspersed elements) et SINE (short interspersed elements). LINE-1, l'élément LINE humain le plus commun, est transcrit par l'ARN polymérase II pour donner un ARNm qui code pour deux protéines, ORF1 et ORF2, qui sont requis pour la rétrotransposition (Brouha *et al.*, 2003; Kolosha & Martin, 1997; 2003; Lander *et al.*, 2001; Sassaman *et al.*, 1997). Au contraire, les éléments Alu sont transcrits en ARN non codants par l'ARN pol III (Schumann, 2007). Les séquences Alu se sont accumulées avec le temps et représentent 11% du génome humain (Lander *et al.*, 2001).

3.3.2. Restriction de la rétrotransposition par les APOBEC3

Ces éléments mobiles modifient profondément le génome des organismes vivants. Toutefois, les eucaryotes ont besoin d'une grande stabilité de leur génome. Ils ont donc été amenés à développer des stratégies pour limiter la prolifération de ces éléments mobiles. De part leur similarité avec les rétrovirus, la fonction des APOBEC3 face à ces éléments a été examinée. De nombreuses études ont démontré qu'elles peuvent restreindre ces rétroéléments. Elles sont ainsi capables d'inhiber la rétrotransposition de IAP et MusD, ces derniers présentant alors des substitutions G-A au sein de leurs séquences (Bogerd *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 1987; Esnault *et al.*, 2006). APOBEC3C, 3F et 3G inhibent la rétrotransposition des

éléments Ty1 chez la levure, et cette inhibition est corrélée à la présence d'hypermutations C-T au sein de ces éléments (Dutko *et al.*, 2005; Schumacher *et al.*, 2005). APOBEC3A, 3B, 3C, 3F, mais pas 3G, inhibent la rétrotransposition des éléments L1 (Chen *et al.*, 2006; Esnault *et al.*, 2005; Muckenfuss *et al.*, 2006; Stenglein & Harris, 2006). La rétrotransposition des éléments Alu dépend de la reverse transcriptase codée par les éléments LINE-1 (L1). Des études ont montré qu'APOBEC3G inhibe fortement la rétrotransposition des séquences Alu, non pas en inhibant la fonction des éléments L1 mais en séquestrant les ARN Alu (Bogerd *et al.*, 2006b; Kinomoto *et al.*, 2007; Muckenfuss *et al.*, 2006; Schumann, 2007; Stenglein & Harris, 2006).

3.4. Restriction par les APOBEC3, par un mécanisme autre que l'édition

Si la capacité d'induire des mutations grâce à l'activité de désamination de cytosine de l'ADN par les APOBEC3 permet d'expliquer la restriction des rétrovirus ou des rétroéléments, de nombreuses études suggèrent que les APOBEC3 possèdent un mécanisme antiviral indépendant de l'édition.

Il a ainsi été décrit que la protéine APOBEC3G peut, suite à des mutations, perdre son activité cytidine désaminase mais maintenir un certain niveau d'activité antivirale face au virus du VIH-1 (Newman *et al.*, 2005). Le même phénomène a pu être observé pour la protéine APOBEC3F (Holmes *et al.*, 2007a). Ce phénomène a aussi été mis en évidence pour le virus du VHB. En effet, une première étude réalisée dans les cellules Huh7 montre clairement qu'APOBEC3G bloque la réplication du virus, mais sans changement significatif de nucléotide. De plus, l'enzyme rendue catalytiquement inactive suite à des mutations est toujours capable de bloquer la réplication du VHB (Turelli *et al.*, 2004). Ce phénomène est aussi observé pour les rétrotransposons. En effet, APOBEC3A est considérée comme un fort inhibiteur des rétrotransposons LTR. Toutefois, aucune mutation n'a pu être observée dans ce cas ce qui suggère ici aussi un mécanisme d'inhibition indépendant de l'activité d'édition (Bogerd *et al.*, 2006a).

Dans le cadre du VIH-1, il a été montré que la protéine APOBEC3F catalytiquement inactive entraînait une diminution de l'accumulation des produits de reverse transcription dans les cellules (Holmes *et al.*, 2007a). Une hypothèse pour expliquer le rôle de la protéine dans cette observation serait une inhibition de l'initiation de la synthèse de cDNA et/ou de la processivité de la polymérase.

Pour le VHB il a été montré qu'APOBEC3G inhibait la production de l'ADN viral (Rosler *et al.*, 2005; Turelli *et al.*, 2004). Ces deux études sont toutefois en désaccord sur un point, l'une suggérant que les ARN associés au core sont 50 fois plus faibles en présence d'APOBEC3G (Turelli *et al.*, 2004), cette dernière interférerait alors sur l'empaquetage de l'ARN prégénomique dans la particule virale, alors que l'autre étude n'observe pas de différence (Rosler *et al.*, 2005). Dans le cadre de la restriction de la rétrotransposition de L1, il a été montré qu'APOBEC3A empêchait l'accumulation de l'ADN de L1 néosynthétisé (Bogerd *et al.*, 2006a). L'ensemble de ces données suggère que l'activité d'inhibition indépendante de l'activité d'édition associée à ces protéines est complexe et met en jeu des mécanismes multiples.

4. Objectifs de l'étude

Des études précédentes au laboratoire ont permis de mettre en évidence un processus d'édition dans des cellules H9/LAI chroniquement infectées par le virus du VIH-1. Des changements G-A et C-U ont été observés entre autre dans le cadre de lecture de l'ARNm de vpr. Par la suite, des études complémentaires ont montré que des transitions G-A pouvaient se produire au niveau de l'ADN proviral lui-même. La protéine VPR (96 aa, 14 kDa) possède plusieurs propriétés dont sa capacité à bloquer la division cellulaire en phase G2 (Ayyavoo *et al.*, 1997; Bodeus *et al.*, 1997). Elle serait aussi impliquée dans le processus d'apoptose des lymphocytes TCD4⁺ infectés (Rogel *et al.*, 1995). Ce processus de mort programmée, induit par VPR, aboutit en quelques heures à la fragmentation de l'ensemble de l'ADN génomique en des multiples de 200 paires de bases (Stewart *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000). Etant donné l'action cytotoxique de cette protéine, conduisant à l'élimination des cellules infectées, nous pouvons imaginer que la diminution de l'expression de vpr soit un mécanisme de protection cellulaire, aboutissant à l'établissement d'une infection chronique par le VIH-1.

Pour ces cellules H9/LAI, les mutations observées pour *vpr* pourraient ainsi être à l'origine de virus défectifs, ce qui pourrait expliquer l'état chronique de l'infection dans ces cellules. Les modifications G-A et C-U observées sur l'ADN proviral et les ARN viraux sont caractéristiques de l'activité de cytidines désaminases. Il est ainsi possible d'envisager que de par leur activité d'édition, ces protéines soient impliquées dans l'apparition de virus défectifs, et ainsi dans la chronicité de l'infection.

Nous avons cherché à préciser quelles désaminases sont exprimées dans les cellules chroniquement infectées, et quelles sont celles qui peuvent être responsables de ce phénomène. Afin de vérifier notre hypothèse, selon laquelle la chronicité de l'infection dans ces cellules pourrait être corrélée à une activité de désamination de type C-U, nous avons étudié la séquence de *vpr* chez des patients non progresseurs à long terme, ainsi que l'expression des différentes désaminases chez ces derniers. Par la suite, avec la mise en place d'un test *in vitro*, nous avons cherché à préciser le rôle de ces cytidines désaminases. En effet, étant donné la diversité des APOBEC3 et l'ubiquité de ces protéines dans différents types cellulaires, il est important de mieux définir le rôle de chacune et d'identifier la (ou les) cytidine désaminase de la famille APOBEC3 qui pourrait être responsable des modifications observées sur la séquence *vpr* du génome du VIH-1.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

1. Souches bactériennes

La souche bactérienne DH5 α d' *Escherichia coli* (*E. coli*) a servi pour la construction et l'amplification de différents plasmides utilisés au cours de ce travail. Cette souche possède le génotype suivant : F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), λ -. Cette souche a la particularité de posséder le marqueur *lacZ* Δ M15, ce qui permet la sélection de colonies blanc/bleu par α -complémentation du gène de la β -galactosidase.

Pour l'expression des différentes cytidines désaminases de la famille APOBEC3, les souches d'*E.coli* BL21 (DE3) ou C41 (DE3) ont été utilisées. La souche BL21 (DE3) possède le génotype suivant : F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]). La souche C41 (DE3) est dérivée de la souche BL21 (DE3), et possède au moins une mutation non caractérisée.

2. Cellules humaines

2.1. Cellules en suspensions

Les cellules Jurkat et H9 sont des cellules lymphocytaires T cancéreuses en suspension, issues de lymphomes cutanés. Expriment naturellement le récepteur CD4, ces cellules ont été sélectionnées pour leur capacité d'être infectées par le VIH-1 (source ATCC®). Les cellules H9/LAI, établies par le Dr Barré-Sinoussi (Institut Pasteur), sont issues d'une leucémie à cellules lymphocytaires T et sont chroniquement infectées par le VIH-1 isolat Laï. La manipulation de ces cellules H9/LAI est réalisée dans une enceinte de type P3.

2.2. Cellules adhérentes

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales issues d'un prélèvement effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951, **Henrietta Lacks**.

Les cellules Huh7 sont une lignée de cellules adhérentes issues d'un hépatocarcinome d'un patient japonais. Les cellules Huh7-NS3-5B sont des cellules Huh7 qui expriment de manière constitutive la polyprotéine NS3-NS5B et qui permettent la production d'un complexe de réplication efficace. Les cellules Huh7 rep5.1 expriment le réplicon Rep5.1 du VHC, et sont manipulées dans une enceinte de type P3.

Les cellules HepG2 sont des cellules adhérentes qui ont été établies à partir d'un carcinome hépatique humain. Les cellules HepG2.2.15, établies à partir des cellules HepG2, contiennent une copie du génome du virus de l'hépatite B intégrée de manière stable. Ces cellules sont ainsi capables de produire les protéines virales et de relarguer des virions dans le milieu de culture. Elles sont donc manipulées dans une enceinte de type P3.

2.3. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

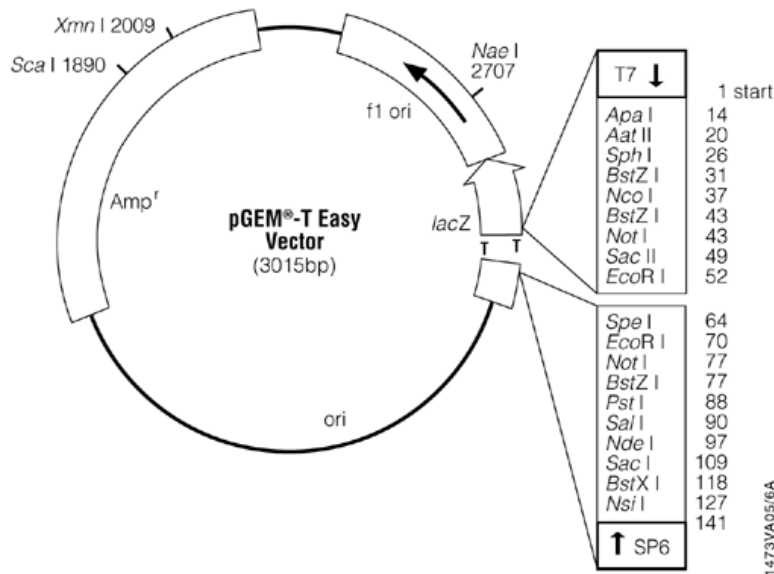
Les PBMC sont les cellules mononucléaires circulant dans le sang périphérique et sont principalement constituées de lymphocytes et de monocytes. Les PBMC sains nous ont été donnés par le Service de Virologie et d'Immunologie Biologique du CHU de Bordeaux. Les PBMC des patients NPLT ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses du Pr. Delfraissy, du CHU Kremlin Bicêtre.

3. Plasmides

La plupart des constructions ont d'abord été effectuées à l'aide du plasmide pGEMTeasy (Promega TM), avant d'être sous-clonées par la suite dans des vecteurs d'expression.

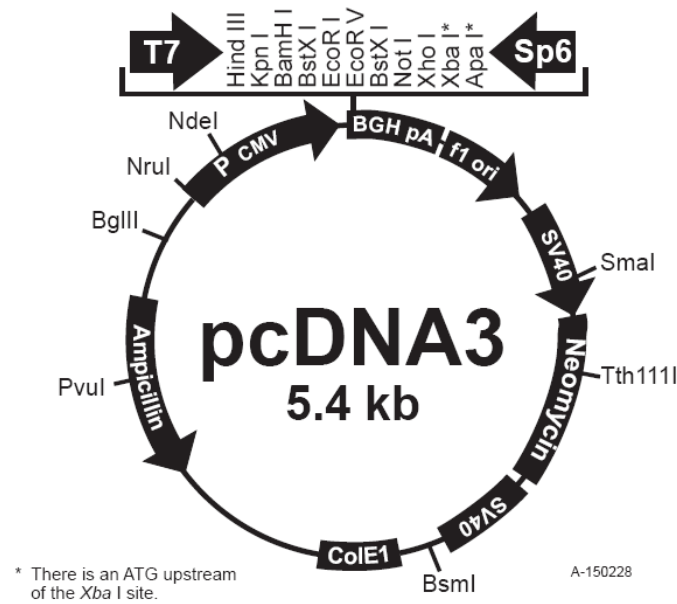
3.1. Le plasmide pGEM-T Easy

Ce vecteur de clonage de 3kb possède un gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans les bactéries. Les séquences d'intérêt sont insérées au niveau du multisite de clonage situé dans le gène LacZ. Ce plasmide vendu linéarisé contient un T à l'extrémité 3' de chaque brin permettant le clonage des produits de PCR obtenus avec la polymérase AmpliTaq-Gold (Applied Biosystem).



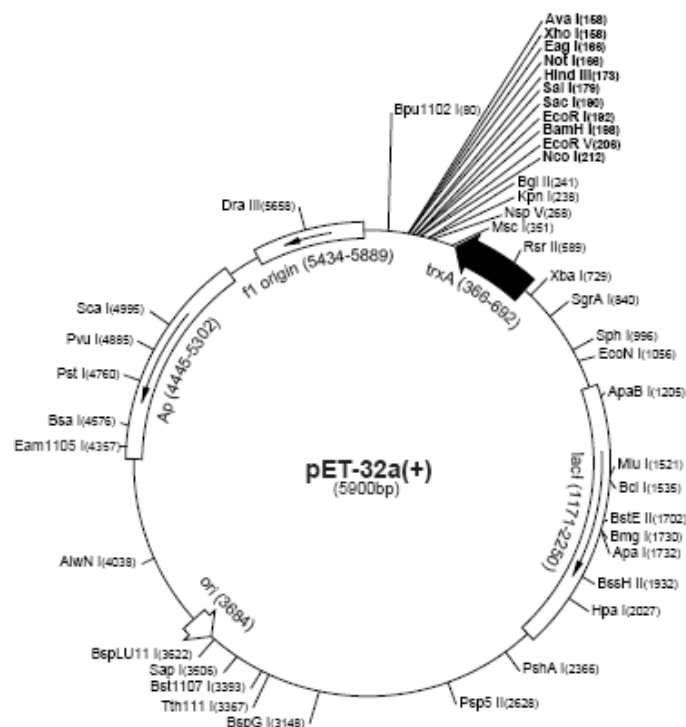
3.2. Le plasmide pcDNA3 (Invitrogen™)

Ce vecteur d'expression eucaryote de 5,4 kb possède un multisite de clonage positionné entre le promoteur constitutif fort CMV la séquence terminatrice de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH pA). L'insertion d'une séquence codante dans ce multisite de clonage permet une expression transitoire de protéines dans les cellules humaines. Ce plasmide peut être amplifié dans les bactéries grâce à l'origine de répllication bactérienne et au gène de résistance à l'ampicilline.



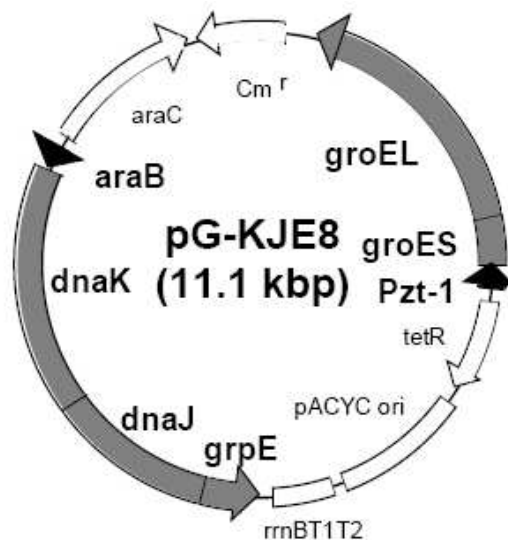
3.3. Le plasmide pET32a (Novagen™)

Ce vecteur d'expression de 5,9 kb possède un multisite de clonage positionné entre un promoteur inducible à l'IPTG et la séquence de la thiorédoxine. L'insertion d'une séquence codante dans ce multisite de clonage permet une expression inducible de protéines étiquetées dans les bactéries. Ce plasmide confère à la bactérie la résistance à l'ampicilline.



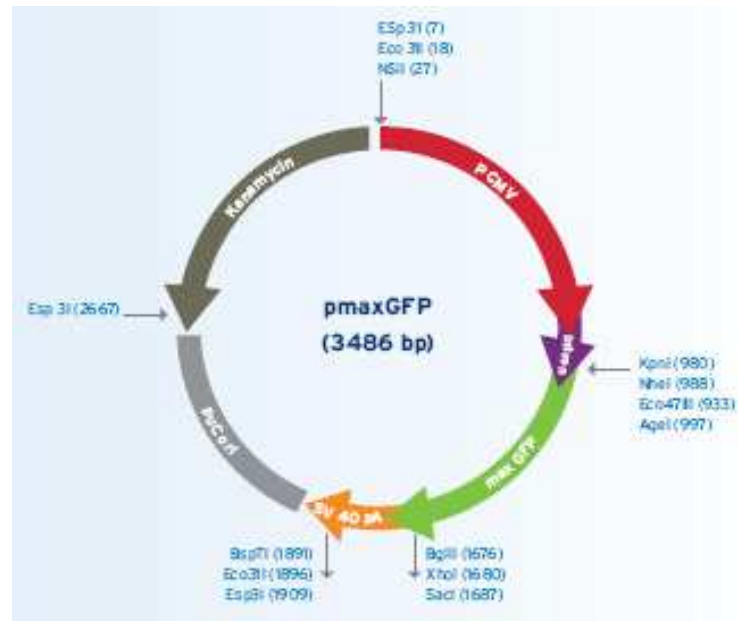
3.4. Le plasmide pG-KJE8 (Takara TM)

Ce vecteur d'expression de 11,1 kb a été choisi pour sa capacité à produire les protéines chaperonnes groES-groEL dans la bactérie. Cette production est inducible par la tétracycline. Ce plasmide confère à la bactérie la résistance au chloramphénicol.



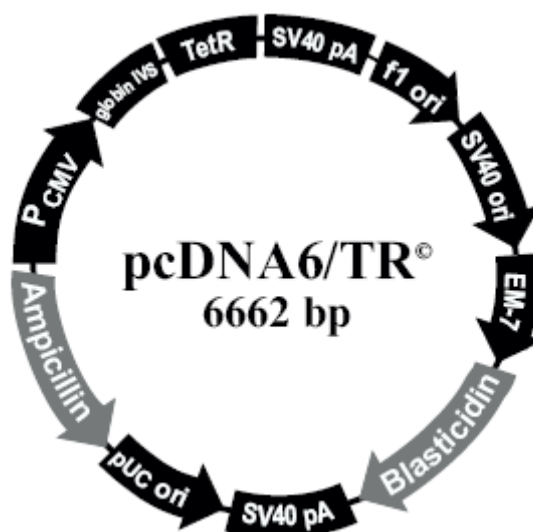
3.5. Le plasmide pmaxGFP (Amaxa TM)

Ce plasmide de 3,5 kb est utilisé comme contrôle positif pour évaluer l'efficacité de transfection des cellules de mammifères. Il permet l'expression de la maxGFP, sous le contrôle du promoteur constitutif fort CMV. Ce plasmide peut être amplifié dans les bactéries grâce à l'origine de réplication bactérienne et au gène de résistance à la kanamycine.



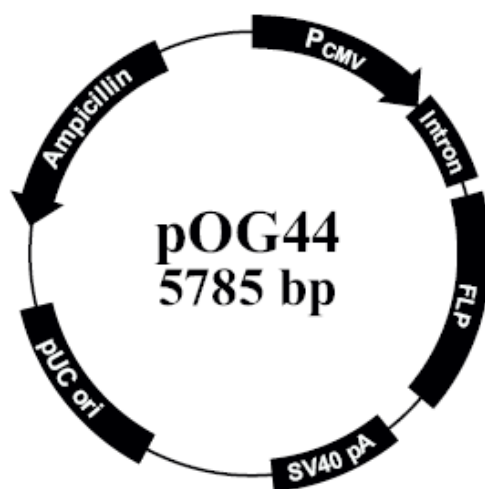
3.6. Le plasmide pcDNA6/TR (Invitrogen™)

Ce vecteur d'expression eucaryote de 6,6 kb permet l'expression du répresseur Tet, sous la dépendance promoteur constitutif fort CMV. Ce plasmide s'intègre de manière aléatoire dans le génome cellulaire, conférant alors la résistance à la blasticidine. Il peut être amplifié dans les bactéries grâce à l'origine de répllication bactérienne et au gène de résistance à l'ampicilline.



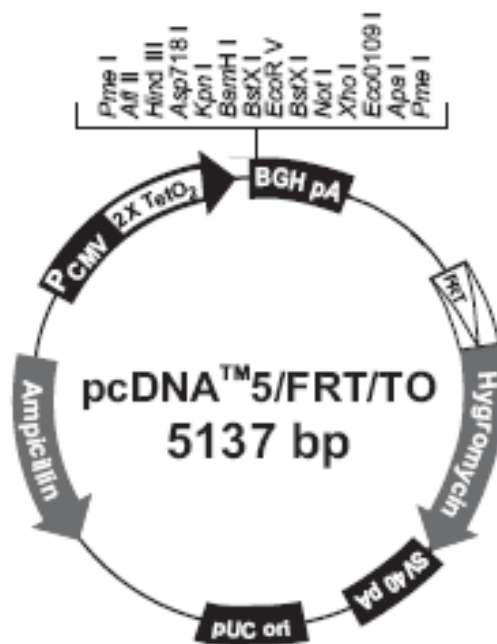
3.7. Le plasmide pOG44 (Invitrogen™)

Ce plasmide de 5,8 kb permet l'expression constitutive de la FLP recombinase sous le contrôle du promoteur CMV humain. Il est utilisé en même temps que le plasmide pcDNA5/FRT/TO, dans le système Flp-In T-Rex (Invitrogen), pour permettre l'insertion site spécifique de ce dernier dans le génome cellulaire. Ce plasmide peut être amplifié dans les bactéries grâce à l'origine de répllication bactérienne et au gène de résistance à l'ampicilline.



3.8. Le plasmide pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen™)

Ce vecteur d'expression de 5,1 kb permet l'intégration d'une séquence d'intérêt de manière unique et stable dans le génome cellulaire et confère aux cellules la résistance à l'hygromycine. L'expression du gène d'intérêt est inductible, et ne peut se faire qu'en présence de tétracycline dans le milieu de culture. Ce plasmide peut être amplifié dans les bactéries grâce à l'origine de répllication bactérienne et au gène de résistance à l'ampicilline.



METHODES

1. Cultures cellulaires et transformations

1.1. *Les bactéries*

1.1.1. Conditions de culture

Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation (220 rpm) dans un milieu LB (Luria-Bertani : 1% bactotryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl et 0,2% agar si milieu solide), avec ou sans pression de sélection. Les cultures en milieu solide sont faites en LB + 1,5% agar, avec l'ajout d'antibiotiques selon le vecteur utilisé.

L'amplification des plasmides est réalisée dans *E.coli* DH5 α rendues compétentes par la méthode de Hanahan (1983). Pour cela, une colonie bactérienne est mise en culture la nuit dans 5 ml de milieu LB. Le lendemain, ces 5 ml de culture sontensemencés dans 200 ml de SOB (2% bactotryptone, 0,5% bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,5. Les bactéries sont ensuite incubées dans la glace pendant 15 min, puis centrifugées à 5 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les culots sont repris dans 60 ml de tampon RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM acétate de potassium, 10 mM CaCl₂, 15% glycérol, pH 5,8) et incubés 15 min dans la glace avant une nouvelle centrifugation de 5 min à 5 000 rpm, 4°C. Les culots sont ensuite repris dans 16 ml de tampon RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glycérol, pH 6,8). Après une incubation finale de 10 min dans la glace, les bactéries devenues compétentes sont aliquotées dans des tubes de 1 ml et conservées à -80°C.

1.1.2. Transformation des bactéries

La transformation est basée sur un choc thermique des bactéries compétentes en présence de l'ADN plasmidique. Après décongélation, 200 μ l de bactéries compétentes sont incubées avec 100 ng d'ADN plasmidique (ou 2 μ l de mélange de ligation) pendant 30 min dans la

glace. Après le choc thermique de 90s à 42°C et un refroidissement de 5 min dans la glace, les bactéries sont cultivées 1h à 37°C, sous agitation (220 rpm), dans 800 µl de milieu non sélectif SOC (milieu SOB contenant 20 mM glucose) afin de permettre l'expression du gène de résistance. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur boîte de LB-agar additionné d'un antibiotique.

1.2. Les cellules humaines

1.2.1. Conditions de culture

Les cellules HeLa, Huh7, Huh7 NS3-5B, Huh7 Rep5.1, HepG2 et HepG2.2.15 sont cultivées dans du milieu Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen™) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF est préalablement décomplementé 20 min à 56°C. Les cellules Jurkat, H9 et H9/LAI sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 Glutamine (Invitrogen™) supplémenté par 10% de SVF et 2 mM glutamine.

Toutes ces cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide et contenant 5% CO₂. Elles sont maintenues par passage 2 à 3 fois par semaine selon leur vitesse de croissance. Pour les cellules adhérentes, un traitement à la trypsine-EDTA est nécessaire pour décoller du support plastique la monocouche de cellules formée par les cellules confluentes. Les milieux DMEM et RPMI 1640 contiennent du rouge phénol, un indicateur de pH. Une forte croissance des cellules entraîne une acidification du milieu et le rouge phénol vire au jaune.

1.2.2. Nucléofection

Les cellules H9 et Jurkat sont très difficilement transfectables (<10% de cellules transfectées). Une nouvelle technologie de transfection, appelée nucléofection, a été développée par la société Amaxa™ permettant de transfecter les cellules difficiles. La nucléofection est basée sur la combinaison d'un choc électrique effectué par le

nucleofectorII[®], ajouté à une solution de composition inconnue, supposée permettre le guidage de l'ADN plasmidique vers le noyau de la cellule. En effet, en utilisant les protocoles proposés, le temps d'expression peut être considérablement réduit. Le programme S-18 du nucleofectorII[®] en combinaison avec la solution V (kit Amaxa[™]) testé avec le plasmide contrôle pmaxGFP (Amaxa[™]) s'est avéré le plus adapté à nos besoins, avec environ 90% de cellules transfectées et un taux de mortalité < 5%.

Brièvement, 2.10^7 cellules/essai mélangées à 5 µg d'ADN plasmidique sont reprises avec 100 µl de solution V et transférées dans une cuvette d'électroporation fournie avec le kit de transfection. La cuvette est placée dans l'appareil afin d'exécuter le pulse électrique du programme sélectionné. Les cellules sont immédiatement reprises avec 500 µl de milieu de culture préchauffé à 37°C et transférées dans une plaque 6 puits préchauffée à 37°C et contenant 2,5 ml de milieu par puit. Les cellules sont ensuite placées dans l'étuve de culture à 37 °C. En cas de sélection par un antibiotique, celui-ci n'est rajouté qu'au bout de 48 heures.

1.2.3. Quantification de la fluorescence par cytométrie de flux

Après 3 lavages en PBS, les culots cellulaires sont repris dans 500 µl de PBS-EDTA 2 mM. Les cellules sont analysées au cytomètre de flux (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Cette technique permet d'obtenir des informations sur les propriétés optiques et fluorescentes de chaque cellule analysée. Pour cela, chaque cellule est incluse dans une microgouttelette constituée par le liquide de "gaine" et soumise à l'analyse de deux lasers. Les informations obtenues concernent la taille, la granulométrie et l'intensité de fluorescence. La quantification de fluorescence des cellules est réalisée sur 10 000 cellules sur FACS Calibur (Bechton-Dickinson, San Jose, CA). Les analyses des données sont réalisées grâce au logiciel FCS express v3.00.0103. Les résultats sont reportés en pourcentage de cellules fluorescentes.

