

Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n°1893

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 Décembre 2011

Par

COSNEFROY Ophélie

Née le 01 Janvier 1986 à Cherbourg

L'Intégrase du VIH-1

Phosphorylation et caractérisation de partenaires cellulaires

Membres du Jury

Mme Corinne Ronfort.....Rapporteur
Chargée de recherche INRA, Lyon

Mr Gilles Mirambeau.....Rapporteur
Maitre de conférences, Barcelone

Mr François Moreau-Gaudry.....Président du Jury
Professeur, Bordeaux

Mr Hervé Fleury.....Examineur
Professeur, Bordeaux

Mme Marie-Line Andréola.....Directeur de Thèse
Directeur de recherche CNRS, Bordeaux

2

SOMMAIRE



INTRODUCTION

A. L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine 2

1) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).....	2
a. Classification	2
b. Le génome viral	3
c. Structure du virus.....	4
d. Le cycle viral	9
2) Le syndrome de l'immunodéficience acquise	17
a. Historique	17
b. Epidémiologie.....	18
c. Variants génétiques et origines du VIH	18
d. Transmission.....	19
e. Pathologie	19
f. Diagnostic	20
3) Les inhibiteurs de l'infection virale.....	21
a. Inhibiteurs de la transcription inverse.....	21
b. Inhibiteurs de la protéase	22
c. Inhibiteurs de l'entrée	23
d. Les inhibiteurs de l'intégration	23

B. L'intégration virale..... 24

1) L'intégrase	24
a. Structure.....	24
b. Rôle de l'intégrase au cours du cycle viral	27
2) Activités de l'intégrase <i>in vitro</i>.....	30
a. 3'-end Processing.....	30
b. Transfert de brin	30
c. Désintégration.....	31
d. Intégration concertée.....	31
3) Les partenaires de l'intégration	31
a. Les partenaires viraux.....	32
b. Les partenaires cellulaires.....	32
4) Les sites préférentiels de l'intégration	34
5) Les facteurs de restriction de l'intégration.....	35
a. Le facteur de restriction TRIM5 α	35
b. Le facteur de restriction APOBEC3G.....	35
6) L'étape de réparation de l'ADN intégré.....	36
a. Le système de réparation de l'ADN RAD	36
b. RAD51 et l'intégrase	36

C. Modifications post-traductionnelles..... 37

1) Historique.....	37
---------------------------	-----------



a.	L'intégrase du Virus du Sarcome de Rous (RSV)	37
b.	Le rétrotransposon Ty5 de levure	38
2)	Modifications post-traductionnelles de l'intégrase de VIH-1	38
a.	L'Acétylation	39
b.	L'ubiquitination	40
c.	La sumoylation	40
d.	La phosphorylation	41

D. La protéine kinase cellulaire GCN2 42

1)	Interaction entre l'intégrase de VIH-1 et GCN2.....	42
2)	Structure et fonction de GCN2.....	42
3)	Rôle lors d'un stress cellulaire.....	44
4)	Rôle des protéines kinases de réponse au stress au cours d'une infection	44
a.	Rôle de PKR	44
b.	Rôle de GCN2.....	45

E. Les objectifs de l'étude 46

MATERIELS ET METHODES

A. Matériels 49

1)	Culture cellulaire.....	49
a.	Bactéries	49
b.	Levures	49
c.	Cellules humaines.....	49
d.	Virus et lentivirus pseudotypés VSV-G.....	50
2)	Acides nucléiques.....	50
a.	Plasmides	50
b.	siRNAs.....	52
c.	Oligonucléotides	52

B. Méthodes..... 53

1)	Cultures cellulaires.....	53
a.	Bactérie.....	53
b.	Levure.....	54
c.	Cellules humaines.....	54
2)	Les virus	54
a.	VIH-1	54
b.	Les particules lentivirales pseudotypées VSV-G.....	55
3)	Manipulation des acides nucléiques	57



a.	Transfection des siRNA.....	57
b.	Transfection des plasmides.....	57
c.	Test de cytotoxicité.....	57
d.	Extraction des acides nucléiques de cellules infectées.....	58
e.	Amplification.....	58
f.	Electrophorèses.....	61
4)	Manipulation des protéines.....	62
a.	Production d'intégrase recombinante.....	62
b.	Production de transcriptase inverse recombinante.....	64
c.	Production d'eIF2 α recombinant.....	64
d.	Détection des protéines néosynthétisées.....	65
e.	Gels de protéines et Western Blot.....	66
f.	Immunoprécipitation.....	67
5)	Tests in vitro.....	67
a.	Activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT.....	67
b.	Activités de l'intégrase.....	68
c.	Expériences de pontage au DSS.....	69
d.	Tests de phosphorylation.....	70

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : La phosphorylation de l'intégrase

A. Objectifs..... 73

B. Identification de la phosphorylation..... 73

1)	Dans les cellules humaines.....	74
a.	Mise au point de l'expression.....	74
b.	Phosphorylation dans les 293T.....	76
2)	Phosphorylation dans les virions.....	76
3)	Phosphorylation dans les cellules infectées.....	77

C. Rôle de la phosphorylation..... 77

1)	Rôle de la phosphorylation sur le cycle viral.....	78
a.	Obtention des particules virales.....	78
b.	Infectiosité des virus wt et mutants.....	78
c.	ADN intégré.....	79
d.	Activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT.....	79
2)	Effet des mutations sur l'activité de l'IN <i>in vitro</i>.....	80
a.	Obtention des IN mutées.....	80
b.	Propriétés enzymatiques.....	80
c.	Oligomérisation des enzymes.....	81



D. GCN2 et la phosphorylation de l'IN	82
1) A partir de protéines purifiées.....	83
2) A partir de lysat cellulaire	84
a. Activation de GCN2	84
b. Test de phosphorylation.....	85
3) Phosphorylation dans des levures GCN2 ^{-/-}	86
E. Conclusion et discussion	86

CHAPITRE 2 : Le rôle de GCN2 sur le cycle viral

A. Objectifs	92
B. Interaction entre l'intégrase et GCN2	93
1) Par double hybride	93
2) Par co-immunoprécipitation.....	93
C. Rôle de GCN2 sur l'infection	94
1) Extinction de GCN2 par ARN interférence	94
a. Mise au point de l'ARN interférence.....	95
b. Infections virales après transfection.....	96
c. Effet de l'extinction de GCN2 sur l'infection virale.....	96
d. Inhibition de l'activité kinase de GCN2	97
2) Surexpression de GCN2	98
a. Dans les cellules humaines	98
b. Effet de la surexpression sur l'infection	99
D. Rôle de l'infection sur la traduction des protéines	100
1) Activation de GCN2 lors de l'infection.....	100
2) Etude de l'infection sur la traduction des protéines cellulaires.....	101
a. Effet de l'infection	101
b. Effet de l'intégrase.....	102
E. Rôle du domaine d'interaction entre GCN2 et IN	104
1) Production des pseudovirus.....	104



2) Infectiosité des virus	105
3) Effet des mutations sur la traduction.....	105

F. Conclusion et discussion 106

CHAPITRE 3 : Caractérisation des virus portant les mutations E85A et E85D de l'intégrase

A. Objectifs 113

B. Effet des mutations sur l'infectiosité 113

1) Quantification de l'ADN intégré	114
2) Quantification de l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT	114
3) Détection des protéines virales contenues dans les virions.....	115

C. Effet des mutations sur l'activité de l'IN *in vitro* 116

1) Expression et purification des IN	116
2) Oligomérisation des enzymes.....	116
3) Propriétés enzymatiques	117

D. Conclusion et discussion 118

CHAPITRE 4 : Le rôle de RAD51 sur l'infection virale

A. Objectifs 122

B. Effet de la surexpression de RAD51 sur la réplication virale 123

1) Mise au point de la surexpression	123
2) Mesure de la cytotoxicité.....	123



3) Infection virale.....	124
4) Rôle de RAD51 sur l'intégration.....	124

C. Effet de RS-1 sur l'infection virale..... 125

1) Cytotoxicité du composé RS-1.....	125
2) Effet de RS-1 sur l'infection virale.....	126
3) Effet de RS-1 sur l'intégration.....	126

D. Conclusion et Discussion 127

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....129

BIBLIOGRAPHIE.....137

PUBLICATION.....149



ABREVIATIONS



Abréviations

A

AEC	Virus de l'Arthrite-Ancéphalite Aaprine
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G
ASLV	Avian Sarcoma Leukosis Virus
AZT	AZidoThymidine

B

BSA	Bovin Serum Albumin
BAF	Barrier to Auto Integration Factor
BRG1	Brahma Related Gene 1

C

CA	protéine de CApside
CCD	Core Catalytique Domain
CCR	Chemiokine Receptor
CD4	Cluster de Différenciation 4
CDC	Centre Disease Control
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CMV	CytoMegalovirus
COS	CV-1 Origin SV40 genetic material
CRF	Circulating Recombinant Form
CTD	C-Terminal Domain
CUL2/VHL	Cullin2 / Von Hippel-Lindau

D

DKA	Dicetoacide
DO	Densité Optique
DSS	Disuccinimidyl Subérate
DTT	DiThioThréitol

E

EDTA	acide Ethylène Diamine Détra Acétique
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2
ERV	Rétrovirus Endogène
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport

F

Fen-1	Flap endonucléase 1
-------	---------------------

G

GAR	GCN2-Activating RNA
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
GCN	General Control Nonderepressed
GEF	Guanine Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein

H

HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HAT	Histone Acetyl Transferase
HDAC	Histone DeAcetylase
HEK	Human Endothelial Kidney
HeLa	Henrietta Lacks



HERV	RétroVirus Endogène Humain
HFV	Human Foamy Virus
HMGA1	High Mobility Group Chromosomal Protein A1
HR	Homologous Recombinaison
HRI	Heme-Regulated Inhibitor
HisRD	Histidyl tRNA synthétase like
HSP	Heat-Shock Proteins
HTLV	Human T-lymphotropic virus
I	
IBD	Integrase Binding Domain
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
INI1	Integrase interactor 1
J	
JNK	JuN Kinase
K	
KAP1	Kidney Androgen regulated Protein 1
L	
LEDGF	Lens Epithelium-Derived Growth Factor
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LTC4	Lymphocyte T CD
LTR	Long Terminal Repeat
M	
MA	protéine de MAtrice
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mo-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
N	
NC	protéine de NuCléocapside
Nef	Negative factor
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NHEJ	Non Homologous End Joinging
NLS	Nuclear LocaliSation factor
NNRTI	Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NRTI	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NTD	N-terminal Domain
NUP	NUcleoPorine
O	
ORF	cadre ouvert de lecture
P	
PBL	Peripheral Blood Lymphocyte
PEG	PolyEthylène Glycol
PERK	Protein kinase-like ER Kinase
PFV	Prototype Foamy Virus
PIR	Post-Integration Repair
PKR	Proteine Kinase R
PP2A	PhosPhatase 2A
PPT	PolyPurine Tract
PR	PRotéase
R	
REA	Restriction Enzyme Accessibility Assay
Rev	Regulator of Virion



RPA	Proteine de Réplication A
RRE	Rev Response Element
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT-PCR	Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne
RWD	RING finger WD Repeat
S	
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SH3	domaine Src Homology 3
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine de type 1
SIR	Silent Information Regulator protein
siRNA	small interfering RNA
SMN	Survival Motor Neuron
snRNP	small nuclear RiboNucleoProteins
SV	Sindbis Virus
SWI/SNF	Switch/Sucrose Non Fermenting
T	
Tat	Transactivateur de la transcription
TCA	Acide TriChloroacétique
TNPO3	Transportine 3
TRIM5 α	TRIPartite Motif-containing protein 5
tRNA	ARN de transfert
U	
UNG	Nuclear uracil-DNA glycosylase
V	
VAIE	Virus de l'anémie infectieuse équine
VBP1	Von Hippel-Lindau binding protein 1
VIB	Virus de l'Immunodéficiency Bovine
VIF	Virus de l'Immunodéficiency Féline
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficiency Simienne
VMV	Virus Maedi-Visna
Vpr	Viral proteine r
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse



INTRODUCTION



Introduction

A. L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1) Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Le VIH est un lentivirus qui fait partie de la famille des retroviridae. Ces derniers sont des virus enveloppés et leurs génomes se composent d'un ARN monocaténaire de polarité positive (**Figure 1**). Ils possèdent une enzyme avec une activité de transcription inverse (transcriptase inverse, RT) qui permet à partir de leur ARN la synthèse d'un ADN viral. Celui-ci pourra être intégré par la suite au génome de la cellule infectée. Les rétrovirus sont des pathogènes de vertébrés potentiellement oncogéniques [1].

a. Classification

Les rétrovirus sont phylogénétiquement classés en deux grandes catégories : les rétrovirus exogènes et les rétrovirus endogènes (**Figure 2**) [2]. Les virus endogènes (ERV) sont une séquence stable du génome d'un organisme et ont des analogies avec certains rétrovirus. Ils ne sont généralement pas exprimés [2]. Les rétrovirus endogènes humains (HERV) n'ont été mis en évidence que depuis le séquençage du génome humain mais en représentent une partie importante (8 %, avec environ 98 000 éléments et fragments).

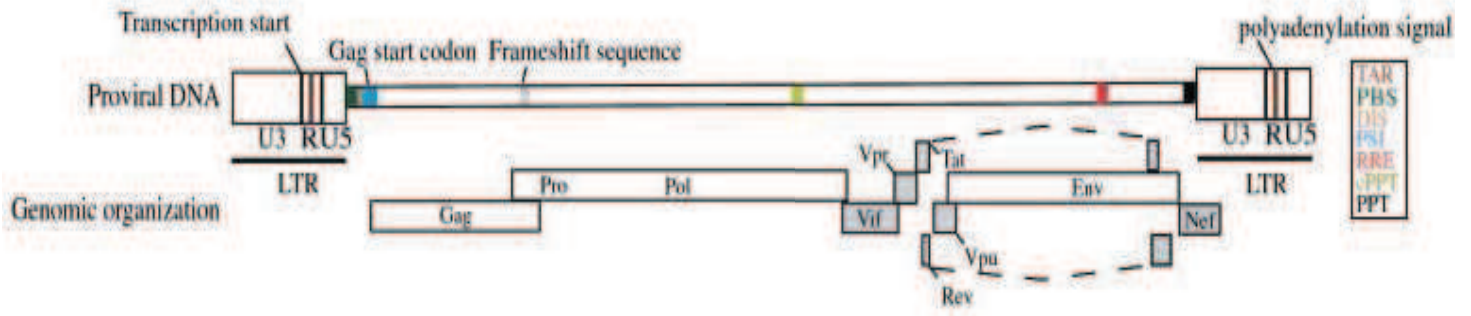
Les rétrovirus exogènes, eux, ne sont pas présents naturellement dans l'organisme et ont donc besoin de l'infecter pour effectuer leur cycle de réplication et ainsi produire des virions. Nous ne parlerons que des rétrovirus exogènes par la suite.

La famille des retroviridae se subdivise en deux sous-familles, les orthoretroviridae et les spumaretroviridae.

Les orthoretroviridae se composent de six genres : Alpharetrovirus (ex : Virus du Sarcome de Rous), Betaretrovirus (ex : Virus de la Tumeur Mammaire de la Souris), Gammaretrovirus (ex : Virus de la Leucémie Murine), Deltaretrovirus (ex : Virus T-Lymphotrope Humain), Epsilonretrovirus (Walley Dermal Sarcoma Virus) et Lentivirus (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Mis à part les lentivirus, tous les virus de la famille des orthoretroviridae sont oncogènes.



a



b

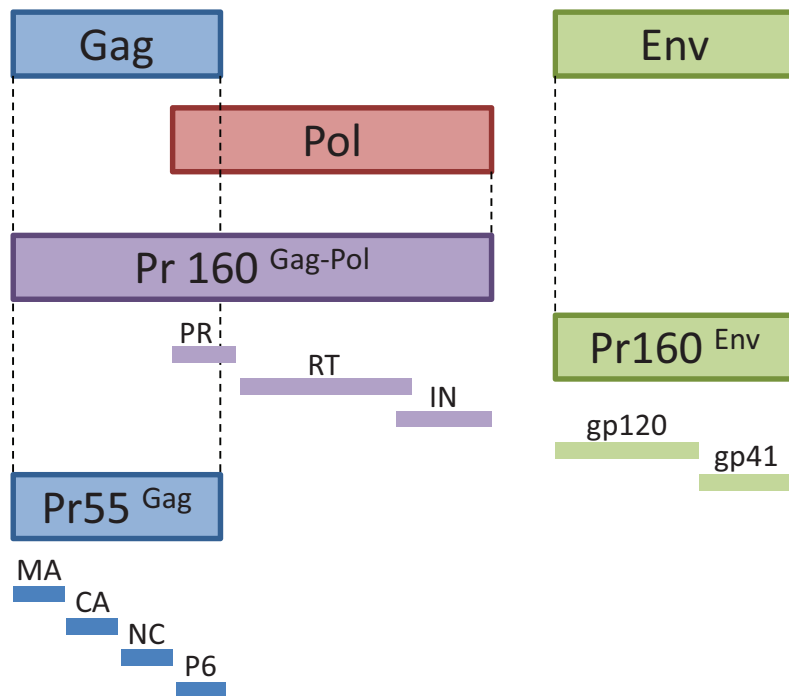


Figure 3. Organisation génomique du VIH-1[3].

(a) Le génome du VIH-1 est entouré de deux régions non traduites (LTR). TAR: Transactivating RNA; PBS: Primer Binding Site; PPT: PolyPurine Tract ; DIS : Dimerization Initiation Site ; PSI : Retroviral Packaging Element. (b) Représentation schématique des précurseurs protéiques et des protéines issues de leur maturation.

Les spumaretroviridae quand à eux ne se composent que du genre spumavirus (Virus de Foamy Humain). Ces virus sont connus pour causer des infections persistantes sans pathologie associée.

Les lentivirus se caractérisent par des maladies chroniques à évolution lente. Parmi les lentivirus, cinq sérogroupes ont pu être caractérisés, infectant chacun une famille particulière de mammifères : les bovins (VIB), les équidés (VAIE), les félins (VIF), les caprins (AEC et VMV) et les primates (VIH et VIS).

b. Le génome viral

L'information génétique du VIH est portée par deux copies d'ARN monocaténaire de polarité positive liées covalamment à leur extrémité 5'. L'ARN du VIH-1 fait une taille de 9181 nucléotides. Les gènes de l'ADN viral sont encadrés par les séquences LTR (Long Terminal Repeat), des séquences identiques qui se divisent en trois éléments : U3, R et U5 (**Figure 3a**)[3].

Ainsi, le génome du VIH-1, comme tous les rétrovirus, se décompose en trois séquences codantes GAG, POL et ENV dans des cadres de lectures différents codant pour les différentes protéines virales. De plus, il code pour un certain nombre de protéines « accessoires ».

Le gène *gag* pour *group antigen* code pour le précurseur polyprotéique Pr55^{gag} qui code pour les protéines de structure du virus : la matrice MA, la capside CA, la nucléocapside NC, P6 ainsi que P2 et P1. Le gène *pol* code pour le précurseur Pr160^{GAG-POL} qui produit les enzymes virales : la protéase PR, la transcriptase inverse RT et l'intégrase IN. Enfin le gène *env* code pour le précurseur Pr160^{ENV} qui produit les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (**Figure 3b**).

Il a été montré que le VIH utilise un décalage de lecture d'un nucléotide programmé pour synthétiser les différents précurseurs [4]. Ainsi dans 95 % des cas sera synthétisée la séquence codante de *gag* mais dans 5 % des cas a lieu le décalage en -1 et cela permet la synthèse du précurseur Pr160^{GAG-PRO-POL}. Ce glissement du ribosome est causé par une séquence spécifique de 20 nucléotides formant une structure tige-boucle. Ce décalage de lecture est donc un élément régulateur important permettant de respecter le ratio entre les différentes protéines virales.



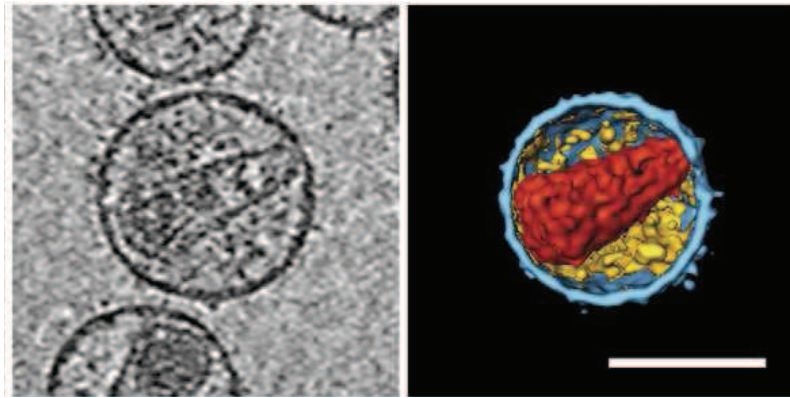


Figure 4. Virions extracellulaires visualisés par cryo-tomographie électronique [5]. La figure de gauche représente une coupe d'un virion par tomographie. A droite, la coupe du virion est reconstituée en 3D et les différents domaines sont colorés. Le VIH-1 se compose d'une enveloppe (en bleu), et d'un core composé de protéines de capsides (rouge) contenant l'ARN du génome viral. Le marquage jaune représente probablement des protéines dérivées de Gag non incorporées dans le core. La barre d'échelle représente 100 nm.

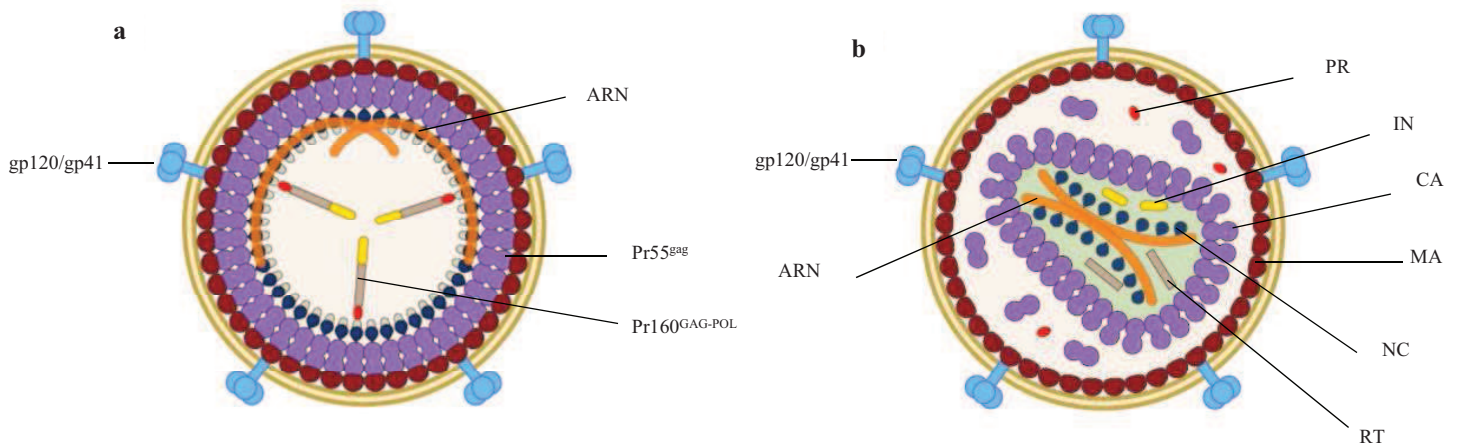


Figure 5. Structure schématique des particules virales immatures (a) et matures (b) du VIH-1 [7].

c. Structure du virus

– La particule virale

Les particules virales du VIH-1 peuvent être observées en microscopie électronique (**Figure 4**). Elles mesurent environ 80 à 120 nm de diamètre [5]. Le virus présente une enveloppe constituée de la membrane plasmique de la cellule infectée et de glycoprotéines virales de surface. L'intérieur des particules se compose d'un réseau de protéines de matrice MA. Les particules immatures (**Figure 5a**)[6] deviennent infectieuses après une étape de maturation (**Figure 5b**)[7] qui passe par la condensation du noyau qui contient le matériel génétique. Cette condensation les rend observables en microscopie (**Figure 4**).

Les virions se composent de différents types de protéines : d'enveloppes, structurales, non structurales et accessoires.

– Les glycoprotéines d'enveloppe

Les spicules présents à la surface des virions se composent d'un trimère des protéines d'enveloppes gp41 (domaine transmembranaire) et gp120 (domaine exposé) (**Figure 6a**)[8].

La gp120

La structure de la protéine gp120 est bien décrite [9]. La gp120 se compose de deux domaines : interne et externe (**Figure 6b**). La variabilité du VIH-1 est due à la gp120 qui est dotée de plusieurs épitopes variables (V1 à V5). Cependant seule l'hypervariabilité de l'épitope V3 est bien étudiée.