1.2.4. Infection des cellules H9 par le virus du VIH-1

Le virus du VIH-1 est produit au laboratoire sous conditions de sécurité P3. Pour cela, les cellules H9/LAI sont cultivées en présences de cellules MT4 ou C8166-45 dans du milieu

RPMI complet. Au bout de 48 heures, le surnageant de la co-culture est centrifugé, filtré (0,22 µm Millex-HA), puis aliquoté et stocké à -80°C. La veille de l'infection, les cellules H9 sont ensemencées dans des plaques 24 puits, à raison de 30.10^3 cellules par puit. Le jour de l'infection, le virus est ajouté directement sur les cellules, à une MOI de 1.

2. Manipulation des acides nucléiques

2.1. Purification de l'ADN plasmidique

Les préparations d'ADN plasmidiques, à partir de la bactérie *E. coli*, ont été effectuées en utilisant le kit Wizard® plus SV minipreps DNA purification system de Promega™ à partir des culots bactériens obtenus à partir de 10 ml de culture d'environ 12h (O.N) à 37°C en milieu sélectif. L'ADN plasmidique est élué avec 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA), quantifié en mesurant la DO au spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000), et stocké à -20°C.

L'ADN plasmidique utilisé pour les transfections de cellules humaines est purifié à l'aide du kit PureYield™ Plasmid Midiprep System de Promega™ permettant d'éliminer de manière efficace les endotoxines bactériennes.

2.2. Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose

Pour extraire une bande après migration en gel d'agarose, nous avons utilisé le kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Le morceau de gel d'agarose contenant la bande d'intérêt est placé dans un tube avec du Capture buffer type 2 à raison de 10 µl de tampon pour 10 mg de gel. Le tout est mélangé par inversion et incubé à 60°C jusqu'à la dissolution complète de l'agarose. La solution obtenue est alors déposée sur une colonne GFX, incubée 1 min à température ambiante, et centrifugée 30 s à 13 000 rpm. L'ADN se fixe sur la membrane de silice contenue dans la colonne GFX. Cette dernière est

ensuite lavée avec 500 µl de Wash buffer type 1. L'ADN est élué par centrifugation avec 50 µl de tampon TE et conservé à -20°C.

2.3.Extraction des ARN totaux des cellules de mammifères

Les cellules sont lavées en PBS puis culotées par centrifugation 2 min à 2 000 rpm, température ambiante. Le culot est repris dans 800 µl de Trizol[®] (Invitrogen) et vortexé 10 s. 160 µl de chloroforme sont ajoutés. Le tout est vortexé 30 s, puis centrifugé 10 min à 13 000 rpm. La phase aqueuse est ensuite récupérée, 400 µl d'isopropanol froid y sont rajoutés. Après 1h de précipitation à -20°C, l'ARN est récupéré par une centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 min, à température ambiante, et lavé avec 200 µl d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation de 10 min, le culot est séché avant d'être repris dans 50 µl d'H₂O DEPC. La DO est mesurée au spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000), et les ARN sont stockés à -80°C.

2.4.Séquençage

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur capillaire *ABI Prism™ 310 Genetic Analyser* et séquenceur 16 capillaires *ABI PRISM 3130xl*) en utilisant le Kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems).

Les réactions sont effectuées à partir de 100 à 250 ng d'ADN plasmidique auxquels sont ajoutés 0,4 pmoles d'amorce, 2 µl de mix, 4 µl de tampon. Après une dénaturation d'1 min à 96 °C, 30 cycles incluant 10 s de dénaturation à 96°C, 5 s d'hybridation à 55°C et 4 min d'élongation à 60°C sont réalisés. Les produits d'élongation sont alors précipités avec 2,5 volumes d'éthanol absolu, 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M pH5,2, 1/10 volume d'EDTA 25 mM, pendant 15 min à température ambiante. Après une centrifugation de 30 min à 13 000 rpm, les culots sont lavés avec 250 µl d'éthanol 70%, puis séchés à l'abri de la lumière.

Après séquençage automatique, l'analyse se fait grâce au logiciel 4Peaks. Les différentes amorces qui ont été utilisées sont indiquées dans la table 1.

Nom des Amorces	Séquences dans le sens 5' - 3'
SP6	TTTAGGTGACACTATAGA
T7	AATACGACTCACTATAG
PU	GTAAAACGACGGCCAGT
PR	GGAAACAGCTATGACCATG

Table 1 : Amorces utilisées pour les réactions de séquençage

2.5.Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'enzyme utilisée pour les réactions de PCR est l'ADN polymerase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Le mélange réactionnel de 100 µl est composé de 10 µl de tampon de réaction 10X, de MgCl₂ à une concentration finale de 2,5 mM, de dNTP à une concentration finale de 200 µM, de chaque amorce à une concentration finale de 0,2 µM, de 2,5 unités d'enzyme.

Le programme de PCR commence par 12 minutes d'activation de la Taq polymerase à 94°C. Cette étape est suivie de 30 cycles composés d'1 min de dénaturation à 94°C, d'1 min d'hybridation des amorces à 55°C et d'1 minute d'élongation à 72°C. L'élongation de produits dont la synthèse est déjà initiée, est poursuivie pendant 12 min à 72°C.

Les produits obtenus sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1% afin de vérifier que l'amplification obtenue est correcte.

	Nom des Amorces	Séquences (dans le sens 5' - 3')	Taille du produit
apobec3A	5'A ext	TGAGCAAGTCGCAAGAGCGGG	805 pb
	3'A ext	ATCTACTTGATCGGGAGCATAC	
	5'BCD	GGCTGAACATGAATCCACAGA	1162 pb

apobec3B	5'BCD	GGCTGAACATGAATCCACAGA	1162 pb
	3'ABG	CATCCTTCAGTTTCCCTGATTC	
apobec3C	5'BC ext	GACAGGGACAAGCGTATCTAA	943 pb
	3'C extintron	GATTACAGGCGTGAGTCACCA	
apobec3DE	5'BCD	GGCTGAACATGAATCCACAGA	581 pb
	3'D ext	TCACCTGAGAATCTCCTTTA	
apobec3F	5'FG	GGCCAAGGATGAAGCCTCACT	1137 pb
	3'F ext	GAGACCCCTCACTCGAGAATCT	
apobec3G	5'FG	GGCCAAGGATGAAGCCTCACT	1168 pb
	3'ABG	CATCCTTCAGTTTCCCTGATTC	
Aid	ehAID 5'	ACACCACTATGGACAGCCTC	613 pb
	ehAID 3'	AGTTGCTATCAAAGTCCCAA	
apobec1	ehApo1 5'	AGAGCACCATGACTTCTGAG	722 pb
	ehApo1 3'	TATTCATCTCCAAGCCACAGA	
apobec2	ehApo2 5'	GCCCCTCCATGGCCCAGAAG	689 pb
	ehApo2 3'	AGTTGCCCTACTTCAGGATGTC	
β -actine	5'b actine	TGCTATCCAGGCTGTGCTATCC	157 pb
	3'b actine	GCCAGGTCCAGACGCAGG	

Table 2 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR

Pour chaque gène ciblé, les amorces sens et antisens sont indiquées, ainsi que la taille attendue pour chaque produit amplifié.

2.6.Synthèse de cDNA

Préalablement à la synthèse de cDNA, toute contamination éventuelle des ARN par de l'ADN génomique résiduel est éliminée par un traitement à la DNase I Amplification Grade (Invitrogen). Pour cela, 1 μ g d'ARN est traité avec l'enzyme pendant 15 min à température ambiante. La réaction est arrêtée avec l'ajout d'EDTA 25 mM, chauffée 10 min à 65°C, et enfin placée 1 min dans la glace. Après ce traitement, un volume de LiCl 7,5 M est ajouté au mélange réactionnel. Après 1h de précipitation à -20°C, l'ARN est culoté, et repris dans 50 μ l d'H₂O DEPC.

Pour l'étape de reverse transcription, l'enzyme utilisée est la Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). L'ARN est mélangé à 2 μ l de dNTP (10 mM) et aux amorces. La

réaction pouvant être réalisée en présence de 4 µl de randoms primers (Promega) ou d'oligonucléotides poly(dT)₂₃ (MWG). Après une incubation de 10 min à 65°C, 4 µl de DTT (0,1 M) et 8 µl tampon de réaction 5X sont ajoutés, et le tout est incubé 2 min à 42°C avant l'addition de l'enzyme. Le mélange réactionnel est incubé pendant 1h30min à 42°C.

Les cDNA obtenus sont purifiés sur des colonnes QIAquick (QIAGEN) et la concentration est déterminée par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

2.7.PCR quantitative

Les PCR quantitatives sont effectuées avec l'appareil MyiQ iCycler Single Color Real-Time RT-PCR Detection System (BioRad). Les réactions sont réalisées selon les recommandations du fournisseur du kit Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas). Le mix contient les dNTPs, l'enzyme (Maxima™ Hot Start *Taq* DNA polymerase), le marqueur fluorescent (SYBR® Green I (λ_{max} excitation : 494 nm, λ_{max} émission : 521 nm)). Le SYBR® Green I est un intercalant de l'ADN double brin et qui émet alors un signal fluorescent, ce dernier augmentant de façon proportionnelle avec la quantité d'ADN.

Pour chaque essai, sont ajoutés les amorces sens et antisens à une concentration finale de 0,3 µM, le Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X), et 30 ng de cDNA dans un volume final de 25 µl. Les différents oligonucléotides utilisés sont répertoriés dans la table 3.

	Nom des Amorces	Séquences (dans le sens 5' - 3')	Taille du produit
gapdh	GAPDH+	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGG	230 pb
	GAPDH-	TCCTGGAAGATGGTGTGGGATTTC	
apobec3B	3BS	GCGCCAGACCTACTTGTGCT	71 pb
	3BAS	TGTGCTGGTCCATCAGGACC	
apobec3C	3CSbis	TCGCTGTGGAGATCATGGA	136 pb
	3CASbis	TCTCCCGTAGCCTTCTTTTCA	
apobec3DE	3DS	GGCTGAGCACCCCAATGTCA	52 pb
	3DAS	CACCCACCGCCAATCTCA	

apobec3F	3FS	CTATGGTCGGAACGAAAGCT	50 pb
	3FAS	TCTTCCAGGAGATAGGTGAG	
apobec3G	3GS	GGTCAGAGGACGGCATGAGA	71 pb
	3GAS	GCAGGACCCAGGTGTCATTG	

Table 3 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitative

Pour chaque gène ciblé, les amorces sens et antisens sont indiquées, ainsi que la taille attendue pour chaque produit amplifié.

Le programme contient une phase de dénaturation à 95°C pendant 3 min suivie de 42 cycles d'amplification : dénaturation (10 s à 95°C), puis hybridation (30 s à 60°C), et élongation (30 s à 72°C). L'intensité de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation. A la fin de la PCR, on réalise une étape dite de dissociation permettant d'obtenir des courbes de fusion et ainsi déterminer le T_m de chaque produit synthétisé. Pour ce faire, la température augmente de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C toutes les 10 s.

Les résultats sont normalisés par rapport au témoin interne, la gapdh, et exprimés en nombre de copies pour 10⁷ copies de gapdh.

La détermination du nombre de copies est effectuée à partir de la formule suivante :

$$\text{Copies/mL} = (N \times C_{260}) / PM$$

Dans cette formule, N représente le nombre d'Avogadro (6,023.10²³), C la concentration mesurée à une DO de 260 nm, et PM le poids moléculaire.

Une fois le nombre de copies déterminé, il est ainsi possible de réaliser une gamme de dilution de 10² à 10⁷ copies, ceci afin de vérifier que l'amplification observée est proportionnelle à la quantité de séquence cible initiale. Pour cela, l'efficacité de PCR (E) est calculée grâce à la formule suivante :

$$E = 10^{(-1/\text{pente})}$$

L'efficacité de PCR doit être comprise entre 90%<E<100%, ou une pente comprise entre -3,59<pente<-3,10.

Nous pouvons donc comparer les résultats entre eux, en les normalisant par rapport au témoin interne (propre à chaque échantillon), la GAPDH, et exprimés en nombre de copies pour 10^7 copies de *gapdh*. Pour déterminer le nombre de copies dans l'échantillon par rapport à la *gapdh*, nous avons utilisé une méthode de quantification relative en appliquant la formule du $2^{-\Delta Ct}$.

Il est à noter que chaque mesure a été effectuée 4 fois de façon indépendante, et chaque point a été réalisé en 3 exemplaires pour chaque échantillon.

3. Manipulation des protéines

3.1. Expression et purification des protéines produites dans les bactéries

3.1.1. Expression des APOBEC3

Les protéines APOBEC3DE, 3F et 3G sont produites dans la souche d'*E.coli* BL21 (DE3), les protéines APOBEC3B dans la souche d'*E.coli* C41 (DE3).

3.1.1.1. Production en absence de protéines chaperonnes

Les bactéries transformées avec le plasmide pET32a sont cultivées à 37°C dans 300 ml de milieu LB, en présence d'ampicilline (100 µl/ml). Lorsque la densité optique à 600 nm de la culture atteint une valeur d'environ 0,8, l'expression de la protéine APOBEC3 est induite par addition d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après 3 heures, les bactéries sont collectées par centrifugation pendant 20 min à 4 000 rpm, puis congelées à -80°C.

3.1.1.2. Production en présence de protéines chaperonnes

Les bactéries co-transformées avec les plasmides recombinants pET32a-APOBEC3 et pG-KJ8 qui code pour les chaperonnes GroEs-GroEL, sont cultivées dans 150 ml de milieu LB, en présence d'ampicilline (100 µg/ml), de chloramphénicol (20 µg/ml), de tétracycline (10 mg/ml), et de glucose (20 mM final), à 42°C. La présence de tétracycline permet l'induction des protéines chaperonnes. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint une valeur de 1, la culture est centrifugée à 4 000 rpm pendant 10 min. Le culot est repris avec 300 ml de milieu de LB, et la production de la protéine APOBEC3 est induite par addition d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après incubation pendant la nuit à 16°C sous agitation, les bactéries sont récupérées par centrifugation à 4 500 rpm pendant 10 min, puis congelées à -80°C.

3.1.2. Extraction des protéines

Le culot bactérien est repris dans 50 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,1 mM DTT, inhibiteurs de protéases), puis 2,25 ml de lysosyme (20 mg/ml) sont ajoutés. Le mélange est laissé 10 à 30 minutes à température ambiante, jusqu'à ce qu'il devienne visqueux. Puis, 750 µl de DNase (RQ1 RNase free DNase Promega) sont ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, le mélange est soumis à un traitement par ultrasons, d'au moins 3 pulsations de 20 secondes. Le lysat est centrifugé 20 minutes à 4 000 rpm. Le surnageant est placé à 4°C, le culot est stocké à -80°C.

3.1.3. Solubilisation des protéines à partir des corps d'inclusion

Le culot obtenu après la lyse bactérienne est resuspendu dans 20 ml de tampon de lyse à l'aide des ultrasons avec 3 pulsations de 20 secondes à 4°C. Les protéines resuspendues sont centrifugées pendant 10 min à 4 000 rpm. Le culot est repris dans 20 ml de tampon TEDU (100 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 2% Triton X-100, 5 mM DTT, 2 M urée, contenant des inhibiteurs de protéases). Après un traitement de 2 pulsations de 10 secondes aux ultrasons, le lysat est centrifugé 10 min à 8 000 rpm. Cette étape de lavage au tampon TEDU est répétée 5 fois. Le culot est ensuite repris dans 3 ml d'un tampon CAPS 50 mM pH 11,

contenant 0,3% N-lauroylsarcosine. Après un traitement par ultrasons de 2 pulsations de 5 secondes, la solution protéique est centrifugée 20 min à 15 000 rpm. Le surnageant est récupéré et dialysé sur la nuit à 4°C, dans 1 L de tampon Tris-HCl 50 mM pH8, 0,1 mM DTT). Le lendemain, après une centrifugation de 10 min à 15 000 rpm, le volume du surnageant est mesuré et du Dowex 50% y est rajouté, à raison de 3 µl de dowex pour 100 µl de surnageant. Après une incubation de 15 minutes à 4°C, sous agitation, le surnageant est récupéré pour être aliquoté en 50% glycérol et stocké à -20°C.

3.1.4. Purification des protéines solubles sur colonne de nickel

Le lysat de bactéries dans lequel les APOBEC3 ont été produites en présence des chaperonnes est obtenu comme décrit précédemment. Le surnageant contenant les protéines solubles est injecté sur une colonne de 1 ml HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) à raison de 0,5 ml/min, puis la colonne est lavée par 5 volumes d'une solution de lavage (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 50% glycérol) jusqu'à l'obtention d'une DO₂₆₀ nulle. L'élution des protéines fixées sur la colonne se fait par passage d'une solution contenant de l'imidazole (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 250 mM imidazole, 50% glycérol). Les fractions contenant les protéines éluées sont ensuite groupées et stockées à -20°C.

3.2.Expression et purification des protéines de cellules de mammifères

3.2.1. Expression et extraction des protéines

Les cellules sont transfectées avec le plasmide pcDNA3 qui permet l'expression des différentes APOBEC3 étiquetées en position N-ter ou C-ter avec une étiquette TAP-tag. Au bout de 72 heures, les cellules sont lavées 3 fois en PBS puis centrifugées 2 min, 2 000 rpm à température ambiante. Après 3 cycles de congélation/décongélation, les cellules sont reprises dans le lysis buffer 2X (100 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 10% Glycérol, 0,4%

Tween 20, 3 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, inhibiteurs de protéases (Roche)) et incubées 15 minutes dans la glace.

3.2.2. Purification des complexes protéiques par TAP-tag (FPLC)

500 µl de billes d'IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare) sont lavées 3 fois avec le lysis buffer 2X par des centrifugations successives, puis incubées avec l'extrait protéique, 3h à 4°C sous agitation. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les billes sont lavées 4 fois avec le lysis buffer 2X, 1 fois avec le TEV cleavage buffer (10 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2% Tween 20). Les billes sont incubées 1h à 16°C avec 100 unités d' AcTEV™ protéase (Invitrogen). Le surnageant récupéré est ajusté à 2 mM CaCl₂ est déposé à 0,1 ml/min sur une colonne calmoduline (500 µl de billes - Calmoduline Sepharose™ 4B, GE Healthcare - équilibrées en TEV cleavage buffer + 2 mM CaCl₂). La colonne est ensuite lavée avec le tampon final (50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 20% Glycérol, 0,2% Tween 20) + 2 mM CaCl₂. Les protéines fixées sur la colonne calmoduline sont ensuite éluées avec le tampon final + 2 mM EGTA, et stockées à -20°C.

3.2.Dosage des protéines

La concentration en protéines présentes est déterminée grâce à la méthode colorimétrique décrite par Bradford (1976). Pour cela, 1 ml de réactif de Bradford (BIORAD) dilué au 1/5 est ajouté à 1 µl d'échantillon protéique dont la concentration est à déterminer. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, le DO à 595 nm des échantillons est mesurée. Une courbe étalon est obtenue dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA).

3.3.Gels de protéines et Western blot

3.3.1. Séparation électrophorétique des protéines

Les protéines préalablement mélangées avec 10 µl de tampon de charge (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol) sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Celui-ci est composé d'un gel de séparation (12,3% acrylamide, 0,33% bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% NH₄-persulfate (APS), 0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)) au sommet duquel est coulé un gel de concentration (5% acrylamide, 0,13% bisacrylamide, 126 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris-Glycine (25 mM Tris-Base pH 8,3, 192 mM glycine, 0,1 % SDS), à 80 V jusqu'à l'entrée des protéines dans le gel de concentration, et à 160 V jusqu'à l'arrivée du bleu de bromophénol à la fin du gel de séparation. La masse moléculaire d'une protéine peut être évaluée par comparaison avec la migration des marqueurs de taille PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

3.3.2. Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, le gel est incubé pendant 1 heure dans une solution de coloration contenant 0,1% de bleu de Coomassie R250, 40% de méthanol et 20% d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré pendant 1 heure dans un mélange 30% méthanol, 10% acide acétique.

3.3.3. Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est réalisée grâce au kit ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma®), selon les recommandations du fournisseur. Les ions argent liés à la protéine sont réduits par le formaldéhyde à pH alcalin et forment un dépôt d'argent métallique dans le gel.

3.3.4. Western blot

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane Immobilon P (Millipore) préalablement immergée dans du méthanol, à l'aide de l'appareil Milliblot™ Graphit Electrobloter System (Millipore). Le gel est incubé 15 minutes dans le tampon

cathode (25 mM Tris-Base, 20% méthanol, 40 mM glycine). Le transfert est réalisé de la manière suivante : 2 papiers Whatman 3MM sont préalablement plongés dans du tampon anode 1 (300 mM Tris-Base, 20% méthanol) et déposés sur l'anode. A ces 2 premiers papiers sont superposés un papier Whatman 3MM imbibé du tampon anode 2 (25 mM Tris-Base, 20% méthanol), et la membrane Immobilon P qui a été préalablement immergée dans du méthanol, puis imbibée du tampon anode 2. Ensuite, le gel de polyacrylamide est placé sur la membrane, suivi de 3 papiers Whatman 3MM préalablement plongés dans le tampon de la cathode. Le transfert est effectué avec une intensité de 2.5 mA/cm^2 pendant 30 minutes.

Après transfert, la membrane est lavée dans du tampon TTBS (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 155 mM NaCl, 0,1% Tween 20), pendant 30 minutes. Elle est ensuite incubée toute la nuit sous agitation avec l'anticorps primaire, à température ambiante. Le lendemain matin, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes avec le tampon TTBS. Après une incubation d' 1 heure à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, la membrane est à nouveau lavée 3 fois pendant 10 minutes avec du tampon TTBS, puis 3 fois pendant 10 minutes avec le tampon TBS (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 155 mM NaCl). Elle est ensuite révélée par incubation dans une solution de révélation (0,05% chloronaphtol, 16,6% méthanol, 0,05% H_2O_2 , TBS). La réaction est arrêtée par immersion de la membrane dans l'eau.

3.4. Test Elisa

Les protéines sont fixées sur une plaque 96 puits toute une nuit, sous agitation à 4°C , en présence de 200 μl de tampon de couplage (16 mM carbonate de sodium, 34 mM bicarbonate de sodium, pH 9,6) par puit. Après 6 lavages au PBS 1X Tween20 0,05%, l'étape de saturation est réalisée pendant 1h à $T^\circ\text{C}$ ambiante sous agitation, en présence de 200 μl PBS 1X. Après 6 lavages au PBS 1X Tween20 0,05%, 100 μl d'une solution de PBS 1X Tween20 0,05% contenant l'anticorps primaire (1/5000 pour Ac anti S-tag) sont déposés dans chaque puit. Après 2 heures d'incubation à 37°C , suivies de 6 lavages au PBS 1X Tween20 0,05%, 200 μl d'une solution PBS 1X Tween20 0,05% contenant l'anticorps secondaire (1/5000 pour anti-lapin peroxydase) sont déposés dans chaque puit. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, et sous agitation, les puits sont lavés avec du PBS 1X Tween20 0,05%.

La révélation s'effectue suite à l'ajout de 100 µl d'une solution contenant de l'H₂O₂ et de l'ABTS (2,2'azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) dilué à 375 mM dans le l'acide citrique ajusté à pH4. Au bout de 10 minutes, une coloration verte apparaît dans les puits qui réagissent positivement. Les résultats de la plaque sont lus à 405 nm.

4. Tests *in vitro*

4.1. Marquage et purification des oligonucléotides

Les oligonucléotides, vprC et vprU, sont purifiés sur gel 12% polyacrylamide/7M urée. Ils sont visualisés sur plaques en couche mince recouverte de fluorescéine illuminée par une lampe UV à 254 nm. Ils sont élués du gel dans une solution 0,5 M acétate ammonium, EDTA 1mM, SDS 0,1%, toute une nuit à 4°C. Ils sont ensuite précipités avec 2 volumes d'éthanol 100% et repris dans 20 µl d'H₂O, et la DO est mesurée.

Les oligonucléotides sont marqués à leur extrémité 5' avec du [γ -P³²]ATP (Perkin Elmer). Pour cela, dans un volume final de 20 µl, 60 pmoles de substrat, 15 unités de T4 polynucléotide kinase (Promega), 2 µl de tampon kinase 10X et 7 µl de [γ -P³²]ATP (6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) sont incubés 1 heure à 37°C. Les substrats ainsi radiomarqués sont purifiés à l'aide de colonnes « microspin™ G25 » (Amersham Pharmacia Biotech) dans le but d'éliminer l'excédent d'ATP libre. La radioactivité des solutions est déterminée au moyen du compteur Wallac 1409.

4.2. Test de désamination

4.2.1. Test réalisé en présence d'UDG

1 pmole de substrat est incubée pendant 2 heures à 37°C, en présence ou non de 10 pmoles d'APOBEC3, dans un tampon de réaction (50 mM HEPES pH 7,0, 15 mM NaCl, 15 mM Mg(Aspartate)₂, 130 mM K-acétate, 1 mM DTT, 5% PEG 6000). Après une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C, du DTT (1 mM final) et du Tris HCl pH 8 (20 mM final)

sont ajoutés, suivi de l'ajout de 5 unités d'UDG (New England Biolabs). Le mélange est incubé 30 min à 37°C. Une étape d'hydrolyse alcaline des sites abasiques est réalisée par l'action du NaOH (0,15 M final). Le mélange est incubé 30 min à 65°C. Les échantillons sont repris dans du tampon de charge dénaturant 98% formamide (98 % formamide, 10 mM EDTA pH 8, 0,025% xylène cyanol FF, 0,025% bleu bromophénol), dénaturés 3 minutes à 95°C. 5 000 cpm sont déposés sur un gel 12% polyacrylamide/7M urée. L'électrophorèse est réalisée à 30W, 400V, 25mA. Le gel est séché sous vide puis soumis à autoradiographie une nuit à -80°C avec les films « Biomax » (Kodak). La taille des fragments est déterminée par comparaison avec le marqueur de taille Oligonucleotide Sizing Markers (8-32 bases) (GE Healthcare Life Sciences).

4.2.2. Test réalisé en présence de GAPDH

Le principe de ce test est le même que celui décrit ci-dessus. Il diffère de ce dernier en 2 points : l'ajout de 10 pmoles de GAPDH dès le début de la réaction et l'absence d'utilisation d'UDG dans la réaction.

4.3. Expérience de retard sur gel

1 pmole de substrat est incubée en présence ou non de 10 pmoles d'APOBEC3 et 10 pmoles de GAPDH dans un tampon de réaction (50 mM HEPES pH 7,0, 15 mM NaCl, 15 mM Mg(Aspartate)₂, 130 mM Kacétate, 1 mM DTT, 5% PEG 6000). Des contrôles sans APOBEC3 ou sans GAPDH ont aussi été réalisés. Pour l'analyse électrophorétique, 5 000 cpm des échantillons repris dans du tampon de charge non dénaturant (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0,1% xylène cyanol FF, 0,1% bleu de bromophénol, 30 % glycérol) sont déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant de 6% comme décrit précédemment.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1

Etude de l'expression des apobec3 dans les cellules et
de leur activité sur l'orf vpr

En travaillant sur des cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1, un processus d'édition a pu être mis en évidence sur le génome de ce virus au laboratoire (Bourara *et al.*, 2000). Parallèlement à ces travaux, une première description des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 chez l'homme a été réalisée (Jarmuz *et al.*, 2002). Depuis, de nombreux travaux ont été menés afin d'élucider le mécanisme de restriction virale qui leur a été attribué par la suite. La première partie du travail présenté ici a pour objectif de faire le lien entre ces différentes études et de mettre en évidence les cytidines désaminases impliquées dans l'état chronique de ces cellules ou chez des patients non progresser à long terme.

1. Cytidines désaminases de la famille APOBEC3 et infection par le virus du VIH-1

1.1. Cytidines désaminases de la famille APOBEC3 et infection chronique par le VIH-1

1.1.1. Etude d'un effet antiviral potentiel des cytidines désaminases de famille APOBEC3 dans les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1

Une des régions la plus modifiée dans le modèle de cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1 étudié au laboratoire est l'ORF *vpr*. L'ADN proviral correspondant à *vpr* a été amplifié, cloné et séquencé (**Figure 11**).

1/1

ATG	GAA	CAA	GCC	CCA	GAA	GAC	CAA	GGG	CCA	CAG	AGG	GAG	CCA	CAC
M	E	Q	A	P	E	D	Q	G	P	Q	R	E	P	H
AAT	GAA	TGG	ACA	CTA	GAG	CTT	TTA	GAG	GAG	CTT	AAG	AAT	GAA	GCT
N	E	W	T	L	E	L	L	E	E	L	K	N	E	A
GTT	AGA	CAT	TTT	CCT	AGG	ATT	TGG	CTC	CAT	GGC	TTA	GGG	CAA	CAT
V	R	H	F	P	R	I	W	L	H	G	L	G	Q	H
ATC	TAT	GAA	ACT	TAT	GGG	GAT	ACT	TGG	GCA	GGA	GTG	GAA	GCC	ATA
I	Y	E	T	Y	G	D	T	W	A	G	V	E	A	T
ATA	AGA	ATT	CTG	CAA	CAA	CTG	CTG	TTT	ATC	CAT	TTC	AGA	ATT	GGG
I	R	I	L	Q	Q	L	L	F	I	H	F	R	I	G
TGT	CGA	CAT	AGC	AGA	ATA	GGC	GTT	ACT	CAA	CAG	AGG	AGA	GCA	AGA
C	R	H	S	R	I	G	V	T	R	Q	R	R	A	R
AAT	GGA	GCC	AGT	AGA	TCC	TAG								
N	G	A	S	R	S	*								

Figure 11 : Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de *vpr* dans les cellules chroniquement infectées par le VIH-1.

Les flèches de petite taille indiquent que les transitions conduisent à des mutations sens (→) ou silencieuses (→), alors que les flèches de grande taille (→) indiquent que les changements conduisent à mutations non sens ou à une inhibition de l'épissage.

L'analyse des séquences provirales de *vpr* dans les cellules H9/LAI chroniquement infectées par le virus du VIH-1 montre 3 transitions C-T et 10 transitions G-A, les transitions G-A seraient le reflet de la désamination de C sur le brin complémentaire. Sur ces 13 modifications, 6 peuvent conduire à une inactivation de *vpr* puisqu'elles créent des codons stop. Il est intéressant de noter qu'une des modifications concerne le motif TGGG qui est changé en TAGG. Or, ce tétramère a été décrit comme étant une séquence inhibitrice de l'épissage alternatif (Del Gatto *et al.*, 1996). En effet, dans un contexte hétérologue, cette séquence est aussi capable d'abolir complètement l'épissage d'un exon alternatif du gène de la fibronectine chez le rat (Del Gatto *et al.*, 1996). Toutefois, l'action inhibitrice de cette séquence n'est possible que si elle est associée à un site faible d'épissage. Par ailleurs, une séquence inhibitrice CAA(UAG)₃ a été identifiée au niveau d'un petit exon cryptique situé du gène *env* (Wentz *et al.*, 1997). Il semble donc que le motif TAGG créé suite à une transition

G-A soit capable de provoquer l'inhibition de l'épissage des ARNm au niveau du site accepteur d'épissage de *vpr*. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Jacquenet et al. (2001) sur les sites inhibiteurs d'épissage (ESS) situés au sein de l'exon 2 de *tat*. Au cours de cette étude, un deuxième site ESS (ESS2p) a été mis en évidence au sein cet l'exon 2, en 5' du site d'épissage, le premier (ESS2) étant situé à environ 60 nucléotides en 3' de ce même site d'épissage (Amendt *et al.*, 1994; Amendt *et al.*, 1995; Si *et al.*, 1997). Il a aussi été montré que la protéine hnRNP se fixe à cet élément inhibiteur ESS2p. De plus, deux substitutions U-C au sein de cet élément ESS2p conduisent à une diminution de l'affinité de la protéine hnRNP, concomitante avec une augmentation de l'efficacité d'épissage. Ces résultats suggèrent que la protéine hnRNP est directement impliquée dans l'inhibition de l'épissage. La comparaison de cet élément ESS2p entre 61 souches de VIH-1 des groupes M, N et O, et de SIV, a permis de mettre en évidence une forte conservation d'une séquence UUGG. Lors de ces mêmes analyses, pour certaines souches, le deuxième résidus U de ce motif, en position 5362, au niveau de la séquence codante de *vpr*, peut être remplacé par un C ou un A, ce qui n'altère pas la capacité codante de l'ARN. Il apparaît donc que l'élément ESS2p est important pour la propagation du virus du VIH-1. Ainsi, au sein de la séquence de *vpr*, la conversion du résidus G en A au sein de la séquence UUGGGUU empêcherait la fixation de la protéine hnRNP, interférant ainsi avec l'épissage et donc avec la multiplication du virus dans les cellules infectées.

Chez l'homme, par similarité de séquence avec APOBEC1, plusieurs protéines susceptibles de posséder une activité cytidine désaminase ont été décrites, toutes présentant au moins une copie du site actif caractéristique de ces enzymes (Holmes *et al.*, 2007b; Jarmuz *et al.*, 2002). Dans la mesure où les APOBEC3 sont décrites comme étant ubiquitaires (Jarmuz *et al.*, 2002; Sheehy *et al.*, 2003), et afin d'appuyer l'hypothèse selon laquelle ces protéines seraient responsables des mutations observées dans les cellules H9/LAI, nous avons voulu confirmer leur présence dans ces cellules, par RT-PCR. Des différences d'expression de ces désaminases pouvant avoir un impact sur l'activité antivirale qui leur est attribuée, nous avons voulu évaluer la quantité de ces dernières. La technique de RT-PCR classique ne permettant pas d'accéder à cette information, il nous a fallu développer une méthode de RT-PCR quantitative.

1.1.1.1. Identification des cytidines désaminases exprimées dans les lignées lymphocytaires chroniquement infectées par le virus du VIH-1 ou non

Dans un premier temps, avant de quantifier les *apobec3*, nous avons vérifié leur expression dans les cellules, par RT-PCR, chaque couple d'amorces ayant été préalablement testé pour sa spécificité d'amplification.

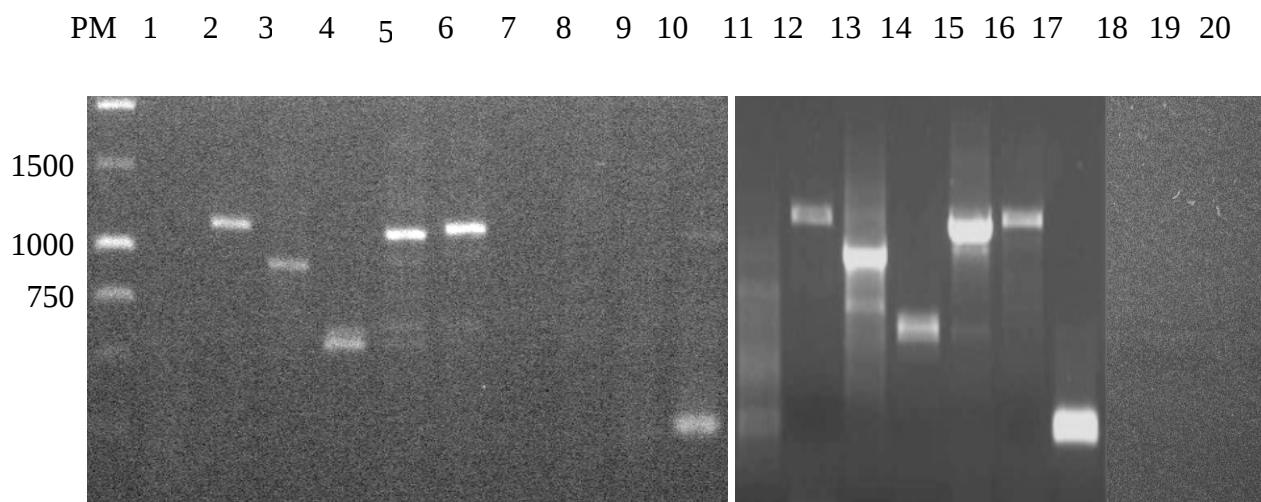


Figure 12 : Détection des cytidines désaminases exprimées dans les lignées lymphocytaires saines H9, et chroniquement infectées par le virus du VIH-1, H9/LAI.

Les résultats sont donnés des pistes 1 à 10 pour les cellules H9, et des pistes 11 à 20 pour les cellules H9/LAI. *Apobec3A* : pistes 1 et 11, *apobec3B* : pistes 2 et 12, *apobec3C* : pistes 3 et 13, *apobec3DE* : pistes 4 et 14, *apobec3F* : pistes 5 et 15, *apobec3G* : pistes 6 et 16, *apobec1* : pistes 7 et 18, *apobec2* : pistes 8 et 19, *aid* : pistes 9 et 20, l'*actine* utilisée comme gène de ménage : pistes 10 et 17.

Parmi les cytidines désaminases de la famille APOBEC3, toutes sauf *apobec3A* sont exprimées dans ces cellules (pistes 1 à 6 et 11 à 16). Comme attendu, *apobec1*, *apobec2* et *aid* ne sont pas exprimées dans les cellules H9 et H9/LAI (pistes 7, 8, 9, 17, 18 et 19) (Chen *et al.*, 1987; Liao *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 1987). Ainsi, nous pouvons penser que toutes ou une partie de ces isoformes pourraient être responsables des modifications qui ont été observées sur le génome du VIH-1 dans les cellules H9/LAI. D'autre part, ces résultats semblent indiquer qu'il existe des différences d'expression de ces isoformes au sein des cellules H9 et

des cellules H9/LAI. Afin de confirmer cela, et pour savoir si de telles différences d'expression existent au sein et entre ces deux types cellulaires, nous avons développé une technique de dosage des différentes *apobec3* par RT-PCR quantitative.

1.1.1.2. Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans les lignées lymphocytaires chroniquement infectées par le virus du VIH-1 ou non

a. Mise au point de la RT-PCR quantitative

Lors de la mise en place de cette technique, nous avons dissocié les étapes de transcription inverse et de PCR.

Afin de corriger les variations expérimentales, une normalisation des données est nécessaire. Nous avons pour cela, décidé d'utiliser la *gapdh* comme témoin endogène. Toutefois, il faut que ce dernier ne soit pas sujet à des variations d'expression au cours de la croissance et du vieillissement cellulaire. Pour vérifier cela, nous avons mesuré l'expression de la *gapdh* au sein de 3 échantillons issus de cellules de passages différents. Nous avons choisi les passages 2, 7 et 14 qui correspondent, respectivement, à 1 semaine, 3 semaines ½ et 7 semaines de culture après la décongélation, la passage 14 étant le passage maximum que nous réalisons.

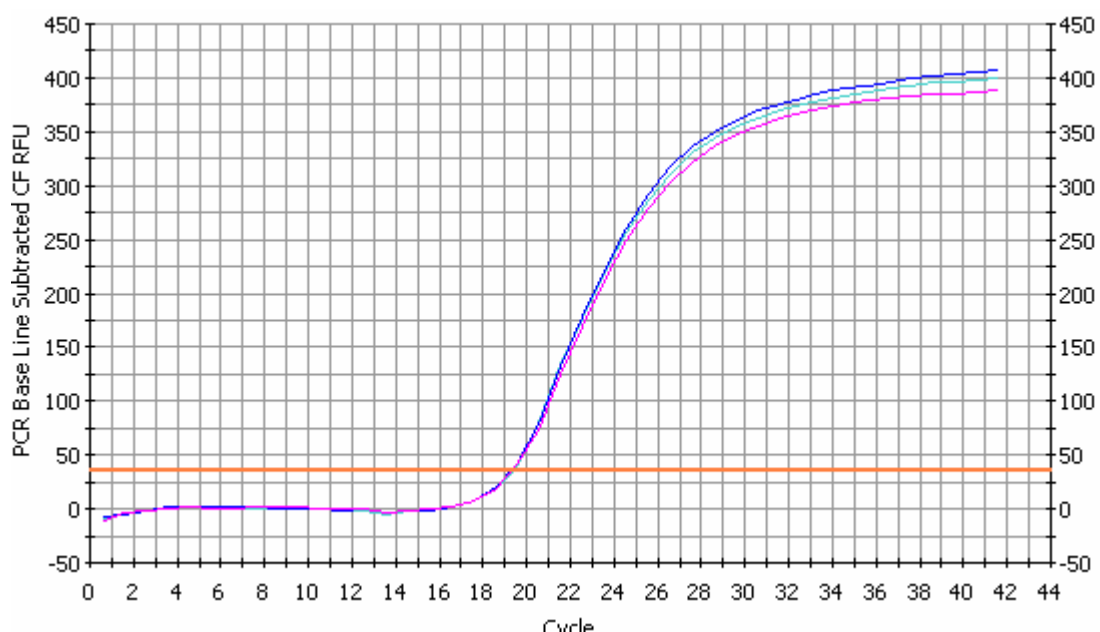


Figure 13 : Mesure de l'expression de la *gapdh*

La *gapdh* a été mesurée au sein de 3 échantillons de culture d'âge différent. La courbe en bleu foncé correspond aux cellules âgées d'1 semaine (2^{ème} passage), la courbe en bleu clair aux cellules âgées de 3 semaines ½ (7^{ème} passage), et la courbe violette aux cellules âgées de 7 semaines (14^{ème} passage).

Les résultats obtenus lors de cette expérience, montrent clairement que la *gapdh* est présente en quantité constante, indépendamment de l'âge de la culture cellulaire. Le gène *gapdh* est donc adéquat comme témoin interne pour les analyses d'expression par qPCR dans les conditions expérimentales que nous utilisons.

Toujours dans une idée d'optimisation, et afin d'obtenir un meilleur signal de détection du produit PCR, nous avons décidé de vérifier la réponse en faisant varier la source de cDNA lors de l'étape de transcription inverse. Pour cela, les cDNA correspondants ont été obtenus par reverse transcription à partir des ARN totaux, soit avec des hexamers de séquence aléatoires, « random primers » (cDNA_{tot}), soit par amorçage avec de l'oligo dT (cDNA_m). Afin d'évaluer la réponse avec les deux types de cDNA, l'expression de la *gapdh* a été analysée aux mêmes passages que précédemment.

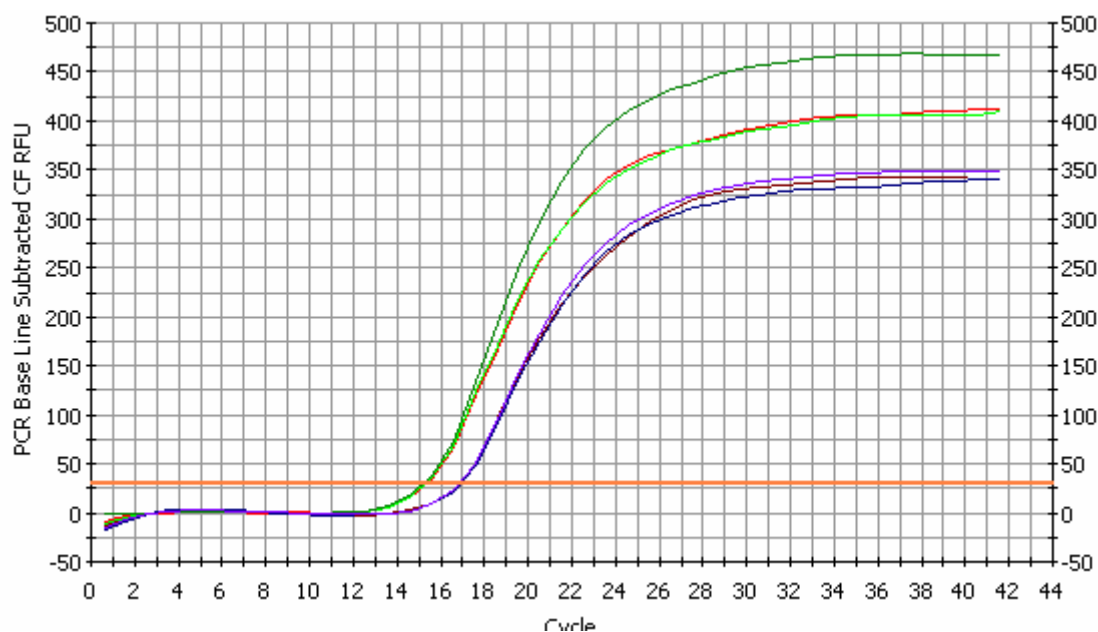


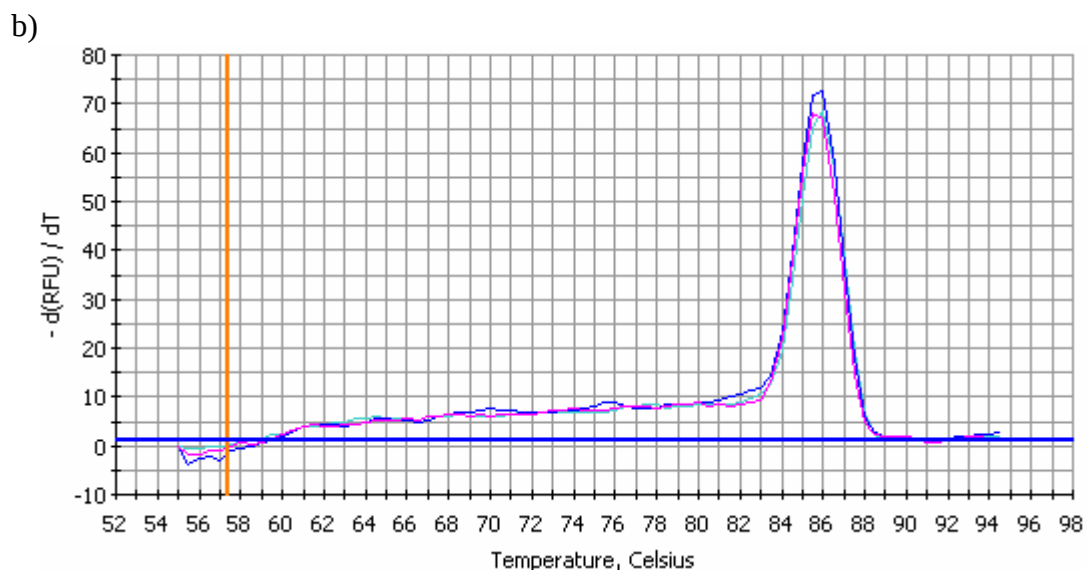
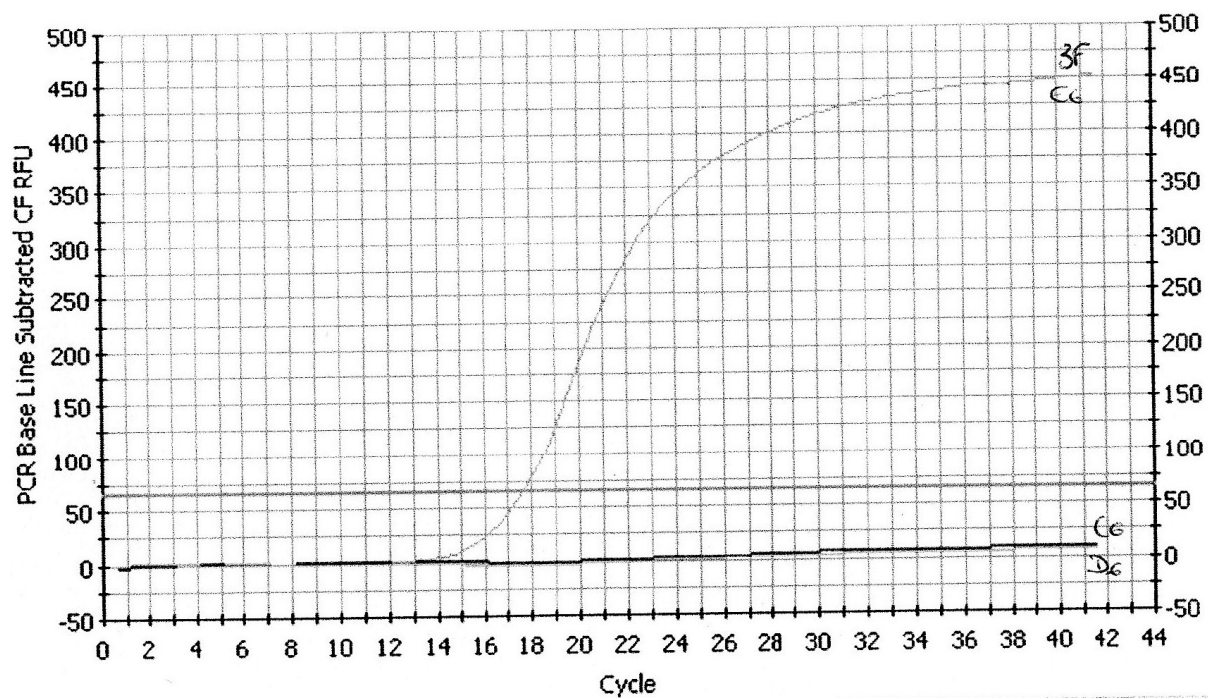
Figure 14 : Mesure de l'expression de la *gapdh*

La *gapdh* a été mesurée, à partir des cDNA_{tot} et cDNA_m, au sein de 3 échantillons de culture d'âge différent. Les courbes en vert foncé, rouge et vert clair, obtenues à partir des cDNA_m, correspondent aux mesures réalisées à partir des cellules âgées de 1, 3 ½ et 7 semaines respectivement. Les courbes en violet, bordeaux et bleu foncé, obtenues à partir des cDNA_{tot}, correspondent aux mesures réalisées à partir des cellules âgées de 1, 3 ½ et 7 semaines respectivement.

Nous pouvons observer une différence du signal de détection. En effet, il apparaît clairement que comparativement aux cDNA_{tot}, les cDNA_m permettent d'obtenir un signal de détection plus précoce de 2 Ct ; le Ct appelé aussi cycle seuil correspondant au nombre de cycles à partir duquel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Comme précédemment, ces résultats montrent que l'ARN_m de la *gapdh* est en quantité constante au sein des échantillons, indépendamment de l'âge de la culture cellulaire. Ces données montrent que l'utilisation d'oligonucléotides poly(dT) au cours de l'étape de reverse transcription permet d'obtenir une meilleure détection.

Une contrainte majeure pour la mise en place de cette technique a porté sur le choix des amorces pour l'amplification des différentes désaminases. En effet, ces dernières exhibent de fortes similarités de séquences, et certaines présentent des duplications de séquence. De plus, les amorces doivent permettre l'amplification d'un fragment d'une taille comprise entre 50 et 250 pb, de façon à ce que l'élongation ne soit pas une étape limitante. A cause de leur forte similarité de séquence, nous avons vérifié que chaque couple d'amorce est bien spécifique de la désaminase ciblée et n'est pas capable d'amplifier les autres. Pour cela, nous avons testé chaque couple d'amorces sur les différentes séquences de désaminases. La confirmation de la présence d'un seul produit d'amplification peut se faire au travers de la courbe de fusion et de l'analyse sur gel d'agarose.

a)



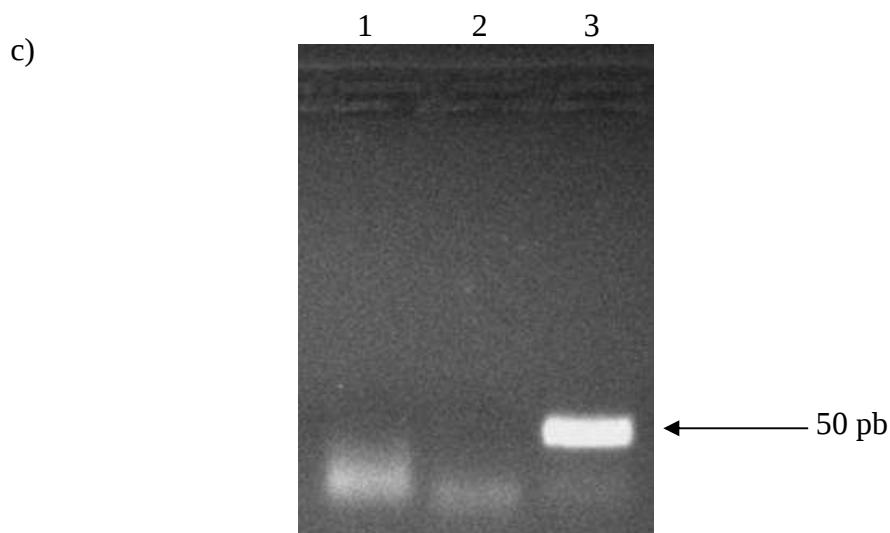


Figure 15 : Vérification de la spécificité des amorces pour l'amplification d'*apobec3F*

- a- Cinétique d'amplification d'*apobec3F* avec les différents couples d'amorces
- b- par analyse de la courbe de fusion (variation de la fluorescence en fonction de la température)
- c- par analyse du produit PCR sur gel d'agarose. Piste 1 : H₂O, piste 2 : échantillon n'ayant pas subi l'étape de revers transcription, piste 3 : 30 ng de cDNA

Dans l'exemple montré dans la figure 15, les couples d'amorces 3A(S/AS), 3B(S/AS), 3C(Sbis/ASbis), 3D(S/AS), 3F(S/AS) et 3G(S/AS) ont été testés sur la séquence d'*apobec3F* clonée dans le plasmide pGEMT-easy. Seul le couple 3F(S/AS) permet d'obtenir une amplification (**Figure 15-a**). Ces résultats confirment la spécificité du couple d'amorces pour la désaminase ciblée. L'analyse de la courbe de fusion correspondante révèle la présence d'un seul pic, ce qui confirme la présence d'un seul produit d'amplification (**Figure 15-b**). Dans le cas où plusieurs produits auraient été amplifiés, nous aurions observés des épaulements au niveau de ce pic, voire plusieurs pics. Le dépôt sur gel d'agarose confirme que le produit amplifié a bien la taille attendue (**Figure 15-c**). Un résultat similaire a été obtenu avec les désaminases APOBEC3B, 3C, 3DE et 3G.

Afin de vérifier si dans les conditions utilisées la quantité de produit PCR obtenue est proportionnelle à la quantité de séquence cible mise initialement, nous avons réalisé une

gamme de dilution de plasmide de 10^2 à 10^7 copies du plasmide contenant le gène d'*apobec3F* (voir Matériels et Méthodes).

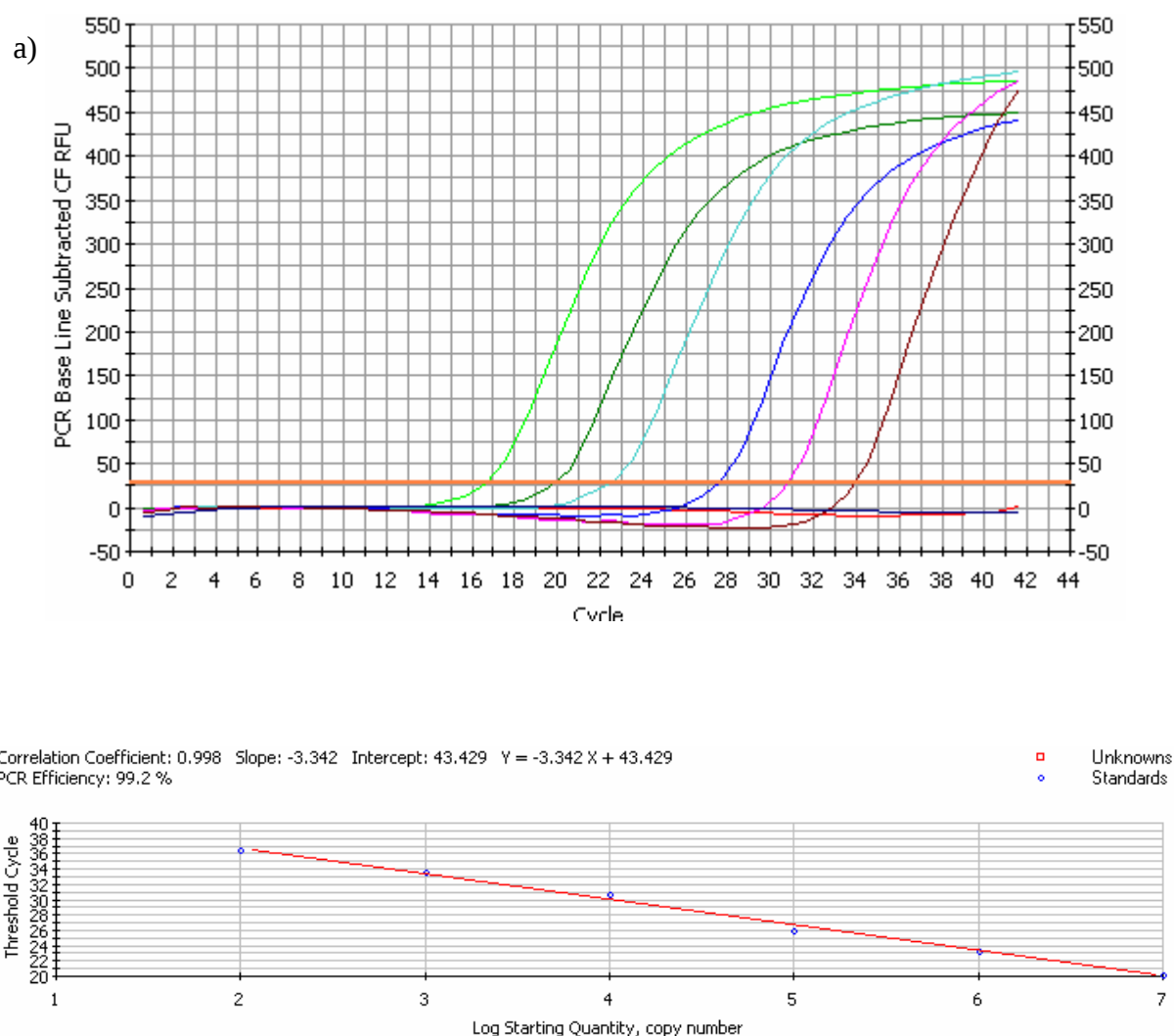


Figure 16 : Mesure de l'efficacité de la PCR

a-amplification des différentes dilutions issues du plasmide pGEMT-easy contenant la séquence d'*apobec3F*

b-gamme étalon qui représente la valeur de Ct obtenus expérimentalement en fonction de la quantité de séquence cible mise initialement exprimée en nombre de copies.