Le rôle de la gp120 est déterminant en ce qui concerne l'infection du VIH-1. Son rôle est de sélectionner les récepteurs appropriés à la pénétration du virus, fixer la particule virale à la cellule cible et assister et diriger l'injection du matériel viral dans la cellule.

La gp41

La gp41 est composée d'hélices (**Figure 6b**) et intervient dans la fusion entre les membranes cellulaires et virales. Lors de la fusion, la gp41 adopte plusieurs états conformationnels distincts qui seront davantage décrits dans le **paragraphe 1d** et dans la **Figure 14**. Les



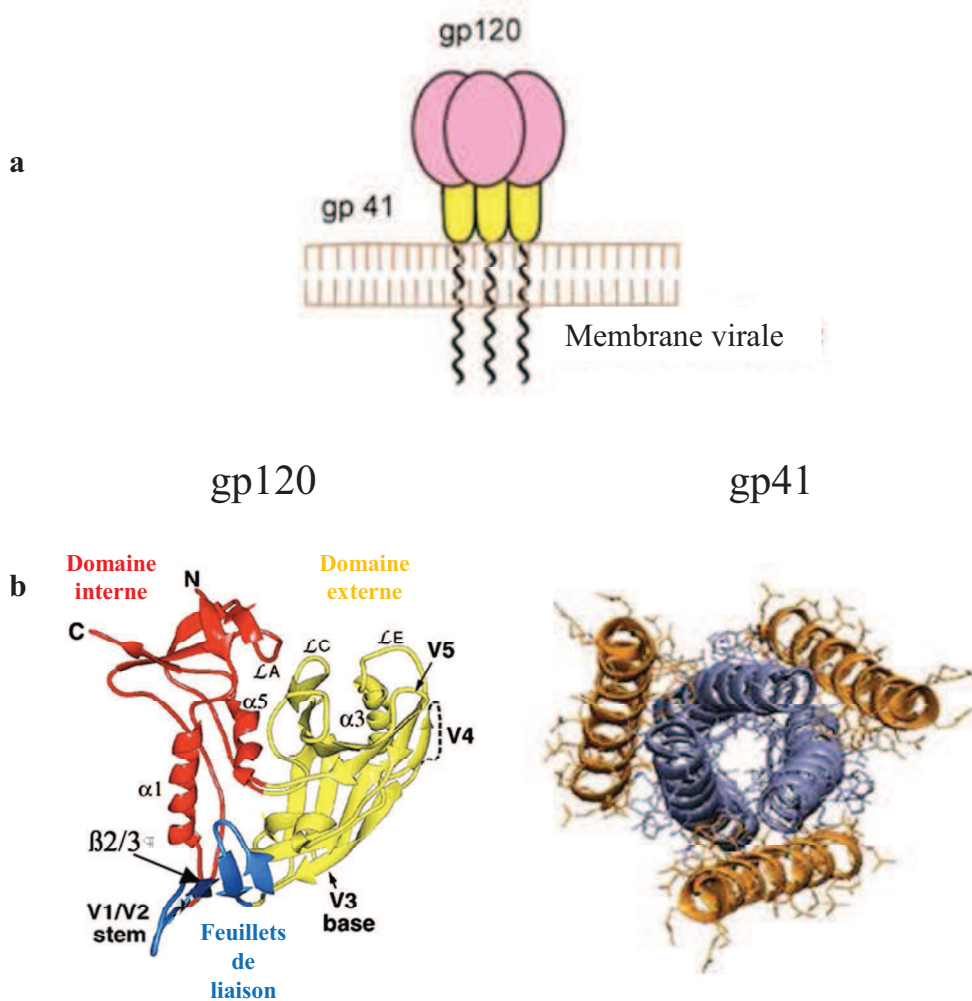


Figure 6. Organisation du récepteur du VIH-1[8].

(a) Représentation schématique de la structure d'un spicule de glycoprotéines d'enveloppes gp120 et gp41 à la surface de la membrane du virus. (b) Structure d'un monomère de gp120 avec les différents domaines et la disposition des différents épitopes. Structure d'un trimère de gp41 vue du dessus avec les deux types d'hélices qui la compose en bleu et jaune.

différences de conformation entre ces étapes sont très importantes et permettent certainement de présenter des surfaces antigéniques distinctes au système immunitaire.

– Les protéines structurales

La matrice (p17)

La structure cristallographique de la matrice a été résolue [10]. Ces études ont permis de montrer que les protéines de MA s'assemblent en trimères (**Figure 7**) [11] et forment une structure en forme de coque associée avec la surface interne de la membrane virale. La partie N-terminale de la MA est myristoylée ce qui lui permet d'interagir avec des résidus basiques et d'ancrer la protéine sur la membrane interne du virus. Ainsi la MA participe à l'assemblage des particules et recrute les protéines d'enveloppes.

La capsid (p24)

La protéine de capsid CA compose le core viral qui renferme l'information génétique du virion. La capsid du VIH-1 est une structure complexe qui est composée de 1500 monomères de CA [12]. Les monomères de CA interagissent entre eux via leurs domaines N-terminaux pour former des anneaux hexamériques (**Figure 8**) [13]. Les monomères interagissent aussi entre eux via leurs domaines C-terminaux pour former un réseau plus complexe [13]. De nombreuses analyses génétiques ont permis de montrer le rôle essentiel de la CA pour les étapes précoces et tardives du cycle viral. La partie C-terminale de la capsid est notamment nécessaire à l'assemblage du virion et est également importante pour l'oligomérisation des protéines GAG [14].

La nucléocapsid (p7)

La nucléocapsid NC comporte deux motifs caractéristiques faits de résidus cystéines et histidines régulièrement espacés [15]. Le motif CCHC ($C(X)_2C(X)_4H(X)_4C$) a une structure appelée en doigt de zinc qui permet la fixation des acides nucléiques (**Figure 9**) [16]. Cette structure permet à la nucléocapsid d'être étroitement liée à l'ARN viral et joue le rôle de protection de l'ARN [17]. La NC permet de stabiliser le dimère d'ARN viral ainsi que



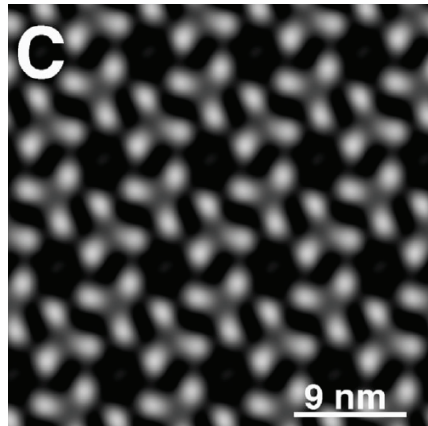


Figure 7. Organisation des protéines de matrice myristoylées à la surface de la membrane virale [11].

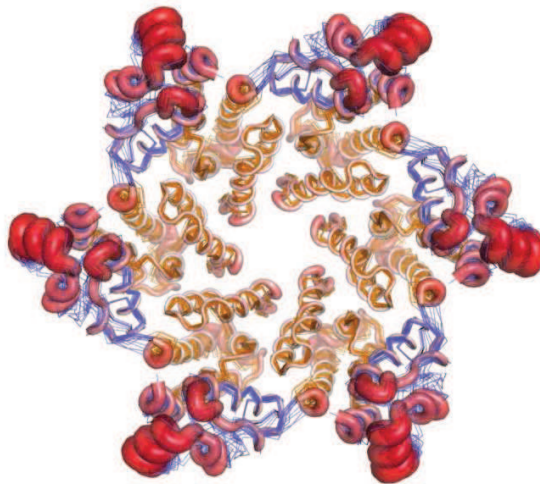


Figure 8. Structure d'un hexamère de protéine de capsid [13].

Les monomères de capsid interagissent entre eux via les hélices (jaune) de leurs domaines N-terminaux. Les domaines N-terminaux sont exposés à l'extérieur de l'hexamère (rouge).

l'interaction entre le tRNA et l'ARN. La présence de la NC permet de stabiliser le complexe ADN/RT et donc d'augmenter l'activité de transcription inverse [18, 19].

Les autres protéines (p6, p2 et p1)

La protéine p6 est une protéine riche en résidus proline. Le domaine p6 a un rôle dans les étapes finales de bourgeonnement du virion et dans l'incorporation des protéines Vpr chez HIV-1 [20] et Vpx pour le SIV [21].

Le peptide p2 est le peptide résiduel situé au niveau du précurseur entre la CA et la NC. Il est capable d'interagir avec la NC et permet de reconnaître spécifiquement le signal d'encapsulation Ψ [22].

Le peptide p1 sépare la NC de p6. Bien que sa fonction ne soit pas encore établie, sa mutation entraîne une altération de la réplication [23].

– Les protéines non structurales

La protéase (PR)

La protéase du VIH-1 (11 kDa) fait partie de la famille des protéases rétrovirales aspartiques. La structure tri dimensionnelle de la protéine a été résolue dès 1989 [24]. Elle s'assemble sous forme d'homodimères (**Figure 10**) [25]. Le site actif est constitué de la triade catalytique Asp25-Thr26-Gly27 conservée parmi les protéases aspartiques. Les résidus Asp25 de chaque homodimère agissent en tant que résidus catalytiques. Le rôle de la protéase au cours du cycle viral est de maturer les protéines virales en clivant les précurseurs polyprotéiques au niveau de sites précis. Les acides aspartiques réalisent une attaque nucléophile des liaisons peptidiques. La spécificité de clivage dépend de l'interaction entre PR et son substrat. La protéase est produite à partir du précurseur GAG-POL par un mécanisme d'autocatalyse qui est une étape déterminante pour la maturation des virions.

La transcriptase inverse (RT, p66/p51)

La RT permet de transcrire l'ARN viral en une double copie d'ADN, c'est une ADN polymérase ARN et ADN dépendante. Chez le VIH-1 la RT se présente sous la forme d'un hétérodimère p66/p51 en solution. La sous-unité p51 est issue du clivage de la p66 à partir



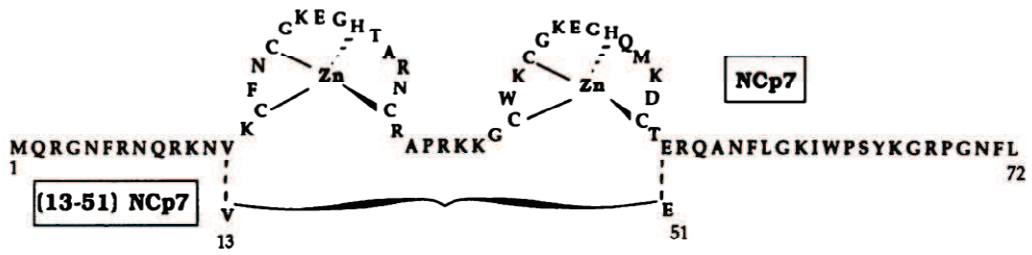


Figure 9. Structure primaire de la nucléocapside du VIH-1 avec les deux domaines en doigts de zinc [22].

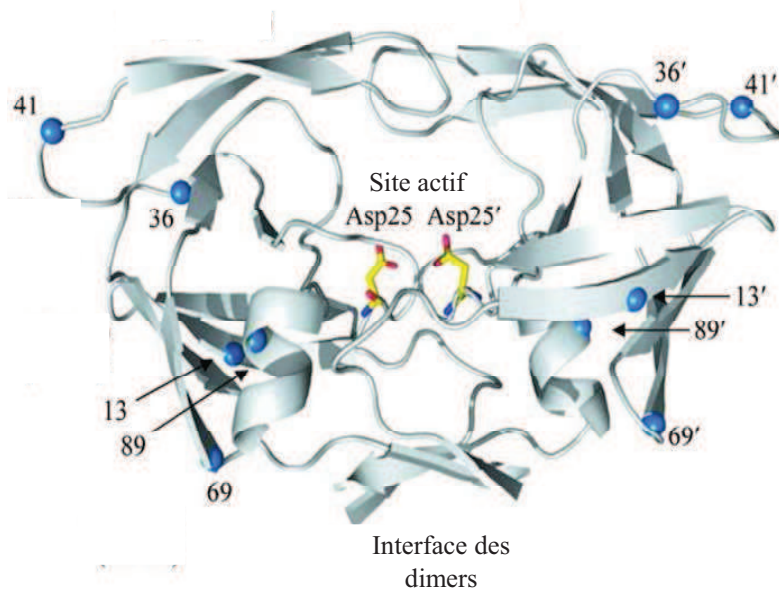


Figure 10. Structure cristallographique d'un homodimère de protéases de sous-type C [25].

d'un dimère p66/p66, libérant la p15. La p51 est constituée du domaine ADN polymérase, la p66 contient à la fois le domaine ADN polymérase et RNase H. La sous unité p66 porte les activités catalytiques, l'activité ADN polymérase ARN et ADN dépendante, et l'activité RNase H qui constitue une activité de dégradation spécifique de l'ARN dans des hybrides ARN/ADN.

L'analyse cristallographique de la RT indique que le domaine polymérase de la p66 se présente sous la forme d'une main droite avec les sous-domaines doigts, la paume et le pouce [26, 27] qui forment un sillon dans lequel vient se loger la matrice/amorce. Un quatrième élément appelé le "sous domaine de connexion" est localisé dans la région entre les deux sites actifs ADN polymérase et RNase H (**Figure 11**) [28]. Bien que la séquence de la p51 soit identique à la séquence du domaine ADN polymérase de la sous-unité p66, la structure de la p51 est très différente. Les domaines de la p51 se structurent de manière à former un support pour la p66, et cette sous-unité n'a pas d'activité catalytique dans l'hétérodimère.

L'intégrase (p32)

L'intégrase IN de VIH-1 est une protéine de la famille des polynucléotidyl transférases. Elle fait 32 kDa et se présente sous la forme de trois domaines (**Figure 12**). Cette enzyme est responsable de l'étape d'intégration de l'ADN viral de façon stable dans le génome de la cellule. Nous détaillerons davantage l'intégrase dans le **chapitre B**.

Les protéines accessoires

Le génome du VIH-1 code pour 6 protéines accessoires : Tat, Rev, Vpr, Vpu, Vif et Nef. Celles-ci sont impliquées dans la régulation de la réplication virale [29].

Tat est un trans-activateur de la transcription. Elle est produite parmi les premières protéines synthétisées à partir des ARN multi épissés et se fixe sur l'élément TAR de l'ARN pour activer la transcription à partir du LTR viral. Rev commande la transition de l'état de latence vers la réplication en favorisant l'export des ARNs messagers viraux non et mono-épissés vers le cytoplasme via l'interaction avec les séquences RRE (Rev Response Element) de l'ARN.

Vpr (Viral Protein R) joue un rôle important dans l'infectiosité du virus. Cette protéine permet de réguler l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et est également essentielle à l'infection des cellules ne se divisant pas [30]. Il a également été montré un rôle



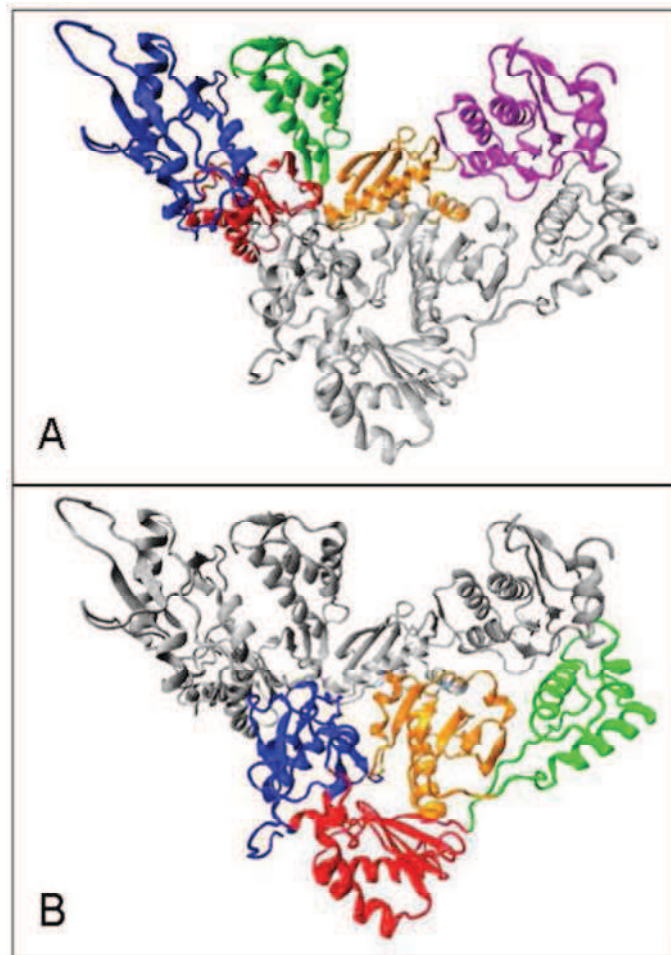


Figure 11. Structure de l'hétérodimère p66/p51 de la RT [28].

(a) La sous-unité p66 est colorée, la sous-unité p51 est en grise. (b) La sous-unité p66 est en gris, la sous-unité p51 est colorée. Les quatre sous-domaines sont colorés ainsi : doigts (bleue) ; pouce (vert) ; paume (rouge) ; connecteur (orange) et RNase H (violet). Les domaines doigts, pouce et paume de la sous-unité p66 se structurent sous la forme d'un sillon où vient se loger la matrice/amorce. Les domaines de la p51 s'assemblent pour former un support pour la p66.

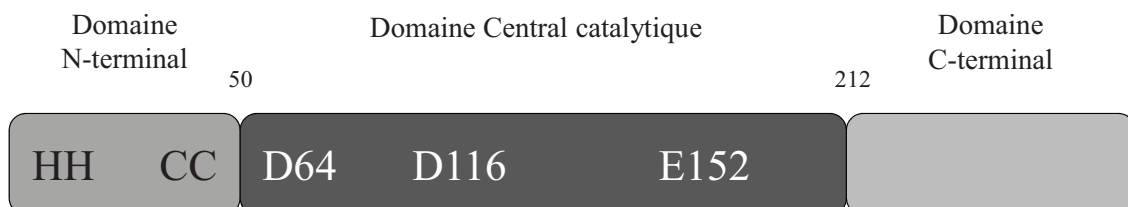


Figure 12 : Schéma de la structure de l'intégrase et ses différents domaines.

dans l'induction de l'apoptose et dans la transactivation des LTR viraux et de certains gènes cellulaires.

Vpu est une petite protéine membranaire qui augmente la libération des nouvelles particules virales et induit la dégradation des récepteurs CD4 [29].

Vif (Virus Infectivity Factor) est fortement exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées. Un rôle essentiel de Vif est de conduire à la dégradation du facteur cellulaire APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G) qui est un inhibiteur de l'infection virale. Vif se fixe à APOBEC3G, permet le recrutement de la ligase L3 qui va permettre sa polyubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. De plus Vif est empaqueté dans les particules virales, et il a été montré son importance pour leur infectiosité [31].

Nef (Negatif Regulator Factor) est une protéine myristoylée qui est abondamment produite lors des étapes précoces de la réplication [32]. Cette protéine possède quatre activités indépendantes au cours de la réplication. Nef affecte l'expression de certaines protéines cellulaires de surface, comme en régulant négativement l'expression des récepteurs CD4 [33]. Nef interfère également avec des signaux de transduction cellulaires. La myristoylation de son extrémité N-terminale permet l'interaction avec les radeaux lipidiques qui co-localisent des médiateurs de signalisation. Nef augmente l'infection et la réplication virale [34]. Cela s'explique en partie par son action de remodelage des faisceaux d'actine et donc l'amélioration du déplacement du core viral dans le cytoplasme. Enfin, Nef agit dans la régulation du trafic du cholestérol cellulaire qui est un facteur important du cycle viral, notamment dans l'assemblage et le bourgeonnement [35].

Les protéines cellulaires empaquetées dans les particules virales

En plus des protéines virales présentes dans les virions, de nombreuses études ont permis d'identifier un certain nombre de protéines cellulaires empaquetées au moment du bourgeonnement. Les protéines citées par la suite ne sont qu'une courte liste non exhaustive.

La cyclophiline A a été décrite comme interagissant avec la protéine de capsid, celle-ci serait importante pour l'assemblage et l'infectiosité des particules virales [36]. Plusieurs protéines impliquées dans le transport sont également retrouvées dans les virions : la protéine Tsg101 [37], des cytosines desaminases [38], des kinases [39], des uraciles DNA glycosylases (UNG) [40] et des protéines chaperonnes de la famille des HSPs [41].



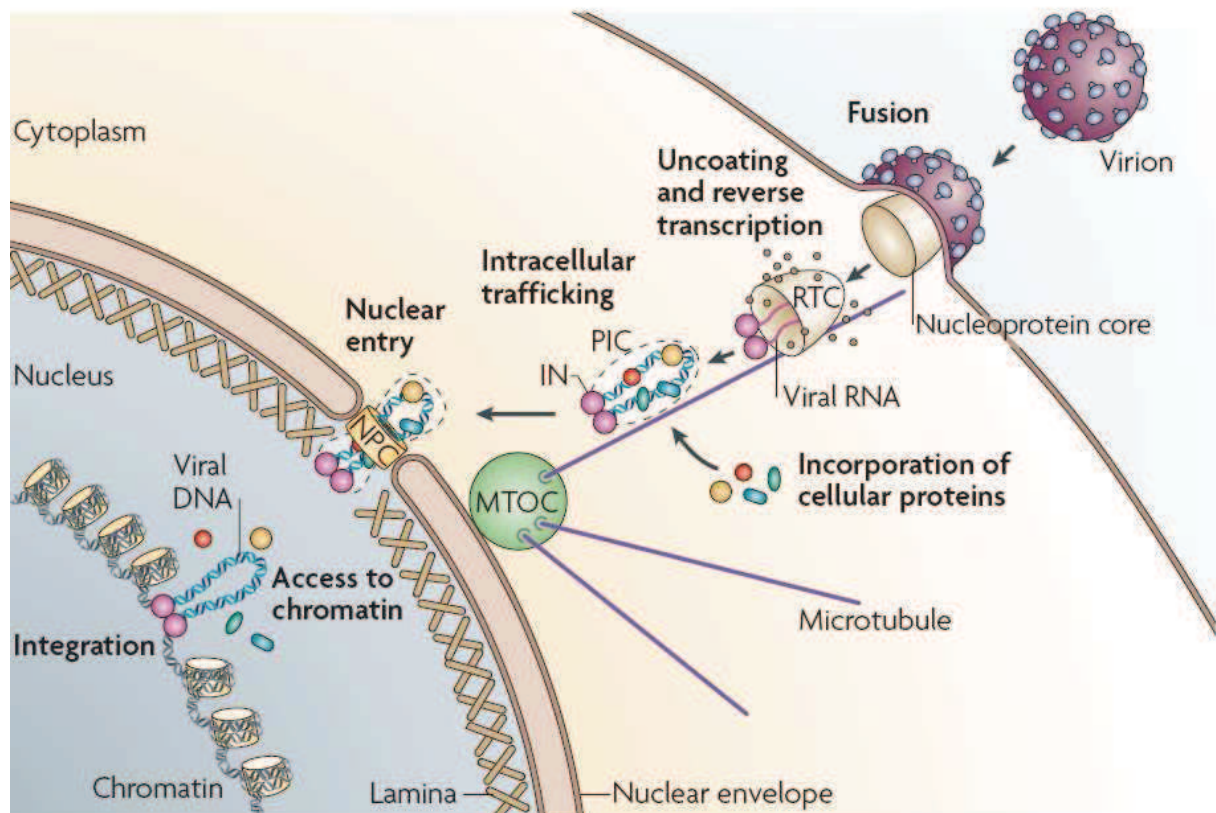


Figure 13. Etapes de l'entrée à l'intégration [43].

La première phase de l'infection consiste en la reconnaissance de la cellule cible par le virus via le complexe récepteur/corécepteur. Après la fusion avec la membrane cellulaire, la capsid est libérée dans le cytoplasme et commence à se désagréger pour permettre à la RT de catalyser la transcription inverse de l'ARN viral en un ADN double brin. Le trafic du CPI se fait via l'utilisation du réseau de microtubule jusqu'au niveau du MTOC. Après l'entrée dans le noyau, l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire par l'intégrase virale.

d. Le cycle viral

Les étapes du cycle viral peuvent être divisées en deux parties : les étapes dites précoces (**Figure 13**) [42] comprenant les étapes de l'entrée du virion à l'intégration du provirus ; et les étapes appelées tardives qui ont lieu après l'intégration.