Dans les conditions que nous avons définies, une réponse parfaitement proportionnelle avec une efficacité de PCR de 99,2% a été obtenue, et ce pour tous les couples d'amorces utilisés avec les matrices respectives.

Les différents paramètres relatifs à cette méthode ayant été testés et validés, il nous est alors possible de quantifier l'expression des différentes désaminases.

b. Expression des différentes cytidines désaminases dans les cellules H9 et H9/LAI

Pour chaque mesure réalisée dans les cellules H9 et H9/LAI nous avons utilisé 30 ng de cDNA. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à la *gapdh*, utilisée comme gène de référence.

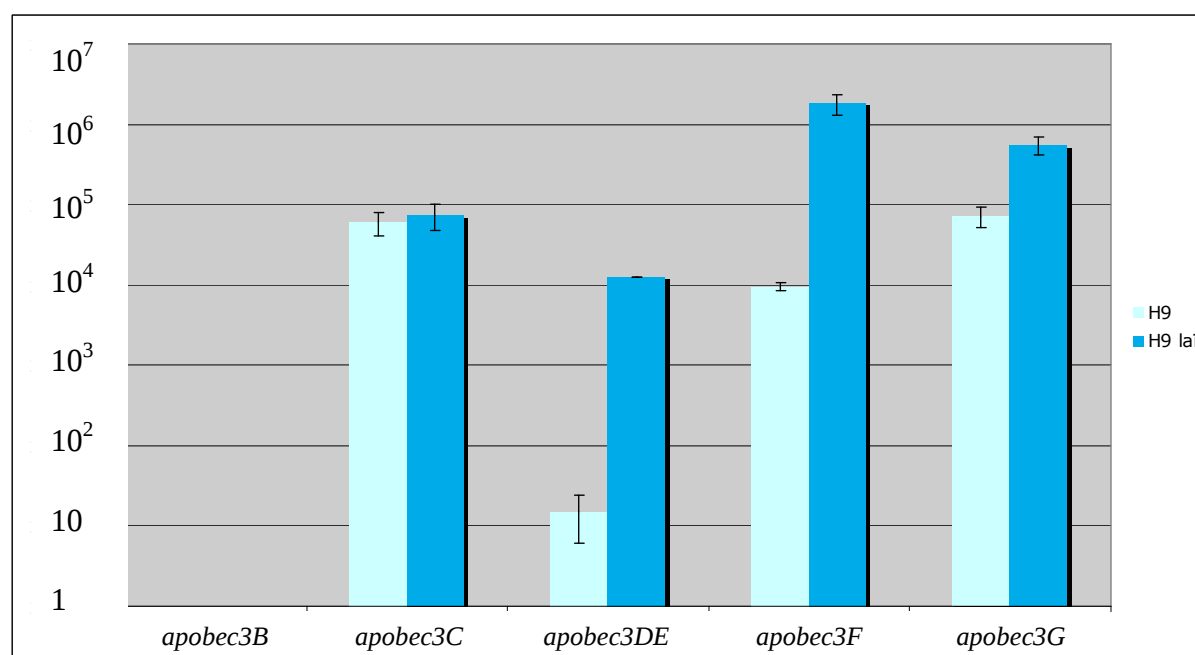


Figure 17: Expression des *apobec3* dans les cellules lymphocytaires saines (H9) et chroniquement infectées par le virus du VIH-1 (H9/LAI).

L'axe des abscisses indique les différentes désaminases, et l'axe des ordonnées, le nombre de copies de ces dernières après normalisation par rapport au gène de référence.

Nous pouvons observer une augmentation de l'expression d'*apobec3DE*, *3F* et *3G* de 830, 190 et 8 fois respectivement dans les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1, par contre *apobec3C* ne montre pas de variation.

Ce résultat semble appuyer l'hypothèse selon laquelle l'expression accrue d'une ou plusieurs cytidines désaminases de la famille APOBEC3 pourrait être responsable de l'apparition de mutations au niveau de la séquence provirale pouvant conduire à la formation de virus défectifs, et ainsi être impliquée dans la chronicité de l'infection dans ces cellules. En effet, il faut noter que sur les 13 modifications observées sur la séquence provirale de *vpr* dans les cellules chroniquement infectées, 7 sont retrouvées dans un contexte nucléotidique 5'-CC caractéristique de la protéine APOBEC3G (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), et 2 dans un contexte 5'-TC caractéristiques des autres cytidines désaminases (Bishop *et al.*, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004).

1.1.2. Etude d'un effet antiviral potentiel des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 chez des patients non progressseurs à long terme (NPLT)

Les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH -1 sont capables de maintenir une faible production virale, et ne meurent pas de l'infection par le virus. Parmi les personnes qui sont infectées par le virus du VIH-1, certaines ne présentent pas les manifestations cliniques classiques qui découlent de cette infection. En effet, malgré leur séropositivité établie, ces personnes restent pendant une longue période dans un état asymptomatique (au moins 10 ans). Elles présentent alors un taux de CD4 normal et une charge virale basse voire indétectable pour certains, tout ceci en l'absence de traitement anti-rétroviral. Ces patients sont définis comme «non progressseurs à long terme» (NPLT). Plusieurs mécanismes tels qu'une réponse immune anti-VIH très efficace, une protection de l'hôte par des facteurs cellulaires, ou encore la présence d'un virus défectif peuvent expliquer ce phénomène (Alexander *et al.*, 2000; Carrington *et al.*, 1999; Greenough *et al.*, 1997; Harrer *et al.*, 1996). Nous nous sommes alors demandés si les cytidines désaminases de la famille APOBEC3, de part leur activité d'édition, pouvaient être impliquées dans l'infection chronique chez ces patients. Une telle situation devrait se traduire par la présence de virus défectifs dont les mutations devraient être caractéristiques de la signature des APOBEC3, c'est-à-dire la présence de résidus T à la place de C, où A à la place de G, analogues à celles décrites pour *vpr* dans les cellules chroniquement infectées. Pour répondre à cette question, nous avons analysé les séquences provirales des patients NPLT, particulièrement la séquence de *vpr*. Ce

choix s'explique par le fait que des mutations au sein de cette séquence pourraient conduire à une diminution de son expression, protégeant ainsi les cellules de l'action cytotoxique de cette protéine.

1.1.2.1. Analyse des séquences provirales correspondant à *vpr* chez les patients NPLT

L'analyse chez de tels patients a été possible grâce à une collaboration avec le Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses du Pr. Delfraissy, au CHU Kremlin Bicêtre, le Dr. Olivier Lambotte nous faisant parvenir des PBMC de patients NPLT. Pour intégrer l'étude, les patients doivent répondre à plusieurs critères (**Tableau 2**).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Année de diagnostic	1988	1985	1993	1987	1985
Sexe/Âge	F/49	M/48	F/42	M/47	M/69
Nb CD4 ($\times 10^6$ cellules/l)	982	753	876	592	706
ARN HIV (copies/ml)	<50	<50	< 50	<50	<50
ADN HIV (copies/ 10^6 PBMC)	3	7	indétectable	80	40

Tableau 2: Caractéristiques des différents patients NPLT intégrés à l'étude

Tous sont séropositifs depuis plus de 10 ans et présentent une charge virale plasmatique inférieure à 400 copies/ml. De plus, ces personnes ne sont pas et n'ont jamais été sous traitement anti-rétroviral. Pour tous ces patients, le virus du VIH-1 est du groupe M, sous-type B.

Pour les différents patients NPLT, l'ADN proviral correspondant à *vpr* a été amplifié, cloné et séquencé (**Tableau 3**).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
clones vpr analysés	n=7	n=11	n=12	n=12	n=11
Transitions G/A, C/T	-	1	-	14	1

Tableau 3: Analyse de la séquence de *vpr* chez les patients NPLT

Pour chaque patient sont précisés le nombre de clones analysés ainsi que le nombre de transitions G-A et C-T observées.

Sur les 5 patients NPLT, 3 présentent des transitions G-A et C-T au niveau de la séquence de *vpr* (**Figures 18 et 19**). Le patient 2 ne montre qu'une seule transition qui est de type G-A et qui conduit à une mutation silencieuse, le codon GAG étant remplacé par un codon GAA, les deux codants pour l'acide glutamique (**Figure 18**). Le patient 5 ne montre lui aussi qu'une seule transition, qui est de type C-T et qui conduit à une mutation silencieuse, le codon AGC étant remplacé par un codon AGT, les deux codants pour la sérine (**Figure 18**).

1/1

```

ATG GAA CAA GCC CCA GAA GAC CAA GGG CCA CAG AGG GAG CCA CAC
M   E   Q   A   P   E   D   Q   G   P   Q   R   E   P   H

AAT GAA TGG ACA CTA GAG CTT TTA GAG GAG CTT AAG AAT GAA GCT
N   E   W   T   L   E   L   L   E   E   L   K   N   E   A

GTT AGA CAT TTT CCT AGG ATT TGG CTC CAT GGC TTA GGG CAA CAT
V   R   H   F   P   R   I   W   L   H   G   L   G   Q   H

ATC TAT GAA ACT TAT GGG GAT ACT TGG GCA GGA GTG GAA GCC ATA
I   Y   E   T   Y   G   D   T   W   A   G   V   E   A   I

ATA AGA ATT CTG CAA CAA CTG CTG TTT ATC CAT TTC AGA ATT GGG
I   R   I   L   Q   Q   L   L   F   I   H   F   R   I   G

TGT CGA CAT AGC AGA ATA GGC GTT ACT CGA CAG AGG AGA GCA AGA
C   R   H   S   R   I   G   V   T   R   Q   R   R   A   R

AAT GGA GCC AGT AGA TCC TAG
N   G   A   S   R   S   *

```

Figure 18: Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de *vpr* chez les patients NPLT 2 et 5

Patient 2 (▶), patient 5 (▶)

Le patient 4 présente 10 transitions G-A et 4 transitions C-T au niveau de la séquence de *vpr*. Pour ce patient, certaines mutations observées sur l'ADN proviral sont comparables à celles observées dans les cellules chroniquement infectées (**Figure 19**).

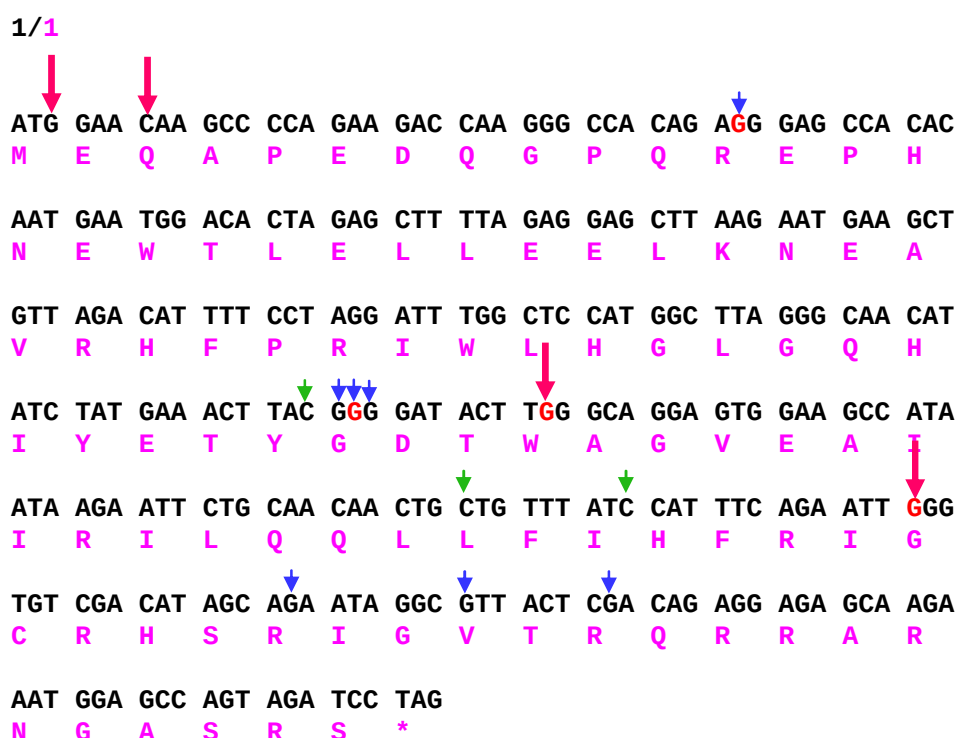


Figure 19: Transitions C-T et G-A sur la séquence provirale de *vpr* chez le patient NPLT 4

Les flèches de petite taille indiquent que les transitions conduisent à des mutations sens (▶) ou silencieuses (▶), alors que les flèches de grande taille (▶) indiquent que les changements conduisent à mutations non sens ou à une inhibition de l'épissage. Les résidus pour lesquels les mutations sont comparables à celles trouvées pour les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1, sont marqués en rouge.

Pour le patient 4, sur les 14 modifications observées, 4 peuvent conduire à une inactivation de *vpr* dans la mesure où elles créent des codons stop où peuvent conduire à l'inhibition de l'épissage dans cette région. Ceci suggère que chez ce patient, des phénomènes d'édition par désamination de cytosines pourraient être à l'origine de virus défectifs, et ainsi être impliqués dans son état d'infection chronique.

1.1.2.2. Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans des PBMC sains et du patient 4

La mise en évidence de modifications au niveau de la séquence de *vpr* chez un patient NPLT, comparables à celles observées dans des cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1, nous a conduit à corréliser cette observation avec l'expression des *apobec3* dans les cellules mononucléaires circulant dans le sang périphérique (PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell) de ce patient.

Les PBMC sont principalement constituées de lymphocytes et de monocytes. Le niveau d'expression de chaque désaminase pouvant être influencé par des facteurs intrinsèques propres à chaque personne, nous avons réalisé ces analyses sur 4 échantillons indépendants, de façon à obtenir une expression moyenne des désaminases dans les PBMC des personnes séronégatives.

	<i>Apobec3B</i>	<i>apobec3C</i>	<i>apobec3DE</i>	<i>apobec3F</i>	<i>Apobec3G</i>
PBMC	0	$2,7.10^4 \pm 1,5.10^4$	$1,8.10^2 \pm 9.10^1$	$10^5 \pm 3,2.10^4$	$1,2.10^5 \pm 9,7.10^3$
PBMC patient4	$10^4 \pm 9,8.10^2$	$4,3.10^4 \pm 0,7.10^4$	$1,9.10^2 \pm 2.10^1$	$5,8.10^5 \pm 8,7.10^4$	$2,4.10^5 \pm 3,5.10^3$
% variation		+ 160 %	+ 105 %	+ 600 %	+ 200 %

Tableau 4: Expression des *apobec3* dans les PBMC sains et du patient 4

Les mesures des différentes *apobec3* ont été réalisées par RT-PCR quantitative, à partir de 30 ng de cDNAm.

L'analyse chez le patient 4, montre clairement une modification de l'expression de ces désaminases, qui se traduit principalement par une augmentation de leur expression. Ainsi, *apobec3F* et *3G* voient leur expression augmenter de 6 et 2 fois respectivement. L'expression d'*apobec3C* et *3DE* reste similaire. Une différence majeure qu'il est important de souligner est la forte expression d'*apobec3B* dans les PBMC de ce patient, alors qu'il n'y a pas d'expression dans les PBMC de sujets sains.

De nombreux travaux ont montré que les protéines APOBEC3B, 3F et 3G sont capables d'inhiber efficacement l'infection par le VIH-1 et présentent une forte activité d'édition sur un substrat ADN au cours de tests de mutations effectués chez *E. coli* (Bishop *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2006; Liddament *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). L'analyse des 14 transitions observées sur la séquence provirale de *vpr* chez ce patient révèle que 7 se font dans un contexte nucléotidique 5'-CC, 3 dans un contexte nucléotidique 5'-TC, 3 dans un contexte 5'-AC et 1 dans un contexte 5'-GC. Si ces 2 derniers ne nous apporte aucune information quant à la protéine responsable de cette activité de désamination, le contexte nucléotidique 5'-CC est caractéristique de la protéine APOBEC3G (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), alors que le contexte 5'-TC est lui caractéristique des protéines APOBEC3B, 3C et 3F (Bishop *et al.*, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004). Ces données, associées à l'apparition prononcée d'*apobec3B* et à l'augmentation de l'expression d'*apobec3F* et *3G*, sont un bon argument pour postuler que ces provirus défectifs ont été générés par un mécanisme d'édition. De même, ils appuient l'hypothèse d'une possible action des désaminases d'acides nucléiques dans l'état NPLT de ce patient.

1.2. Etude de l'expression des apobec3 suite à l'infection de cellules par le virus du VIH-1

Dans la majorité des cas, l'infection par le virus du VIH-1 conduit à une infection aiguë, et non pas à un état chronique. Nous nous sommes demandés si dans le cadre d'une infection aiguë, ces désaminases étaient aussi sujettes à des variations d'expression, et si oui, à quel moment par rapport à l'infection. Pour répondre à cette question, nous avons infecté des cellules H9 avec le virus du VIH-1 et suivi l'expression des différentes désaminases sur une

durée qui correspond à l'accomplissement d'un cycle viral complet, soit environ 48 heures post-infection (Perelson *et al.*, 1996).

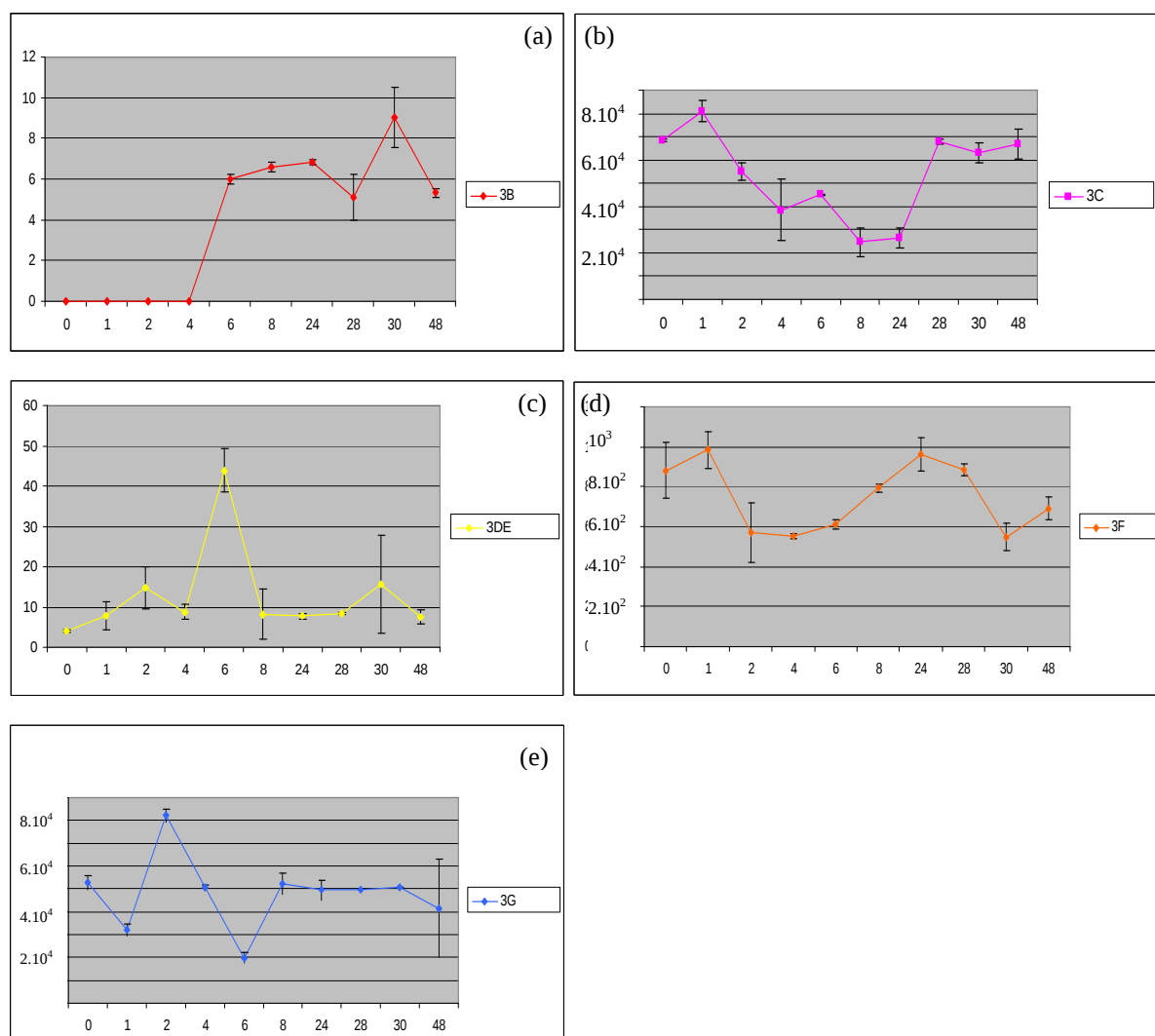


Figure 20: Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 au cours des 48 heures suivant l'infection des cellules lymphocytaires H9 par le virus du VIH-1.

(a) : mesure de l'expression d'*apobec3B* (3B), (b) : mesure de l'expression d'*apobec3C* (3C), (c) : mesure de l'expression d'*apobec3DE* (3DE), (d) : mesure de l'expression d'*apobec3F* (3F), (e) : mesure de l'expression d'*apobec3G* (3G)

Cette expérience a été répétée 4 fois de façon indépendante, et l'analyse de chaque point est réalisée en 3 exemplaires.

Le premier constat que nous pouvons faire est qu'au cours des 48 heures qui suivent l'infection des cellules par le virus du VIH-1, chaque désaminase présente un profil qui lui est propre. Ceci suggère que dans la cellule, toutes ces cytidines désaminases ne répondent pas de manière équivalente aux signaux mis en place dans la cellule suite à l'infection. Nous pouvons toutefois, en fonction du moment où ces modifications apparaissent, classer les désaminases en 3 groupes : celles qui sont modifiées au cours de la phase précoce qui correspond aux 8 premières heures suivant l'infection (Desfarges, 2007), au cours de la phase tardive qui débute 8 heures après l'infection, ou encore celles dont l'expression n'est modifiée que pendant un court moment au cours du cycle viral.

Ainsi, *apobec3C*, *3F* et *3G* voient leur expression diminuer au moment de la phase précoce du cycle viral. La fixation et l'entrée de la particule virale entraînent certainement des changements au sein de voies de signalisation de la cellule qui peuvent être responsables de cette modification d'expression. Néanmoins, nous ne pouvons pas écarter la mise en place d'un mécanisme de dégradation des ARNm de ces enzymes.

Apobec3DE connaît une stimulation d'un facteur 9 de son expression à une étape précise du cycle du viral, entre 5 et 7 heures après l'infection. Etant donné que la protéine virale Vif entraîne la dégradation d'APOBED3DE (Dang *et al.*, 2006), l'augmentation de l'expression observée pourrait être due à un phénomène de compensation mis en place par la cellule, afin de palier à la diminution de quantité de protéines dans le cytoplasme.

Enfin, pour *apobec3B* nous pouvons détecter une stimulation de l'expression au moment de la phase tardive du cycle viral. Dans la mesure où APOBEC3B n'est pas dégradée par la protéine Vif (Doehle *et al.*, 2005), l'hypothèse d'une induction compensatoire peut être exclue pour expliquer ce phénomène. Cette modification d'expression pourrait être le résultat de changements au sein des voies de signalisation de la cellule, suite à la fixation et à l'entrée de la particule virale.

Ces résultats montrent clairement que les différentes désaminases sont sujettes à des variations d'expression, au cours de 48 heures qui suivent l'infection des cellules par le VIH-1. Toutefois, nous ne savons pas à l'heure actuelle par quel processus ceci est possible. En effet, nous ne sommes pas en mesure de préciser si ces changements sont dus au mécanisme

général de la fixation du virus à la surface cellulaire, ou s'ils sont spécifiques des composants du VIH-1.

2. Mesure de l'expression des cytidines désaminases de la famille APOBEC3 dans différents contextes viraux

Suite à la découverte de modifications résultant de la désamination de cytosines sur le génome du VIH-1, conduisant à un phénomène de restriction virale, de nombreuses études ont été menées afin de savoir si ce mécanisme et ses conséquences pouvaient être retrouvés pour d'autres virus humains. Il a ainsi été montré que pour le virus de l'hépatite B (VHB), plusieurs APOBEC3 étaient capables d'édition et d'inhibition de la réplication virale (Baumert *et al.*, 2007; Bonvin *et al.*, 2006; Bonvin & Greeve, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Noguchi *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2004; Suspene *et al.*, 2005; Turelli *et al.*, 2004). Dans le cadre du papillomavirus humain (HPV), des phénomènes d'édition ont récemment été mis en évidence (Vartanian *et al.*, 2008). Enfin, pour le virus de l'hépatite C (VHC), si des phénomènes d'édition n'ont pas été mis en évidence jusqu'à présent, il a été montré qu'*apobec3G* était plus exprimée chez des patients chroniquement infectés par le VHC (Komohara *et al.*, 2006). Dans la mesure où nous avons mis au point un outil qui nous permet d'avoir une vision plus précise quant à l'expression des différentes cytidines désaminases dans les cellules, nous avons voulu savoir si dans ces différents contextes viraux il était possible de corrélérer ces observations avec des modifications d'expression des *apobec3*.

Les différentes analyses ont été réalisées de la même façon que précédemment pour les cellules H9 et H9/LAI, c'est-à-dire au cours de la phase exponentielle de croissance. L'ARN a été rétrotranscrit en utilisant les oligos dT comme amorce et la quantification des transcrits des différentes *apobec3* a été déterminée comme indiqué dans le Matériel et Méthodes.

2.1. Virus de l'hépatite B (VHB)

Pour l'analyse de l'expression des cytidines désaminases dans le cadre d'une infection par le virus de l'hépatite B, la lignée cellulaire utilisée est la lignée HepG2.2.15. Cette dernière est issue des cellules adhérentes HepG2, établies à partir des carcinomes hépatiques, contient une copie du génome du virus de l'hépatite B intégrée de manière stable. Ces cellules sont capables de produire les protéines virales et de relarguer des virions dans le milieu de culture.

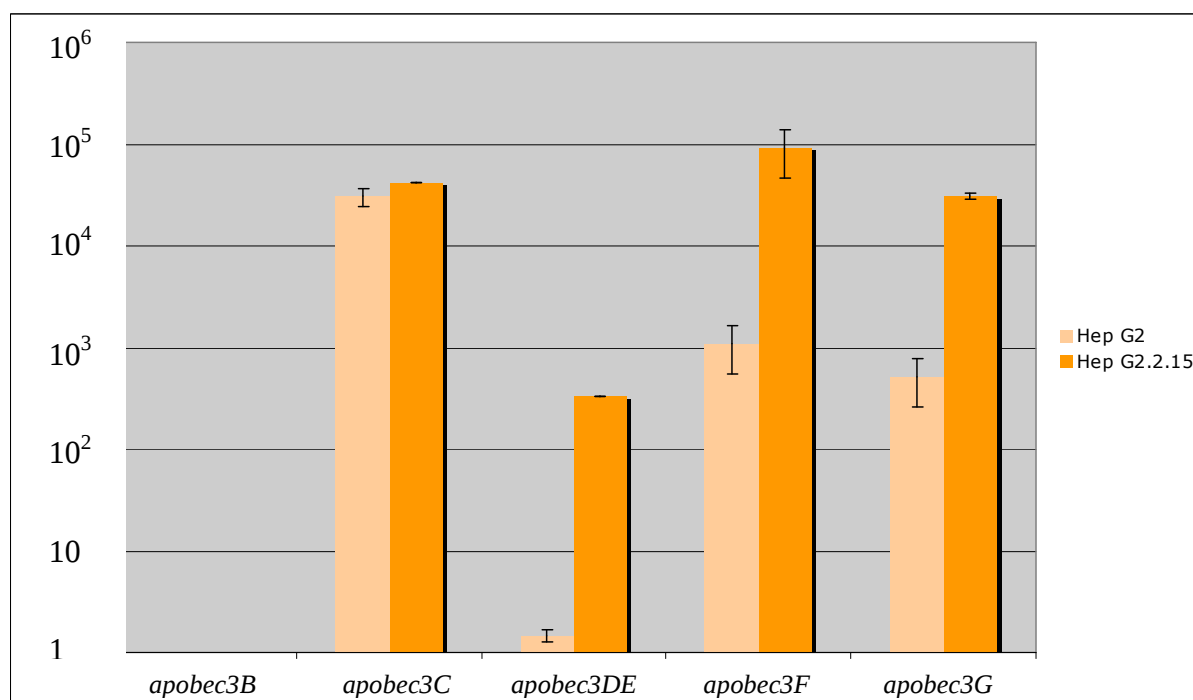


Figure 21: Expression des *apobec3* dans des cellules hépatiques contenant ou non le génome du VHB

L'axe des abscisses indique les différentes désaminases, et l'axe des ordonnées, le nombre de copies de ces dernières après normalisation par rapport au gène de référence.

L'expression des *apobec3DE*, *3F* et *3G* est augmentée de 150, 100 et 60 fois, respectivement, dans les cellules HepG2.2.15 qui produisent le VHB par rapport aux cellules non infectées. Par contre, l'expression d'*apobec3C* est similaire dans ces deux lignées, et le transcrit d'*apobec3B* est indétectable.

De nombreux travaux ont montré que plusieurs protéines de la famille APOBEC3 sont capables d'inhiber efficacement l'infection des cellules par le VHB (Baumert *et al.*, 2007;

Bonvin *et al.*, 2006; Bonvin & Greeve, 2007; Rosler *et al.*, 2005; Rosler *et al.*, 2004; Suspene *et al.*, 2005; Turelli *et al.*, 2004). Cette interférence virale par les APOBEC3 peut être le résultat de deux mécanismes distincts, dépendant ou non de l'activité cytidine désaminase associée à ces protéines. Quel que soit le mécanisme d'interférence virale, les résultats obtenus suggèrent que pour certaines de ces protéines, l'activité antivirale qui leur est associée, serait corrélée à une augmentation de leur expression.

2.2. Virus du papillome humain (HPV)

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire adhérente de kératinocytes établie à partir d'un prélèvement sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus. Ces cellules présentent le génome du HPV de type 18 intégré dans leur génome (Schneider-Gadicke & Schwarz, 1986).

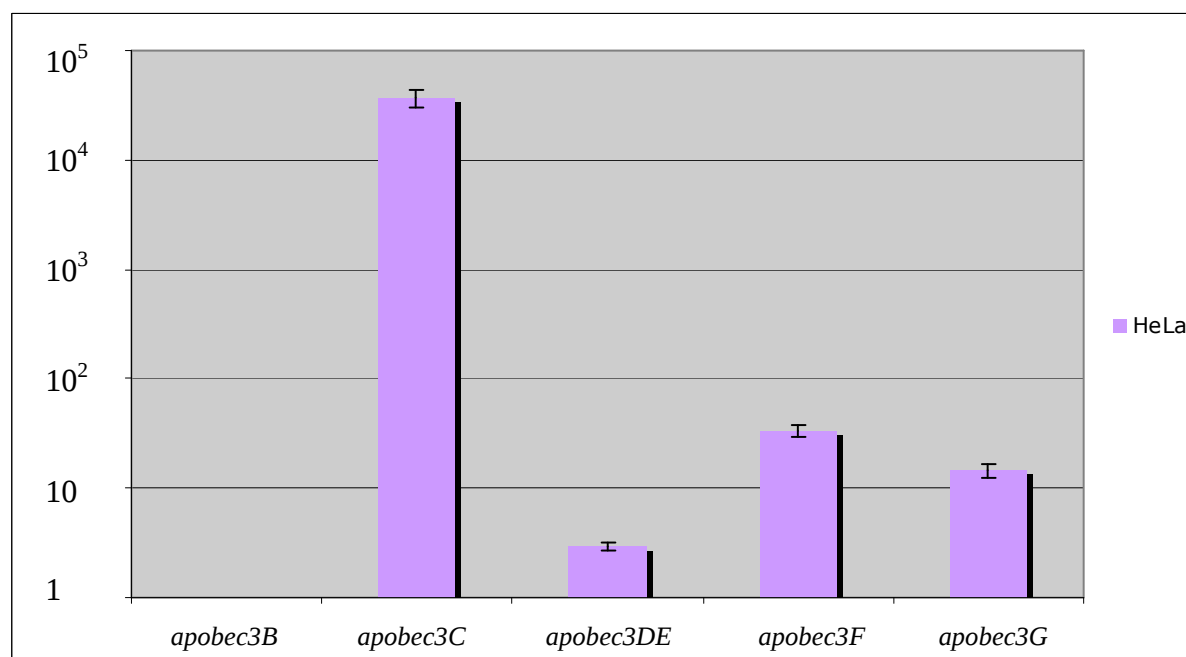


Figure 22: Expression des *apobec3* dans les cellules présentant le génome du HPV-18 intégré dans leur génome.

L'axe des abscisses indique les différentes désaminases, et l'axe des ordonnées, le nombre de copies de ces dernières après normalisation par rapport au gène de référence.

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que dans ces cellules HeLa, *apobec3C* est très fortement exprimée comparativement aux autres cytidines désaminases. Elle est en effet 12.10^3 , 11.10^3 et 25.10^2 fois plus exprimée qu'*apobec3DE*, *3F* et *3G* respectivement.

Basée sur l'hypothèse que le génome des papillomavirus humains pouvait être une cible pour les APOBEC3 qui ont une localisation nucléaire, un étude a récemment pu mettre en évidence la présence d'hypermutations au niveau de l'ADN de ces virus (Vartanian *et al.*, 2008). Les analyses qui ont porté sur le HPV1a, responsable de verrues plantaires, et le HPV16, retrouvé au sein de biopsies cervicales précancéreuses, ont permis de mettre en évidence des transitions C-T et G-A sur les génomes viraux, qui se font principalement dans un contexte nucléotidique 5'TC et 5'CC. Ces résultats suggèrent que parmi les protéines APOBEC3 qui ont une localisation nucléaire, APOBEC3A, 3C et 3H pourraient être responsables de phénomènes d'édition observés. Il est donc intéressant de noter que dans les cellules HeLa qui contiennent le HPV16, *apobec3C* très fortement exprimée comparativement aux autres désaminases dans ces mêmes cellules

2.3. Virus de l'hépatite C (VHC)

Le VHC est un virus à ARN (+) monocaténaire linéaire (**Figure 24**). Ce dernier code pour une polyprotéine qui est clivée par des protéases cellulaires et virales, et permet l'obtention de 10 protéines virales qui sont classées en protéines structurales et non structurales.

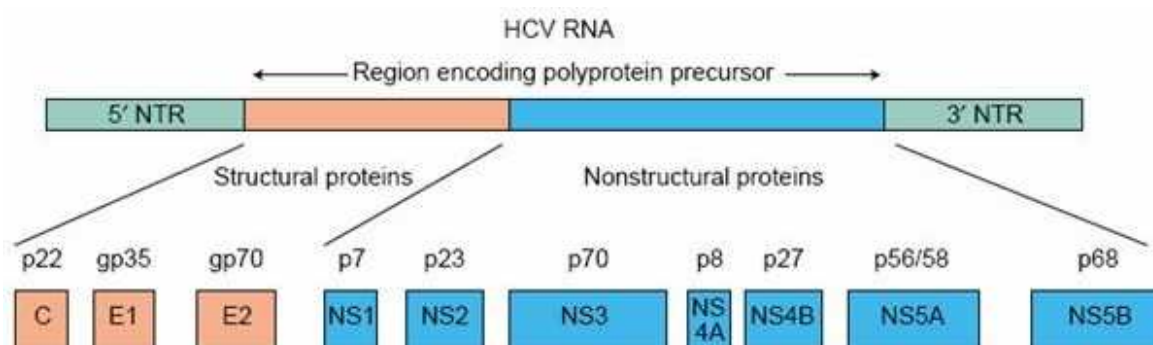


Figure 23: Organisation génomique du VHC

L'ARN est encadré par deux régions non traduites. Il code pour des protéines structurales (C, E1 et E2) et des protéines non structurales (NS1 à NS5B).

Pour l'analyse de l'expression des désaminases dans le cadre du virus de l'hépatite C, nous avons à notre disposition des lignées cellulaires établies à partir de cellules Huh7 qui sont des cellules adhérentes issues d'un carcinome hépatique. Deux lignées ont été utilisées : la lignée Huh7 Rep5.1 qui contient le génome complet du virus et la lignée Huh7 NS3-5B qui ne contient qu'une partie du génome correspondant aux protéines non structurales NS3 à NS5B.

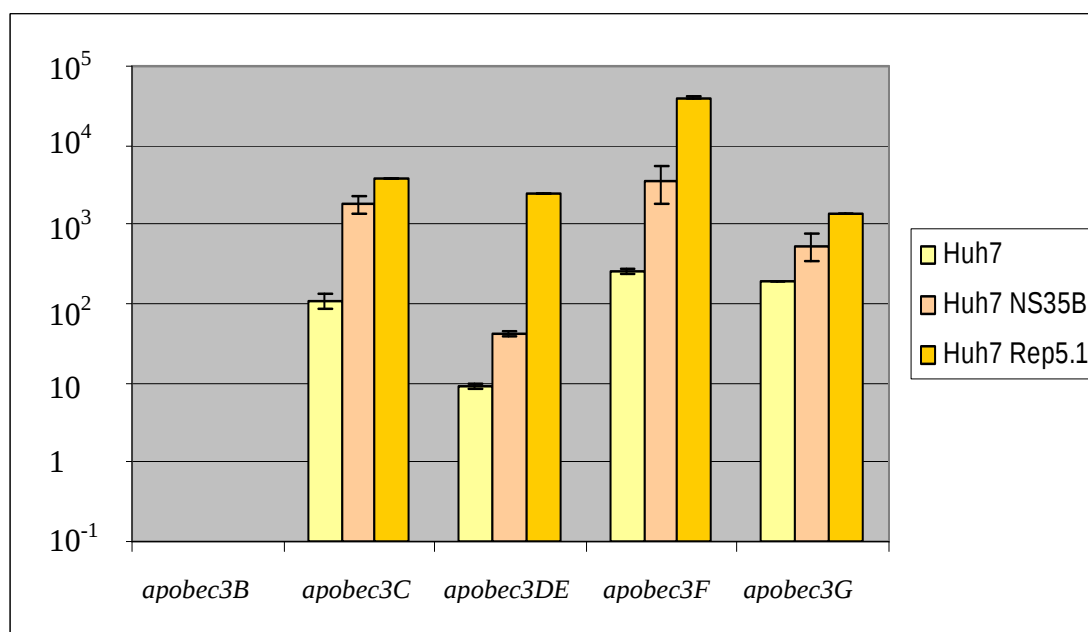


Figure 24: Expression des *apobec3* dans des cellules hépatiques contenant ou non, toute ou une partie du génome viral du VHC.

L'axe des abscisses indique les différentes désaminases, et l'axe des ordonnées, le nombre de copies de ces dernières après normalisation par rapport au gène de référence.

Pour les cellules qui n'expriment que les protéines non structurales (Huh7 NS3-5B), nous pouvons constater une augmentation de l'expression des différentes cytidines désaminases.

Ainsi, *apobec3C*, *3DE*, *3F* et *3G* sont augmentées de 18, 4, 14 et 2,5 fois respectivement par rapport aux cellules Huh7. L'expression d'*apobec3B* n'est pas détectée dans les différentes lignées de cellules huh7.

Pour les cellules qui contiennent le génome complet du VHC (Huh7 Rep5.1), nous constatons une augmentation très significative des 4 cytidines désaminases. *Apobec3C*, *3DE*, *3F* et *3G* voient leur expression augmenter de 400, 250, 160 et 7,5 fois respectivement, par rapport aux cellules Huh7.

Parmi les protéines non structurales du virus du VHC, NS5A est seule responsable de l'augmentation d'*apobec3G* (Komohara *et al.*, 2006). A ce jour, cette étude n'a pas été étendue aux autres cytidines désaminases. Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules qui ne contiennent que les gènes des protéines non structurales confirment cette observation mais indiquent clairement qu'*apobec3G* ne serait pas la seule désaminase à être sensible à une telle régulation. En effet, *apobec3C*, *3DE* et *3F* voient leur expression augmenter d'une manière encore plus importante qu'*apobec3G*. De plus, le taux d'expression des *apobec3* observé dans la lignée Huh7 Rep5.1 qui contient le génome complet du VHC suggère que la régulation de l'expression des désaminases est un processus plus complexe que prévu et dans lequel d'autres protéines virales semblent prendre part. Cette observation pose le problème de savoir comment des protéines qui sont normalement localisées dans des structures membranaires lors de la réplication virale (Bartenschlager *et al.*, 2004), sont capables d'agir à un niveau nucléaire. Une possibilité serait que la réponse observée soit produite par l'intermédiaire d'autres facteurs tels l'interféron, IFN- α ou IFN- γ (Komohara *et al.*, 2006; Matys *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2004). De nombreuses études ont examiné l'effet de l'IFN- α sur l'expression des APOBEC3 dans différents types cellulaires et viennent conforter cette possibilité. Il a ainsi été montré que l'expression d'APOBEC3G était stimulée par l'IFN- α dans les macrophages, les hépatocytes, les lymphocytes, les PBL et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Komohara *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Dans ces dernières, il a également été montré qu'APOBEC3G n'est pas la seule cytidine désaminase à être stimulée par l'IFN- α , APOBEC3A, 3C, 3F voyant aussi leur expression augmenter (Wang *et al.*, 2008). Par ailleurs, la protéine NS5A stimule la croissance cellulaire par l'activation de facteurs nucléaires tels que la PCNA, STAT-3 et NF- κ B (Choi & Hwang, 2006; Ghosh *et al.*, 1999; Girard *et al.*, 2004; Waris *et al.*, 2005) et est capable de bloquer

l'apoptose par inhibition de la transactivation médiée par la voie de P53, permettant la production virale dans les cellules infectées par le VHC (Lan *et al.*, 2002).

Partie 2

Etude *in vitro* des APOBEC3

Dans la première partie de ce travail, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les cytidines désaminases de la famille APOBEC3 pouvaient, en partie, être impliquées dans l'infection chronique par le VIH-1. Etant donné la diversité des APOBEC3 et l'ubiquité de ces protéines dans différents types cellulaires, il est important de mieux définir le rôle de chacune et d'identifier la (ou les) cytidine désaminase de la famille APOBEC3 qui pourrait être responsable des modifications observées sur la séquence *vpr* provirale. C'est ce que nous avons cherché à déterminer dans la deuxième partie de ce travail. Pour cela, nous avons mis en place un test *in vitro* qui consiste à mettre en présence une cytidine désaminase et un substrat, et regarder si nous avons ou non une activité de désamination sur ce dernier.

1. Obtention des protéines APOBEC3

Les différentes cytidines désaminases ont été exprimées dans la bactérie *E. coli*. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide pET32a. Ce dernier, de part son côté inducible à l'IPTG, est classiquement utilisé pour obtenir une forte expression de protéines, possédant alors une étiquette histidine et une étiquette thiorédoxine qui permettent une détection et une purification facilitée. Outre ces caractéristiques, l'étiquette thiorédoxine est décrite pour sa capacité à pouvoir aider à la solubilisation des protéines auxquelles elle est fusionnée, et qui normalement s'agrègent en forme insoluble chez *E. coli* (LaVallie *et al.*, 1993). Dans ce système Pet (Novagen), l'IPTG va induire la T7 RNA polymérase présente dans la bactérie, et non directement le gène codé par le plasmide. Cette stratégie est utile pour minimiser la transcription basale du gène cloné avant l'induction, étant donné la toxicité potentielle des protéines APOBEC3 de part leur activité mutagène (Harris & Liddament, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Petersen-Mahrt & Neuberger, 2003). Pour cela, le plasmide recombinant est introduit dans une bactérie portant un épisome avec le gène du lysosyme qui inactive l'ARNpol T7 qui peut être produite avant l'induction (Moffatt & Studier, 1987; Studier, 1991).

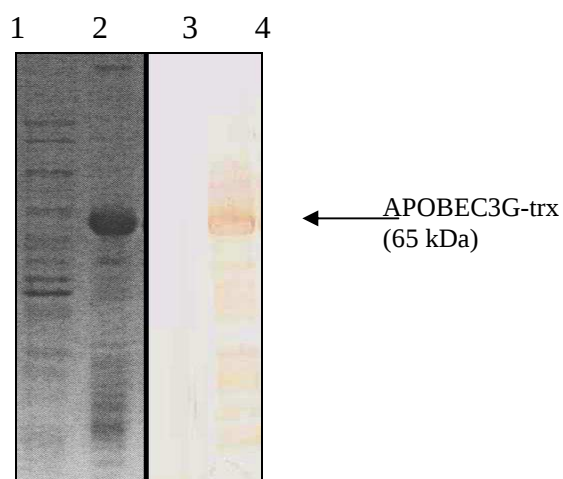


Figure 25: Expression de la protéine APOBEC3G fusionnée à la thiorédoxine

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. La piste 1 représente la fraction protéique présente dans le surnageant, la piste 2 la fraction correspondant au culot bactérien. Pour ces deux pistes, la révélation est effectuée par coloration au bleu de coomassie. Les pistes 3 et 4 confirment ou non, grâce à l'Ac anti-trx, la présence de la protéine d'intérêt dans les deux fractions (piste 3 : surnageant, piste 4 : culot).

Nous pouvons remarquer une forte expression de protéine à la taille de 65 kDa dans le culot (piste 2), mais pas dans le surnageant (piste 1). Des analyses en Western blot nous ont permis de confirmer que la protéine fortement exprimée détectée en piste 2 est bien notre protéine d'intérêt (piste 4). La protéine APOBEC3G est absente de la fraction soluble (pistes 1 et 3) et se trouve au sein de corps d'inclusions. Un résultat similaire a été obtenu lorsque les protéines APOBEC3B, 3DE et 3F ont été exprimées en suivant le même protocole (**Figure 26**).

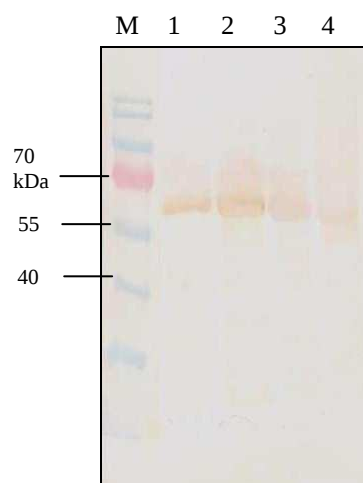


Figure 26: Expression des APOBEC3 fusionnées à la thiorédoxine au sein de corps d'inclusion

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. La révélation des protéines est réalisée grâce à l'anticorps anti-Trx.

M : marqueur de poids moléculaire, piste 1 : APOBEC3B-Trx, piste 2 : APOBEC3DE-Trx, piste 3 : APOBEC3F-Trx, piste 4 : APOBEC3G-Trx.

Etant donné que le test d'activité *in vitro* nécessite une protéine soluble, les désaminases ont été solubilisées à partir des corps d'inclusion. Pour cela les culots contenant les corps d'inclusion, après plusieurs étapes de lavage avec un tampon contenant de l'urée, ont été repris dans du CAPS pH 11 et du N-Lauroylsarcosine. Le mélange est dialysé contre un tampon Tris-HCl pH8, et le N-Lauroylsarcosine est ensuite éliminé grâce à l'utilisation de Dowex AG1-X8. Les protéines sont alors stockées à -20°C, en 50% glycérol (voir Matériels et Méthodes).

Une autre alternative a été de co-exprimer les différentes cytidines désaminases avec des protéines chaperonnes dans la bactérie. Les protéines chaperonnes sont impliquées dans les processus de repliement des protéines (Thomas *et al.*, 1997). Un plasmide codant pour les chaperonnes groES-groEL, dont l'expression est contrôlée par la tétracycline, a été utilisé pour la co-transformation d'*E.coli* avec le vecteur d'expression des désaminases. Nous avons choisi d'induire l'expression des chaperonnes avant d'induire l'expression des désaminases avec de l'IPTG, de façon à ce qu'elles soient présentes et dès le début de la production des désaminases (Matériels et Méthodes). Enfin, dans le but de nous dégager d'un effet négatif

potentiel de l'étiquette thiorédoxine, et du fait qu'elle ne permettait pas de solubiliser les APOBEC, nous avons aussi éliminé la région contenant l'étiquette Trx via des délétions directement sur le plasmide.

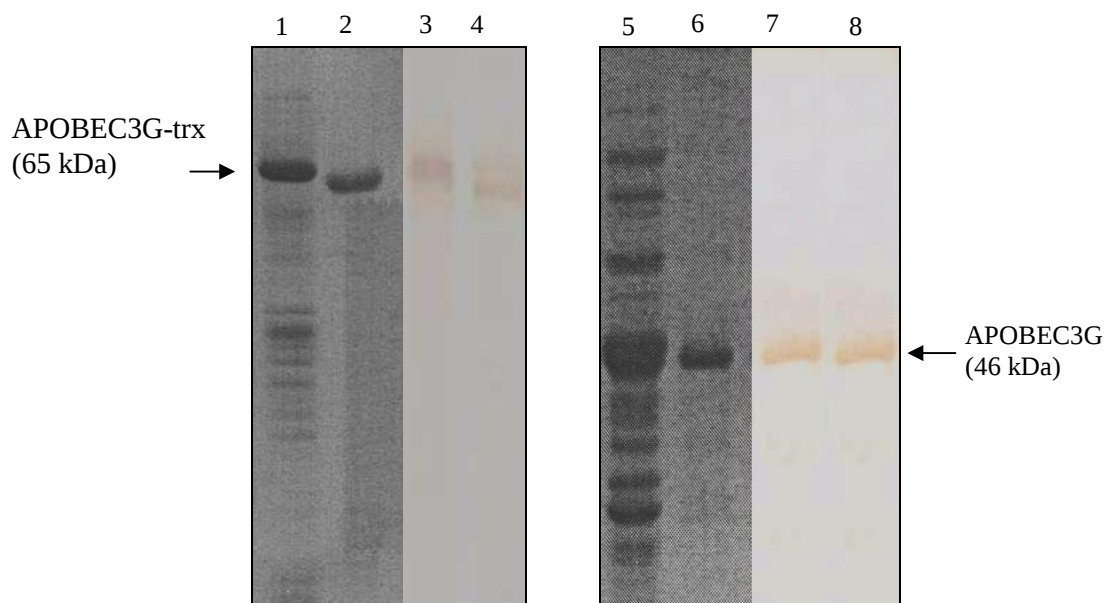


Figure 27: Expression de la protéine APOBEC3G produite en présence des protéines chaperonnes groES-groEL, fusionnée ou non à la thiorédoxine

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. Les protéines fusionnées à la thiorédoxine sont situées pistes 1 à 4, les protéines non fusionnées à la thiorédoxine, pistes 5 à 8.

Les pistes 1 et 5 représentent la fraction protéique présente dans le surnageant, les pistes 2 et 6 représentent la fraction correspondant au corps d'inclusion. La révélation des pistes 1, 2, 5 et 6 est effectuée par coloration au bleu de coomassie. Les pistes 3 et 4 montrent la présence de la protéine APOBEC3G, révélée par l'anticorps anti-Trx (piste 3 : surnageant, piste 4 : corps d'inclusion). Les pistes 7 et 8 confirment, grâce à l'Ac anti-S-Tag, la présence d'APOBEC3G dans les deux fractions (piste 7 : surnageant, piste 8 : culot).

La co-expression d'APOBEC3G avec les chaperonnes groES-groEL conduit toujours à la surexpression d'une protéine à la taille attendue dans le culot (pistes 2 et 8), mais une quantité importante de la désaminase se trouve dans la fraction soluble (piste 1 et 5). Les analyses en Western blot confirment qu'APOBEC3G se trouve partagée dans ces deux fractions (pistes 3

-4, et 7-8). Ainsi, dans les conditions expérimentales mises en place, nous avons pu obtenir toutes les désaminases sous forme soluble, et ce, avec ou sans l'étiquette Trx (**Figure 28**).

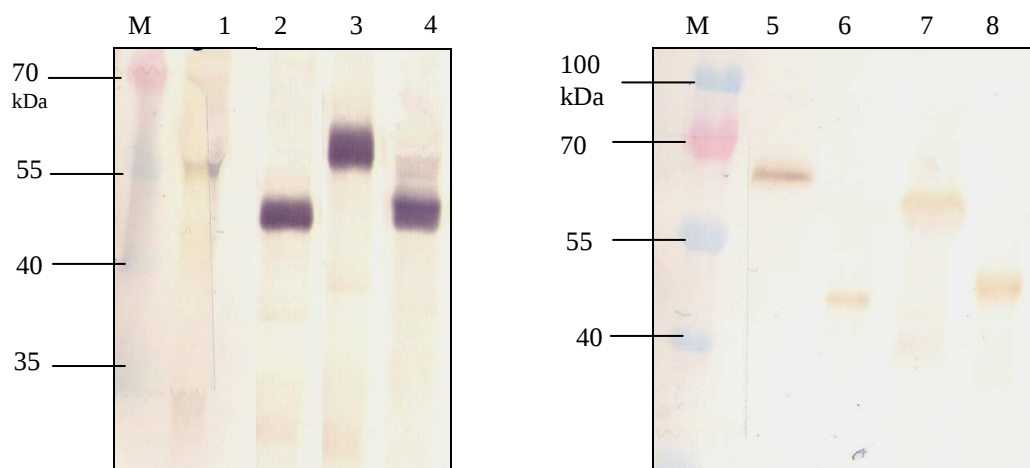


Figure 28: Expression des différentes APOBEC3 dans la fraction soluble grâce à la coexpression avec les protéines chaperonnes groES-groEL.

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. La révélation des protéines est réalisée grâce à l'anticorps anti-S-Tag.

M : marqueur de poids moléculaire, piste 1 : APOBEC3B-Trx, piste 2 : APOBEC3B, piste 3 : APOBEC3DE-Trx, piste 4 : APOBEC3DE, piste 5 : APOBEC3F-Trx, piste 6 : APOBEC3F, piste 7 : APOBEC3G-Trx, piste 8 : APOBEC3G

Les APOBEC3 ont été purifiées à l'aide de colonne nickel, grâce à l'étiquette histidine qu'elles possèdent (**Figure 29**).

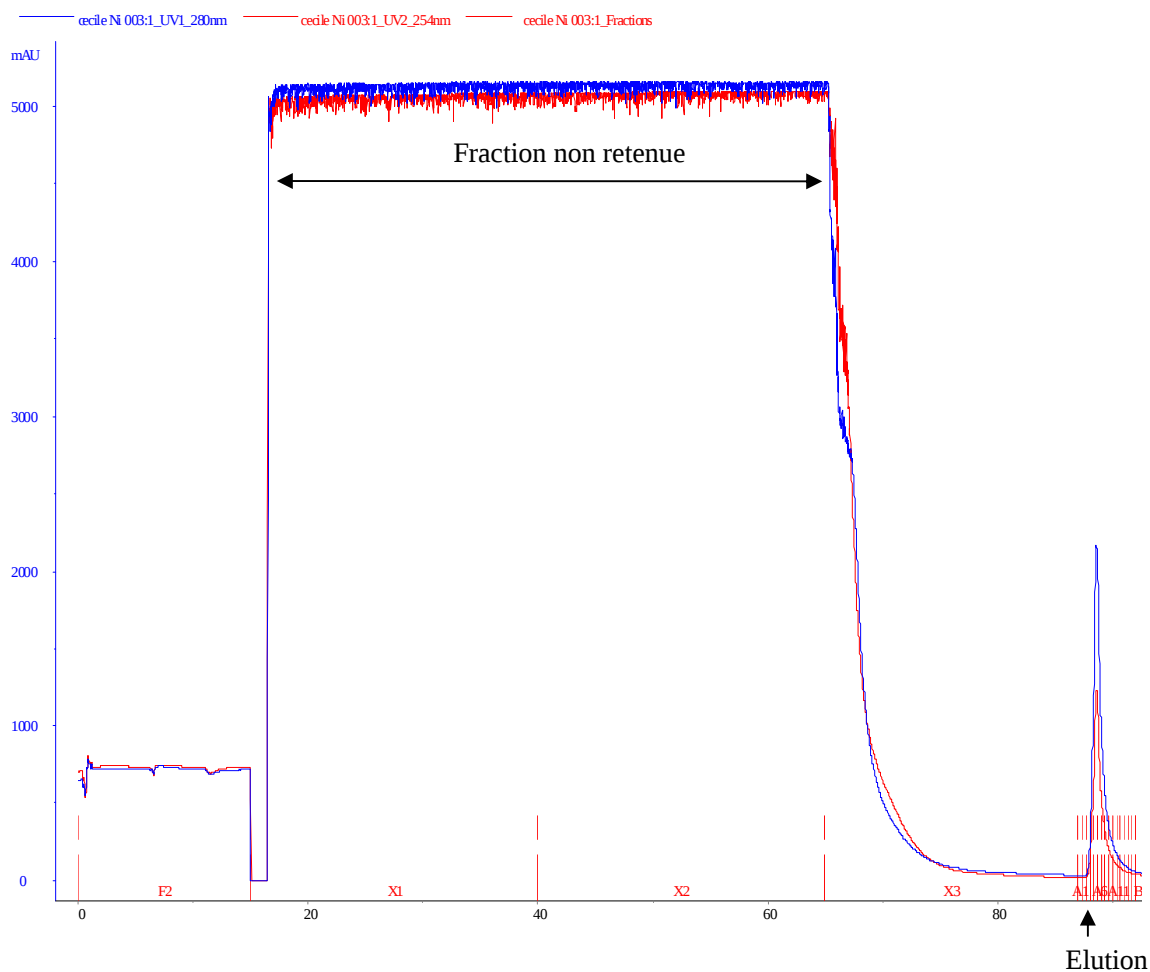


Figure 29: Chromatogrammes résultant de la purification sur colonne de nickel (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare) de la protéine APOBEC3G à partir de la fraction soluble de l'extrait bactérien.