– L'entrée

Le processus d'entrée du virus dans la cellule cible constitue la première étape de l'infection virale. Celle-ci est caractérisée par une série d'évènements complexes qui sont initiés par le contact entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et les récepteurs membranaires. Ces évènements sont illustrés sur la **Figure 14** [16]. Les glycoprotéines membranaires s'assemblent sous forme de spicules contenant 3 hétérodimères de gp120 et de protéine transmembranaire gp41. La gp120 possède un domaine de liaison au récepteur CD4 (**Figure 14 A**). L'interaction entre les deux protéines induit un changement de conformation de la gp120 qui va permettre son interaction avec un corécepteur transmembranaire aux chemokines, CCR5 ou CXCR4 [43]. L'interaction gp120 / corécepteur va permettre l'activation du potentiel de fusion membranaire de la gp41 : une partie de la région transmembranaire de la gp41 est capable de former une structure en forme de tige avec un faisceau de six hélices [44] (**Figure 14 C**). Plusieurs spicules de glycoprotéines forment alors un anneau et permettent la fusion des deux membranes et l'entrée du virus dans la cellule [16].

L'entrée du virus s'accompagne par la suite d'une régulation négative de l'expression des récepteurs CD4 à la surface cellulaire qui est contrôlée par les protéines accessoires Nef et Vpu. Cette diminution des récepteurs CD4 permet de limiter les « super infections » mais également de permettre la libération efficace de nouveaux virus en bloquant les interactions prématurées enveloppe-récepteurs [33].

– La décapsidation

La fusion des membranes cellulaires et virales va permettre l'entrée du core viral dans le cytoplasme de la cellule. La capsidie contient le génome viral (deux molécules d'ARN monocaténaire), certaines protéines virales (CA, IN, NC, RT, Vpr) et des protéines cellulaires.



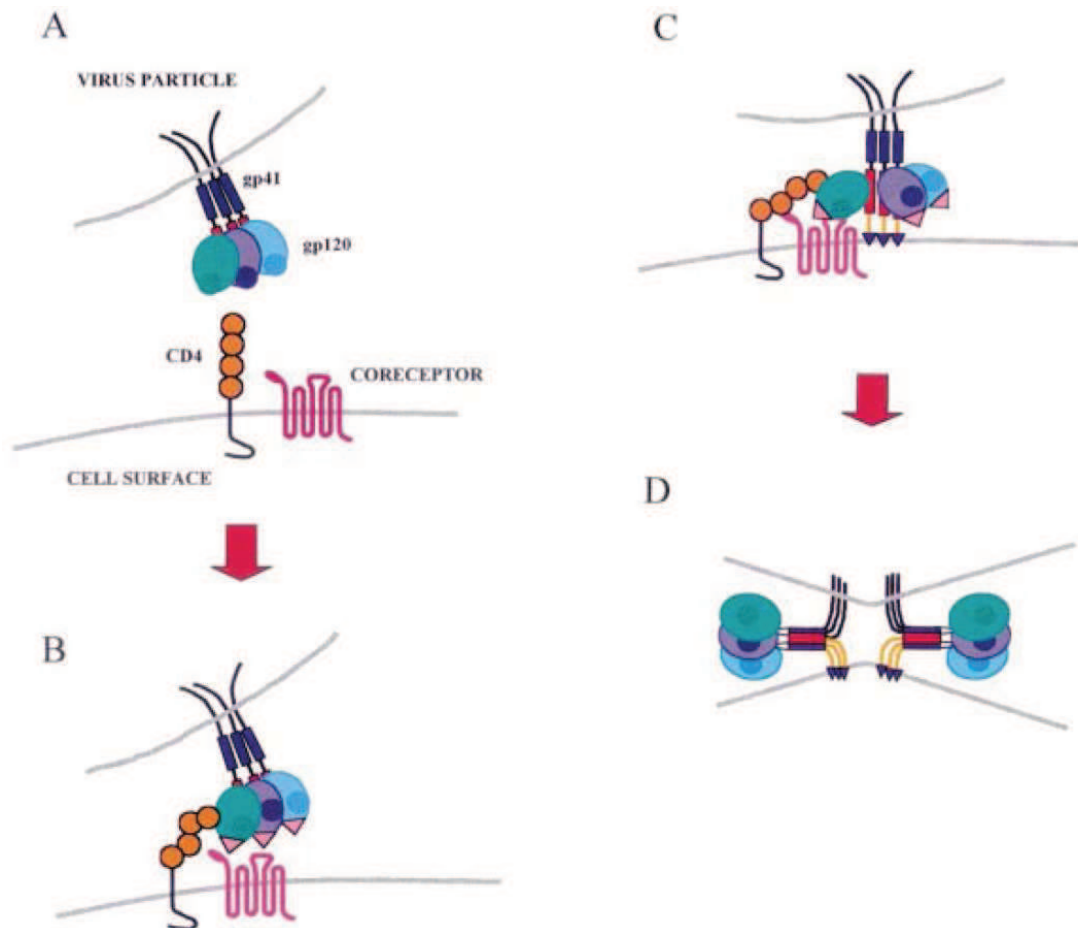


Figure 14. Etapes d'attachement et fusion du VIH-1 à la cellule cible [16].

(A) Le virion se lie au récepteur CD4. (B) Des changements de conformation de la gp120 et le mouvement des boucles variables entraînent l'exposition du site de fixation au corécepteur. (C) L'interaction entre la gp120 et le corécepteur déclenche des changements de conformation, principalement dans la gp41, le domaine de fusion s'intègre dans la membrane de la cellule hôte. (D) L'interaction entre le domaine leucine zipper (rouge) et l'hélice α (en bleu) permet le rapprochement de la région transmembranaire et des domaines de fusion permettant la formation d'un pore de fusion.

Sa fonction principale est d'organiser et de contenir le génome viral pour optimiser sa livraison dans les cellules cibles et permettre une transcription inverse efficace. La décapsidation est un processus nécessaire au cycle du VIH. Bien que pour certains rétrovirus, il ait été montré l'importance du core dans l'interaction avec la chromatine et donc à l'intégration [45], dans le cas du VIH, l'entrée dans le noyau se fait par le pore nucléaire dont le diamètre est 2 fois plus petit que celui du core. Le core est essentiel à l'acheminement jusqu'au noyau, mais pas dans les étapes après l'entrée dans le noyau [46].

Bien que la plupart des recherches montrent que la décapsidation survient après l'entrée dans le cytoplasme et avant l'import nucléaire, la communauté scientifique reste divisée quant au moment et au lieu de cet événement. Il existe trois modèles principaux.

Dans un premier modèle, la décapsidation a lieu à proximité de la membrane plasmique immédiatement après la fusion et la plupart des CA sont dissociées [47]. La décapsidation est nécessaire à la formation du complexe de transcription inverse (RTC) et est probablement déclenchée par le changement soudain de l'environnement dans lequel le complexe viral se trouve. Le rôle de la capsid est donc uniquement d'amener l'ARN viral dans le cytoplasme.

Un second modèle propose que la capsid reste intacte jusqu'à l'initiation de la transcription inverse, et que la décapsidation s'effectue graduellement lors du transport vers le noyau [48]. Dans ce modèle, la décapsidation a lieu en réponse à de multiples changements successifs dans l'environnement cellulaire, et à travers les réarrangements moléculaires qui accompagnent la transcription inverse.

Un troisième modèle, propose que la capsid demeure intacte jusqu'à atteindre la membrane nucléaire, à la fin de la transcription inverse. Dans ce modèle, la capsid est très importante pour maintenir une concentration élevée de RT afin d'améliorer son activité [49]. Bien que l'on ne sache pas exactement l'ordre chronologique de ces événements, il reste néanmoins sûr que la CA est une protéine essentielle au bon déroulement de ces étapes.

– La transcription inverse

Il est convenu qu'après l'entrée du virus dans la cellule, le core se restructure sous forme d'un complexe de transcription inverse, le RTC. Il semblerait qu'un complexe pré – RTC commence déjà à se former dans les virions matures. Les partenaires minimums de ce



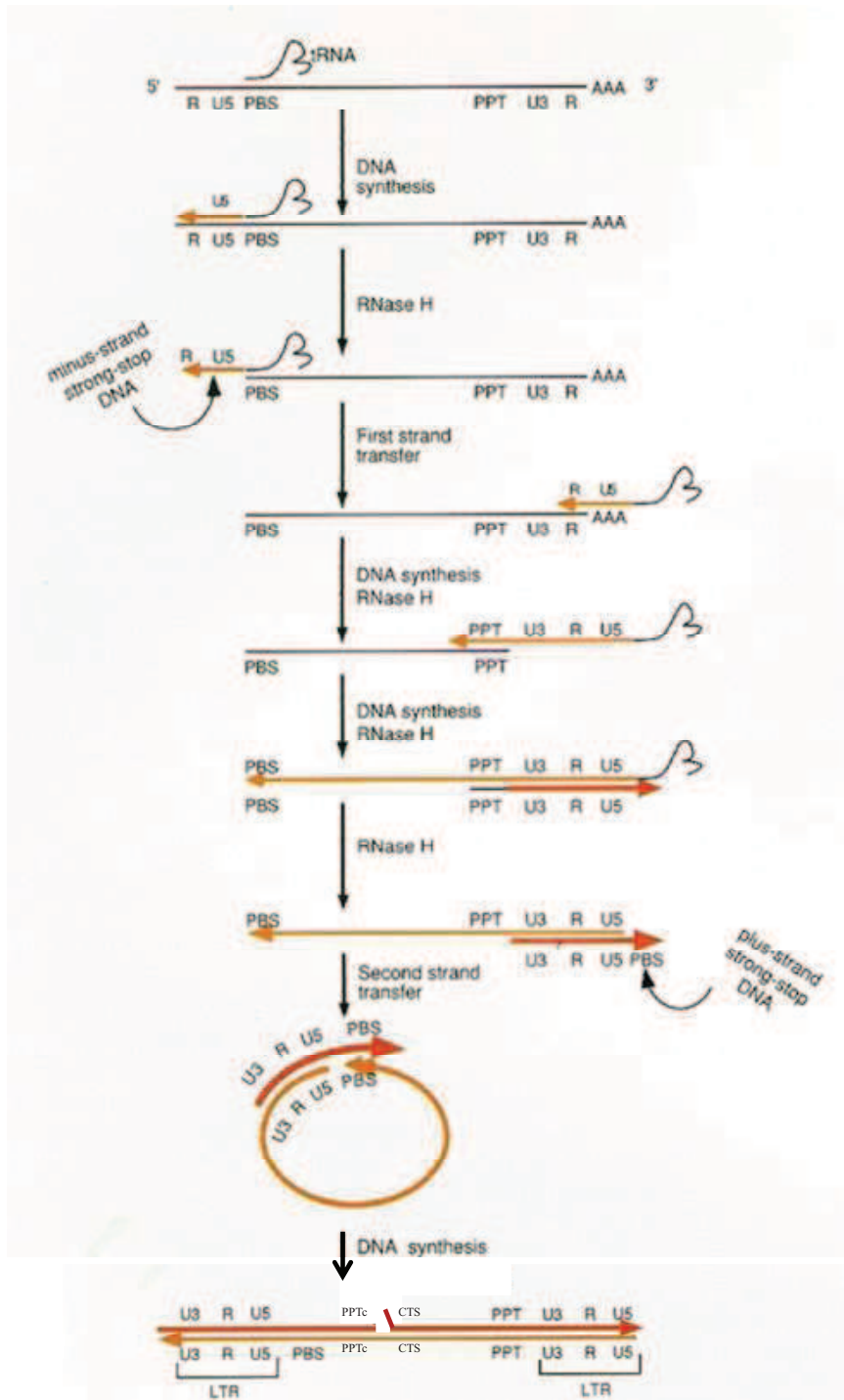


Figure 15. Etapes de la transcription inverse du VIH-1 [55].

PBS: Primer Binding Site; PPT: Poly Purine Tract; CTS: Central Termination Sequence; LTR: Long Terminal Repeat.

complexe sont l'ARN génomique viral, la RT, la NC et l'ARNt^{lys3} [50]. Lors de l'assemblage, l'ARN génomique viral et certains ARNt dont les ARNt^{lys} iso accepteurs (ARNt^{lys3}, ARNt^{lys1,2}) sont concentrés sélectivement sur le site de formation des particules virales [51]. Une partie des ARNt^{lys} fusionne alors à la séquence de 18 nucléotides du PBS viral (Primer Binding Site) en 5' qui est parfaitement complémentaire au ARNt^{lys3} [48].

La liaison de l'ARNt^{lys3} à l'ARN viral est un mécanisme complexe qui fait intervenir des interactions qui impliquent l'ARNt, l'aminocyl ARNt^{lys3} synthétase (Lys-RS) et la RT et la NC. Le contact entre Gag, Gag-Pol et Lys-RS facilite le recrutement de l'ARNt^{lys3} sur le PBS [52, 53].

L'ARNt^{lys3} est utilisé comme amorce pour la synthèse de l'ADN viral selon les étapes suivantes également décrites dans la **Figure 15** [54]:

1. La synthèse du brin d'ADN négatif se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN. Cela génère un court intermédiaire ADN appelé ADN brin négatif « strong-stop » (-sssDNA).
2. L'ARN viral complémentaire du sssADN est alors dégradé par la RNase H. Le premier transfert de brin permet d'apparier le sssADN à l'extrémité 3' complémentaire de l'ARN. Ce transfert de brin est permis par la présence de séquences répétées R aux extrémités de l'ARN viral.
3. La synthèse de l'ADN viral se poursuit sur tout le brin et est suivie par la dégradation de l'ARN complémentaire par la RNase H, excepté plusieurs séquences riches en purines, les PPT (PolyPurine Tract).
4. Les régions PPT, résistantes à l'activité de la RNase H vont servir d'amorce pour la synthèse du brin positif de l'ADN viral et seront finalement éliminées au cours de l'élongation.
5. Le fragment d'ADN positif synthétisé est alors transféré à l'extrémité 3' de l'ADN négatif : c'est le second transfert de brin.
6. La synthèse de l'ADN aboutit à un brin positif constitué de deux segments distincts, séparés par un court chevauchement appelé le « flap central ».

Le produit terminal de la transcription inverse est un ADN linéaire comprenant à ses extrémités les LTR, composés des séquences U3RU5. Le mécanisme par lequel le flap central est éliminé puis l'ADN viral est réparé reste à définir, mais est sans doute assuré par des facteurs cellulaires.



L'étape de transcription inverse se fait au sein du RTC, les protéines virales (MA, CA, RT, Vpr, IN) et les protéines cellulaires qui composent le complexe lui permettent de se déplacer le long du réseau intracellulaire du microtubule. Il a été montré que les filaments d'actine qui interagissent avec le RTC sont nécessaires à une transcription inverse efficace [55].

– Le transport intracellulaire et l'import nucléaire

Il est admis que lorsque l'étape de transcription inverse est achevée, le transport de l'ADN néosynthétisé à travers le cytoplasme se fait au sein d'un complexe nucléoprotéique de grande taille : le Complexe de Pré Intégration ou CPI. L'analyse du CPI a pu montrer qu'il contient à la fois le génome viral, des protéines virales (RT, IN, MA, Vpr, NC) et des protéines cellulaires. Le suivi des protéines au cours du transport du complexe vers le noyau montre une perte de RT et des protéines de capsid [56]. Différentes études montrent une accumulation du CPI au niveau du MTOC (Centre d'Organisation des Microtubules), à la périphérie nucléaire [57].

Une fois que le complexe de protéines virales se localise à proximité du noyau, il lui reste à traverser la membrane nucléaire. Certains rétrovirus ont besoin que la cellule se divise pour pouvoir pénétrer dans le noyau. Le VIH lui est capable de se répliquer dans des cellules quiescentes. Le CPI est un complexe de nucléoprotéines de grande taille dont le diamètre est supérieur à 50 nm selon les estimations, ce qui est supérieur au diamètre d'un pore nucléaire et donc exclue un passage passif à travers la membrane. Le transport dans le noyau fait donc appel à un mécanisme de transport actif. Un certain nombre des protéines du CPI contiennent des séquences de type karyophiliques qui permettent leur localisation nucléaire lorsqu'elles sont exprimées dans les cellules. Nous allons essayer de voir quel(s) partenaire(s) pourrai(en)t être responsable(s) de ce transport actif dans le noyau.

Les partenaires viraux

La protéine de matrice MA contient une Séquences de Localisation Nucléaire, NLS, au niveau de son domaine N-terminal. Une autre séquence NLS a également été identifiée du côté C-terminal de la protéine, cependant la MA exprimée seule dans des cellules ne se localise pas dans le noyau.



La protéine Vpr a également été proposée comme candidate. Une séquence NLS atypique a été trouvée dans la séquence de Vpr. Il a été montré que Vpr pourrait mimer une protéine cellulaire impliquée dans l'import nucléaire [58]. En effet Vpr est capable d'interagir avec des importines et des nucléoprotéines.

L'intégrase IN est également un bon candidat pour l'import nucléaire. Nous verrons son rôle plus en détail dans le **Chapitre B**.

Les protéines CA n'ont pas de propriétés karyophiliques mais il a été supposé que la cinétique de décapsidation pourrait être un moyen de réguler l'entrée dans le noyau via l'exposition des différentes séquences NLS du CPI ou en activant la machinerie cellulaire pour le transport de l'ADN viral [59]. Récemment l'interaction entre CA et différents partenaires (la transportine 3 TNPO3 et NUP153) a été montrée comme déterminante pour la localisation nucléaire [60, 61].

Il a également été mis en évidence que l'ADN viral pourrait jouer un rôle dans cet import. En effet, à l'issue de l'étape de transcription inverse, l'ADN viral présente un « flap central », qui pourrait être un déterminant de l'import nucléaire [62]. Cependant le rôle de ce flap reste controversé [46, 63].

Les partenaires cellulaires

La capacité du CPI à traverser l'enveloppe nucléaire implique des mécanismes cellulaires de transport actif. Deux voies majeures ont été décrites : la voie des importines et LEDGF/p75.

Plusieurs protéines virales (MA, Vpr, IN) interagissent avec des membres de la famille de l'importine α . L'importine α est une protéine qui forme un hétérodimère avec l'importine β et transporte des protéines cargo portant des séquences NLS à travers la membrane nucléaire. Après l'accrochage à un pore nucléaire via l'interaction entre nucléoporine et importine β , le complexe importine / protéine cargo est transporté dans le noyau grâce à l'utilisation d'ATP. Dans le noyau, la molécule cargo est libérée dans le nucléoplasme par la GTPase Ran81. L'interaction de ces protéines virales avec l'importine α suggère donc que celles-ci pourraient faciliter le passage à travers le pore nucléaire. Cependant des virus chimériques pour ces protéines présentent toujours une localisation nucléaire [64]. Récemment l'importance de l'importine 7 a été mise en avant mais son rôle reste incertain [65].

D'autre part, l'importance de NUP153 pour l'infection virale a été montrée. L'interaction avec l'IN et la CA a été mise en évidence [66] [61] [67].



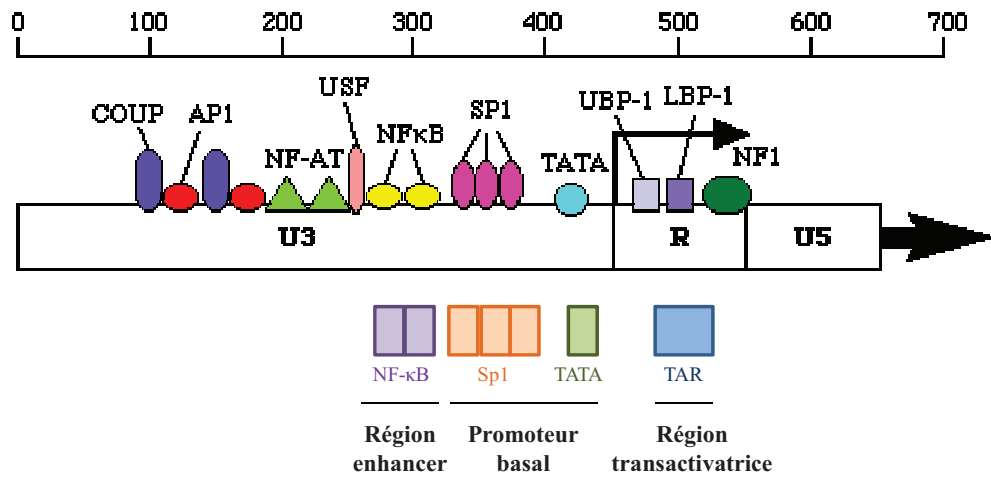


Figure 16. Représentation schématique du promoteur du VIH-1.

Enfin le rôle de la transportine 3 (TNPO3) a été étudié par plusieurs équipes dernièrement. Il apparaît que TNPO3 est essentielle à l'import du PIC dans le noyau du VIH-1 [50, 60, 61], mais également d'autres lentivirus [68].

– L'intégration

Une fois dans le noyau, l'ADN viral est intégré de façon stable dans le génome de la cellule.

Les différentes étapes de l'intégration seront d'avantages décrites ainsi que les partenaires impliqués dans le **Chapitre B**.

– Transcription et épissage

La régulation de la transcription du VIH-1 est un mécanisme très complexe qui fait appel à de nombreux facteurs cellulaires et viraux. Le promoteur se situe dans la région LTR. Celle-ci est divisée en trois régions composées de quatre domaines fonctionnels : la région transactivatrice TAR, le promoteur basal core, la région enhancer, et les éléments de régulation. TAR est situé dans la région répétée R alors que les trois autres domaines sont situés dans la région U3 (**Figure 16**).

Le promoteur se compose d'une TATA Box et une région initiatrice. La TATA Box Protéine est essentielle à l'initiation de la transcription et LEF-1 joue un rôle central dans la coordination des facteurs de transcription. La région enhancer est constituée de deux domaines de fixation en tandem au facteur de transcription NF- κ B. Tous ces éléments régulateurs favorisent la transcription par l'ARN polymérase II cellulaire.

Le génome viral est composé de 9 cadres ouverts de lecture codant pour 15 protéines différentes. La présence de nombreux sites d'épissages permet la transcription des différents ARN messagers. Trois types d'ARNs messagers sont synthétisés : non-épissés, mono-épissés et multi-épissés.

Au début de la transcription, une faible quantité d'ARN est produite, causée par la faible processivité de la polymérase II. Ces ARNs sont multi-épissés. Ils permettent la production de protéines régulatrices comme Tat. L'élément TAR de l'ARN forme une structure secondaire stable tige-boucle et représente un élément clé dans l'activation transcriptionnelle médiée par Tat [69]. Ainsi, cela va permettre une transactivation de la transcription et amener à la production d'ARN de grande taille mono-épissés ou non épissés.



– Export des ARNs produits

Le contrôle du transport des ARNs épissés ou non vers le cytoplasme est un élément important de la régulation post transcriptionnelle des gènes proviraux. Les protéines de la famille des nucléoporines qui participent à l'import du complexe de pré intégration sont également impliquées dans l'export des ARNs proviraux.

Au début de la transcription, les ARNs multi-épissés produits sont exportés dans le cytoplasme par le système de transport des ARN messagers TAP ce qui permet la production des protéines accessoires Rev, Nef, et Tat. Ce n'est qu'ensuite après l'import de Rev dans le noyau et sa multimérisation qu'il pourra y avoir export des ARN mono ou non épissés. La protéine accessoire Rev permet le transport des ARNs mono ou non épissés qui sont nécessaires à l'expression des protéines structurales et à la production de l'ARN génomique viral. Une fois multimérisée, Rev se fixe à la région RRE de l'ARN viral et interagit avec l'importine β et la phosphoprotéine nucléolaire B23 via son domaine NLS. Le complexe Rev-importine β -B23 est recruté au niveau du pore nucléaire. Le transport à travers le pore nucléaire fait appel aux protéines Ran - ATP dépendantes [70, 71].

Enfin, les transcrits non épissés vont servir d'une part d'ARN génomique. Ils seront dimérisés et encapsidés au cours de la formation des nouveaux virions. D'autre part, les ARN non épissés ou mono-épissés seront traduits et permettront la production de polyprotéines qui deviendront des protéines de structure, des enzymes virales ou des protéines accessoires après maturation par la protéase virale.

– Assemblage

Tout d'abord, les glycoprotéines virales sont transportées dans des vésicules à travers l'appareil de Golgi après traduction et sont exposées à l'extérieur de la cellule au niveau de la membrane plasmique. Des mouvements latéraux effectués par des radeaux lipidiques permettent de les amener au site de bourgeonnement [72].

Le domaine MA des précurseurs, qui est myristoylé, est responsable du ciblage des précurseurs polyprotéiques Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} à la membrane plasmique au niveau du site de bourgeonnement et va conduire à leur encapsidation [73]. Le domaine MA cible spécifiquement la membrane plasmique en se liant étroitement à la phosphoinositide PI (4,5)



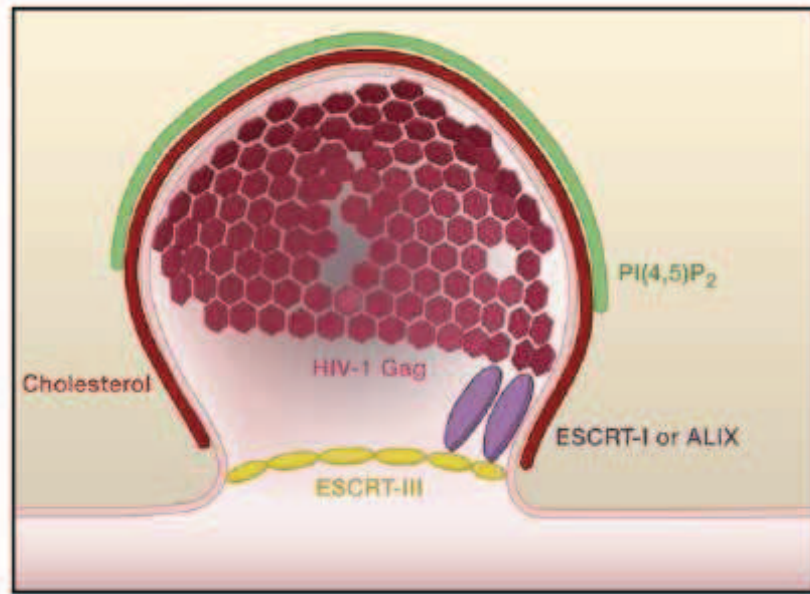


Figure 17. Rôle des lipides et ESCRTs dans l'assemblage des particules virales [80].

P2, et cette interaction est nécessaire pour l'assemblage de Gag et la libération des virions (**Figure 17**) [74].

Ensuite, l'encapsidation de l'ARN génomique viral est médiée par la présence d'une séquence signal d'encapsidation Ψ située dans la région 5' du codon d'initiation de Gag [75, 76]. Les deux ARNs viraux interagissent ensemble au niveau d'une séquence située en 5' appelée signal d'initiation de dimérisation DIS. Les deux motifs en doigts de zinc de la NC permettent de lier spécifiquement la double copie d'ARN génomique viral. La spécificité d'encapsidation est contrôlée par l'interaction entre la séquence d'encapsidation et le domaine NC de Gag. Le complexe Gag/Gag-pol/ARN interagit également avec le complexe tRNA^{Lys,3}/LysRS ce qui permettra son encapsidation dans les virions nouvellement formés.

Le Pr160^{Gag-Pol} est lui encapsidé dans les virions via son domaine Gag, en grande partie via des interactions entre Gag.

– Bourgeonnement

L'étape finale du processus d'assemblage viral et de la libération des particules virales fait intervenir le bourgeonnement des virions de la membrane plasmique cellulaire. Cette étape fait intervenir des séquences spécifiques qui favorisent la libération des particules. Ces séquences appelées domaine L pour Late, sont situées dans la partie N terminale de la séquence p6 du précurseur Gag. Le domaine L contient un motif Pro-Pro-Pro-Tyr qui est une séquence consensus de fixation pour une famille de protéines cellulaires appelées ESCRT, pour Endosomal Sorting Complex Required for Transport [77] (**Figure 17**).

– La maturation des particules virales

La maturation des particules virales passe par le clivage des précurseurs polyprotéiques par la protéase virale. La protéase clive les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-pol} pour générer des protéines structurales et non structurales matures. Le processing réalisé par la protéase se déroule dans un ordre précis afin de former des virions infectieux [78].

Après le clivage, les protéines de capsid s'assemblent sous forme d'une coquille conique [12] autour du complexe ARN / protéine NC (**Figure 5**). Lors de l'assemblage, le domaine N terminal de CA fixe la cyclophiline A [79]. Cette fixation est spécifique à HIV-1. Cette protéine qui fonctionne dans la cellule comme une peptidyl-prolyl isomérase cis-trans,



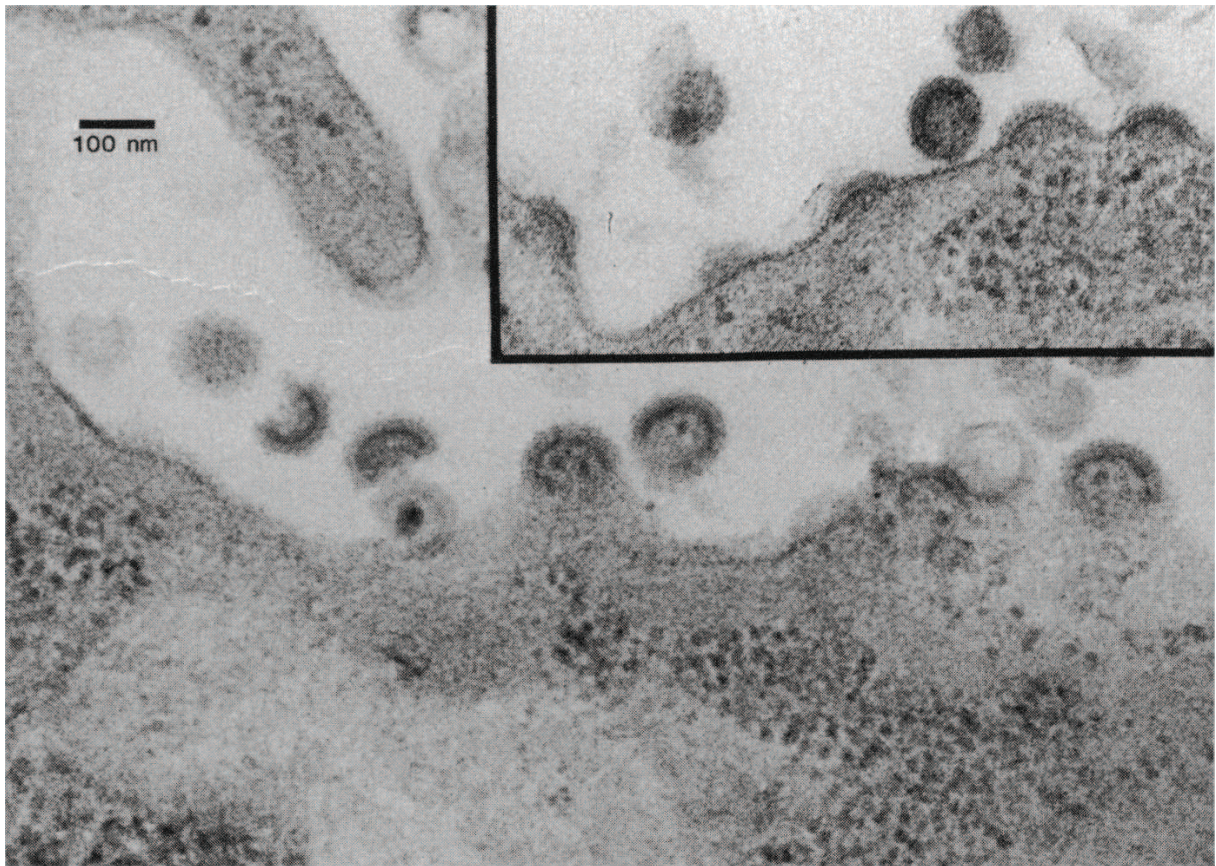


Figure 18. Coupe fine de lymphocytes producteurs de virus [87].

pourrait agir comme une chaperonne au cours de la maturation pour empêcher une agrégation défavorable de CA.

2) Le syndrome de l'immunodéficience acquise

Le syndrome de l'immunodéficience acquise désigne un ensemble de symptômes consécutifs à la destruction du système immunitaire. Il existe plusieurs rétrovirus responsables, chacun infectant une espèce particulière.

a. Historique

La publication du 5 juin 1981 par Michael S. Gottlieb décrit le début de l'épidémie. En juillet de cette même année, le Center for Disease Control and Prevention (CDC) d'Atlanta relève une fréquence anormalement élevée de sarcomes de Kaposi, en particulier chez des patients homosexuels. Cette maladie fut d'abord appelée « gay pneumoniae » aux Etats-Unis. A l'époque l'agent responsable n'est pas identifié, et une intoxication est mise en cause. Mais en 1982 devant la diversité des patients atteints, une origine infectieuse est admise et celle-ci est renommée A.I.D.S aux Etats-Unis ou S.I.D.A. en France pour Syndrome d'Immunodéficience Acquise.

En 1983, l'analyse des ganglions lymphatiques de Mr Bru, un patient décédé, permet de mettre en évidence une activité de rétro transcription. Le Lymphadenopathy Associated Virus LAV, est alors isolé par l'équipe du Professeur Jean-Claude Chermann, avec Luc Montagnier à l'Institut Pasteur [80]. Un examen au microscope électronique permet de visualiser, pour la première fois le virus, le 4 février 1983 (**Figure 18**). Le 23 avril 1984 l'équipe de Robert Gallo aux Etat-Unis découvre à son tour un rétrovirus qu'ils baptisent HTLV-III [81].

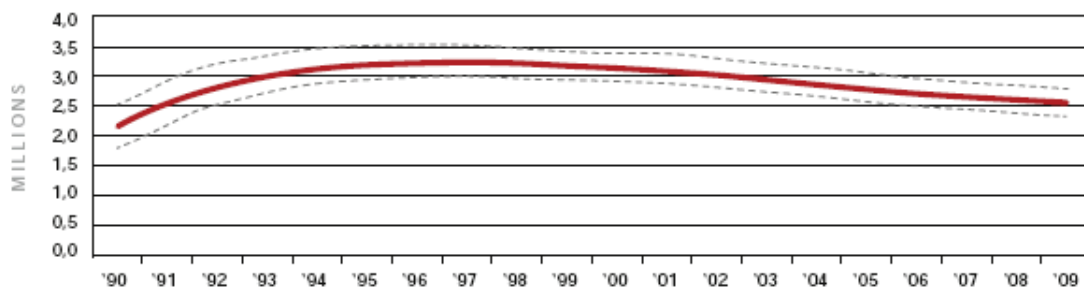
En parallèle, l'équipe de Jay A. Levy à San Francisco fait de même le 24 août 1984 et trouve plusieurs rétrovirus, qu'elle nomme AIDS-associated retroviruses (ARV) [82].

En 1985, les génomes du LAV, ARV et du HTLV-III sont alors séquencés, confirmant que ces trois appellations désignent un seul et même virus. En 1986, la communauté scientifique décide de renommer le virus VIH pour *Virus de l'immunodéficience humaine*.

Cette année-là, l'équipe de Pasteur isole également un deuxième virus, nommé le VIH-2 [83].



Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH



Prévalence du VIH au niveau mondial, 2009

Source : ONUSIDA

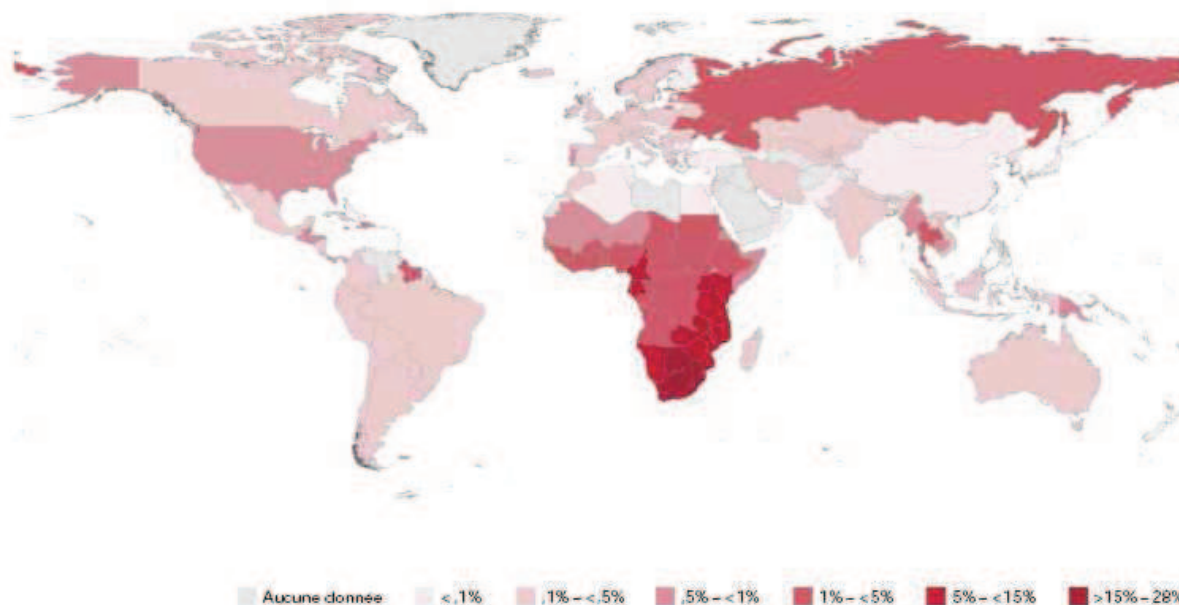


Figure 19. Evolution de l'épidémie et répartition de la maladie (Rapport de l'ONUSIDA 2010).

b. Epidémiologie

À l'aube de la quatrième décennie de l'épidémie de SIDA, le monde a passé un cap critique, il a enrayer la propagation de l'épidémie et a commencé à inverser la tendance actuelle. Depuis 1999, année où l'épidémie aurait atteint son maximum, le nombre de nouvelles infections dans le monde a reculé de 19 %. On peut également observer une diminution du nombre de décès liés au SIDA grâce à un élargissement de l'accès et à une diversification des traitements antirétroviraux. Bien que le nombre de nouvelles infections ait diminué, le nombre de personnes contaminées a augmenté du fait de la réduction significative de la mortalité.

Ainsi, en 2009, on comptait 2.3 millions de nouvelles personnes infectées ce qui porte à 33.3 millions de personnes infectées dans le monde (**Figure 19**).

c. Variants génétiques et origines du VIH

Les virus d'immunodéficiences humaines VIH-1 et VIH-2 ainsi que le Virus d'Immunodéficience Simienne VIS font partie de la famille des lentivirus de primates.

Le VIH-2 sévit principalement en Afrique de l'ouest, il se compose de deux groupes : VIH-2a et VIH-2b. Le VIH-2 se rapproche du VIS du macaque Mangabey [84].

Le VIH-1 présente lui une phylogénie beaucoup plus complexe. Il existe 4 groupes principaux : M (major), O (Outlier), N (Non-M, non-O) et P [85]. Phylogénétiquement, les groupes M, O et N du VIH-1 se rapproche du SIV du chimpanzé [86] et le groupe P du VIS du gorille (**Figure 20**).

Le groupe M est de loin le groupe le plus important en nombre de personnes contaminées, mais il est également celui qui est le plus répandu de par le monde, en étant présent sur tous les continents, alors que les autres groupes sont uniquement présents en Afrique centrale. Le groupe M comprend neuf sous-types ou clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) auxquelles s'ajoutent plusieurs formes recombinantes (CRF), qui ont pour origine la multiple infection d'une cellule par des sous-types différents, ce qui entraîne des mélanges dans le génome viral [87]. Il est probable que le virus continue d'évoluer. Actuellement la répartition des sous-types et CRF dans le monde est assez hétérogène. Les pays en développement avec les plus forts taux de transmissions sont ceux présentant le plus grand nombre de CRFs (**Figure 21**).



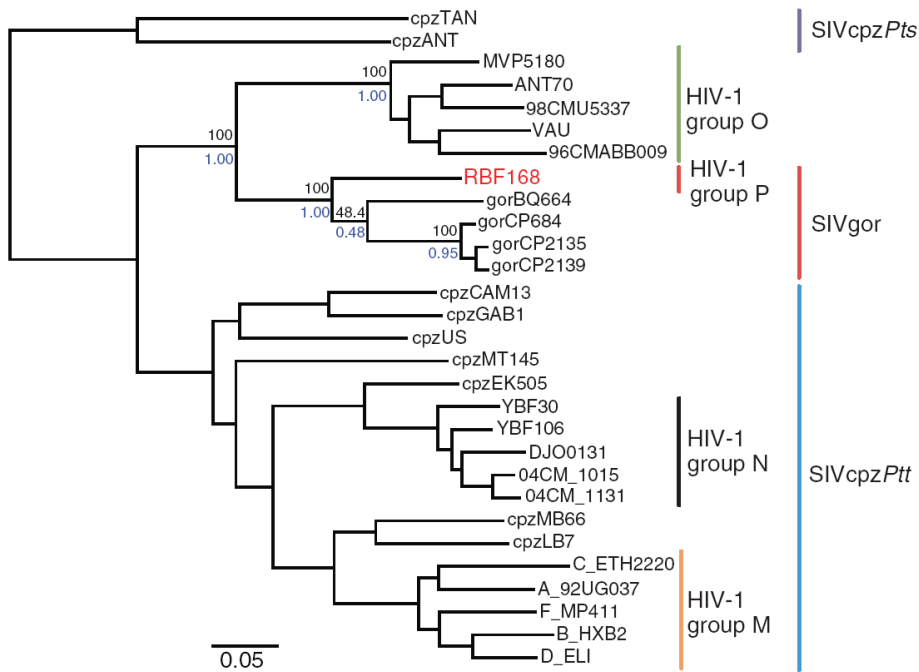


Figure 20. Relations évolutionnaires des groupes du VIH-1 et leur origine [92].
L'arbre a été réalisé après alignements des séquences d'acides nucléiques.

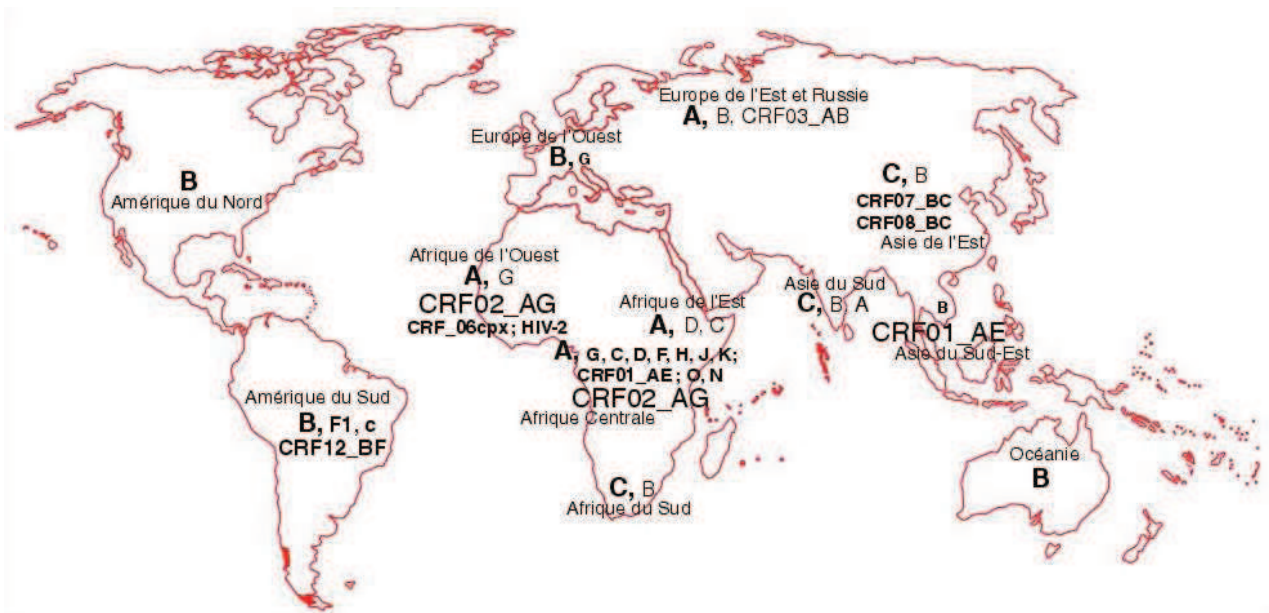


Figure 21. Répartition des sous-types et CRF de VIH-1 dans le monde [93].

d. Transmission

Le VIH est présent dans de nombreux fluides organiques. La transmission peut survenir de 3 manières. Les rapports sexuels non protégés représentent la part la plus importante des contaminations. Le contact avec du matériel contaminé chez les toxicomanes par injection, les transfusés et le personnel de santé a également constitué au début de l'épidémie une voie de transmission importante. Enfin, il existe la transmission périnatale ou « mère-enfant », qui peut survenir durant la grossesse, pendant l'accouchement et lors de l'allaitement.

e. Pathologie

Les cellules présentant les récepteurs CD4 à leur surface constituent les cibles du virus. Parmi ces cellules on compte les lymphocytes T CD4+, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Le cycle de réplication du virus conduit à une destruction des cellules infectées et amène donc à une destruction du système immunitaire de l'hôte. Durant les différentes phases de la maladie, on peut observer un combat entre la réplication virale et la réaction immunitaire qui conduit à une balance entre le nombre de cellules CD4+ et la charge virale chez le patient. Généralement, on peut décrire trois phases caractéristiques de l'infection à VIH (**Figure 22**).

– La primo-infection

La primo-infection survient entre deux et quatre semaines après la contamination et les symptômes sont peu spécifiques. Les symptômes rappellent un syndrome pseudo grippal avec une fièvre quasi constante accompagnée de céphalées, de myalgies et d'asthénie. Cependant jusqu'à une personne sur deux ne présente pas de symptômes.

Dès la primo-infection, le virus se réplique activement dans l'organisme, avec une production quotidienne de dix milliards de virions, entraînant la destruction d'environ cinq milliards de lymphocytes T CD4+. A ce moment là la charge virale est alors maximale alors que le patient n'ayant pas encore développé d'anticorps est toujours séronégatif. La quantité de virus baisse très rapidement par la suite tout en restant à un niveau minimal, et on peut alors observer une réplication virale dite à bas bruit. La mise en place d'une défense humorale dirigée par les



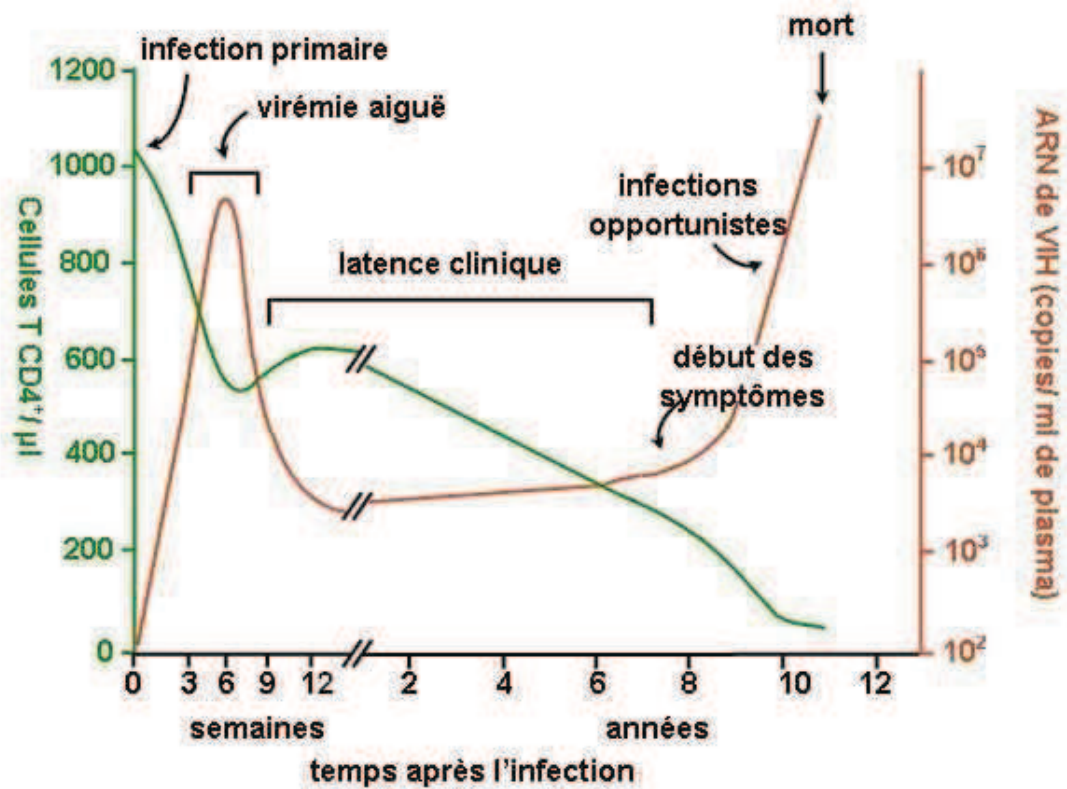


Figure 22. Phases caractéristiques de l'infection à VIH-1 (<http://www.ulb.ac.be/info/sida/16quefautil.html>).

lymphocytes B et la prolifération des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques permettent de contenir l'infection. La production d'anticorps rend le patient séropositif.