Le chromatogramme indique la fraction non retenue sur la colonne, qui s'étend des fractions X1 à X3, ainsi que le pic obtenu après élution à l'imidazole (250 mM final), et qui s'étend des fractions A4 à A8.

L'apparition d'un pic d'absorbance à 280 nm, suite à l'élution par l'imidazole, qui s'étend des fractions A4 à A8 correspond à la présence de la protéine APOBEC3G comme le révèle la réaction avec l'anticorps anti-S-Tag par test ELISA (**Figure 30**). Ce test a pour avantage de nous donner une réponse rapide quant à la présence de notre protéine dans les différentes fractions, la mise en place de tests d'activité étant longue et complexe à mettre en place.

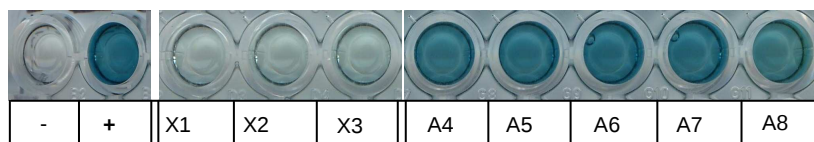


Figure 30: Test ELISA effectué sur les différentes fractions obtenues lors de la purification d'APOBEC3G sur colonne de nickel.

Les puits – et + sont des contrôles positifs et négatifs. Le puit – contenant le tampon de couplage seulement, le puit + contenant la protéine APOBEC3G. Les puits X1, X2 et X3 représentent la fraction protéique non retenue lors du passage sur la colonne (**Figure 29**). Les fractions A4 à A8 représentent les fractions qui correspondent au pic d'élution (**Figure 29**).

Les résultats obtenus pour les puits contrôles (+) et (-) valident les conditions expérimentales. Les fractions X1, X2 et X3 non retenues par la colonne de nickel (**Figure 29**) ne révèlent pas la présence de la désaminase recombinante. Par contre, les fractions A4 à A8, qui correspondent au pic d'élution (**Figure 29**), réagissent positivement. Les fractions qui contiennent la protéine sont ensuite poolées et stockées à -20°C, en 50% glycérol.

2. Tests *in vitro*

La réaction de désamination *in vitro* est basée sur la réaction de clivage en milieu alcalin d'un déoxynucléotide qui présente un site abasique. Cette situation est générée par l'apparition d'un résidu U dans la chaîne nucléotidique suite à l'action de la désaminase de cytidines, suivie d'un traitement par une Uracile DNA Glycosylase (UDG).

2.1. Choix du substrat

Un substrat de 35 nucléotides (vprC) a été choisi dans une zone où nous avons observé des modifications C-U dans la séquence de vpr (**Figure 31**). Comme contrôle, nous avons choisi un substrat similaire (vprU), dans lequel le résidu C₂₀ a été remplacé par un U.

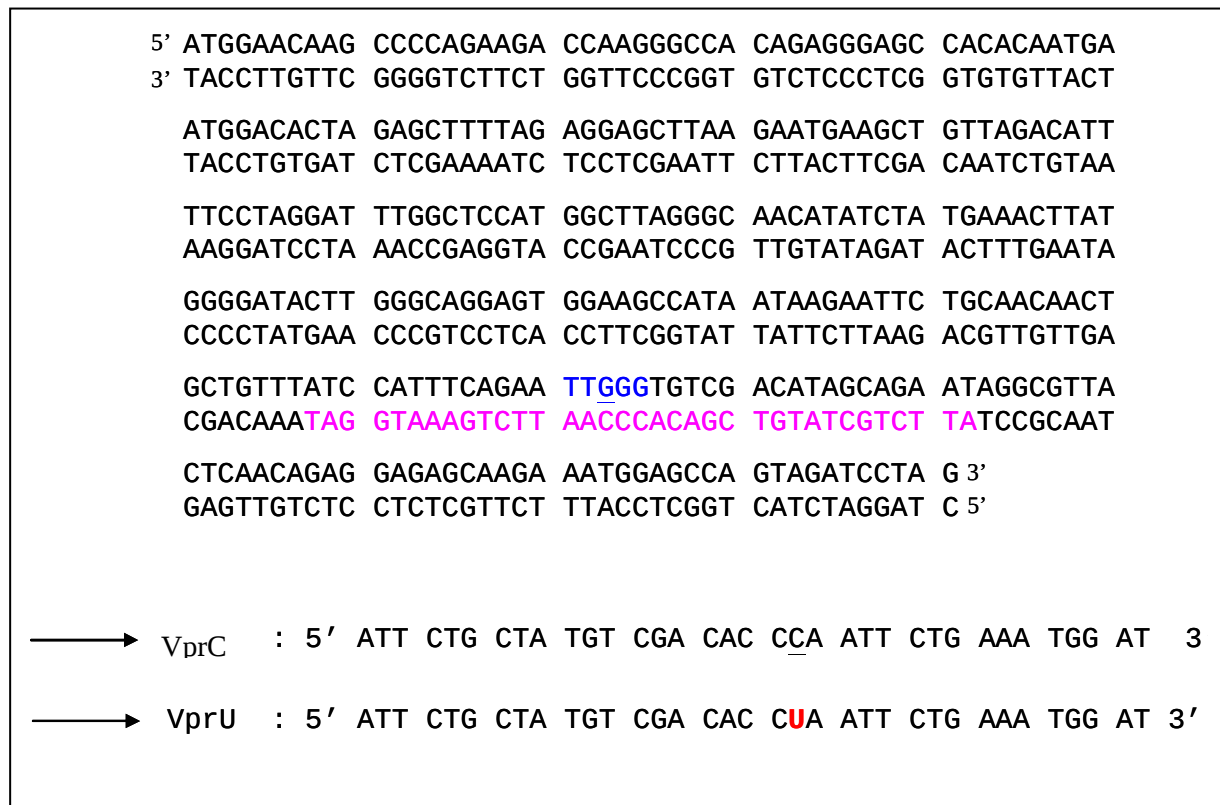


Figure 31: Choix des substrats utilisés pour les tests *in vitro* au sein de la séquence de *vpr*

La totalité de la séquence de l'ORF *vpr* est montrée comme ADN double brin. La séquence qui est préférentiellement modifiée par APOBEC3G est indiquée en bleue. L'oligonucléotide choisi comme substrat (V_{pr}C), développé en triplets, est signalé en bas de la figure. L'oligonucléotide V_{pr}U correspond à la forme éditée et est utilisé comme contrôle positif lors de la réaction de désamination.

Pour la réalisation des tests *in vitro*, les oligonucléotides ont été préalablement marqués à l'extrémité 5' avec du [γ -P³²]ATP, puis purifiés sur un gel dénaturant de polyacrylamide.

2.2. Tests de désamination *in vitro*

2.2.1. Principe du test de désamination

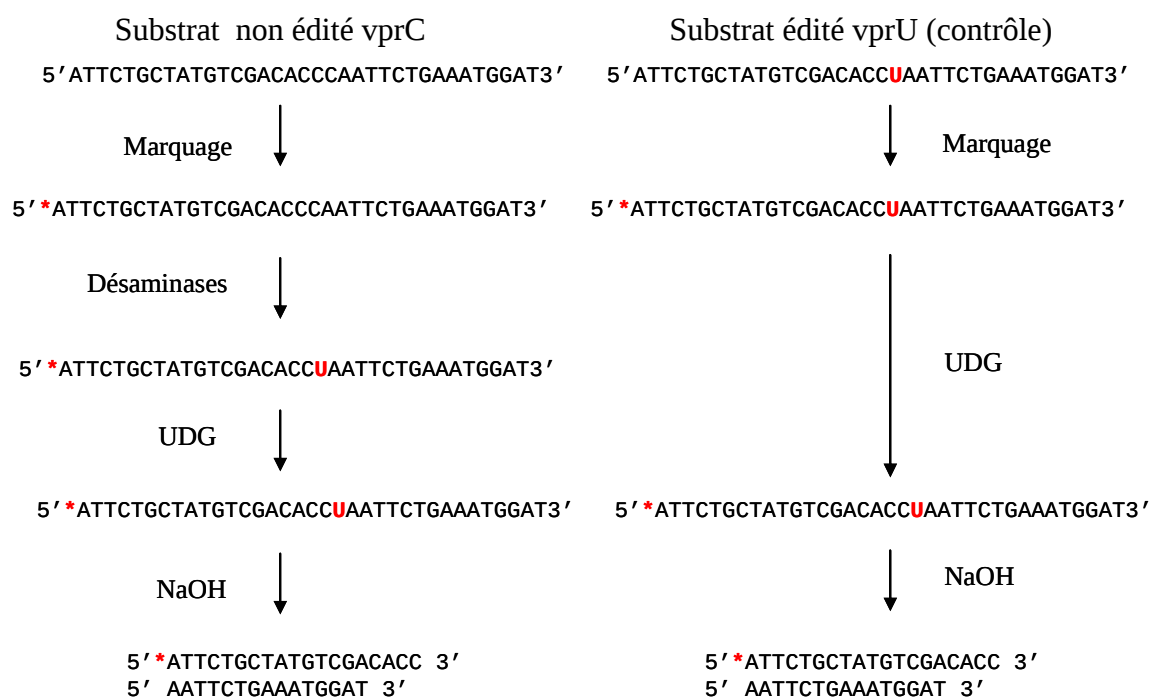


Figure 32: Principe du test de désamination

Le substrat vprC est incubé avec la désaminase dans les conditions décrites dans le Matériels et Méthodes. Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'ajout d'UDG assure le clivage de la base U générée par l'action de la désaminase. Finalement le produit est soumis à l'action du NaOH qui produit le clivage de la liaison phosphodiester au niveau du site abasique. La réaction contrôle avec le substrat vprU est réalisée dans les mêmes conditions, sauf qu'il n'y a pas d'incubation avec la désaminase. Ce test permet de s'assurer que les étapes auxiliaires à l'essai de désamination de C, le traitement UDG et l'hydrolyse alcaline, fonctionnent correctement. Les produits de clivage sont détectés par autoradiographie après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.2.2. Test de désamination

Dans un premier temps, nous avons effectué le test de désamination en absence des APOBEC3 afin d'écarter la possibilité d'un clivage non spécifique dans les conditions de l'essai (**Figure 33**).

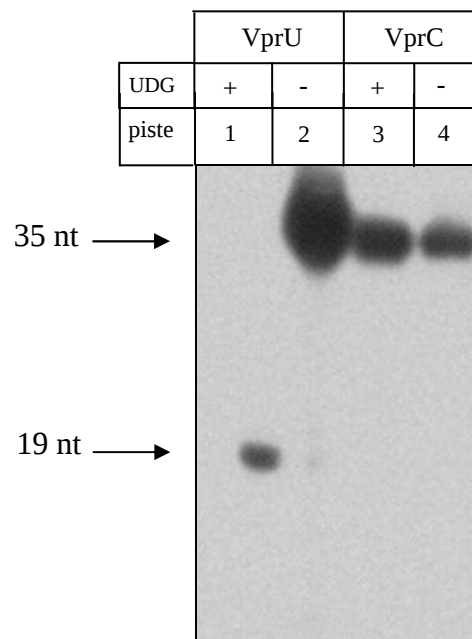


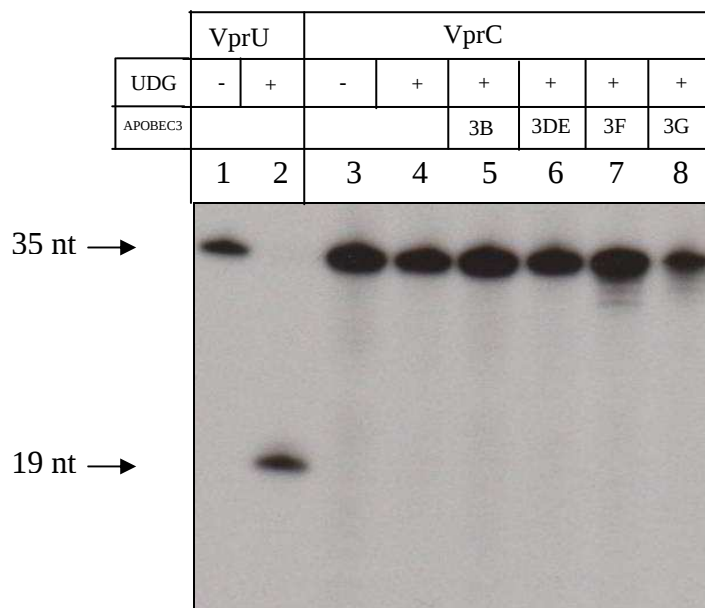
Figure 33: Test de clivage à l'UDG

La migration des produits issus de la réaction est réalisée sur un gel dénaturant 12 % polyacrylamide, 7M urée

Nous pouvons observer le clivage de vprU lorsque l'UDG est rajoutée au mélange réactionnel (piste1). Le substrat vprC ne subit pas de clivage en présence d'UDG (piste 3). En absence d'UDG, les deux substrats ne sont pas modifiés (piste 2 et 4). L'ensemble de ces résultats confirme que le clivage observé pour vprU correspond à la perte de base qui facilite l'hydrolyse par la soude. De plus, aucun clivage non spécifique, pouvant être l'action de nucléases contaminantes de l'UDG, n'est observé.

Ce test de désamination a ensuite été réalisé avec les différentes protéines APOBEC3 que nous avons produites (**Figure 34**).

a)



b)

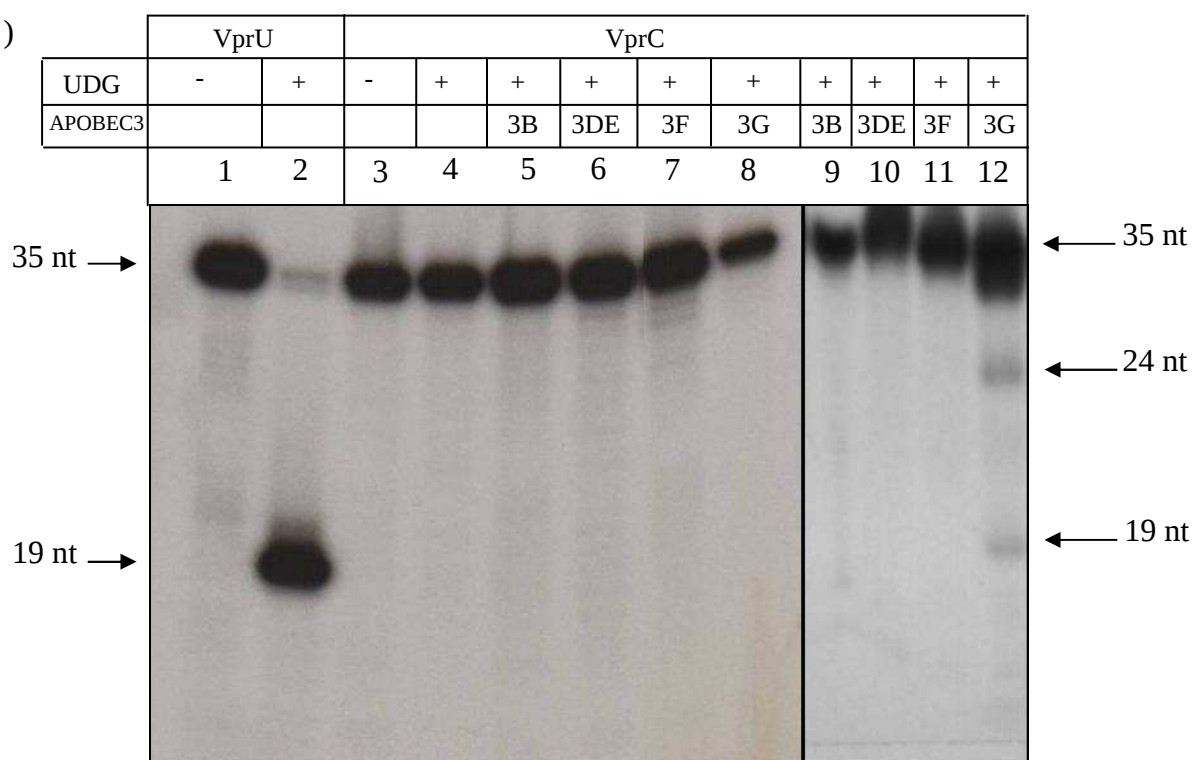


Figure 34: Tests de désamination

La migration des produits issus de la réaction est réalisée sur gel dénaturant 12 % polyacrylamide, 7M urée.

a- Test réalisé avec les protéines issues des corps d'inclusion

b- Test réalisé avec les protéines solubles obtenues suite à la co-expression avec des protéines chaperonnes

Les réactions 5 à 8 sont réalisées avec les protéines fusionnées à la thiorédoxine, les réactions 9 à 12 avec les protéines sans l'étiquette thiorédoxine.

Pour les protéines fusionnées à la thiorédoxine, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité cytidine désaminase (Pistes 5 à 8, **figures 34a et b**). Pour ces différents tests, les conditions expérimentales (UDG) ne sont pas en cause (Pistes 1 à 4, **figures 34a et b**). Pour les protéines produites sans étiquette thiorédoxine, en présence des protéines chaperonnes, nous pouvons observer un clivage de vprC en présence d'APOBEC3G, mais pas avec les autres protéines (**Figure 34b**, pistes 9 à 12). Dans ce cas, si vprC reste majoritairement non clivé, deux bandes de faible intensité apparaissent à 19 et 24 nucléotides. La taille des fragments obtenus est compatible avec la désamination des résidus C20 et C25 par la protéine APOBEC3G (**Figure 35**).

VprC : 5' ATT CTG CTA TGT CGA CAC CCA ATT CTG AAA TGG AT 3'

Figure 35: Localisation des sites de clivage observés sur vprC au cours du test de désamination réalisé avec la protéine APOBEC3G soluble ne possédant pas l'étiquette thiorédoxine.

Les deux sites concernés sont indiqués en rouge.

Sur toutes les désaminases testées, seule APOBEC3G a montré une activité sur le substrat vprC. La question que l'on peut alors se poser est de savoir si ce substrat est adéquat pour l'ensemble des désaminases. Sur les 35 nucléotides qui le composent, 8 résidus sont des C qui peuvent être sujettes à la désamination par les APOBEC3. Sur ces 8 sites, 3 se situent dans un contexte dinucléotidique 5'TC, 2 dans un contexte dinucléotidique 5'AC, 2 se situent dans un contexte dinucléotidique 5'CC, et 1 dans un contexte dinucléotidique 5'GC. Si les contextes nucléotidiques 5'AC et 5'GC ne sont pas de sites cibles identifiés pour les APOBEC3, le contexte 5'CC est lui caractéristique d'APOBEC3G (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), et le contexte 5'TC est caractéristique des autres désaminases (Bishop *et*

al., 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004). Le substrat vprC est donc une cible adéquate pour l'ensemble des désaminases.

Afin de visualiser l'interaction des protéines avec le substrat VprC, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel (**Figure 37**). Le test consiste à incuber le substrat vprC avec les protéines de la famille APOBEC3. Le mélange réactionnel est ensuite soumis à une électrophorèse en conditions non dénaturantes. En cas d'interaction, le signal radioactif sera déplacé dans une zone de masse moléculaire plus élevée.

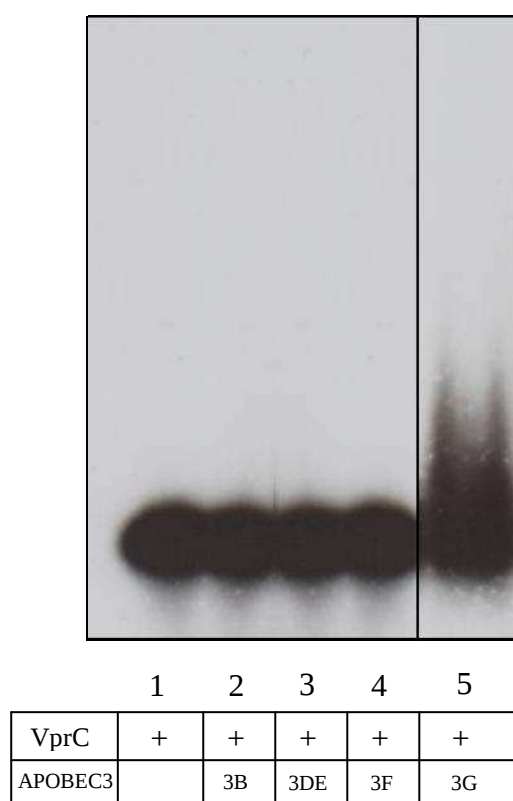


Figure 36: Test de retard sur gel entre VprC et les APOBEC3

La migration est réalisée sur un gel non dénaturant, 6% polyacrylamide.

Dans les conditions utilisées, le signal radioactif n'est déplacé qu'en présence de la protéine APOBEC3G (piste 5), ce qui suggère que cette protéine est capable de se fixer au substrat. L'absence de fixation des autres désaminases sur ce substrat (pistes 2 à 4) permet d'expliquer l'absence d'activité de ces dernières (**Figure 34**). En effet, dans la mesure où le substrat est

une cible potentielle pour chaque désaminase, nous pouvons penser que cette absence de fixation pourrait être due à un mauvais repliement de la protéine ce qui empêcherait cette dernière d'exercer son activité. Une autre possibilité pour expliquer l'absence d'activité *in vitro* pourrait être l'absence de cofacteurs facilitant l'activité des APOBEC3.

Lors de leur formation, les particules virales incorporent des protéines cellulaires. Des études montrent qu'APOBEC3G peut être incorporée dans les nouveaux virions (Cen *et al.*, 2004). La protéine APOBEC3G serait alors idéalement placée d'un point de vue stratégique pour exercer son activité de désamination. Il est intéressant de noter que des protéines cellulaires comme l'UNG2 qui est une uracile DNA glycosylase (Priest *et al.*, 2003), ou la GAPDH qui outre sa fonction dans la glycolyse possède aussi une activité UDG (Meyer-Siegler *et al.*, 1991), ont été trouvées incorporées dans les virions du VIH-1 (Ott *et al.*, 2000; Priest *et al.*, 2003). Or l'activité UDG placée dans le même environnement pourrait accéder rapidement à l'ADN viral modifié par APOBEC3G. Une étude récente a montré que UNG2 ne participait pas à l'effet antiviral d'APOBEC3G (Kaiser & Emerman, 2006). La GAPDH est une protéine aux fonctions multiples (Sirover, 1999; 2005), qui est capable de se lier à l'ADN (Perucho *et al.*, 1977), mais aussi à l'ARN (Nagy & Rigby, 1995; Ryazanov, 1985; Singh & Green, 1993) et qui intervient dans l'action de plusieurs virus (De *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1996; Zang *et al.*, 1998).

Dans la mesure où nous savons que la GAPDH est capable de se lier à l'ADN et d'interagir avec des protéines (Perucho *et al.*, 1977; Sirover, 1999), nous avons voulu savoir, dans un premier temps, si la GAPDH était capable d'interagir avec le complexe APOBEC3G-VprC. Afin de tester cette possibilité, nous avons incorporé la GAPDH dans les expériences de retard sur gel. Le test consiste à incuber le substrat vprC avec la GAPDH, en présence ou non de la protéine APOBEC3G. Le mélange réactionnel est ensuite soumis à une électrophorèse en conditions non dénaturantes.

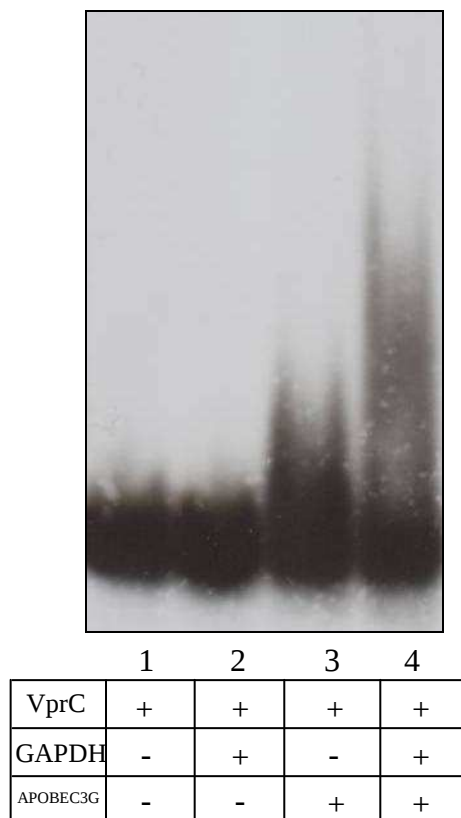


Figure 37: Test de retard sur gel entre vprC, APOBEC3G et la GAPDH

La migration est effectuée sur un gel non dénaturant, 6% polyacrylamide.

Dans les conditions utilisées, aucun retard de la sonde vprC n'est observé avec la GAPDH (Figure 38, piste 2). Comme observé précédemment, un déplacement du signal radioactif est obtenu lorsque vprC est incubé avec APOBEC3G (piste 3). Quand vprC est incubé avec les deux protéines, le retard est évident dans une région de masse moléculaire supérieure, suggérant la formation d'un complexe tripartite vprC-APOBEC3G-GAPDH (piste 4). Le fait de ne pas observer une bande nette pour les pistes 3 et 4, peut s'interpréter comme une dissociation du complexe au cours de l'électrophorèse. Ce résultat suggère que la GAPDH interagit avec APOBEC3G, formant un supercomplexe avec le substrat.

Devant ces résultats, nous avons vérifié que la GAPDH possédait bien l'activité UDG qui lui était attribuée (Meyer-Siegler *et al.*, 1991). Pour cela, nous avons utilisé vprC et vprU comme substrat dans les conditions similaires à celles du test *in vitro* déjà décrit (**Figure 38**).

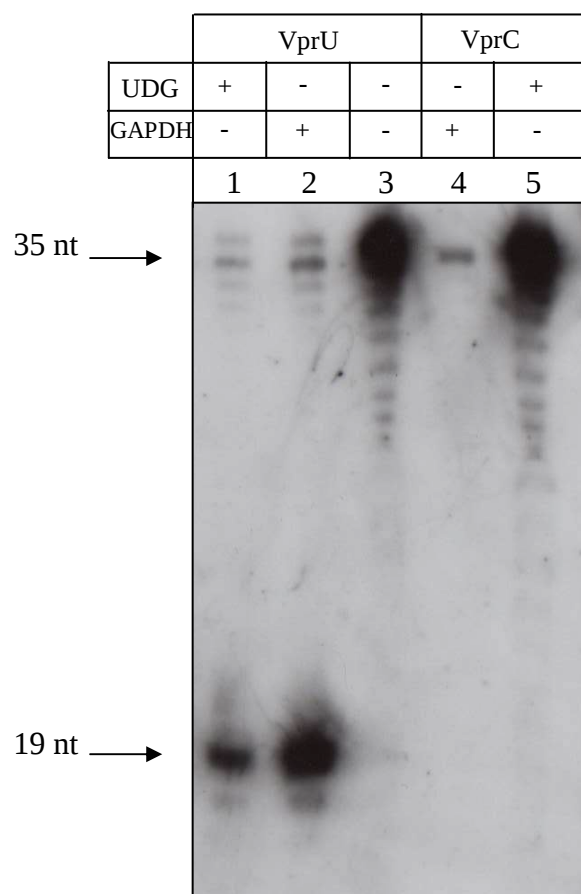


Figure 38: Test de l'activité UDG de la GAPDH sur le substrat vprU

La migration des produits issus de la réaction est réalisée sur un gel dénaturant 12 % polyacrylamide, 7M urée.

En présence de GAPDH, le substrat vprU est clivé de la même façon qu'avec l'UDG (pistes 1 et 2). Comme attendu, vprC utilisé comme contrôle ne subit aucune modification en présence de la GAPDH (piste 4) ou de l'UDG (piste 5). Ces résultats montrent que la GAPDH possède bien une activité UDG, et que celle-ci est compatible avec les conditions que nous utilisons lors de nos expériences.