– La phase asymptomatique

La phase asymptomatique peut durer de quelques mois à plusieurs années. Certains patients présentent une phase de latence très longue, même sans traitements et sont appelés non-progresseurs à long terme. Durant cette phase le virus se multiplie activement. Les lymphocytes T CD4+ semblent se renouveler rapidement malgré leur destruction par le virus, jusqu'à ce que l'épuisement des organes lymphoïdes centraux ne permette plus leur régénération. Le taux de CD4 diminue progressivement.

– La phase symptomatique

La phase symptomatique correspond à l'apparition des premiers signes cliniques de l'infection. Après dix à quinze ans d'évolution spontanée sans traitement, le sujet est immunodéprimé. Des pathologies infectieuses ou tumorales ne peuvent plus être contrôlées par le système immunitaire du patient et celles-ci conduisent au décès.

f. Diagnostic

Le diagnostic visant à déterminer le statut sérologique au VIH est réalisé en deux étapes. La première étape se base sur la détection des anticorps anti-VIH, via la technique ELISA. L'utilisation de deux tests commerciaux d'origines différentes est généralement effectuée pour éliminer le maximum de faux positifs dès la première étape. Si la détection se révèle positive, douteuse, ou discordante, une confirmation est réalisée. Un western blot est réalisé à l'aide de bandelettes portant des protéines virales incubées avec le sérum de patient.

Il existe également de nouvelles techniques comme le dosage de la p24 et la mesure de la charge virale par RT-PCR quantitative qui sont plus sensibles.



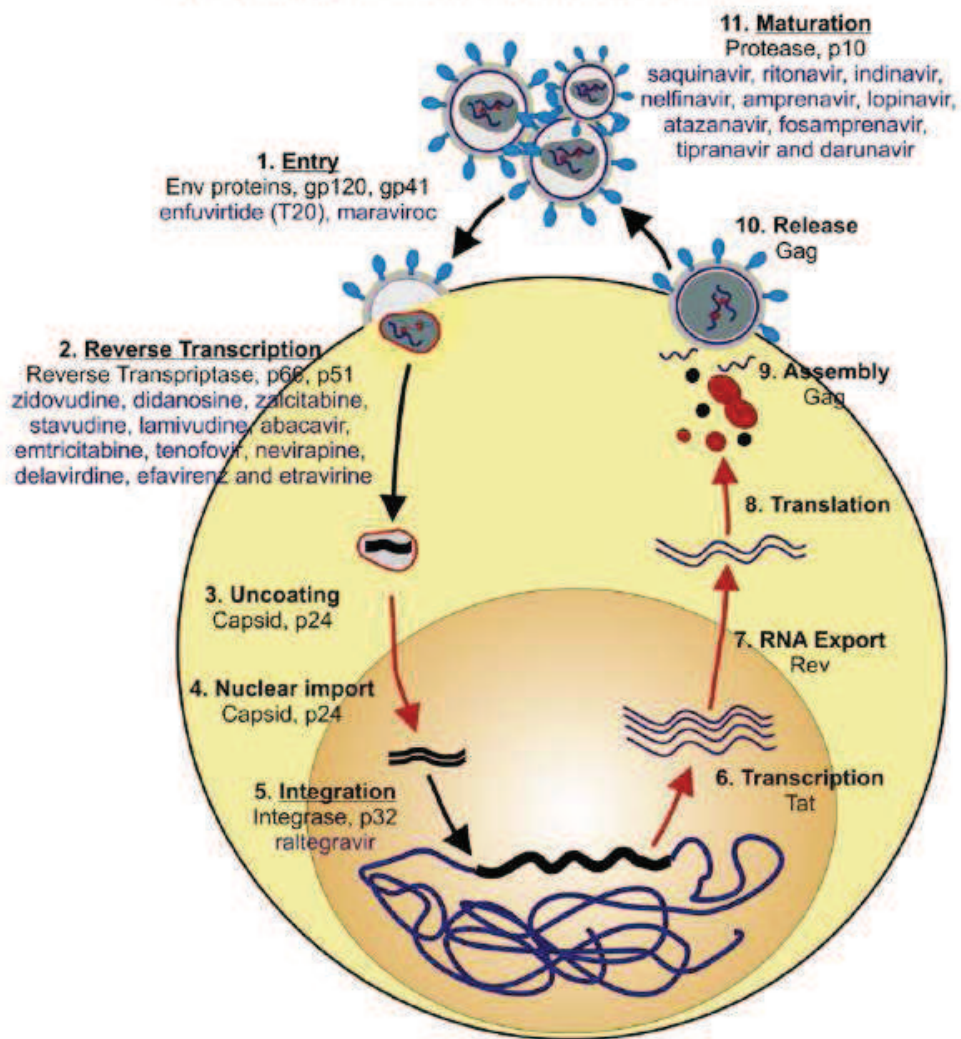


Figure 23. Les étapes du cycle viral actuellement ciblées par les inhibiteurs HAART [94]

3) Les inhibiteurs de l'infection virale

L'amélioration de la connaissance du cycle viral a permis de développer des traitements afin d'améliorer et de prolonger la vie du patient. Ces traitements reposent actuellement sur l'utilisation d'inhibiteurs qui ciblent différentes étapes de l'infection virale. La plupart des traitements se présentent sous la forme d'une trithérapie. Les traitements les plus efficaces sont appelés HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy). Bien évidemment, ces traitements sont essentiellement utilisés dans les pays d'Europe et d'Amérique, la situation dans les pays en voie de développement étant plus compliquée et les traitements moindres. Le traitement standard du patient se compose en général de 2 ou 3 inhibiteurs dirigés contre la RT auxquels peuvent s'ajouter un inhibiteur de la protéase ou plus récemment de l'intégrase. Les inhibiteurs anti RT et anti PR occupent donc une place prépondérante dans les traitements. Ce succès s'explique en partie par la persistance intracellulaire des molécules. Malgré l'efficacité de ces molécules, des résistances ont émergé. L'apparition de mutations de résistances est essentiellement due à la fréquence des mutations introduites par la RT qui est peu fidèle ainsi qu'au taux de multiplication du virus qui est telle qu'elle permet très rapidement de sélectionner des virus résistants.

Depuis 1985 et la découverte de l'AZT (3'-azidothymidine) le premier antirétroviral, anti nucléosidique dirigé contre l'activité de transcription inverse, la recherche a permis de développer de nombreuses autres molécules, dirigées contre plusieurs étapes du cycle viral. Ceux-ci sont résumés dans la **Figure 23** [88].

a. Inhibiteurs de la transcription inverse

Les inhibiteurs de l'étape de transcription inverse se divisent en deux catégories : les NRTIs (nucleosides and nucleotides reverse transcriptase inhibitors) et les NNRTIs (non nucleosides and nucleotides reverse transcriptase inhibitors).

– Les NRTIs

Il existe 8 inhibiteurs de type nucléosidique en plus de l'AZT qui ont été approuvés par le « United States Food and Drug Administration for the treatment of HIV infection » : didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T), lamivudine (3TC), abacavir (ABC),



tenofovir disoproxil fumarate (TDF, nucléotide), emtricitabine (FTC), Entecavir (ETV) et récemment en 2011 Apricitabine (ATC).

Les NRTIs sont tous des 3'OH désoxynucléotides et donc des terminateurs de chaîne de l'élongation d'ADN. L'ajout de trois phosphates en 3'OH des molécules par des nucleoside/tide transférases est nécessaire pour que celles-ci puissent être incorporées lors de l'élongation de l'ADN viral [89]. Les NRTIs peuvent également être le substrat de Phosphatase 5'nucléotidases qui vont empêcher leur activation.

Les types de résistances observés affectent principalement la liaison et le taux d'incorporation des analogues de nucléotides. Les acides aminés de la RT directement en contact avec les NRTIs présentent les mutations de résistance (ex : K65R, L74V, Y115F, M184V/I et Q151M...) [90].

– Les NNRTIs

Les NNRTIs sont des molécules qui se fixent au niveau du site allostérique de la RT et bloquent l'activité de l'enzyme. Il existe actuellement 30 classes de molécules de structures différentes avec de nombreux dérivés.

Le site de fixation des molécules sur la RT se situe au niveau d'une région hydrophobe qui est appelée Non Nucleosidique Inhibitor Binding Pocket (NNIBP), située non loin du site actif de l'enzyme [91]. Toutes les mutations de résistance associées à l'utilisation de NNRTIs sont localisées au niveau de ce site d'interaction. Ces mutations diminuent l'affinité entre la RT et la molécule (A98, L100, K103...). Une seule mutation au niveau du site d'interaction peut amener un fort niveau de résistance à un ou plusieurs NNRTIs.

b. Inhibiteurs de la protéase

Les connaissances détaillées de la structure de la protéase ont permis de développer rapidement des inhibiteurs spécifiques. Les inhibiteurs ont été conçus pour se lier à la protéase avec une haute affinité et pour occuper plus d'espace dans la poche catalytique que les substrats naturels. Actuellement, neuf inhibiteurs sont officiellement approuvés pour une utilisation clinique : saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir et darunavir.



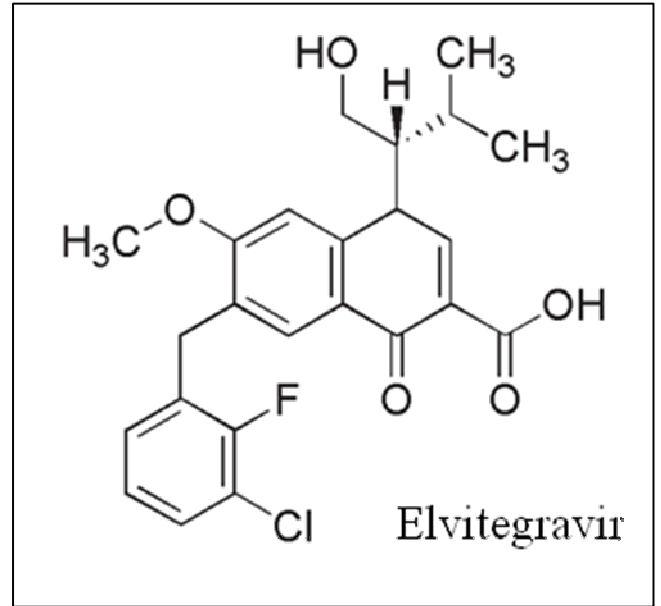
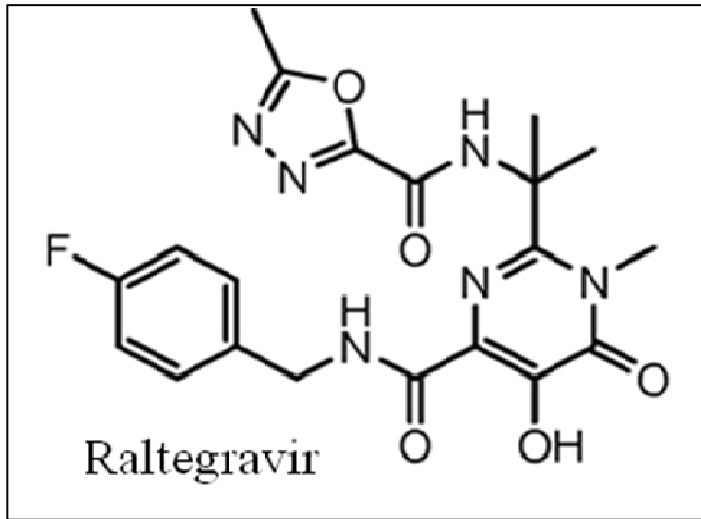


Figure 24. Raltégravir et Elvitegravir, molécules inhibitrices de l'intégrase développées par Merck et Gilead respectivement.

Les mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase induisent un élargissement du site catalytique de la protéase qui conduit à une diminution de l'affinité entre l'inhibiteur et l'enzyme. Les premières mutations qui apparaissent de façon individuelle sont appelées majeures. Comme pour la RT, des mutations secondaires ou mineures peuvent apparaître plus tard et permettent aux virus mutés de se répliquer plus efficacement [92]. Des mutations de résistances ont également été observées dans la séquence des substrats de la protéase, à proximité des sites de clivages.

c. Inhibiteurs de l'entrée

L'étape d'entrée est une phase complexe qui fait intervenir différents partenaires. Différents type d'inhibiteurs ont donc été développés pour cibler les différents partenaires et les différentes étapes de l'entrée [93]. Deux inhibiteurs, l'un de l'interaction avec les récepteurs (maraviroc), l'autre de la fusion (T-20), sont utilisés en thérapie.

Certaines molécules inhibent le mécanisme d'adhésion du virus sur ses cibles en bloquant la fixation du virus au récepteur CD4 de la cellule (BMS-806) tandis que d'autres agissent en se fixant aux récepteurs des chemokines, afin que le virus ne puisse plus les employer pour pénétrer dans la cellule. Ainsi le SCH-C se fixe sur les corécepteurs CCR5 et l'AMD-3100 agit comme un antagoniste des récepteurs CXCR4. Par ailleurs les inhibiteurs de fusion, le T-20 et le T-1249, sont des peptides qui fonctionnent en bloquant la conformation de la protéine virale gp41 [94]. Le T-20 a montré une efficacité particulièrement intéressante chez les personnes en échappement thérapeutique. Les mutations de résistance au T-20 concernent la protéine de l'enveloppe du virus gp41.

d. Les inhibiteurs de l'intégration

De nombreux inhibiteurs de l'intégrase rétrovirale ont été testés mais à l'heure actuelle seulement un inhibiteur est autorisé pour traiter les patients, le raltégravir, et seulement un autre inhibiteur est en phase III d'essai clinique, l'elvitégravir (**Figure 24**).

Le raltégravir et l'elvitégravir partagent le même mécanisme d'action contre l'intégrase, ils sont dérivés des acides dicétoniques (DKA). Les inhibiteurs empêchent la fixation de l'intégrase sur l'ADN cible cellulaire par la chélation des ions magnésium. Ce sont des



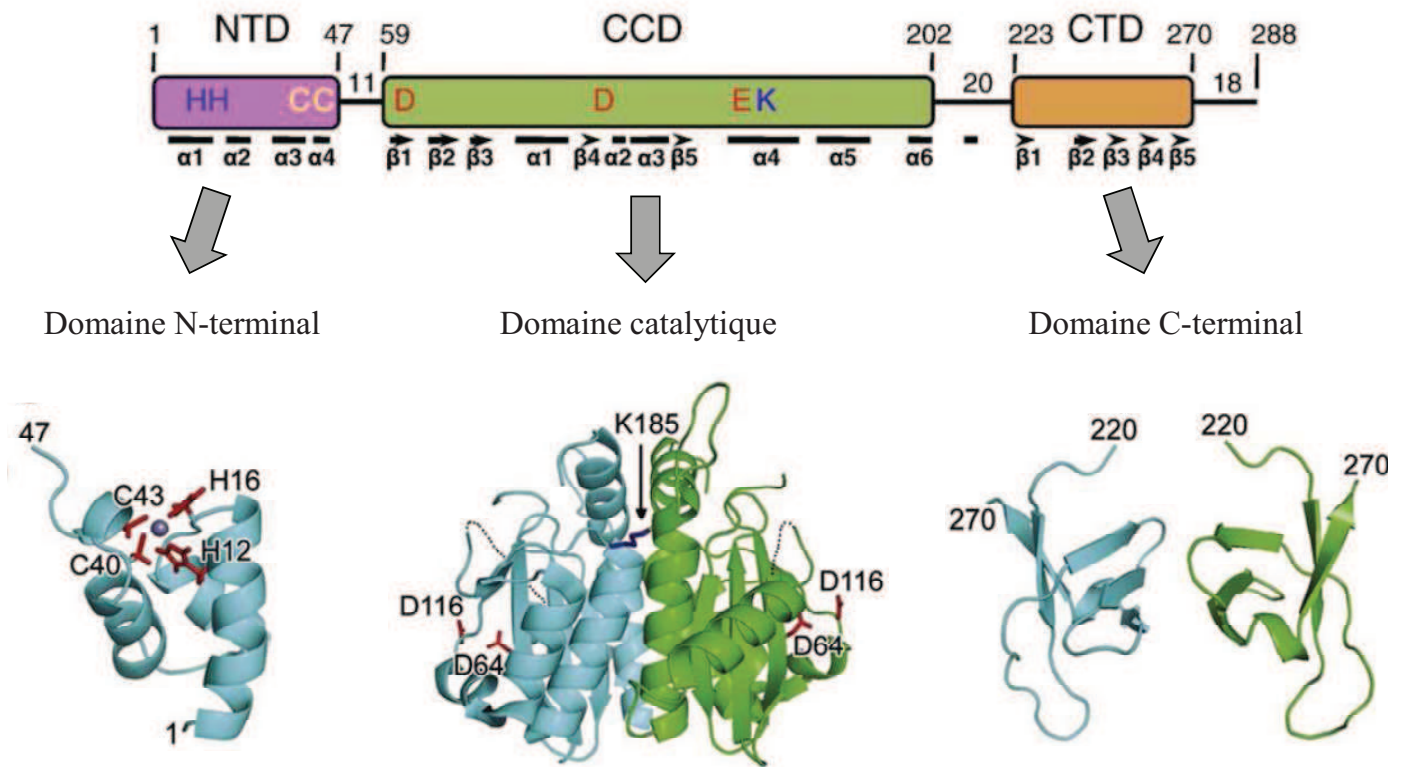


Figure 25. Structure de l'intégrase de VIH-1 [106].

La protéine se compose de trois domaines distincts dont la structure a été résolue.

inhibiteurs de transfert de brin. Cette interaction a récemment été confirmée par une étude cristallographique entre l'intégrase du prototype foamy virus et les deux inhibiteurs [95]. On observe des mutations majeures accompagnées de mutations mineures permettant la restauration de l'activité de l'enzyme. Pour le raltégravir, trois voies de résistances ont été décrites : i) Q148H/R/K combinée avec E138K ou G140S; ii) N155H avec L74M, E92Q et G163R et iii) Y143R/C et T97A. Cette dernière voie de résistance a notamment été bien étudiée au laboratoire [96, 97].

Il existe également d'autres inhibiteurs de l'intégration dont la cible n'est pas le transfert de brin. Il a été montré que l'interaction entre l'intégrase et le facteur de transcription LEDGF/p75 au cours du cycle viral est essentielle à l'infectiosité du virus. Ainsi, ont été développés des inhibiteurs visant à empêcher cette interaction. La conception de peptides inhibiteurs, appelés Ledgins, est basée sur des résidus de LEDGF/p75 qui empêche l'interaction entre l'intégrase et LEDGF/P75 [98]. Il existe également des inhibiteurs à base d'hétérocycle ou de quinoléine capables d'inhiber cette interaction [99].

B. L'intégration virale

1) L'intégrase

a. Structure

L'étape d'intégration met en jeu trois principaux partenaires : l'ADN viral, l'ADN cellulaire et l'intégrase. L'intégrase est une protéine de 288 acides aminés, soit 32 kDa, dont la structure tridimensionnelle se compose de trois domaines (**Figure 25**) [100]. Un domaine N-terminal (résidus 1-50), un domaine central ou core catalytique (résidus 50-212), et un domaine C-terminal (résidus 212-288).

– Le domaine N-terminal

La structure du domaine isolé a pu être déterminée par NMR [101]. Il se compose d'un faisceau de trois hélices α et d'un domaine conservé HHCC permettant la liaison au zinc qui stabilise la structure des hélices. Le zinc joue un rôle structural clé dans un grand nombre de protéines, et plus de 10 classes de domaine de liaison au zinc ont été identifiés. Ces domaines sont soit impliqués dans la liaison à l'ADN, ou dans les interactions protéine-protéine. Dans



chaque cas, le zinc est coordonné par les résidus Cys et His. Bien que le domaine HHCC de l'intégrase ne corresponde à aucun autre domaine connu de liaison au zinc, il a pu être montré que celui-ci joue un rôle important dans la fixation à l'ADN [102].

Il a également été montré que ce domaine est important pour l'activité de l'enzyme [103], ainsi que pour l'infectiosité du virus [104]. Sa structure présente un motif similaire aux motifs tour-hélice-tour (HTH) que l'on trouve dans les protéines se liant à l'ADN. Ce domaine peut s'assembler sous forme de dimères et pourrait être impliqué dans la tétramérisation de l'enzyme entière.

– Le domaine central

Le domaine central est appelé domaine catalytique (CCD) de l'enzyme. Il contient la triade catalytique D₆₄D₁₁₆E₁₅₂ conservée parmi les intégrases rétrovirales, rétrotransposons et les transposases. La mutation d'un seul de ces résidus entraîne une sévère diminution de l'activité catalytique de l'enzyme. Par homologie avec les ADN polymérases, ces résidus ont été proposés comme étant capables de coordonner un ion métallique divalent. Le rôle de ces acides aminés dans la liaison à un ion métallique divalent a été démontré par la caractérisation de la structure des core catalytique de l'intégrase du VIH-1, SIV ou encore du Rous Sarcoma Virus [105].

La structure du core de l'enzyme du VIH-1 a pu être obtenue après introduction de la mutation F185K qui permet d'augmenter de façon significative la solubilité de l'enzyme [106]. Toutes les études montrent que le CCD cristallise sous forme de dimères homogènes (**Figure 25**). La triade catalytique est capable de coordonner un ou deux ions divalents Mg²⁺ ou Mn²⁺. L'enzyme est ainsi capable de catalyser la coupure du squelette phosphodiester de l'ADN. La structure du monomère montre qu'il contient 6 hélices α (α 1 à α 6) et 5 feuillets β et ainsi ressemble à toutes les autres protéines de la famille des polynucléotidyl transférase, dont la RNase H fait également partie. Les monomères de CCD se dimérisent via les interactions entre les hélices α 1 et α 5' et inversement. Au sein d'un dimère, les hélices α 4 et α 5 constituent un motif bi-hélice que l'on retrouve dans les motifs de fixation à l'ADN. Il a été clairement montré que le magnésium interagit avec plusieurs régions du core et a un rôle de stabilisation de la structure [107]. Cependant, la région comprenant les résidus 140 à 152 reste mal définie, on sait seulement qu'elle forme une boucle flexible qui doit adopter une conformation plus stable en présence de l'ADN.



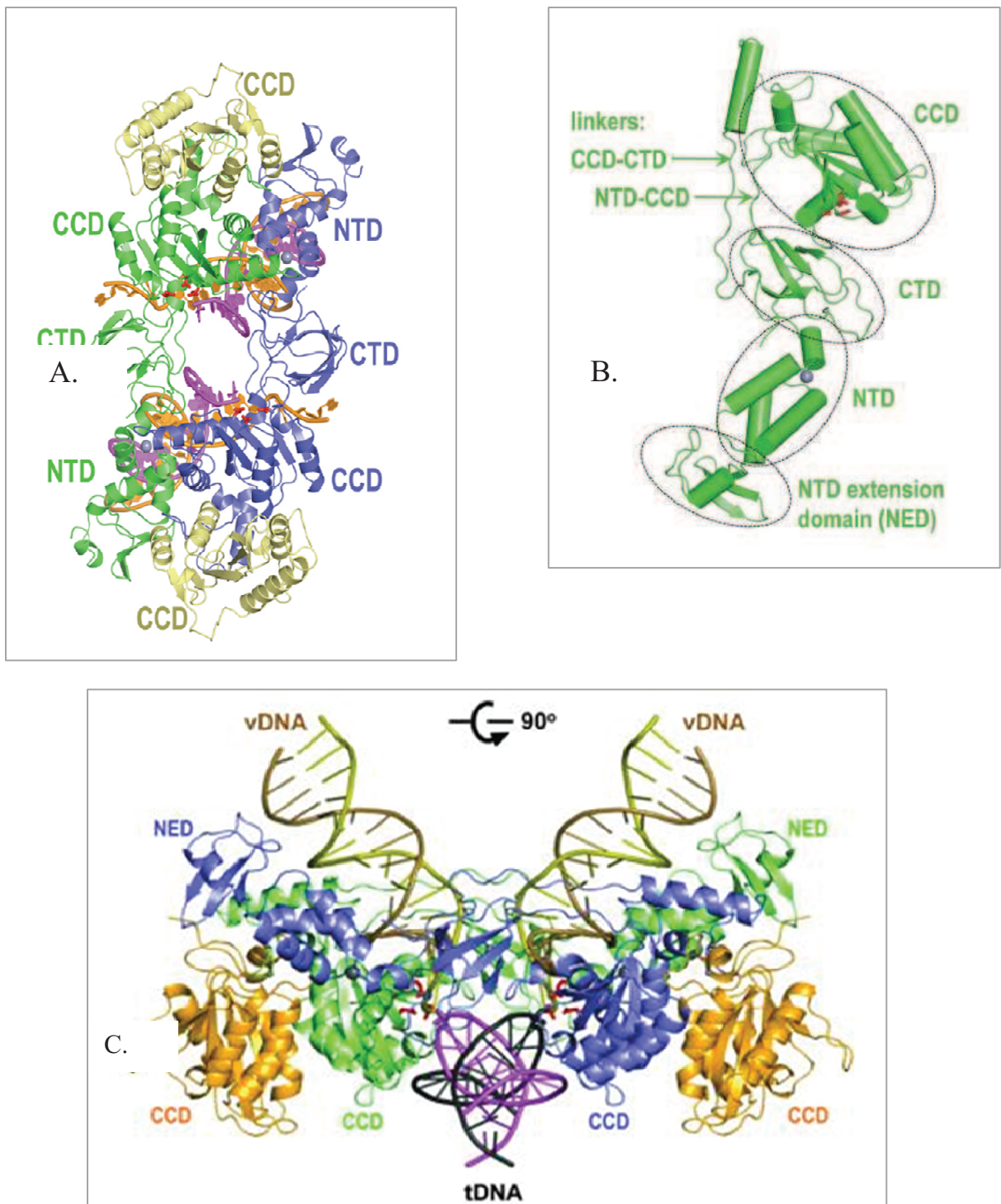


Figure 26. Structure de l'intasome du Prototype Foamy Virus (PFV) [101].

(A) Les sous-unités internes du tétramère d'IN engagés avec l'ADN viral, sont représentés en bleu et en vert; les chaînes d'IN externes sont en jaunes. Les brins d'ADN réactifs sont en magenta et les non transférés sont en orange. L'emplacement des domaines (NTD, CCD et CTD) est indiqué.

(B) Les sous-unités internes du tétramère d'IN engagés avec l'ADN viral et les linkers sont indiqués (Vert). L'orientation est la même que dans A.

(C) Représentation de la structure du complexe de transfert de brin. Les sites actifs des tétramères d'IN sont indiqués en rouge. (Maertens et al. 2011)

NTD : domaine N-terminal; CTD : domaine C-terminal; CCD : domaine catalytique central; NED : extension du NTD ; vDNA : ADN viral ; tDNA : ADN cellulaire.

Enfin, le core catalytique seul n'est pas suffisant pour catalyser la réaction d'intégration complète, cependant *in vitro* il est capable d'effectuer une réaction inverse de son activité appelée désintégration [108].

– Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal est celui qui présente le moins d'homologie avec les autres intégrases rétrovirales. Celui-ci présente un groupe d'acides aminés basiques dont la structure est apparentée à un sarc homology domain (SH3) permettant la fixation à l'ADN de manière non spécifique. Le SH3 se compose de 5 feuillets β (**Figure 25**). Le domaine C-terminal dimérique en solution est cependant monomérique lorsqu'il est lié au CCD [109]. Il a pu être montré que la délétion de ce domaine aboutit à une abolition des activités de 3'end Processing et de transfert de brin de l'enzyme.

– L'intasome du Virus de Prototype Foamy (PFV)

Bien que les différents domaines de l'intégrase aient été cristallisés seuls ou deux à deux, la structure entière de l'enzyme n'est pas connue. Très récemment la structure entière de l'intégrase de prototype Foamy a été élucidée [95]. Ici l'intégrase a été cristallisée en présence de son ADN substrat sous forme pré-processé. L'étude et la compréhension de cette structure pourrait nous aider à mieux comprendre des mécanismes concernant l'intégrase de VIH-1 de part les homologies entre les intégrases de Foamy et de VIH-1.

L'étude cristallographique nous montre qu'un dimère d'IN s'associe étroitement à une molécule d'ADN viral (**Figure 26a**). Deux complexes dimères/ADN s'assemblent de façon symétrique pour former un tétramère d'intégrase. L'interface dimère/dimère est stabilisée par des interactions entre les domaines N-ter et CCD (**Figure 26b**). Les sous-unités internes du tétramère (vert et bleu dans la **Figure 26**) sont responsables de tous les contacts impliqués dans la tétramérisation et l'interaction avec l'ADN viral. Les CCD des sous-unités extérieures (or dans la **Figure 26**) semblent stabiliser la structure globale. Ainsi l'ADN cellulaire cible interagirait au niveau du sillon formé à l'interface des dimères d'IN (**Figure 26c**). Ainsi l'interaction entre les sites actifs des dimères d'IN et l'ADN cible conduirait à un espacement de 4 pb correspondant au décalage de paires de bases connue de l'intégration concertée du PFV [95].



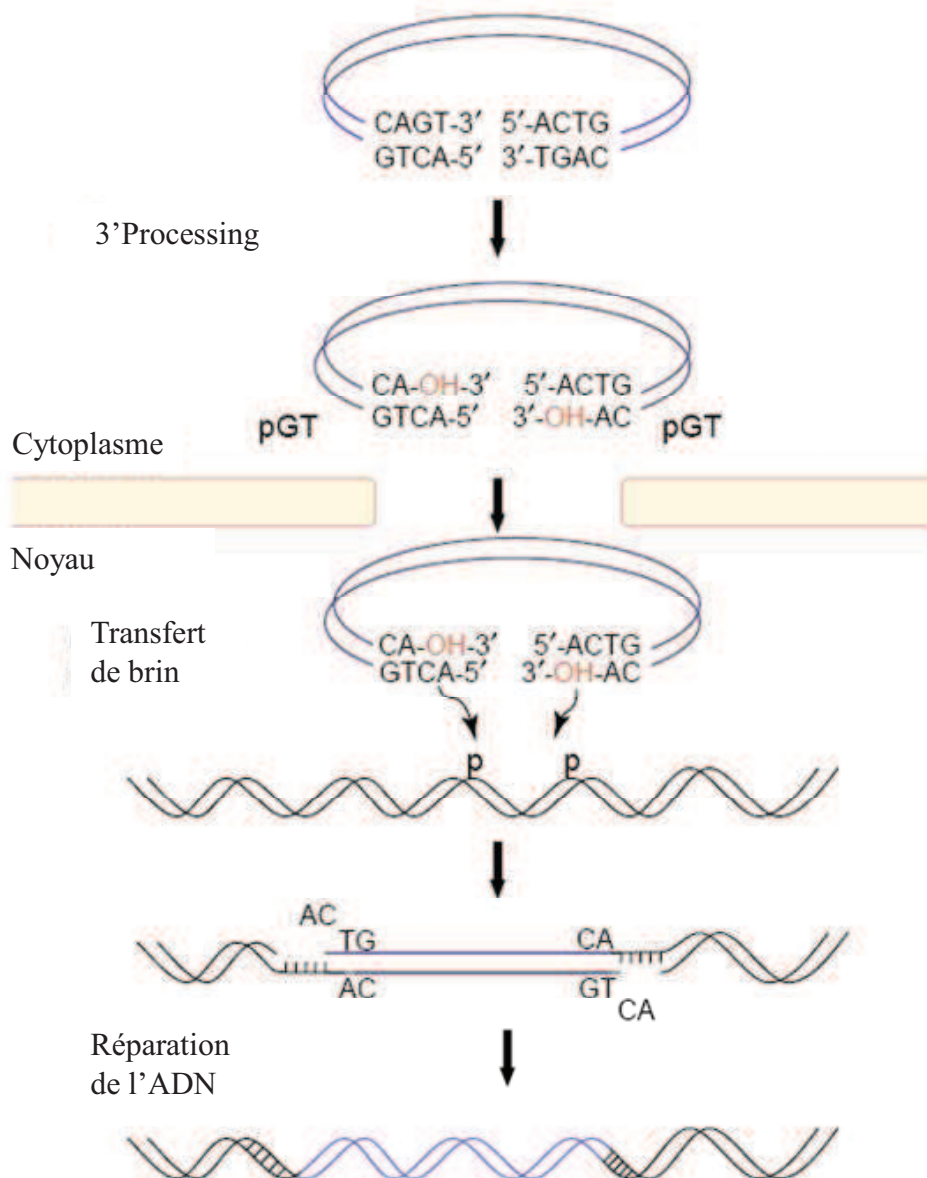


Figure 27. Schémas de la réaction d'intégration *in vivo* [116].

L'IN catalyse le clivage de 2 nucléotides au niveau des extrémités 3' des LTR (3'Processing). Cette attaque se traduit par la formation d'extrémités 3'OH. Cet ADN ainsi généré est transporté dans le noyau de la cellule hôte, au sein du CPI. L'IN provoque alors des coupures décalées de 5 pb dans le génome de la cellule. L'insertion de l'ADN viral dans le génome est réalisée grâce au transfert de brin suivi d'une phase de réparation de assurant l'intégration complète de l'ADN viral dans le génome cellulaire.

b. Rôle de l'intégrase au cours du cycle viral

L'intégrase est une enzyme clé du cycle de réplication. Bien entendu, elle permet l'étape d'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, mais elle participe également à d'autres étapes du cycle viral. Ainsi, elle intervient dans l'étape de transcription inverse avec la RT. Enfin, l'étape de transport nucléaire est encore mal définie et certaines propriétés de l'IN font que différents laboratoires ont étudié la possibilité qu'elle intervienne dans cette étape.

– La réaction d'intégration

La réaction d'intégration se décompose en deux étapes : le 3'end Processing suivi du transfert de brin (**Figure 27**) [110]. L'intégrase reconnaît tout d'abord une séquence spécifique au niveau des extrémités virales LTR. L'intégrase catalyse la coupure endonucléotidique du dinucléotide GT laissant des extrémités CA 3'OH rentrantes. Cette étape a lieu dans le cytoplasme de la cellule. Après translocation du PIC dans le noyau, il y a catalyse de la seconde étape, le transfert de brin. Les extrémités 3'OH vont permettre l'intégration de l'ADN viral par une attaque nucléophile sur les liaisons phosphodiester de l'ADN génomique. Cette réaction se produit simultanément et au même site pour chacune des deux extrémités virales et celles-ci sont insérées dans le génome cellulaire qui est clivé chez VIH-1 avec un décalage de 5 pb par l'intégrase.

Les deux étapes catalysées par l'intégrase sont contrôlées par différents états oligomériques de la protéine. En effet l'interaction de l'intégrase avec l'ADN viral au niveau des LTR permet la dimérisation de l'intégrase qui catalyse le processing. Ensuite le transfert de brin se fait par la formation d'un tétramère actif issu de l'interaction entre les deux dimères précédemment formés. Les différentes formes oligomériques de l'intégrase ne possèdent donc pas les mêmes propriétés catalytiques [111, 112].

Il a pu être montré au laboratoire que la formation d'oligomères d'intégrases actifs dépend de la séquence de fixation. Ainsi une séquence d'ADN aléatoire bien que pouvant être reconnue par l'intégrase entraîne la formation de dimères inactifs incapable de réaliser la réaction de 3'end Processing. Seule la séquence des LTR permet d'obtenir des complexes actifs de l'enzyme [113].



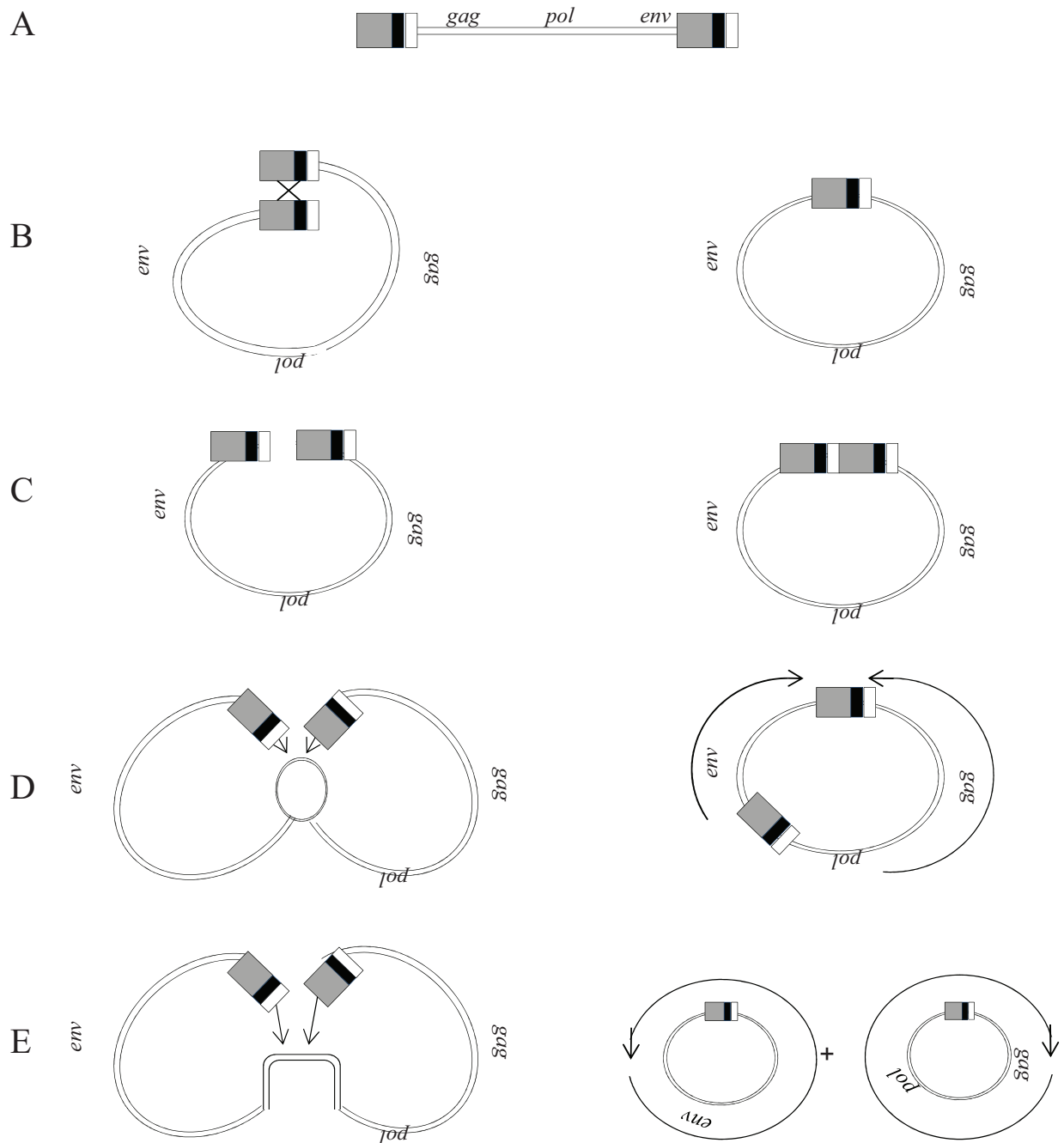


Figure 28. Représentation des formes non intégrées de l'ADN génomique viral.

L'ADN viral linéaire (A) peut former des produits de formes circulaires à 1LTR (B) ou 2LTR (C). Les produits d'autointégration (D et E) ont une structure qui dépend du site d'intégration. Les flèches indiquent l'orientation de la séquence, les rectangles gris représentent les régions U3, les rectangles noirs R et les rectangles blancs U5.

La dernière étape d'intégration consiste en la réparation de l'ADN qui permet d'assurer la continuité entre l'ADN viral et cellulaire. Les facteurs impliqués dans ces processus demeurent inconnus à ce jour. Cependant, plusieurs candidats ont été proposés : l'endonucléase FEN-1, les systèmes de réparation par jonction des terminaisons non-homologues, NHEJ [114, 115], ou la recombinaison homologue, HR. Des interactions entre l'IN de VIH-1 et des facteurs de type RAD, réparant les cassures double brin de l'ADN, ont été rapportées [116, 117], suggérant que cette voie de réparation homologue pourrait participer à ce mécanisme de réparation et/ou à la régulation de l'intégration rétrovirale. Récemment, le laboratoire a identifié hRAD51, facteur central de la voie HR, comme cofacteur potentiel de l'IN [118].

– L'IN et l'ADN viral non intégré

Seul l'ADN viral complet obtenu après la transcription inverse est intégré dans le génome de la cellule. Cependant de nombreuses études ont pu montrer qu'il existe plusieurs autres formes linéaires ou circularisées de l'ADN viral qui elles ne sont pas intégrées (**Figure 28**). Il existe des formes d'ADN linéaires partiellement retro transcrit, des formes d'ADN circulaires contenant une copie du LTR (**Figure 28b**) ou deux copies du LTR en tandem résultant de la circularisation de l'ADN viral linéaire (**Figure 28c**) et également des ADN contenant 2 ou plusieurs séquences LTR discontinues qui résultent de l'autointégration (**Figure 28d et e**) [119]. En l'absence d'intégration, lors de l'utilisation d'un inhibiteur de l'intégrase, on observe l'accumulation des formes circulaires 2-LTR non intégrées dans les cellules infectées [120]. Il a récemment été montré que l'intégrase est capable *in vitro* de cliver la jonction 2-LTR [120]. Même si on ne connaît pas la situation *in vivo*, on peut supposer que ces formes non intégrées accumulées pourraient constituer un réservoir, éventuellement réactivé lors de l'arrêt de l'utilisation d'inhibiteurs.

– Rôle de l'IN dans la transcription inverse

Après son entrée dans la cellule, la structure de la capsid subit des modifications et forme un complexe de nucléoprotéines qui sera le siège de la transcription inverse. A l'intérieur de ce complexe se trouvent entre autre, la RT et l'IN. Un certain nombre de travaux ont tenté de voir si des interactions physiques et fonctionnelles existent entre les deux enzymes. *In vitro*,



plusieurs équipes ont montré une interaction physique entre l'intégrase et la RT [121, 122]. Des études contradictoires montrent que la RT peut inhiber l'activité d'intégration *in vitro* [123] ou stimuler la réaction de transfert de brin catalysée par l'IN, cependant il a été montré que l'intégrase n'influence pas l'activité de la RT [124]. *Ex vivo* d'autres travaux ont montré que l'IN est essentielle pour l'initiation de la transcription inverse. L'interaction entre l'intégrase, la RT et l'amorce RNAt^{Lys3} permettrait une bonne structuration du complexe de reverse transcription [125]. Dans le virus, plusieurs équipes ont montré que certaines mutations de l'intégrase entraînent une inhibition de l'étape de reverse transcription : notamment le motif KRK au niveau du domaine central [126, 127] et le domaine C terminal [128]. Tous ces résultats suggèrent qu'une interaction fonctionnelle entre les deux enzymes pourrait se produire durant la réplication virale.

Il a également été montré un rôle de l'intégrase sur l'étape de transcription inverse via son interaction avec un troisième facteur : la Gemin2, ou survival motor neuron (SMN)-interacting protein 1 [129, 130]. La Gemin 2, dont le rôle est encore mal connu, serait impliquée dans l'assemblage des petites ribonucléoprotéines nucléaires spliceosomales (snRNPs). Lors de l'infection virale, Gemin2 permet de stabiliser des formes multimériques de l'IN qui améliorent l'étape de transcription inverse en augmentant l'assemblage de la RT sur l'ARN.

– Rôle de l'IN sur le transport

Le déplacement du CPI dans le cytoplasme se fait par un mécanisme actif : l'un ou plusieurs des composants du CPI interagissent avec la dynéine et utilisent le réseau de microtubules de la cellule. Ce transport amène à une localisation péri nucléaire au niveau du centre organisateur des microtubules : le centrosome [57, 131]. Cependant le mécanisme exact n'est pas bien décrit et notamment on ne connaît pas les facteurs du CPI impliqués dans l'interaction avec les microtubules. Le CPI contient des protéines virales avec des séquences NLS qui permettent probablement le transport à travers les pores nucléaires.

L'une des protéines virales du CPI qui pourrait être un bon candidat est l'intégrase. En effet nous avons montré au laboratoire que l'intégrase interagit avec plusieurs protéines associées aux microtubules : STU2, DYN2 [132]. De nombreuses études ont montré les propriétés caryophiles de l'intégrase. Plusieurs séquences NLS possibles ont été identifiées dans l'intégrase (entre les a.a 161-173), notamment un motif conservé KRK dans le domaine



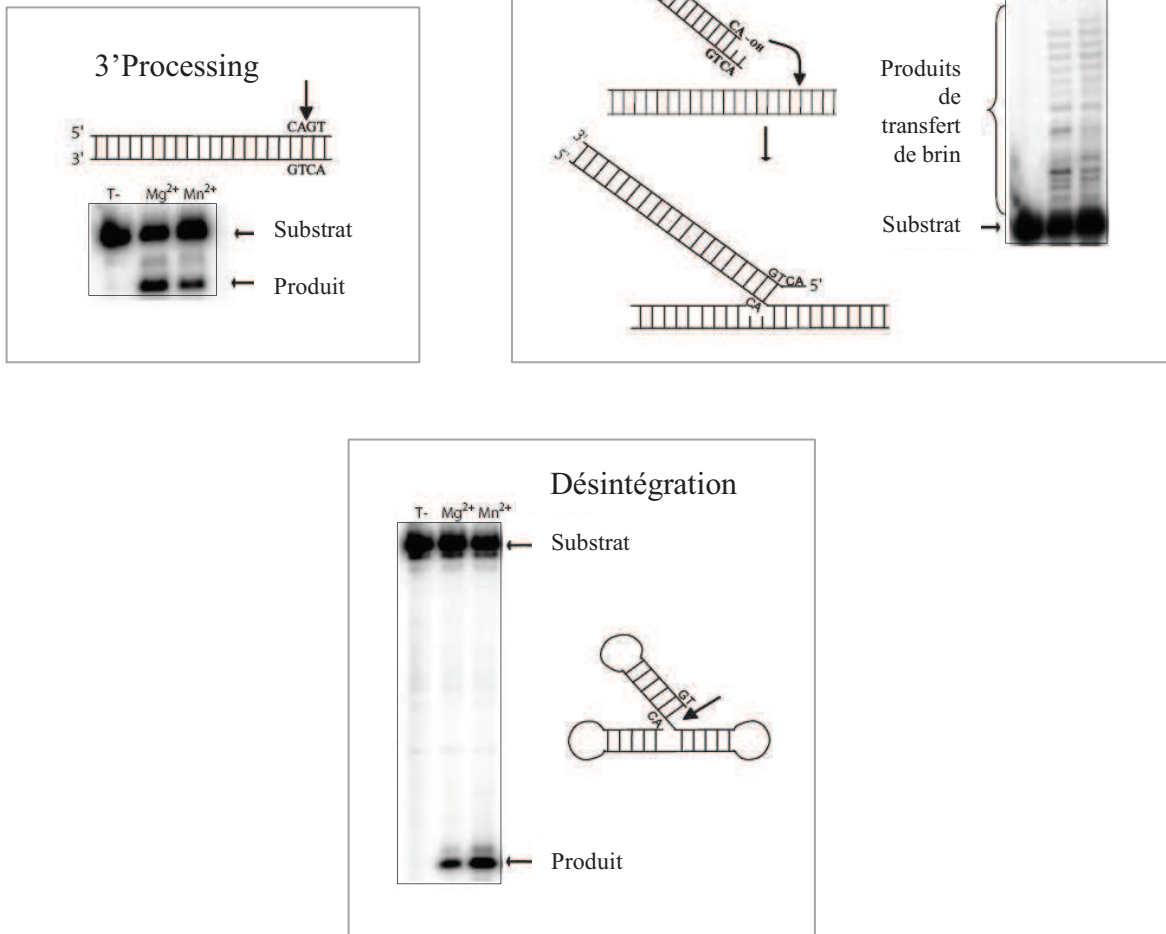


Figure 29. Réactions catalysées par l'intégrase *in vitro*.

catalytique central et un domaine en C terminal [128], et elle s'accumule dans le noyau lorsqu'elle est exprimée. Il a récemment été montré que l'interaction entre IN et LEDGF/p75 pourrait être responsable de sa localisation nucléaire [133]. De plus, l'intégrase est capable de lier plusieurs importines capables de stimuler l'accumulation nucléaire de l'intégrase via un transport Ran-dépendant [134]. Dernièrement, il a été montré par siRNA screen que l'intégrase interagit avec NUP153, une nucléoporine faisant partie du pore nucléaire [66]. L'interaction entre les deux protéines est un facteur essentiel à la localisation nucléaire de l'intégrase [67]. Pourtant, il a été montré que les propriétés caryophiles de l'IN dans le transport ne semblent pas intervenir [135].

2) Activités de l'intégrase *in vitro*

L'étude de la réaction d'intégration est possible grâce à l'utilisation de tests *in vitro* qui permettent de reproduire les différentes étapes successives de cette réaction ou encore la réaction totale (**Figure 29 et 30**).

a. 3'-end Processing

Le test de 3'end Processing permet de reproduire la première étape d'intégration qui consiste en le clivage des extrémités virales de l'ADN. L'utilisation d'un oligonucléotide de 21 nt contenant la séquence de l'extrémité U5 du LTR viral radiomarqué au niveau des extrémités 5' permet de simuler l'ADN viral. Lors de l'incubation de l'intégrase avec cet ODN, ce dernier va subir la coupure du di nucléotide GT, laissant un produit de 19 nt. Les produits obtenus sont visualisés sur gel de polyacrylamide dénaturant après électrophorèse.

b. Transfert de brin

Le test de transfert de brin permet de reproduire la seconde étape d'intégration. L'utilisation d'un ODN préalablement traité radiomarqué sur ses extrémités 5' permet de simuler l'attaque nucléotidique d'un ODN dans un autre en présence d'intégrase. Les produits obtenus seront alors de tailles diverses puisque l'insertion se fait au hasard dans l'ADN cible.