Dans le cas de l'édition du transcrit de l'apolipoprotéine B, il a été montré que la protéine APOBEC1 est nécessaire mais pas suffisante pour catalyser seule la réaction d'édition

(Navaratnam *et al.*, 1995; Teng & Davidson, 1992). La protéine ACF, connue pour interagir avec APOBEC1 (Lellek *et al.*, 2000; Mehta *et al.*, 2000), est capable de se lier sur le transcrit sur une région qui encadre le site à éditer, dirigeant alors la sous-unité catalytique de la désaminase sur le site d'édition. Dans le cas de la protéine APOBEC3G, nous avons vraisemblablement à faire à un tout autre mécanisme. En effet, d'après nos résultats, et contrairement à APOBEC1, la protéine APOBEC3G seule semble être suffisante pour catalyser la réaction de désamination (Chelico *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2007).

Les données que nous avons obtenues avec la GAPDH permettent de postuler un rôle de cette dernière dans la réaction d'interférence virale par l'APOBEC3G. De plus, l'interaction de la GAPDH avec la désaminase pourrait expliquer pourquoi elle est retrouvée encapsidée dans les virions, APOBEC3G étant elle-même incorporée dans les virions grâce à une interaction spécifique avec la protéine virale Gag (Alce & Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004). Il serait intéressant d'analyser la présence de la GAPDH dans les virions provenant de souches de VIH-1 Δ Vif.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Partie 1

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu mettre en évidence dans les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1 et chez un patient non progressif à long terme, des transitions C-T et G-A au niveau de la séquence *vpr* qui pourraient être le résultat de l'activité de cytidines désaminases. Ces changements conduisent à la création de codons stop ou à l'inhibition de l'épissage. Or, la protéine VPR possède plusieurs activités qui lui confèrent une activité cytotoxique. Ainsi, la diminution de l'expression de cette protéine pourrait être considérée comme un mécanisme de protection cellulaire visant à abolir l'effet cytotoxique de VPR. En échappant ainsi à la destruction, la cellule se trouverait dans un état d'infection chronique. Des analyses par RT-PCR nous ont permis de mettre en évidence l'expression d'*apobec3B*, *3C*, *3DE*, *3F* et *3G* dans ces cellules. Grâce à la mise en place d'une technique de dosage des différentes apobec3 par RT-PCR quantitative, nous avons pu mettre en évidence des différences d'expression de ces cytidines désaminases dans un contexte d'infection chronique, comparativement à un contexte sain. Ces différences se traduisent principalement par une forte augmentation d'*apobec3DE*, *3F* et *3G* dans les cellules chroniquement infectées, et par une augmentation plus faible de ces mêmes apobec3 chez le patient NPLT, ainsi que l'apparition de l'expression très prononcée d'*apobec3B*. Ces données, appuyées par les contextes nucléotidiques de désamination, nous permettent de dire que pour les cellules chroniquement infectées par le virus du VIH-1 et pour le patient 4, il nous semble fortement envisageable de penser que cet état chronique soit dû à la présence de virus défectif, dont l'origine serait imputable à l'action de protéines de la famille APOBEC3 surexprimées. Devant ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre cette étude à d'autres patients NPLT. Sur les 5 patients intégrés à l'étude, 1 présentait de nombreuses transitions C-T et G-A au niveau de la séquence de *vpr*, capables de conduire à l'inactivation de *vpr*. L'analyse chez un plus grand nombre de patients nous permettrait de savoir si d'autres présentent des mutations comparables, ceci afin de savoir si les phénomènes d'édition observés et les modifications d'expression des différentes désaminases pour le patient 4 sont un cas unique ou s'ils peuvent être généralisés à d'autres patients NPLT.

Dans la mesure où dans la majorité des cas, l'infection par le virus du VIH-1 ne conduit pas à un état chronique mais donne lieu à une infection aiguë, nous avons voulu savoir si l'expression des cytidines désaminases est sujette à des modifications suite à l'infection, et si

oui, à quel moment par rapport à l'infection. Ainsi, nous avons pu observer qu'au cours des 48 heures qui suivent l'infection des cellules par le virus du VIH-1, l'expression de chaque désaminase est soumise à des modifications. Nous avons pu classer les cytidines désaminases en 3 groupes, en fonction du moment où ces modifications sont visibles. Ainsi, *apobec3C*, *3F* et *3G* voient leur expression diminuer au cours de la phase précoce du cycle viral. *Apobec3DE* voit son expression stimulée d'un facteur 9 à une étape précise du cycle viral. Et enfin, l'expression d'*apobec3B* est stimulée au moment de la phase tardive du cycle viral. Il apparaît clairement que l'infection des cellules par le virus du VIH-1 modifie l'expression des transcrits correspondants aux *apobec3*. Toutefois à ce stade, nous ne sommes pas en mesure de préciser si ces changements sont dus au mécanisme général de la fixation du virus à la surface cellulaire, ou s'ils sont spécifiques des composants du VIH-1. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de réitérer cette expérience d'infection avec des pseudoparticules virales.

Enfin, dans la mesure où nous avons à notre disposition un outil qui nous permet d'avoir une vision plus précise quant à l'expression des différentes cytidines désaminases dans les cellules, nous avons voulu savoir s'il était possible de corréler une possible augmentation de l'expression de ces désaminases avec les phénomènes d'édition ou de chronicité observés pour d'autres virus. Ainsi, dans le cadre du papillomavirus, nous avons pu mettre en évidence une forte expression d'*apobec3C* comparativement aux autres désaminases, ce qui semble aller dans le sens de données récentes qui suggèrent que la protéine APOBEC3C pourrait être responsable des phénomènes d'édition observés sur le génome de ce virus (Vartanian *et al.*, 2008). Dans le cadre du virus de l'hépatite B, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression d'*apobec3F* et *3G*, qui ont été montrées comme étant capables d'éditer massivement le génome viral (Suspene *et al.*, 2005). Nous avons aussi mis en évidence une forte stimulation de l'expression d'*apobec3DE*, mais à ce jour aucune étude ne portant sur la capacité de cette protéine à éditer le génome du VHB n'a été menée. Il serait intéressant en effet de savoir s'il est possible de corréler cette augmentation d'expression à ce phénomène. Enfin pour le virus de l'hépatite C, nous avons confirmé une augmentation de l'expression d'*apobec3G*, et mis en évidence l'augmentation de l'expression d'autres désaminases (*apobec3C*, *3DE*, *3F*). Une étude menée en 2006 (Komohara *et al.*, 2006), a permis de mettre en évidence que l'expression d'*apobec3G* était stimulée par la protéine non structurale NS5A, mais pas par les autres. Les résultats obtenus

suggèrent que d'autres désaminases pourraient être sujettes à de telles régulations par les protéines virales non structurales, mais aussi par les protéines virales structurales.

Partie 2

Grâce à des modifications apportées au protocole de production des désaminases chez la bactérie, nous avons pu obtenir des protéines sous forme soluble. Au cours des différents tests *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence, une activité de désamination pour la protéine APOBEC3G sur le substrat vprC. Ceci suggère que cette protéine pourrait exercer seule son activité de désamination et pourrait être responsable des phénomènes d'édition observés sur le génome du VIH-1 dans les cellules chroniquement infectées. L'absence d'activité des autres cytidines désaminases ne permet pas de conclure qu'elles ne sont pas responsables des phénomènes d'édition dans ces mêmes cellules. Il se peut en effet que leur cible ne corresponde pas à l'oligonucléotide VprC que nous avons choisi, mais soit une autre séquence au niveau de *vpr*, voire une autre séquence au sein du génome du VIH-1. Une autre possibilité est que ces protéines aient besoin de cofacteurs pour exercer leur activité. La réalisation de tests *in vitro* en présence de facteurs nucléaires pourraient nous permettre de répondre à cette hypothèse.

Des études ayant montré qu'APOBEC3G était incorporée dans les nouveaux virions (Cen *et al.*, 2004) et dans la mesure où lors de leur formation, les particules virales incorporent des protéines cellulaires, certaines de ces protéines pourraient participer à l'activité d'APOBEC3G. Nous nous sommes alors orientés vers la GAPDH, car cette dernière a en effet été montrée comme étant incorporée dans les virions (Ott *et al.*, 2000), et possède une activité UDG (Meyer-Siegler *et al.*, 1991). Nous avons confirmé l'activité UDG qui lui est associée. Nous avons aussi montré que cette protéine est capable d'interagir avec la protéine APOBEC3G, mais elle ne se lie pas au substrat vprC. Une analyse préliminaire montre que la présence de GAPDH semble modifier l'activité d'APOBEC3G.

Si la mise en place de ces tests *in vitro* nous a apporté quelques informations, il serait intéressant de développer un système de test *ex vivo*. Pour cela, la technique envisagée consiste à mettre au point des cellules contenant le gène *vpr* intégré de manière stable dans le

génomique cellulaire, et dont l'expression serait inductible. Le test consisterait alors à surexprimer une désaminase dans ces cellules, puis par clonage suivi de séquençage, regarder si des phénomènes d'édition peuvent être observés sur l'ARN et l'ADN correspondant à *vpr*.

Il est aussi important de signaler que la fonction de telles désaminases dans la cellule, ainsi que les mécanismes de protection des acides nucléiques cellulaires de l'action mutagène potentielle de ces enzymes sont inconnus. Il semble toutefois évident que ces enzymes soient régulées au sein de la cellule. En effet, si la maîtrise de cette fonction peut conférer à la cellule un potentiel d'évolution accru, un dysfonctionnement peut être à l'origine de pathologies et éventuellement contribuer à la formation de tumeurs. Il semble donc nécessaire de connaître la façon dont ces protéines sont régulées dans la cellule. Pour cela, une possibilité consisterait à identifier les partenaires cellulaires de ces protéines. La technique envisagée fait appel au système TAP-tag dans les cellules humaines. Pour cela, les cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour la protéine dont on cherche les partenaires potentiels. La purification du complexe protéique associé à la désaminase est réalisée en conditions non dénaturantes, grâce aux étiquettes fusionnées en position N-ter ou C-ter de la protéine.

TRAVAUX EN COURS

1. Mise en place d'un test de désamination *ex vivo*

1.1. Principe du test

Parallèlement aux tests de désamination *in vitro*, nous avons voulu développer un système *ex vivo*. Ce système nous permet de nous affranchir des problèmes liés à la production et à la purification des protéines dans un système bactérien, tout en étant dans un contexte physiologique optimum. Pour cela nous avons cherché à mettre au point des cellules contenant la séquence de *vpr* intégrée de manière stable dans le génome cellulaire, mais dont l'expression est inductible. Une fois cette étape réalisée, le test consiste à surexprimer une désaminase, puis par clonage suivi de séquençage, regarder si des phénomènes d'édition peuvent être observés sur l'ARN (via analyse des cDNA après reverse transcription) ou l'ADN correspondant à *vpr*. Pour mettre au point cette lignée cellulaire, nous avons utilisé le système Jurkat Flp-in T-REx de chez Invitrogen. Dans notre système, l'expression de ce dernier est induite par l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture.

Les cellules Jurkat Flp-in possèdent un site FRT (Flp Recombination Target) intégré dans leur génome. C'est au niveau de ce site que la séquence d'intérêt sera insérée par la suite, à l'aide du plasmide pOG44 codant pour une Flp recombinase. La séquence d'intérêt est portée par le plasmide pcDNA5/FRT/TO. C'est au niveau du site FRT de ce plasmide que l'intégration est réalisée, et l'expression du gène d'intérêt est inductible par la tétracycline. Ce système nécessite donc qu'au préalable, les cellules soient transfectées avec le plasmide pcDNA6/TR codant pour un répresseur. Ainsi, en absence de tétracycline, le plasmide pcDNA6 code pour un répresseur qui va venir se fixer au niveau du promoteur du plasmide pcDNA5/FRT/TO, ce qui réprime l'expression de notre gène d'intérêt. En présence de tétracycline, celle-ci vient se fixer sur le répresseur, entraînant un changement de conformation de ce dernier. Le complexe répresseur-tétracycline ainsi formé se détache du promoteur, permettant la transcription du gène d'intérêt.

1.2. Mise au point des conditions de transfection

La lignée cellulaire Jurkat est une lignée lymphocytaire. Le problème de ces cellules est qu'elles sont difficilement transfectables par les agents de transfection classiquement utilisés, les taux de transfections variant de 3 à 5 % au mieux. Ces taux sont très insuffisants pour espérer mettre au point ce système. Nous avons testé la nucléofection. Pour chaque essai, 10^6 cellules sont transfectées avec 1 μ g de plasmide contrôle, le pmaxGFP. Les différents programmes conçus pour la nucléofection de ces cellules ont été testés, et nous avons pu obtenir plus de 90 % de cellules transfectées avec le programme S-18 (**Figure 39**).

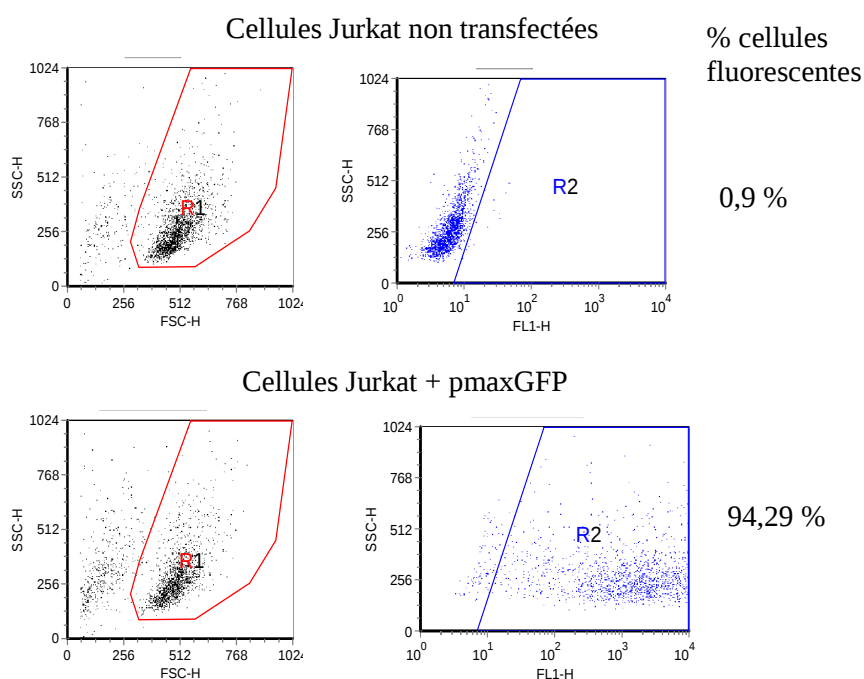


Figure 39: Quantification par cytométrie de flux, de la fluorescence associée à la nucléofection du plasmide pmaxGFP, dans les cellules Jurkat.

1.3. Obtention de populations clonales

La première transfection avec le plasmide pcDNA6/TR est une étape primordiale dans la mise en place de la lignée cellulaire. En effet, suivant l'endroit où le gène codant pour le répresseur est inséré dans le génome, il sera peu ou bien exprimé. Nous avons réalisé un tri

cellulaire afin d'obtenir des populations clonales. Sur les 4 plaques 96 puits réalisées pour le tri cellulaire, nous avons pu obtenir après sélection par les antibiotiques adéquats, 32 populations clonales.

1.4. Sélection de la population clonale adéquate pour les tests ex vivo

Chacun des 32 clones a été testé par transfection transitoire à l'aide du plasmide pCDNA5/FRT/TO contenant la séquence de l'*hMGFP* à la place de la séquence *vpr*, ceci afin d'analyser leur comportement en présence et en absence de tétracycline. La population clonale idéale étant alors définie comme celle n'ayant pas, ou peu, de fluorescence en absence de tétracycline, et une forte fluorescence en présence de tétracycline. Nous avons reproduit ces transfections 3 fois, de manière indépendante, afin de confirmer les résultats obtenus. Au bout de 48 heures après la transfection, les cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre de flux. Sur les 32 populations initiales, il s'avère que seul un clone, le clone B5A2, correspond au profil recherché (**Figure 40**). Nous avons donc sélectionné ce clone pour la suite de l'étude.

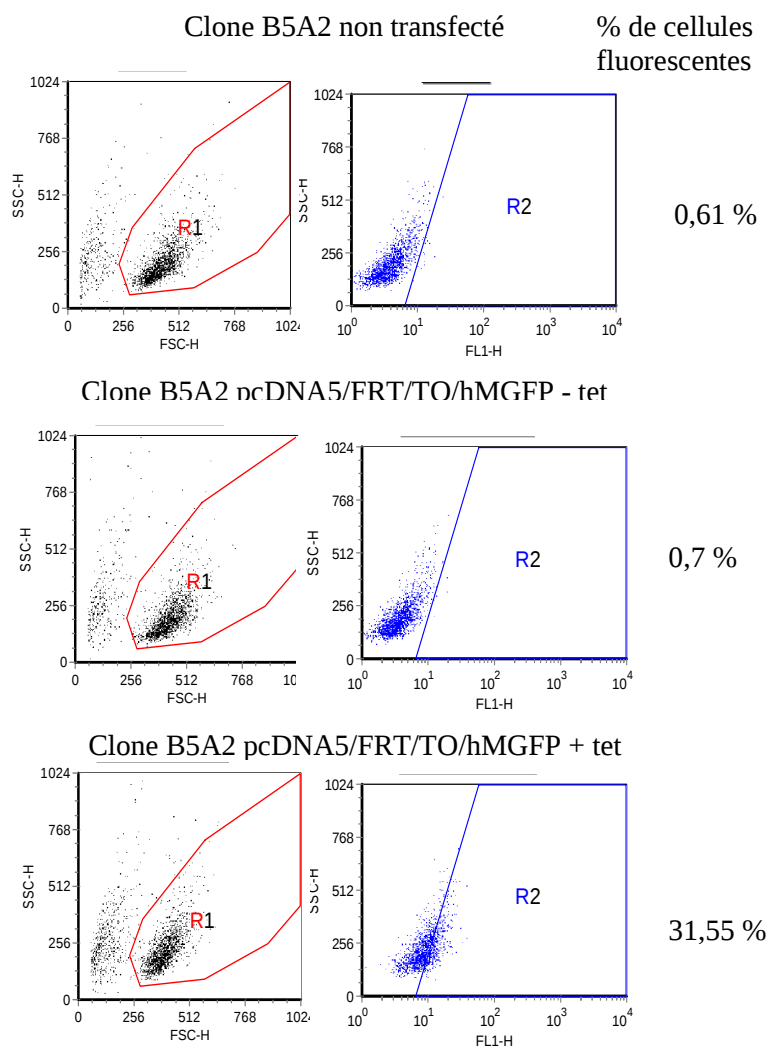


Figure 40: Quantification par cytométrie de flux de la fluorescence associée à la nucléofection d'un plasmide codant pour l'hMGFP, en présence et en absence de tétracycline, pour le clone B5A2.

1.5. Etablissement de la lignée cellulaire contenant la séquence vpr intégrée de manière stable dans son génome

Le clone B5A2 a alors été co-transfecté avec le plasmide pOG44 et le plasmide pCDNA5/FRT/TO contenant soit la séquence de l'hMGFP (contrôle), soit la séquence correspondant à *vpr*, de façon à obtenir une lignée contenant les séquences de *vpr* ou de l'hMGFP intégrées de manière stable dans leur génome. Nous avons réussi à établir une

lignée contenant la séquence de l'*hMGFP* intégrée de manière stable au sein de son génome cellulaire. A ce jour, nous n'avons pas été en mesure d'établir une telle lignée avec la séquence *vpr*.

2. Recherche des partenaires cellulaires potentiels des cytidines désaminases de la famille APOBEC3

La fonction de telles désaminases dans la cellule n'est pas élucidée. En effet, si ces protéines sont principalement étudiées pour leur activité de restriction virale, il ne faut pas oublier qu'elles sont aussi exprimées dans un contexte sain. L'identification de ces partenaires protéiques serait un grand pas en avant quant à la compréhension du rôle et de la régulation des APOBEC3 dans la cellule. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser la technique de purification de complexes protéiques par TAP-tag, dans les cellules humaines. Cette méthode consiste à étiqueter une protéine, et après extraction dans des conditions non dénaturantes, la purifier et analyser les protéines qui lui sont associées.

2.1. Principe de la technique

L'étiquette que nous avons utilisée est constituée des deux domaines d'affinité CBP et Protéine A séparés par un site de clivage par la protéase TEV (**Figure 41**).

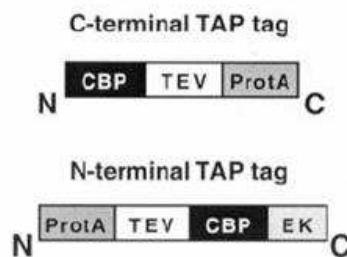


Figure 41: Etiquettes utilisées pour la purification des complexes protéiques

Différentes constructions ont été réalisées, dans le plasmide pcDNA3, de façon à obtenir chaque cytidine désaminase fusionnées en position N-ter ou C-ter avec cette étiquette. Les cellules sont transfectées de manière transitoire par le plasmide contenant la construction d'intérêt. Au bout de 72 heures, les cellules sont lysées et les protéines totales extraites. Les complexes protéiques sont purifiés par passage sur deux colonnes et coupure spécifique à la TEV. Dans un premier temps, les protéines totales sont incubées avec des billes d'IgG. Après plusieurs lavages afin d'éliminer le maximum de protéines contaminantes, les complexes sont élués par clivage par la TEV et passées sur une colonne calmoduline. L'élué des complexes protéiques se fait par ajout d'EGTA.

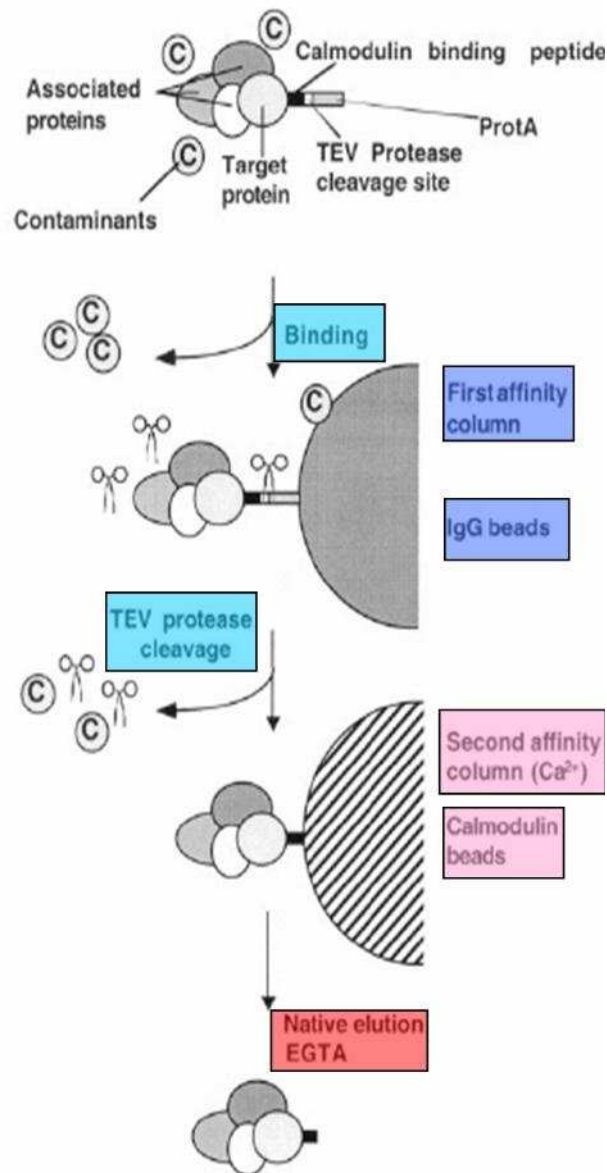


Figure 42: Principe de la purification de complexes protéiques par TAP-tag

2.2. Mise au point de la technique

Afin d'avoir une quantité de matériel suffisante, nous avons besoin de transfecter au moins 2.10^8 cellules, or le protocole standard de nucleofection suggère l'utilisation de 10^6 cellules par transfection. Suite à différents essais, nous avons pu, grâce au programme S-18 et une quantité d'ADN plasmidique de 5 μ g, augmenter la quantité de cellules par transfection à 2.10^7 , et ce avec un pourcentage de transfection compris entre 90 et 95%.

Une fois les cellules transfectées, il a d'abord fallu vérifier l'expression de la construction dans les cellules. Pour cela, nous avons extrait les protéines 24, 48, 72 heures après transfection, puis l'expression de la protéine a été analysée par Western blot. Etant donné la présence du domaine protéine A dans la protéine de fusion, nous avons pu utiliser des IgG comme anticorps primaire.

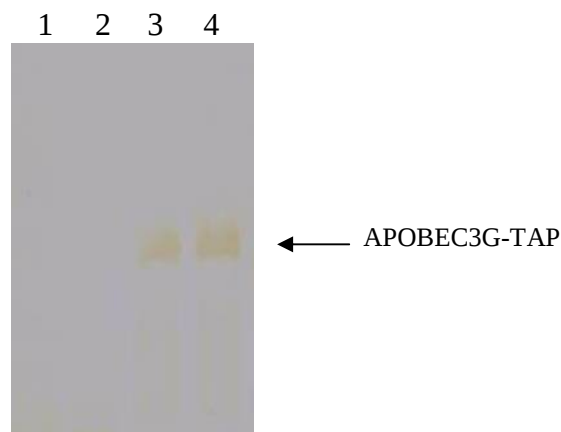


Figure 43: Expression de la protéine APOBEC3G fusionnée au TAP-tag

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. La piste 1 représente la fraction protéique issues de cellules non transfectées, les pistes 2 à 4 les fractions issues de cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine APOBEC3G fusionnée en N-ter avec le TAP-tag, à 24 h (piste 2), 48 h (piste 3) et 72 h (piste 4).

L'absence de réaction en piste 1 confirme la spécificité de la détection. La protéine est détectée au bout de 48 heures après la transfection des cellules (piste 3). L'expression de la protéine étant plus importante à 72 h qu'à 48 h (pistes 2 et 3), nous avons choisi d'extraire les protéines au bout de 72 heures.

2.3. Purification et analyse des complexes protéiques

Pour chaque construction, 10 transfections de 2.10^7 cellules sont effectuées. Au bout de 72 heures, et après 3 cycles de congélation-décongélation, les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse. Le lysat ainsi obtenu est incubé avec des billes d'IgG. Puis 100 unités de TEV sont rajoutées. Les billes d'IgG sont alors centrifugées et le surnageant déposé sur une colonne calmoduline, à raison de 0,1 mL/min, après avoir été ajusté à 2 mM CaCl_2 final. Après le dépôt de l'échantillon sur la colonne, celle-ci est lavée et les protéines sont éluées en présence d'EGTA, 2mM final. Nous avons aussi réalisé cette expérience avec des cellules H9 non transfectées. Ces dernières constituent un témoin négatif et nous donnent des indications sur les protéines qui pourraient se fixer de façon non spécifiques.

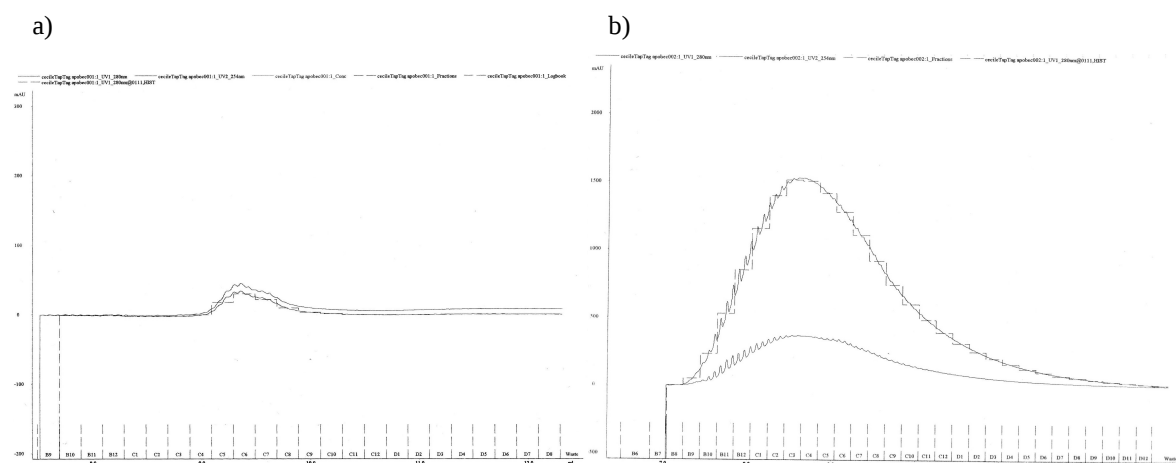


Figure 44: Chromatogrammes obtenus après élution à l'EGTA

a- cellules non transfectées

b- cellules transfectées par le plasmide codant pour la protéine APOBEC3G fusionnée en C-ter par le TAP-tag.