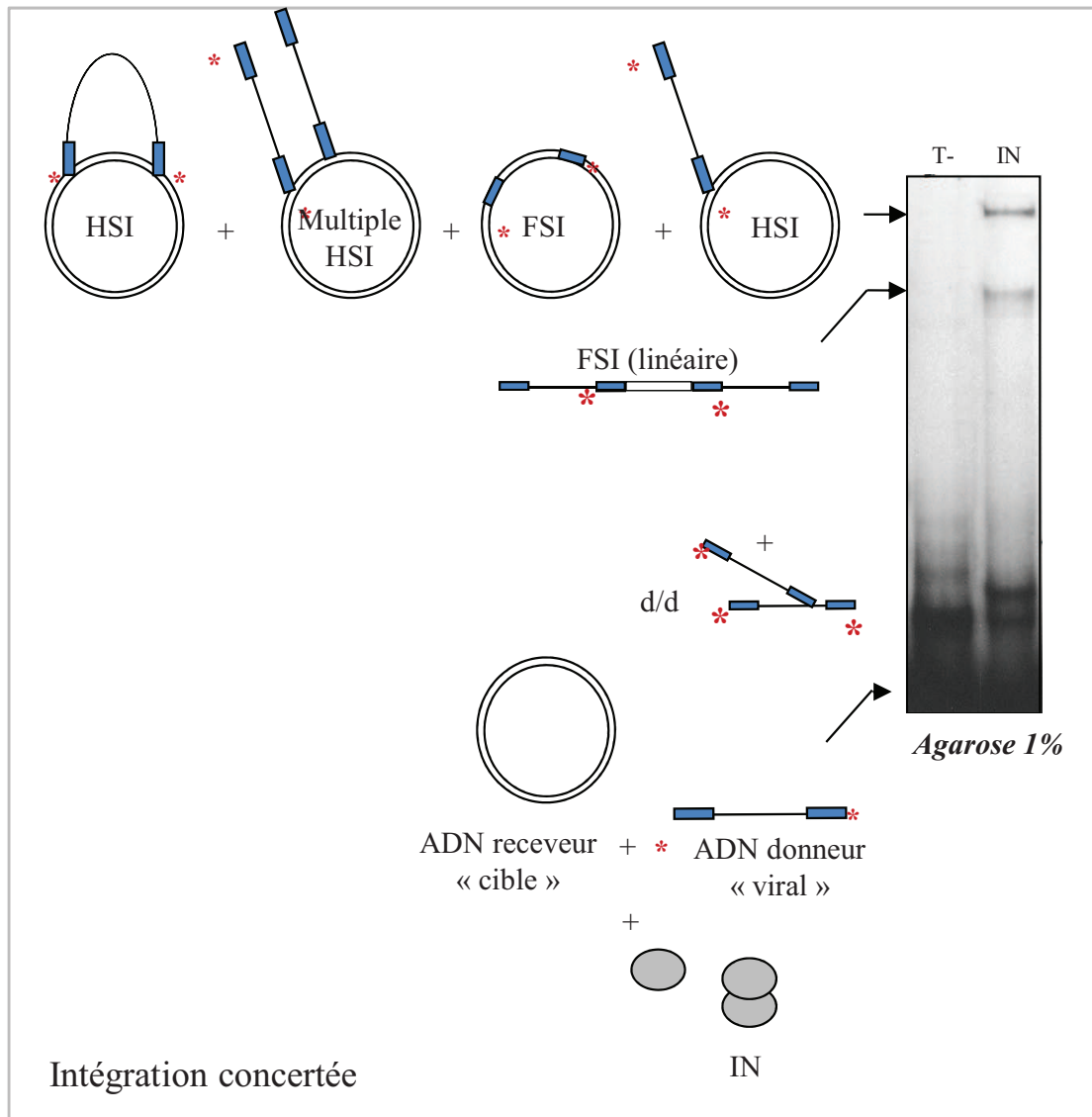


Figure 30. Réactions catalysées par l'intégrase *in vitro*.

c. Désintégration

L'intégrase est capable de catalyser *in vitro* la réaction inverse de transfert de brin : la désintégration. La réaction se fait à partir d'un substrat radiomarqué mimant le produit d'intégration d'une extrémité virale dans un brin d'ADN cible. L'intégrase clive le brin viral [136]. Cette réaction n'a pas été caractérisée *in vivo* et est la seule activité catalysée par les domaines de l'enzyme *in vitro*.

d. Intégration concertée

L'intégration concertée est le test *in vitro* qui permet de se rapprocher le plus des conditions *in vivo*. En effet, celui-ci fait intervenir un ADN viral qui présente les deux extrémités virales LTR et qui permet donc d'observer l'intégration concertée des deux extrémités dans l'ADN cellulaire. Cette réaction fait intervenir une molécule d'ADN receveur mimant l'ADN cellulaire, un ADN donneur radiomarqué mimant l'ADN viral avec les deux extrémités virales LTR et l'intégrase recombinante. La réaction est réalisée dans un mix d'activité contenant du PEG et du DMSO qui permettent de restituer l'activité d'intégration qui requiert les autres constituants du PIC *in vivo*.

L'intégrase va catalyser différents produits d'intégration pouvant être séparés et identifiés sur gel d'agarose. On obtient des produits d'autointégration (d/d) d'un donneur dans un autre donneur, des produits d'intégration non concertée (Half Site Integration ou HSI) d'une seule extrémité d'un donneur dans l'ADN receveur, ou de deux extrémités dans deux sites différents, et des produits d'intégration concertée (Full site integration FSI) des deux extrémités de l'ADN donneur dans le même site du receveur.

3) Les partenaires de l'intégration

L'intégrase est suffisante pour catalyser la réaction d'intégration *in vitro*. Cependant un certain nombre de facteurs cellulaires et viraux sont nécessaires à la régulation de cette activité dans la cellule infectée.



a. Les partenaires viraux

Il a été montré que la nucléocapside permettrait de stimuler l'étape d'intégration de part sa propriété de fixation aspécifique sur l'ADN. Ainsi son positionnement tout le long de l'ADN viral augmenterait la spécificité de fixation de l'intégrase au niveau des extrémités virales [137]. La RT participerait également à cette étape en jouant sur l'activité de l'intégrase en interagissant avec cette dernière [138].

b. Les partenaires cellulaires

Depuis l'entrée jusqu'à l'arrivée à proximité des chromosomes, l'ADN viral est entouré d'un complexe multi protéique dont la composition exacte reste mal définie. Composé de nombreux facteurs viraux et cellulaires, ce complexe évolue tout au long du cheminement vers le noyau au fur et à mesure que les différentes étapes du cycle viral se succèdent. Ainsi l'étape d'intégration débute dans le cytoplasme au sein du CPI. Les cofacteurs cellulaires de ce CPI ont été identifiés par différentes techniques : reconstitution de l'activité *in vitro*, utilisation de la technique de double hybride chez la levure ou encore co-immunoprécipitation. Les complexes purifiés à partir de cellules infectées présentent des propriétés non reproductibles *in vitro*. Ils sont capables d'intégrer de façon majoritaire les deux extrémités virales de façon concertée dans un ADN cible. De plus, ils intègrent l'ADN viral préférentiellement dans l'ADN cible, évitant ainsi l'auto intégration improductive [110]. Il existe plusieurs partenaires cellulaires qui sont nécessaires à une intégration correcte et qui ont été largement étudiés :

– Barrier-to-Autointegration factor (BAF)

Les CPI isolés à partir de cellules infectées présentent une intégration préférentielle dans l'ADN cible contrairement à ce que l'on peut observer *in vitro*. Il a été montré que le Barrier-to-Autointegration factor (BAF) fait partie du complexe de pré-intégration par co-immunoprécipitation avec l'intégrase [139]. BAF est une protéine cellulaire très conservée qui s'assemble sous forme de dimères. La fonction endogène de la protéine reste inconnue, on sait seulement de part des études d'ARN interférence qu'elle aurait une grande importance dans l'organisation nucléaire. Les études ont pu montrer que la présence de BAF dans le CPI est essentielle pour que l'intégration se fasse préférentiellement dans l'ADN cellulaire cible,



et ainsi permet d'éviter l'autointégration suicidaire [140]. Il est probable que BAF joue un rôle de manière indirecte sur l'intégration rétrovirale via son interaction avec l'ADN.

Uracylation de l'ADN

Un travail récent montre que l'ADN produit lors de la transcription inverse dans les cellules humaines est fortement uracilé, de l'ordre de 20-25 %. Il apparaît que ce processus de modification d'acides nucléiques de la séquence d'ADN viral, permet de le protéger du phénomène d'autointégration, et facilite l'intégration dans les chromosomes qui sont, quand à eux, beaucoup moins uracilés. Plusieurs études ont suggérées qu'UNG2, uracil-DNA glycosylase 2, pourrait être responsable de ces remplacements de thymidines en uraciles. [141].

– HMGA1

HMGA1 (high mobility group chromosomal protein A1) est une protéine de liaison à l'ADN qui peut moduler la régulation de la transcription ainsi que la structure de la chromatine. Des études *in vitro* montrent que HMGA1 pourrait faciliter l'étape d'intégration via sa liaison à l'ADN. Sa fixation sur les extrémités LTR de l'ADN viral pourrait faciliter leur rapprochement et augmenter la fixation de l'intégrase en « déroulant » les extrémités [142]. Cependant aucune confirmation d'interaction entre les protéines du CPI et HMGA1 n'a pu être montrée par co-immunoprécipitation [143]. D'autres études ont identifiées de multiples sites de haute affinité à HGMA1 dans le 5'LTR de l'ADN, ce qui suggèrerait une importance dans l'étape de transcription. La plupart de ces sites de fixation chevauchent des sites de fixations aux facteurs de transcription ce qui permettrait à HMGA1 de moduler la fixation de ces différents facteurs de transcription. De plus il a récemment été montré que HMGA1 serait nécessaire au recrutement du complexe de remodelage SWI/SNF au niveau du site de transcription du VIH-1.

– INI1

INI1 est l'homologue humain de la protéine de levure SNF5, un activateur de la transcription faisant partie du complexe de remodelage SWI/SNF. INI1 a également été montré comme



Retroviridae Genera	In Transcription Units ^a	± 2kb Transcription Start Sites ^a	± 2 kb CpG Islands ^a
Lentiviruses	+ / ++	0	- / 0
Alpharetroviruses	+	0	+
Betaretroviruses	0	0	0
Gammaretroviruses	+	++	++
Deltaretroviruses	+	+	+
Epsilonretroviruses	NA	NA	NA
Spumaviruses	0	++	++

Figure 31. Ciblage du site d'intégration [150].

La nature de la zone d'intégration pour chaque genre de rétrovirus est indiquée par un 0 (nul), -/0 (très rare) + ou ++ (faible ou important) ou NA (non déterminé). Une zone de 2Kb autour des sites d'intégration a été prise en compte.

faisant partie du complexe SWI/SNF chez les mammifères. De nombreuses études de mutation et de structure ont permis de montrer l'interaction entre INI1 et l'intégrase *in vivo* [144]. INI1 interagit également avec de nombreux autres facteurs protéiques cellulaires et viraux. Il a été montré qu'INI1 augmente la liaison de l'IN à l'ADN, cependant, le rôle exact d'INI1 *in vivo* reste mal défini, même s'il est clair que sa présence est importante pour une réplication efficace du virus. Faisant partie du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, INI1 pourrait jouer un rôle dans le ciblage du site d'intégration ou bien dans l'étape de transcription. En effet, nous avons montré *in vitro* au laboratoire que le complexe SWI/SNF complet est nécessaire à la restauration de l'intégration dans la chromatine [145].

– LEDGF/P75

LEDGF/P75 (Lens epithelium derived growth factor) est une protéine de la famille des facteurs de croissance dérivés des hépatomes (HDGF). En temps que facteur de survie, LEDGF/p75 est impliquée dans la croissance des cellules de mammifères ainsi que dans la protection des cellules contre la mort cellulaire provoquée par le stress. Son rôle protecteur s'explique par l'induction de la transcription de protéines de stress anti-apoptotique (HSP27, HSP90, antioxidant protein 2) [146]. LEDGF/P75 est une protéine de fixation à l'ADN qui est associée aux chromosomes. L'interaction avec l'intégrase se fait via l'Intégrase Binding Domain IBD [147]. La structure cristallographique de ce domaine complexé avec un dimère du core catalytique de l'IN a été résolue. Non seulement, LEDGF/P75 permet d'augmenter l'activité de transfert de brin de l'intégrase *in vitro*, mais des expériences d'ARN interférence de LEDGF montrent que cette dernière est indispensable à la localisation nucléaire de l'intégrase du VIH-1 et à son interaction avec les chromosomes *in vivo* [148].

4) Les sites préférentiels de l'intégration

De nombreuses études ont permis de montrer que les rétrovirus intègrent dans des régions préférentielles différentes du génome cellulaire (**Figure 31**) [149]. En effet VIH-1 intègre dans des zones de transcription active contrairement à Mo-MLV et ASLV [150]. Ces différences suggèrent une spécificité d'interaction entre le complexe de pré-intégration et la chromatine qui permet de cibler le site d'intégration. Le ciblage et l'accessibilité de la



structure chromatinienne fait appel à une modification des histones [151] ou à l'interaction avec des protéines cellulaires d'attachement à la chromatine telle que LEDGF/P75 [152].

5) Les facteurs de restriction de l'intégration

En plus d'un rôle prépondérant du système immunitaire, il existe des systèmes de défense de la cellule hôte contre l'infection rétrovirale appelés facteurs de restriction.

a. Le facteur de restriction TRIM5 α

Trim5 α a été identifiée lors de l'étude de l'infection du VIH-1 dans des cellules de singe rhésus, qui ne sont pas permissives à l'infection [153]. L'homologue humain de Trim5 α est beaucoup moins actif contre le VIH-1. Différents groupes ont pu montrer que l'interaction entre Trim5 α et la protéine de capsid CA des rétrovirus était un facteur déterminant de la restriction [154]. Cependant, le mécanisme d'action précis de Trim5 α reste mal connu mais il semblerait que l'étape affectée ait lieu avant la transcription inverse [153]. De plus, la restriction virale n'impliquerait ni un blocage d'entrée dans le cytoplasme, ni la dégradation protéosomale des capsides virales [155]. Enfin, Trim5 α semble se lier avec la protéine CA uniquement sous sa forme multimérique, dans le contexte d'un "core" viral assemblé [156]. L'hypothèse la plus probable serait donc que Trim5 α accélère la décapsidation après l'entrée de la particule virale dans la cellule hôte ce qui perturberait la transcription inverse au cours de l'infection et ainsi inhiberait la réplication virale.

b. Le facteur de restriction APOBEC3G

La protéine APOBEC3G est une désaminase d'ADN et elle est incorporée dans les particules virales lors du bourgeonnement [157, 158]. Pendant l'infection, l'action antivirale d'APOBEC3G a lieu au cours de la transcription inverse en induisant une conversion des G en A provoquant ainsi des hypermutations du génome viral [159]. Les nombreuses mutations apportées dans le génome ont des conséquences néfastes pour la réplication virale. En présence de la protéine virale Vif, la protéine APOBEC3G est dégradée et son incorporation dans les virions est ainsi bloquée. Les virus produits deviennent parfaitement infectieux. Cependant, *in vivo*, la protéine Vif ne permet pas une élimination complète d'APOBEC3G et



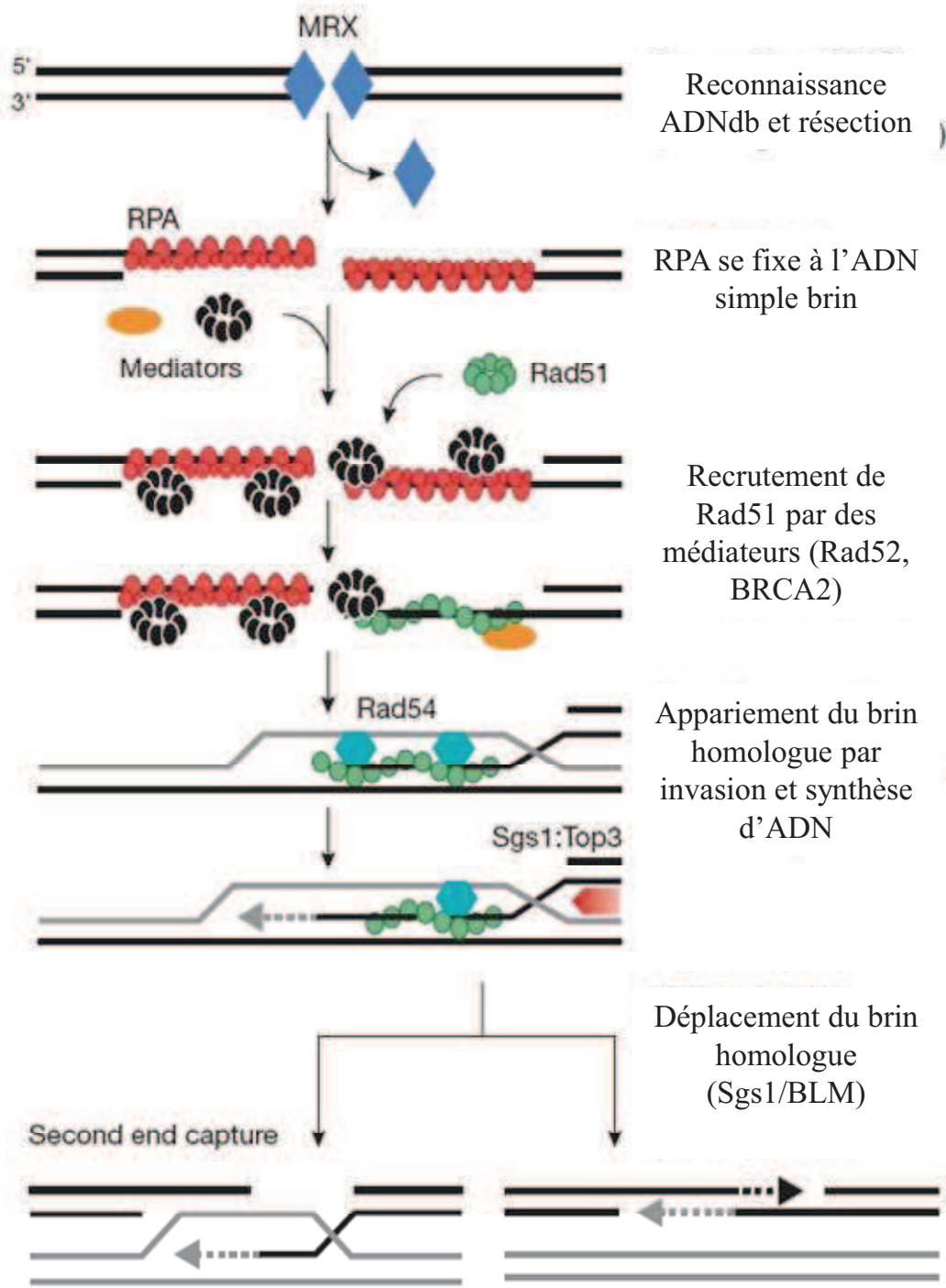


Figure 32. Mécanisme de réparation homologue des coupures de l'ADN [163].

il est possible que quelques molécules soient incorporées dans les virions et mutent partiellement l'ADN du virus. Si de telles mutations s'avèrent dans la majorité des cas néfastes pour le virus, il est possible que dans de rares cas, ces mutations confèrent un avantage sélectif au virus et permettent d'augmenter la diversité génétique du VIH.

6) L'étape de réparation de l'ADN intégré

a. Le système de réparation de l'ADN RAD

Lors de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, la cassure de l'ADN double brin cellulaire par attaque endonucléotidique des extrémités virales peut être reconnue par la machinerie cellulaire comme une cassure de l'ADN causée par un facteur environnemental tel que les U.V. Après l'étape d'intégration, les « gaps » encadrant l'élément intégré vont donc être réparés par des systèmes de réparations cellulaires. Les facteurs impliqués dans ces processus sont toujours inconnus à ce jour. Cependant, plusieurs candidats ont été proposés : l'endonucléase FEN-1, les systèmes de réparation par jonction des terminaisons non-homologues, NHEJ [114, 115], ou la recombinaison homologue, HR [160, 161]. La recombinaison homologue fait intervenir la protéine RAD51 (radiation-repair protein). Cette protéine se localise au niveau des cassures doubles brins et forme des foci observables en microscopie lorsque le mécanisme de recombinaison est actif (**Figure 32**) [162].

Lors d'une cassure de l'ADN double brin, une protéine MRX reconnaît et se fixe au niveau de cette cassure. Une exonucléase va alors réaliser une résection des extrémités 5' de l'ADN. La protéine RPA (Replication Protein A) se polymérise alors sur les ADN simples brins afin de les stabiliser. La protéine RAD52 reconnaît la coupure qui à son tour a la capacité de recruter RAD51. RAD51 remplace le filament de RPA, en le chassant, et se polymérise sur l'ADN simple brin. L'événement de réparation à proprement parler peut alors avoir lieu. RAD51 va permettre une réaction d'échange de brin avec une région homologue de l'ADN appelé duplex donneur. Cette séquence va servir de matrice afin de repolymériser l'ADN au niveau de la cassure.

b. RAD51 et l'intégrase

Ce qui nous amène à nous intéresser plus particulièrement à cet événement de réparation, outre son rôle potentiel lors du cycle viral, est que des interactions entre l'intégrase virale et



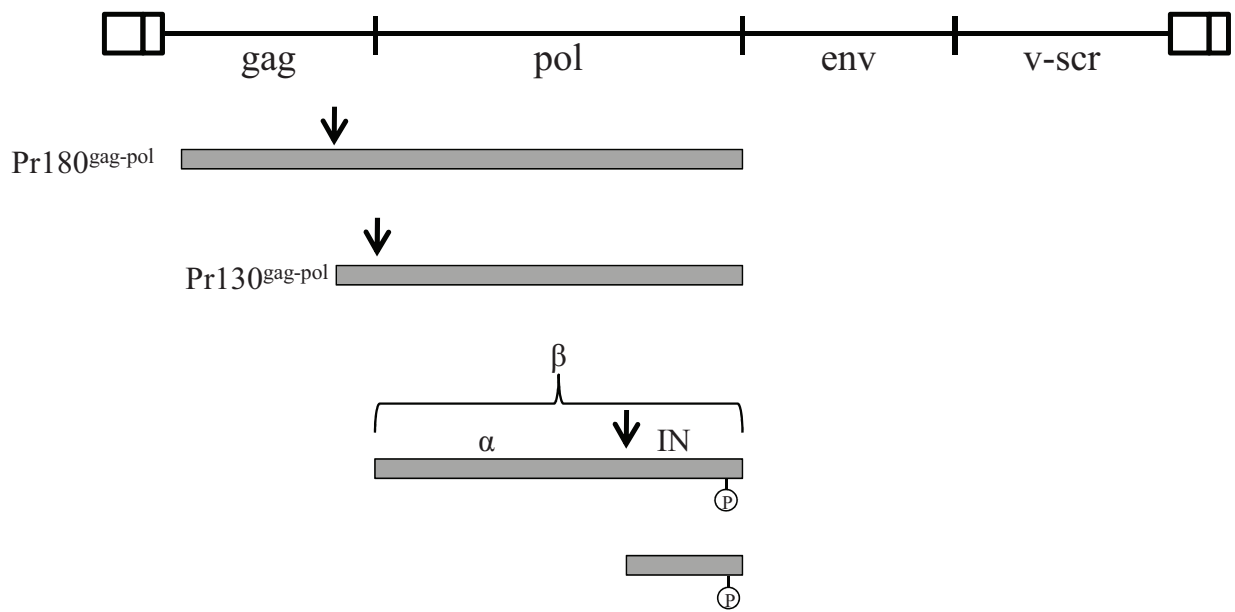


Figure 33. Représentation schématique du Virus du Sarcome de Rous.