Dans les cas des cellules H9 non transfectées (**Figure 44-a**), nous pouvons observer l'apparition d'un pic de faible intensité au moment de l'élution. Ce dernier nous indique que des protéines non spécifiques, dites protéines contaminantes, sont capables de se fixer et ainsi d'être purifiées. Pour les cellules transfectées avec la construction codant pour la protéine APOBEC3G fusionnée en C-ter avec le TAP-tag, nous avons pu observer un pic au moment de l'élution nettement plus important que pour les cellules non transfectées (**Figure 44-b**). Ce premier résultat suggère que des protéines autres que les protéines contaminantes se sont fixées.

Après élution, les fractions correspondant au pic d'élution sont regroupées. La quantité de protéine est ensuite mesurée. Les protéines sont ensuite précipitées, par la méthode méthanol chloroforme. Les culots protéiques ainsi obtenus sont ensuite directement repris dans du tampon de charge. La migration est effectuée sur un gel SDS-PAGE. A cause de la faible quantité de protéines, une coloration au bleu de coomassie n'est pas envisageable. Nous avons donc coloré les gels au nitrate d'argent, à l'aide du kit ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma®), ce dernier étant compatible avec les analyses en spectrométrie de masse.

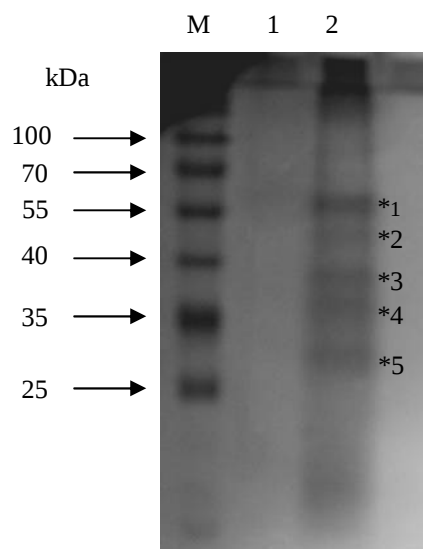


Figure 45: Analyse des protéines co-purifiées avec la protéine APOBEC3G

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (12 % acrylamide). La révélation des protéines est réalisée grâce au nitrate d'argent, à l'aide du kit ProteoSilver™ Silver Stain Kit

(Sigma®). La piste 1 correspond à l'éluat obtenu pour les cellules H9 non transfectées, la piste 2 correspond à l'éluat obtenu pour les cellules transfectées avec la construction TAP-APOBEC3G

Nous n'observons pas de protéine pour les cellules non transfectées. Lors des tests effectués avec la protéine APOBEC3G, nous avons pu mettre en évidence l'apparition de 5 bandes sur le gel SDS-PAGE, ce qui suggère l'existence d'un complexe d'au moins 5 protéines. A ce jour, nous n'avons pas obtenus de résultats quant à l'identification de ces protéines. Toutefois, nous pouvons supposer que la bande *2 d'environ 51 kDa correspond à la protéine APOBEC3G dans la mesure où c'est elle qui sert d'appât. Sur les 4 autres bandes observées, la bande *4 a une taille qui pourrait correspondre à celle de la GAPDH (37 kDa), protéine que nous avons montré comme interagissant avec APOBEC3G (Résultats et Discussion, Partie 2).

L'identification des différentes protéines est possible grâce à la spectrométrie de masse. A ce jour, à cause d'une trop faible quantité de protéine au sein des échantillons, nous n'avons pas réussi à identifier ces différentes protéines. Une solution pour palier à ce problème consisterait à augmenter la quantité de matériel de départ.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguiar, R. S. & Peterlin, B. M. (2008). APOBEC3 proteins and reverse transcription. *Virus Res* 134, 74-85.
- Alce, T. M. & Popik, W. (2004). APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 279, 34083-34086.
- Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T. C., Gaddis, N. C., Auerbach, M. R., Malim, M. H., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Sullivan, J. L. & Desrosiers, R. C. (2000). Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 74, 4361-4376.
- Amendt, B. A., Hesslein, D., Chang, L. J. & Stoltzfus, C. M. (1994). Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Cell Biol* 14, 3960-3970.
- Amendt, B. A., Si, Z. H. & Stoltzfus, C. M. (1995). Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 and tat-rev exon 3: evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol Cell Biol* 15, 6480.
- Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Kudchodkar, S., Chang, D., Nagashunmugam, T., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1997). HIV-1 viral protein R (Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cells and monocytoïd cells in vitro. *J Leukoc Biol* 62, 93-99.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Bartek, J. & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 238-245.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63, 71-180.
- Bass, B. L. & Weintraub, H. (1987). A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell* 48, 607-613.
- Baumert, T. F., Rosler, C., Malim, M. H. & von Weizsacker, F. (2007). Hepatitis B virus DNA is subject to extensive editing by the human deaminase APOBEC3C. *Hepatology* 46, 682-689.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H. & Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.

- Berkowitz, R. D., Ohagen, A., Hoglund, S. & Goff, S. P. (1995). Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* 69, 6445-6456.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S. J. & Malim, M. H. (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14, 1392-1396.
- Blanc, V., Farre, J. C., Litvak, S. & Araya, A. (2002). Réécriture du matériel génétique : fonctions et mécanismes de l'édition de l'ARN. *Medecine/Sciences* 18, 181-192.
- Blanc, V., Litvak, S. & Araya, A. (1995). RNA editing in wheat mitochondria proceeds by a deamination mechanism. *FEBS Lett* 373, 56-60.
- Bodeus, M., Margottin, F., Durand, H., Rouer, E. & Benarous, R. (1997). Inhibition of prokaryotic cell growth by HIV1 Vpr. *Res Virol* 148, 207-213.
- Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K. & Cullen, B. R. (2006a). APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 89-95.
- Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Hulme, A. E., Garcia-Perez, J. L., O'Shea, K. S., Moran, J. V. & Cullen, B. R. (2006b). Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8780-8785.
- Bonvin, M., Achermann, F., Greeve, I., Stroka, D., Keogh, A., Inderbitzin, D., Candinas, D., Sommer, P., Wain-Hobson, S., Vartanian, J. P. & Greeve, J. (2006). Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 43, 1364-1374.
- Bonvin, M. & Greeve, J. (2007). Effects of point mutations in the cytidine deaminase domains of APOBEC3B on replication and hypermutation of hepatitis B virus in vitro. *J Gen Virol* 88, 3270-3274.
- Bourara, K., Litvak, S. & Araya, A. (2000). Generation of G-to-A and C-to-U changes in HIV-1 transcripts by RNA editing. *Science* 289, 1564-1566.
- Brennicke, A., Marchfelder, A. & Binder, S. (1999). RNA editing. *FEMS Microbiol Rev* 23, 297-316.
- Briggs, C. J., Ott, D. E., Coren, L. V., Oroszlan, S. & Tozser, J. (1999). Comparison of the effect of FK506 and cyclosporin A on virus production in H9 cells chronically and newly infected by HIV-1. *Arch Virol* 144, 2151-2160.
- Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V. & Kazazian, H. H., Jr. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5280-5285.

- Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K. & O'Brien, S. J. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283, 1748-1752.
- Cen, S., Guo, F., Niu, M., Saadatmand, J., Deflassieux, J. & Kleiman, L. (2004). The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279, 33177-33184.
- Chelico, L., Pham, P., Calabrese, P. & Goodman, M. F. (2006). APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' → 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 13, 392-399.
- Chen, H., Lilley, C. E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N. R. & Weitzman, M. D. (2006). APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* 16, 480-485.
- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M. & et al. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238, 363-366.
- Chester, A., Scott, J., Anant, S. & Navaratnam, N. (2000). RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1494, 1-13.
- Choi, S. H. & Hwang, S. B. (2006). Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 281, 7468-7478.
- Choury, D., Farre, J. C., Jordana, X. & Araya, A. (2004). Different patterns in the recognition of editing sites in plant mitochondria. *Nucleic Acids Res* 32, 6397-6406.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. & et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Conticello, S. G., Harris, R. S. & Neuberger, M. S. (2003). The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* 13, 2009-2013.
- Conticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22, 367-377.
- Dang, Y., Wang, X., Esselman, W. J. & Zheng, Y. H. (2006). Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80, 10522-10533.
- Davis, D. A., Newcomb, F. M., Starke, D. W., Ott, D. E., Miéyal, J. J. & Yarchoan, R. (1997). Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate

- the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro. *J Biol Chem* 272, 25935-25940.
- De, B. P., Gupta, S., Zhao, H., Drazba, J. A. & Banerjee, A. K. (1996). Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3. *J Biol Chem* 271, 24728-24735.
- Deininger, P. L., Moran, J. V., Batzer, M. A. & Kazazian, H. H., Jr. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 13, 651-658.
- Del Gatto, F., Gesnel, M. C. & Breathnach, R. (1996). The exon sequence TAGG can inhibit splicing. *Nucleic Acids Res* 24, 2017-2021.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P. & Schwartz, O. (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80, 605-614.
- Desfarges, S. (2007). Transport intracellulaire et intégration du VIH-1 - Implication de l'intégrase rétrovirale -.
- Doehle, B. P., Schafer, A. & Cullen, B. R. (2005). Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology* 339, 281-288.
- Dutko, J. A., Schafer, A., Kenny, A. E., Cullen, B. R. & Curcio, M. J. (2005). Inhibition of a yeast LTR retrotransposon by human APOBEC3 cytidine deaminases. *Curr Biol* 15, 661-666.
- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T. & Schwartz, O. (2005). APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430-433.
- Esnault, C., Millet, J., Schwartz, O. & Heidmann, T. (2006). Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* 34, 1522-1531.
- Estevez, A. M. & Simpson, L. (1999). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review. *Gene* 240, 247-260.
- Farre, J. C., Leon, G., Jordana, X. & Araya, A. (2001). cis Recognition elements in plant mitochondrion RNA editing. *Mol Cell Biol* 21, 6731-6737.
- Fasken, M. B. & Corbett, A. H. (2005). Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 12, 482-488.
- Franke, E. K., Yuan, H. E. & Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359-362.
- Gerber, A. P. & Keller, W. (2001). RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends Biochem Sci* 26, 376-384.

- Ghosh, A. K., Steele, R., Meyer, K., Ray, R. & Ray, R. B. (1999). Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 80 (Pt 5), 1179-1183.
- Giege, P. & Brennicke, A. (1999). RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15324-15329.
- Girard, S., Vossman, E., Misek, D. E., Podevin, P., Hanash, S., Brechot, C. & Beretta, L. (2004). Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 40, 708-718.
- Golden, D. E. & Hajduk, S. L. (2006). The importance of RNA structure in RNA editing and a potential proofreading mechanism for correct guide RNA:pre-mRNA binary complex formation. *J Mol Biol* 359, 585-596.
- Gommers-Ampt, J. H. & Borst, P. (1995). Hypermodified bases in DNA. *FASEB J* 9, 1034-1042.
- Greenough, T. C., Brettler, D. B., Somasundaran, M., Panicali, D. L. & Sullivan, J. L. (1997). Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis* 176, 118-125.
- Gurer, C., Cimarelli, A. & Luban, J. (2002). Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions. *J Virol* 76, 4666-4670.
- Hadjiagapiou, C., Giannoni, F., Funahashi, T., Skarosi, S. F. & Davidson, N. O. (1994). Molecular cloning of a human small intestinal apolipoprotein B mRNA editing protein. *Nucleic Acids Res* 22, 1874-1879.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R. P., Elbeik, T., Feinberg, M. B., Buchbinder, S. P. & Walker, B. D. (1996). Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol* 156, 2616-2623.
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S. & Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.
- Harris, R. S. & Liddament, M. T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868-877.
- Harris, R. S., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. (2002). RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* 10, 1247-1253.

- Hernould, M., Suharsono, S., Litvak, S., Araya, A. & Mouras, A. (1993). Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2370-2374.
- Holmes, R. K., Koning, F. A., Bishop, K. N. & Malim, M. H. (2007a). APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J Biol Chem* 282, 2587-2595.
- Holmes, R. K., Malim, M. H. & Bishop, K. N. (2007b). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* 32, 118-128.
- Honjo, T., Muramatsu, M. & Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659-668.
- Hume, R. I., Dingledine, R. & Heinemann, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253, 1028-1031.
- Ireton, G. C., McDermott, G., Black, M. E. & Stoddard, B. L. (2002). The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *J Mol Biol* 315, 687-697.
- Janini, M., Rogers, M., Birx, D. R. & McCutchan, F. E. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. *J Virol* 75, 7973-7986.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. & Navaratnam, N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-296.
- Kaiser, S. M. & Emerman, M. (2006). Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase APOBEC3G. *J Virol* 80, 875-882.
- Kao, S., Khan, M. A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A. & Strebel, K. (2003). The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* 77, 11398-11407.
- Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Kazazian, H. H., Jr. & Goodier, J. L. (2002). LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 110, 277-280.
- Kazazian, H. H., Jr. & Moran, J. V. (1998). The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet* 19, 19-24.

- Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T. & Tokunaga, K. (2007). All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 35, 2955-2964.
- Kleiman, L. & Cen, S. (2004). The tRNA^{Lys} packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1776-1786.
- Ko, T. P., Lin, J. J., Hu, C. Y., Hsu, Y. H., Wang, A. H. & Liaw, S. H. (2003). Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution. *J Biol Chem* 278, 19111-19117.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Shindo, K., Abudu, A., Fukunaga, K. & Uchiyama, T. (2004). APOBEC3G targets specific virus species. *J Virol* 78, 8238-8244.
- Kolosha, V. O. & Martin, S. L. (1997). In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10155-10160.
- Kolosha, V. O. & Martin, S. L. (2003). High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *J Biol Chem* 278, 8112-8117.
- Komohara, Y., Yano, H., Shichijo, S., Shimotohno, K., Itoh, K. & Yamada, A. (2006). High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol* 37, 327-332.
- Lan, K. H., Sheu, M. L., Hwang, S. J., Yen, S. H., Chen, S. Y., Wu, J. C., Wang, Y. J., Kato, N., Omata, M., Chang, F. Y. & Lee, S. D. (2002). HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21, 4801-4811.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T.,

- Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. & Chen, Y. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. & McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* 11, 187-193.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. & Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300, 1112.
- Lei, Y. C., Hao, Y. H., Zhang, Z. M., Tian, Y. J., Wang, B. J., Yang, Y., Zhao, X. P., Lu, M. J., Gong, F. L. & Yang, D. L. (2006). Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 12, 4492-4497.
- Lellek, H., Kirsten, R., Diehl, I., Apostel, F., Buck, F. & Greeve, J. (2000). Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex. *J Biol Chem* 275, 19848-19856.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840-842.
- Li, J., Potash, M. J. & Volsky, D. J. (2004). Functional domains of APOBEC3G required for antiviral activity. *J Cell Biochem* 92, 560-572.

- Liao, W., Hong, S. H., Chan, B. H., Rudolph, F. B., Clark, S. C. & Chan, L. (1999). APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 398-404.
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. (2004). APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14, 1385-1391.
- Lochelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y. B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., Flory, E., Cichutek, K. & Munk, C. (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7982-7987.
- Longerich, S., Basu, U., Alt, F. & Storb, U. (2006). AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 18, 164-174.
- Luo, G. X., Chao, M., Hsieh, S. Y., Sureau, C., Nishikura, K. & Taylor, J. (1990). A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. *J Virol* 64, 1021-1027.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. & Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9, 1398-1403.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gossling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V., Kloos, D. U., Land, S., Lewicki-Potapov, B., Michael, H., Munch, R., Reuter, I., Rotert, S., Saxel, H., Scheer, M., Thiele, S. & Wingender, E. (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* 31, 374-378.
- Meehan, R. R. (2003). DNA methylation in animal development. *Semin Cell Dev Biol* 14, 53-65.
- Mehta, A., Kinter, M. T., Sherman, N. E. & Driscoll, D. M. (2000). Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 1846-1854.
- Melcher, T., Maas, S., Higuchi, M., Keller, W. & Seeburg, P. H. (1995). Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. *J Biol Chem* 270, 8566-8570.
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J. K. & Sirover, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8460-8464.

- Mikl, M. C., Watt, I. N., Lu, M., Reik, W., Davies, S. L., Neuberger, M. S. & Rada, C. (2005). Mice deficient in APOBEC2 and APOBEC3. *Mol Cell Biol* 25, 7270-7277.
- Moffatt, B. A. & Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49, 221-227.
- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L. & Cohen, E. A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* 74, 5441-5451.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Lower, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G. G. & Munk, C. (2006). APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* 281, 22161-22172.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. & Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.
- Nagy, E. & Rigby, W. F. (1995). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J Biol Chem* 270, 2755-2763.
- Navaratnam, N., Bhattacharya, S., Fujino, T., Patel, D., Jarmuz, A. L. & Scott, J. (1995). Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* 81, 187-195.
- Neuberger, M. S., Harris, R. S., Di Noia, J. & Petersen-Mahrt, S. K. (2003). Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* 28, 305-312.
- Newman, E. N., Holmes, R. K., Craig, H. M., Klein, K. C., Lingappa, J. R., Malim, M. H. & Sheehy, A. M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* 15, 166-170.
- Nguyen, D. H., Gummuluru, S. & Hu, J. (2007). Deamination-independent inhibition of hepatitis B virus reverse transcription by APOBEC3G. *J Virol* 81, 4465-4472.
- Noguchi, C., Ishino, H., Tsuge, M., Fujimoto, Y., Imamura, M., Takahashi, S. & Chayama, K. (2005). G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 41, 626-633.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E. (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* 72, 2962-2968.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Kane, B. P., Sowder, R. C., 2nd, Kim, Y. D., Fisher, R. J., Zhou, X. Z., Lu, K. P. & Henderson, L. E. (2000). Actin-binding

- cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 266, 42-51.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Arthur, L. O. & Henderson, L. E. (1995). Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 1003-1006.
- Peng, G., Lei, K. J., Jin, W., Greenwell-Wild, T. & Wahl, S. M. (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* 203, 41-46.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582-1586.
- Perucho, M., Salas, J. & Salas, M. L. (1977). Identification of the mammalian DNA-binding protein P8 as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 81, 557-562.
- Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. (2003). In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1). *J Biol Chem* 278, 19583-19586.
- Petit, V., Guetard, D., Renard, M., Keriell, A., Sitbon, M., Wain-Hobson, S. & Vartanian, J. P. (2008). Murine APOBEC1 Is a Powerful Mutator of Retroviral and Cellular RNA In Vitro and In Vivo. *J Mol Biol.*
- Pham, P., Chelico, L. & Goodman, M. F. (2007). DNA deaminases AID and APOBEC3G act processively on single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* 6, 689-692; author reply 693-684.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. & Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.
- Prak, E. T. & Kazazian, H. H., Jr. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet* 1, 134-144.
- Priet, S., Navarro, J. M., Gros, N., Querat, G. & Sire, J. (2003). Differential incorporation of uracil DNA glycosylase UNG2 into HIV-1, HIV-2, and SIV(MAC) viral particles. *Virology* 307, 283-289.
- Prochnow, C., Bransteitter, R., Klein, M. G., Goodman, M. F. & Chen, X. S. (2007). The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* 445, 447-451.

- Rebagliati, M. R. & Melton, D. A. (1987). Antisense RNA injections in fertilized frog eggs reveal an RNA duplex unwinding activity. *Cell* 48, 599-605.
- Ribeiro, A. C., Maia e Silva, A., Santa-Marta, M., Pombo, A., Moniz-Pereira, J., Goncalves, J. & Barahona, I. (2005). Functional analysis of Vif protein shows less restriction of human immunodeficiency virus type 2 by APOBEC3G. *J Virol* 79, 823-833.
- Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 69, 882-888.
- Rogozin, I. B., Basu, M. K., Jordan, I. K., Pavlov, Y. I. & Koonin, E. V. (2005). APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 4, 1281-1285.
- Rosler, C., Kock, J., Kann, M., Malim, M. H., Blum, H. E., Baumert, T. F. & von Weizsacker, F. (2005). APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology* 42, 301-309.
- Rosler, C., Kock, J., Malim, M. H., Blum, H. E. & von Weizsacker, F. (2004). Comment on "Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G". *Science* 305, 1403; author reply 1403.
- Rueter, S. M., Burns, C. M., Coode, S. A., Mookherjee, P. & Emeson, R. B. (1995). Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 267, 1491-1494.
- Russell, R. A., Wiegand, H. L., Moore, M. D., Schafer, A., McClure, M. O. & Cullen, B. R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* 79, 8724-8731.
- Ryazanov, A. G. (1985). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is one of the three major RNA-binding proteins of rabbit reticulocytes. *FEBS Lett* 192, 131-134.
- Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Gabriel, A., Swergold, G. D. & Kazazian, H. H., Jr. (1997). Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16, 37-43.
- Schneider-Gadicke, A. & Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5, 2285-2292.
- Schultz, D. E., Hardin, C. C. & Lemon, S. M. (1996). Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J Biol Chem* 271, 14134-14142.

- Schumacher, A. J., Nissley, D. V. & Harris, R. S. (2005). APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9854-9859.
- Schumann, G. G. (2007). APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans* 35, 637-642.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9, 1404-1407.
- Shindo, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Abudu, A., Fukunaga, K. & Uchiyama, T. (2003). The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* 278, 44412-44416.
- Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Yokoyama, M., Izumi, T., Matsui, M., Io, K., Sato, T., Sato, H. & Uchiyama, T. (2008). Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol*.
- Si, Z., Amendt, B. A. & Stoltzfus, C. M. (1997). Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon 2. *Nucleic Acids Res* 25, 861-867.
- Simon, J. H., Gaddis, N. C., Fouchier, R. A. & Malim, M. H. (1998). Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4, 1397-1400.
- Simpson, L., Sbicego, S. & Aphasizhev, R. (2003). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* 9, 265-276.
- Singh, R. & Green, M. R. (1993). Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* 259, 365-368.
- Sirover, M. A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432, 159-184.
- Sirover, M. A. (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95, 45-52.
- Smith, A. A., Carlow, D. C., Wolfenden, R. & Short, S. A. (1994). Mutations affecting transition-state stabilization by residues coordinating zinc at the active site of cytidine deaminase. *Biochemistry* 33, 6468-6474.

- Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R. & Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-19.
- Stenglein, M. D. & Harris, R. S. (2006). APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* 281, 16837-16841.
- Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., Xie, Y. & Chen, I. S. (1999). Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12039-12043.
- Stewart, S. A., Poon, B., Song, J. Y. & Chen, I. S. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol* 74, 3105-3111.
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 12, 591-601.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Gottlinger, H. G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699.
- Stuchell, M. D., Garrus, J. E., Muller, B., Stray, K. M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Krausslich, H. G., Morham, S. G. & Sundquist, W. I. (2004). The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* 279, 36059-36071.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219, 37-44.
- Suspene, R., Guetard, D., Henry, M., Sommer, P., Wain-Hobson, S. & Vartanian, J. P. (2005). Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8321-8326.
- Svarovskaia, E. S., Xu, H., Mbisa, J. L., Barr, R., Gorelick, R. J., Ono, A., Freed, E. O., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2004). Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279, 35822-35828.
- Tanaka, Y., Marusawa, H., Seno, H., Matsumoto, Y., Ueda, Y., Kodama, Y., Endo, Y., Yamauchi, J., Matsumoto, T., Takaori-Kondo, A., Ikai, I. & Chiba, T. (2006). Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 314-319.
- Taylor, M. W., Grosse, W. M., Schaley, J. E., Sanda, C., Wu, X., Chien, S. C., Smith, F., Wu, T. G., Stephens, M., Ferris, M. W., McClintick, J. N., Jerome, R. E. & Edenberg, H. J. (2004). Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 24, 107-118.

- Teng, B. & Davidson, N. O. (1992). Evolution of intestinal apolipoprotein B mRNA editing. Chicken apolipoprotein B mRNA is not edited, but chicken enterocytes contain in vitro editing enhancement factor(s). *J Biol Chem* 267, 21265-21272.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. & Gottlinger, H. G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372, 363-365.
- Thomas, J. G., Ayling, A. & Baneyx, F. (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 66, 197-238.
- Turelli, P., Mangeat, B., Jost, S., Vianin, S. & Trono, D. (2004). Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829.
- Vartanian, J. P., Guetard, D., Henry, M. & Wain-Hobson, S. (2008). Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* 320, 230-233.
- von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbora, D. M., Scott, A., Krausslich, H. G., Kaplan, J., Morham, S. G. & Sundquist, W. I. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-713.
- Wang, F. X., Huang, J., Zhang, H. & Ma, X. (2008). APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. *J Gen Virol* 89, 722-730.
- Wang, K. S., Choo, O. L., Weiner, A. J., Ou, J. H., Denniston, K. J., Gerin, J. L. & Houghton, M. (1987). The viroid-like structure of the hepatitis delta (delta) genome: synthesis of a viral antigen in recombinant bacteria. *Prog Clin Biol Res* 234, 71-82.
- Waris, G., Turkson, J., Hassanein, T. & Siddiqui, A. (2005). Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol* 79, 1569-1580.
- Weiner, K. X., Weiner, R. S., Maley, F. & Maley, G. F. (1993). Primary structure of human deoxycytidylate deaminase and overexpression of its functional protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 12983-12989.
- Wentz, M. P., Moore, B. E., Cloyd, M. W., Berget, S. M. & Donehower, L. A. (1997). A naturally arising mutation of a potential silencer of exon splicing in human immunodeficiency virus type 1 induces dominant aberrant splicing and arrests virus production. *J Virol* 71, 8542-8551.
- Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23, 2451-2458.

- Wolffe, A. P. & Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-486.
- Xu, H., Svarovskaia, E. S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M. A., Strebel, K. & Pathak, V. K. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5652-5657.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. & Yu, X. F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060.
- Yu, Y., Liu, Y., Shen, N., Xu, X., Xu, F., Jia, J., Jin, Y., Arnold, E. & Ding, J. (2004). Crystal structure of human tryptophanyl-tRNA synthetase catalytic fragment: insights into substrate recognition, tRNA binding, and angiogenesis activity. *J Biol Chem* 279, 8378-8388.
- Zang, W. Q., Fieno, A. M., Grant, R. A. & Yen, T. S. (1998). Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Virology* 248, 46-52.
- Zennou, V. & Bieniasz, P. D. (2006). Comparative analysis of the antiretroviral activity of APOBEC3G and APOBEC3F from primates. *Virology* 349, 31-40.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C. & Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94-98.
- Zheng, Y. H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T. & Peterlin, B. M. (2004). Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 78, 6073-6076.

Avec la découverte de l'édition des acides nucléiques, le dogme selon lequel l'information génétique est transmise de manière fidèle jusqu'aux protéines a été remis en question. Mise en évidence sur les ARN, l'édition est définie comme la modification de certains transcrits résultant dans la production d'une protéine différente de la séquence codée par le gène. Sur l'ADN, ce processus serait un mécanisme de protection, empêchant l'invasion du génome cellulaire par des gènes exogènes. Chez l'homme, la conversion C-U est catalysée par des cytidines désaminases dont font partie APOBEC3.

L'objectif de ce travail a consisté à étudier les enzymes de la famille APOBEC3 impliquées dans les phénomènes de restriction virale observés sur le génome viral du VIH-1, en particulier dans la région de l'ORF Vpr. Des transitions C-T et G-A conduisant à l'inactivation de vpr, corrélées à la variation de l'expression des apobec3, suggèrent que les protéines de la famille APOBEC3 pourraient être en partie responsables de la présence de virus défectifs, et ainsi être impliquées dans la chronicité de l'infection observée pour les cellules H9/LAI et pour au moins un patient non progresser à long terme. Des tests de désamination *in vitro* ont permis de montrer une activité d'APOBEC3G au niveau de 2 résidus C. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité de désamination sur ce même substrat pour les autres APOBEC3 testées. Ceci suggère que la protéine APOBEC3G pourrait être responsable des modifications observées sur le génome du VIH-1. Des expériences préliminaires à la recherche des partenaires cellulaires potentiels, suggèrent l'existence d'un complexe composé d'au moins 5 protéines.

RNA editing is a post-transcriptional process that changes the informational capacity within the RNA. This process modifies transcripts in many organisms and thus contributes to expanding the number of gene products without the generation of new genes. Base changes on DNA by C deaminases can be considered as a protection mechanism preventing the invasion of the cell by exogenous genes. In human, A-I and C-U conversion have been described. The C-to-U changes are catalyzed by APOBEC cytidine deaminases, with the APOBEC3 family involved in DNA modifications.

The aim of this work is to study the APOBEC3 proteins that are involved in viral restriction phenomenon observed particularly in HIV-1 infections. One of the targets for deamination, the vpr orf, was chosen as model. The correlation between C-T and G-A transitions inactivating vpr with the variation of apobec3 expression, led us to postulate that APOBEC3 family proteins could be partially responsible of the presence of defective viruses. In that way, the activity of restriction deaminases may be involved in chronic infection observed in the H9/LAI cells and, in some cases, on long-term non-progressor patients. *In vitro* deamination assays showed that two C residues in vpr can be modified in Us by APOBEC3G, but not by other APOBEC3 deaminases, suggesting that APOBEC3G is responsible of the changes observed on the HIV-1 genome. I also look for potential cellular partners for APOBEC3G using a TAP-tag approach. Preliminary experiments indicate a complex composed of at least five proteins.