Les flèches indiquent les sites de clivages protéolytiques du précurseur des gènes *gag-pol*. Les P entourés d'un cercle indiquent les principaux sites de phosphorylation.

des facteurs de type RAD ont été identifiées [116, 117]. Cela suggère que cette voie de réparation homologue pourrait participer au mécanisme de réparation post intégration (PIR) ou à la régulation de l'intégration rétrovirale. Récemment, le laboratoire a identifié hRAD51, facteur central de la voie de réparation homologue, comme cofacteur potentiel de l'IN. Il a été montré que hRAD51 est capable de dissocier le complexe IN•ADN *in vitro* mais aussi qu'il est capable d'inhiber l'intégration *in vitro* [118]). Au cours de mon travail de thèse j'ai été amenée à travailler sur le rôle de RAD51 sur le cycle viral *in vivo* (voir **Résultats Chapitre 4**).

C. Modifications post-traductionnelles

1) Historique

Les modifications post-traductionnelles sont extrêmement nombreuses et variées. Elles permettent entre autre une régulation de l'activité des protéines, leur étiquetage pour permettre une reconnaissance par d'autres partenaires ou encore leur dégradation. L'intégrase est impliquée dans différentes étapes où des modifications post-traductionnelles pourraient avoir un rôle à jouer (transport du CPI vers le noyau, oligomérisation de l'IN, interaction avec différents partenaires, ou élimination de l'IN après intégration...). Cependant peu d'études concernant ces modifications chez l'intégrase ont été rapportées jusqu'à très récemment.

a. L'intégrase du Virus du Sarcome de Rous (RSV)

Les modifications les plus anciennes datent des années 1980 et concernent la phosphorylation de l'intégrase de rétrovirus aviaire [163]. Chez les rétrovirus aviaires, contrairement au VIH-1, l'intégrase est présente à l'extrémité C-terminale de la sous unité β portant la RT, et sous la forme d'une protéine de 32 kDa issue de la maturation de β (**Figure 33**). La RT se compose de l'hétérodimère β/α . Une phosphorylation de l'intégrase sous la forme de 32 kDa et de la sous-unité β de la RT au niveau de la sérine 282 a été identifiée chez le RSV [164]. Le résidu se trouve à côté d'un possible site de clivage par une protéase virale ou cellulaire. Cette phosphorylation pourrait avoir un rôle sur ce clivage [165]. En effet, la mutation *in vitro* de la sérine en phénylalanine entraîne la conversion de l'intégrase en une espèce dont l'extrémité C-terminale est protéolysée. En revanche, la mutation du résidu S en D convertit toute la



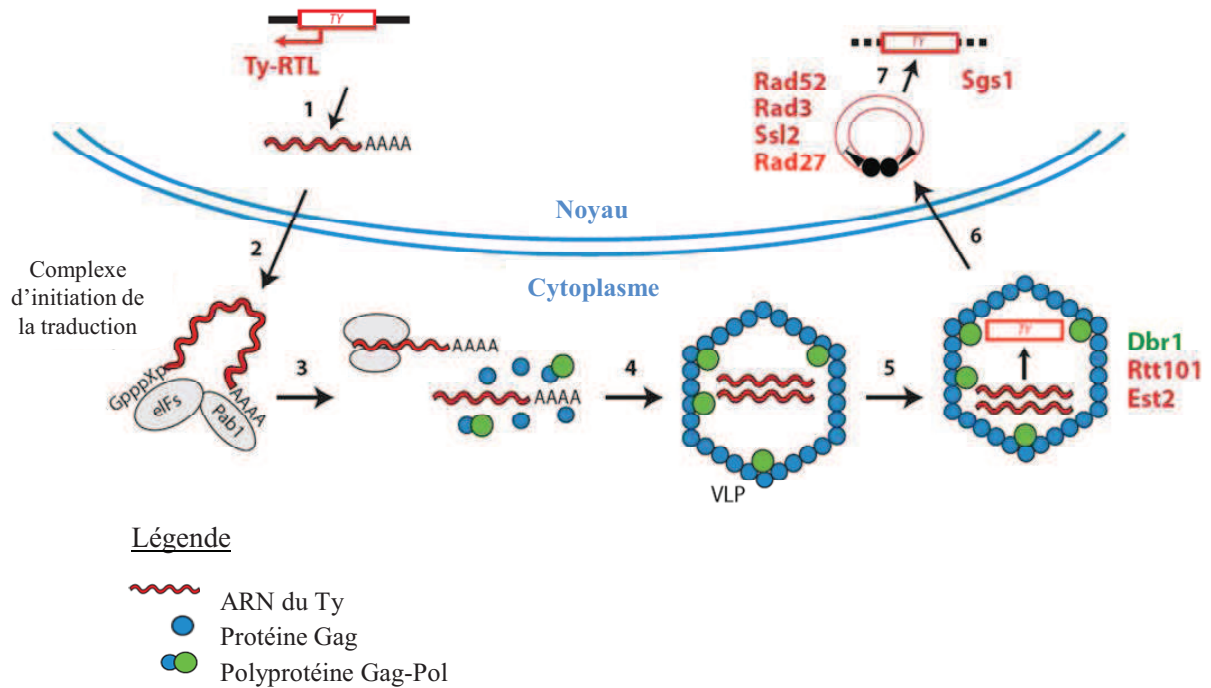


Figure 34. Représentation schématique du cycle de retrotransposition des Ty [169].

Les étapes du cycle sont les suivantes : (1) transcription de l'élément Ty par l'ARN polymérase II, (2) transport dans le cytoplasme, (3) traduction, (4) assemblage des Virus Particule-Like (VLP) et encapsidation de l'ARNm, (5) transcription inverse, (6) import dans le noyau et (7) intégration dans le génome de l'ADNc.

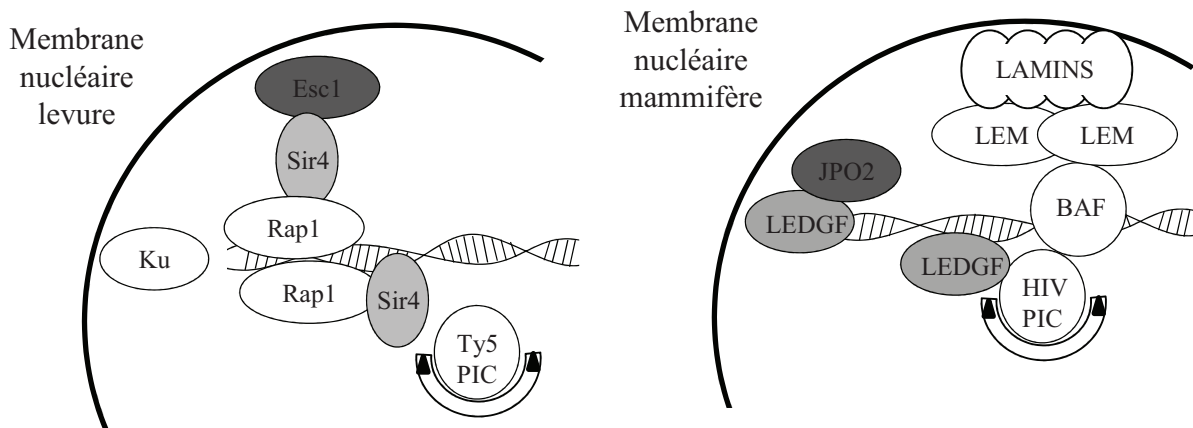


Figure 35. Modèle pour le ciblage de l'intégration par le Ty5 et le VIH [168].

Des facteurs associés à la chromatine cibleraient l'intégration via leur interaction avec l'intégrase. LEDGF et BAF interagiraient avec le PIC du VIH de la même manière que Sir4 et Rap1 avec le PIC du Ty5. LEM : protéines contenant des domaines LEM

population d'intégrase en un seul polypeptide, suggérant que cet acide aminé chargé similaire à une sérine phosphorylée, pourrait inhiber la protéolyse. Il a ensuite été montré que cette modification est réalisée par une kinase cellulaire elle-même activée par la protéine virale v-src [166].

b. Le rétrotransposon Ty5 de levure

Récemment, le rôle d'une phosphorylation dans la régulation de l'intégration a été décrit chez le rétrotransposon Ty5 de levure [167]. Les rétrotransposons de levure ont été largement étudiés. Ils sont ubiquitaires chez les eucaryotes et ils ont en commun avec les rétrovirus leurs étapes d'intégrations (**Figure 34**) [168]. Bien que non pathogènes, les rétrotransposons de levures peuvent être oncogéniques via leur site d'intégration. L'intégration se fait principalement au niveau de l'hétérochromatine dans des régions peu transcrites. L'intégrase du rétrotransposon Ty5 possède un « Targeting domain » TD en C-terminal qui est phosphorylé par une sérine kinase cellulaire. Cette phosphorylation est indispensable à l'interaction avec un composant de l'hétérochromatine Sir4, interaction qui gouverne l'intégration dans l'hétérochromatine. Dans des conditions de stress, l'absence de phosphorylation entraîne une intégration au hasard qui est souvent cause de mutations et qui peut être interprétée comme une réponse adaptative aux conditions environnementales (**Figure 35**). Cette équipe propose que l'intégration du VIH-1 puisse être gouvernée par un mécanisme similaire. L'interaction entre l'intégrase phosphorylée et LEDGF conduirait à l'intégration dans les régions transcriptionnellement actives (**Figure 35, [167]**)

2) Modifications post-traductionnelles de l'intégrase de VIH-1

Plusieurs études récentes ont permis de décrire de nouvelles modifications post traductionnelles sur l'IN du VIH-1. Cependant ces études sont restreintes et nous avons peu de recul sur le rôle et l'importance de ces modifications. Depuis 2000, il a été montré que l'intégrase du VIH-1 peut présenter 4 types de modifications post traductionnelles dont chacune est importante à sa manière pour le cycle viral. Ces récentes découvertes laissent présager l'identification de nouvelles modifications post traductionnelles de l'intégrase qui permettraient d'éclaircir les fonctions de la protéine au cours du cycle viral.



a. L'Acétylation

L'acétylation est une modification réversible qui catalyse l'ajout d'un groupement acétyle en N terminal d'un résidu Lysine par une acétyltransférase. La principale réaction d'acétylation décrite concerne les histones. L'acétylation de résidus lysines à l'extrémité N-Terminale d'une protéine histone neutralise les charges positives et modifie la taille de la chaîne latérale du résidu, ce qui induit un changement de conformation des protéines modifiées et le mode d'interaction avec les molécules cibles, en particulier l'ADN qui est chargé négativement. L'acétylation des lysines réduit l'affinité "histone/ADN" et permet l'ouverture de la chromatine et la fixation de facteurs de transcriptions. L'acétylation des histones est une modification réversible et favorise la transcription tandis que la désacétylation catalysée par des déacétylases inhibe la transcription.

Chez l'intégrase du VIH-1, deux groupes ont rapporté la présence d'acétylation sur la protéine. Une interaction entre l'intégrase de VIH-1 et P300, qui fait partie de la famille des histones acétyltransférase (HAT), a été décrite. L'interaction entre les deux protéines entraîne une acétylation de l'intégrase au niveau de 3 lysines en C terminal (K264, K266, K273). Cette modification permet une meilleure affinité entre l'intégrase et l'ADN cellulaire, augmente l'activité de transfert de brin *in vitro* et serait essentielle à l'étape d'intégration *in vivo* [169]. Cependant une autre équipe a montré que bien que ces 3 résidus soient essentiels et que les acétylations soient confirmées, ces modifications post-traductionnelles ne semblent pas avoir de rôle dans le cycle viral [170].

Une nouvelle acétylation a été caractérisée l'année dernière : la lysine 258 est acétylée par l'histone acétyle transférase GCN5 [171]. Bien que l'acétylation de l'intégrase par GCN5 permette d'augmenter l'activité *in vitro* de l'enzyme, et que l'extinction de GCN5 dans des cellules infectées inhibe l'intégration virale, ce travail n'a pas pu montrer un rôle significatif sur l'infection par rapport aux trois acétylations précédemment décrites.

D'autre part, la recherche de partenaires cellulaires interagissant spécifiquement avec l'intégrase acétylée a permis d'identifier récemment KAP1 qui fait partie de la famille de protéine à motif tripartite (TRIM). KAP1 possède une activité de corépresseur transcriptionnel via le recrutement de différents facteurs, notamment HDAC (NuRD histone deacetylase complex). Il a pu être montré que KAP1 est un facteur restrictif de l'infection à VIH-1 en inhibant clairement l'étape d'intégration virale, via le recrutement de HDAC qui va désacétyler l'intégrase [172].



b. L'ubiquitination

L'ubiquitination permet la fixation d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine majoritairement sur des résidus lysine. L'ubiquitine est une protéine servant de marqueur à l'élimination des protéines. Cette modification a principalement pour fonction la reconnaissance et la dégradation de la protéine marquée par le protéasome.

Après la maturation des précurseurs polyprotéiques, l'intégrase présente une phénylalanine en N-terminal pouvant servir de signal de dégradation reconnue par la voie de dégradation ubiquitine-protéasome [117]. L'intégrase interagit avec von Hippel–Lindau binding protein 1 (VBP1) qui est une protéine chaperonne de la famille des prefoldin impliquée dans le repliement des protéines. L'interaction avec VBP1 permet à IN d'interagir avec le complexe ubiquitine ligase cullin2 / Von Hippel–Lindau (Cul2/VHL). Ce complexe conduit à la dégradation de l'intégrase, ce qui permet aux facteurs de réparations de l'ADN d'accéder au site d'intégration. L'ADN viral intégré est ensuite transcrit en différents ARN. L'absence de Cul2/VHL après ARN interférence conduit à une inhibition de la transcription de ces ARN viraux [173].

c. La sumoylation

La sumoylation permet la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Il existe quatre protéines SUMO (SUMO-1, -2, -3 et -4). La sumoylation implique trois étapes enzymatiques qui permettent de réguler les activités biochimiques des protéines telle que leur trafic intracellulaire, les interactions entre protéines, les interactions ADN-protéine ou encore leur activité transcriptionnelle. Les protéines SUMO sont relativement proches structurellement de la protéine ubiquitine.

Il a été montré que l'intégrase est sumoylée *in vivo* au niveau de trois résidus lysines K46, K136, K244. Bien que la mutation au niveau de ces lysines entraîne une diminution de l'infectiosité *in vivo*, la distribution cellulaire de l'intégrase, sa stabilité ou encore son activité *in vitro* ainsi que sa fixation à LEDGF restent inchangées [174]. Le rôle exact des sumoylations reste donc inconnu.



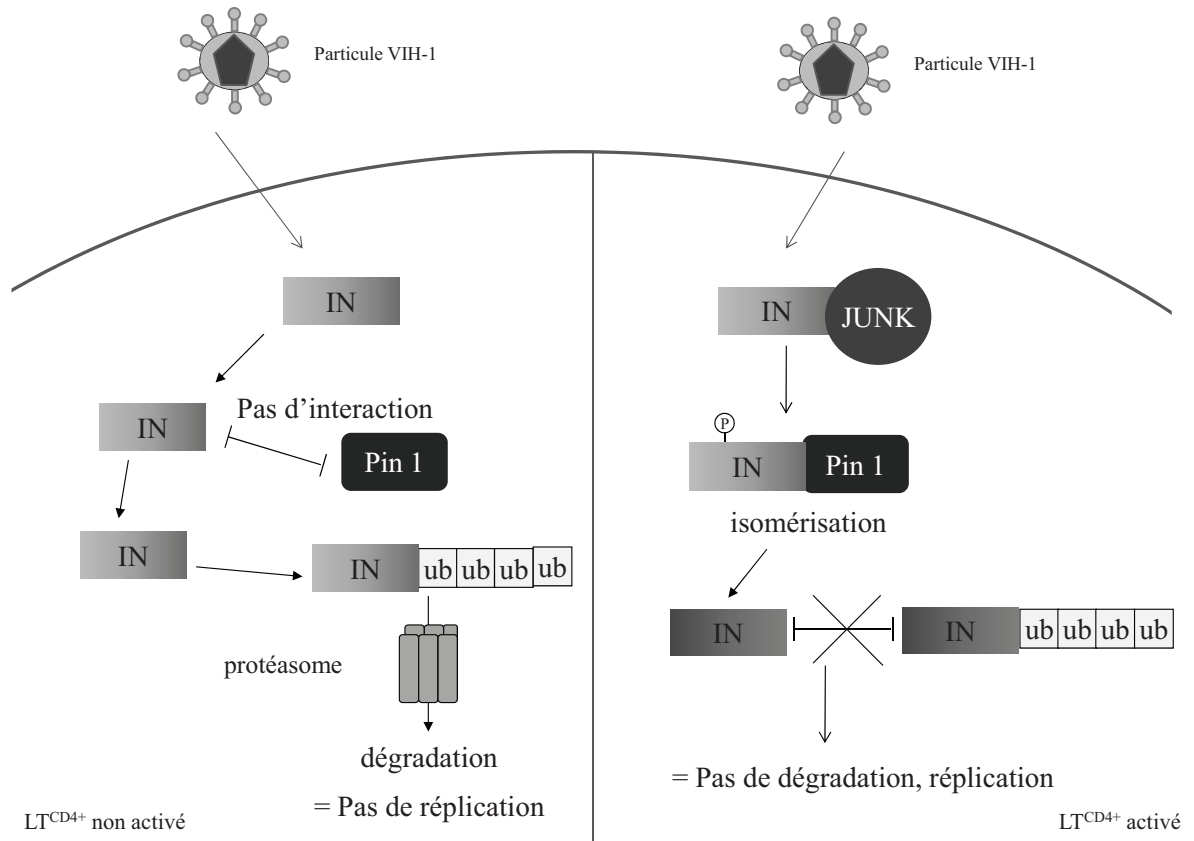


Figure 36. Représentation de l'effet de JUNK sur la stabilité de l'intégrase et la réplication virale.

A gauche est représenté une cellule CD4⁺ non activée, et à droite une cellule CD4⁺ activée dans laquelle sont activées les MAP kinases telle que JUNK.

d. La phosphorylation

Chez les eucaryotes, la phosphorylation des protéines est l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent. La phosphorylation consiste en l'addition d'un groupe phosphate sur une protéine. Cette réaction peut être catalysée par de nombreuses protéines kinases. La déphosphorylation est réalisée par des phosphatases. L'équilibre entre phosphorylation/déphosphorylation permet de réguler de nombreuses voies cellulaires qui permettent la transduction de signaux extérieurs comme les hormones, cytokines et autres facteurs de croissance ainsi que par les variations de calcium intracellulaire.

Les phosphorylations ont lieu sur les chaînes latérales des acides aminés comportant une fonction alcool : sérine et thréonine. Une autre classe de kinase phosphoryle les protéines au niveau des tyrosines. Enfin, des phosphorylations au niveau des histidines et aspartates sont rencontrées dans les organismes procaryotes [175].

Des études de mutagenèses portant sur des acides aminés conservés et potentiellement phosphorylables ont été réalisées sur l'IN du VIH-1 afin d'évaluer l'importance potentielle de la phosphorylation de IN sur ses différentes fonctions. Ces travaux ont montré que certaines de ces mutations pourraient affecter l'étape d'intégration à des degrés différents : T66A, T93A, T125A, S195A et S283A [126]. Cependant aucune phosphorylation n'a pu être montrée sur ces résidus. Le résidu Tyr143 est lui aussi extrêmement conservé parmi les intégrases rétrovirales infectant les mammifères. La mutation de ce résidu en G affecterait le transport nucléaire du CPI mais pas l'étape d'intégration [126].

Très récemment a été mis en évidence une phosphorylation de l'intégrase de VIH-1 par l'équipe italienne de M. Giacca. Cette équipe s'est intéressée à une lignée cellulaire particulière, les lymphocytes T humains quiescents du sang périphérique (PBLs). Dans les PBLs quiescentes, d'une part la transcription inverse de l'ARN viral prend plus de temps à cause de la fixation de l'ARN viral par APOBEC3G [176], et d'autre part l'intégration du peu d'ADN génomique viral formé est inhibé [177]. Pourtant dans les PBLs dites activées, la réplication du virus est efficace.

Lorsque les PBLs interagissent avec une cellule présentatrice de l'antigène, la voie des MAPKs (Mitogen Activated Protéin Kinases) est activée. Ce travail a permis de montrer que JNK1 qui fait partie des MAPKs, interagit avec l'intégrase et la phosphoryle au niveau de la sérine 57. La sérine 57 fait partie d'un motif Ser-Pro qui une fois phosphorylé est reconnu par Pin1 qui est une peptidyl-prolyl cis/trans isomérase. L'isomérisation des protéines est un



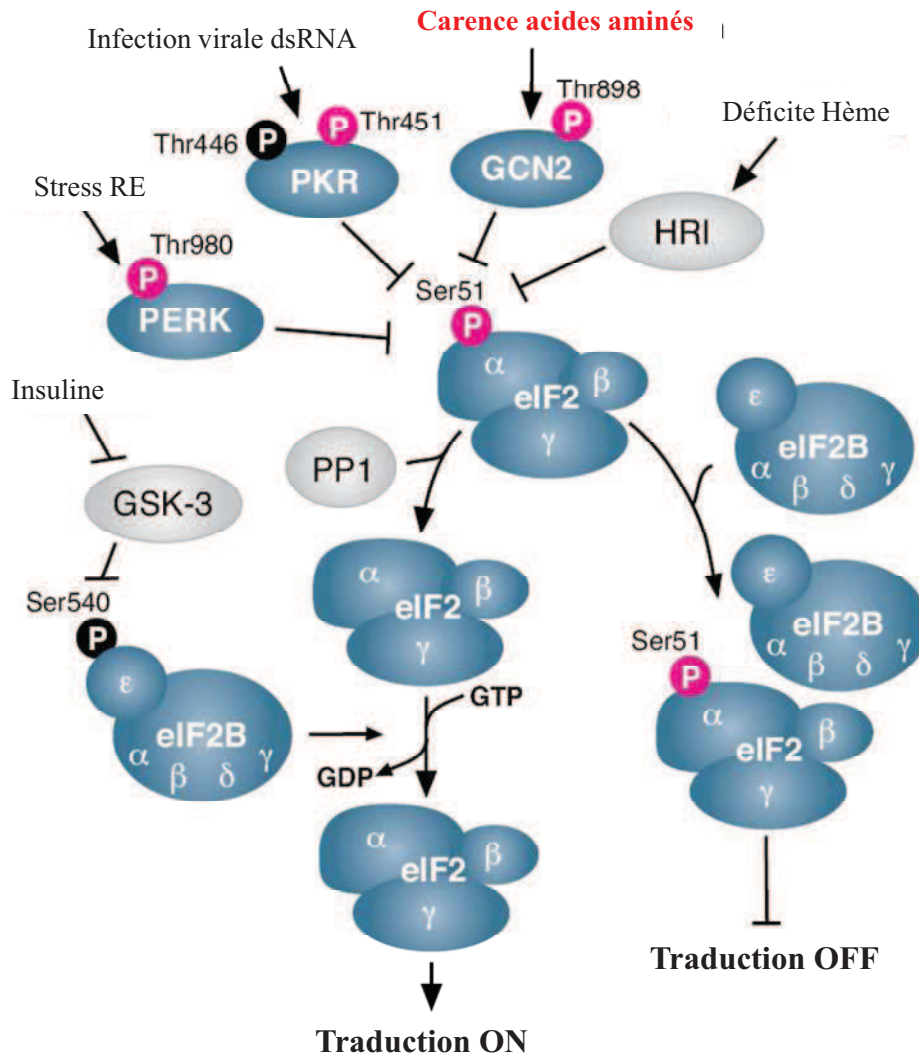


Figure 37. Mécanisme d'action d'eIF2 et rôle des quatre protéines kinases sur la traduction des protéines.

Lors d'un stress varié, l'une des protéines kinases s'autophosphoryle, excepté HRI, et va aller phosphoryler eIF2 α . La phosphorylation va entraîner un arrêt de la traduction des protéines cellulaires.

mécanisme qui a été largement étudié. Celle-ci permet de moduler l'activité d'une protéine et ainsi de déterminer sa localisation cellulaire, sa stabilité, son activité enzymatique ou encore sa capacité d'interaction avec d'autres substrats. Ainsi il semblerait que l'isomérisation de l'intégrase inhibe son ubiquitination et sa dégradation par la voie du protéasome (**Figure 36**). Ainsi l'infection des PBLs activés est possible de par la phosphorylation de l'intégrase par JNK1 activée qui augmente sensiblement la stabilité de la protéine [178].

D. La protéine kinase cellulaire GCN2

1) Interaction entre l'intégrase de VIH-1 et GCN2

Lors d'une recherche de partenaires potentiels de l'intégrase réalisée au laboratoire, l'utilisation d'un système double hybride utilisant l'intégrase comme appât et une banque de levure a permis d'identifier de nombreux facteurs cellulaires. Il a été montré que l'intégrase peut interagir avec des protéines de la famille des MAPs (Microtubules Associated Proteins) comme DYN2 et STU2, avec diverses protéines impliquées dans la transcription ainsi qu'avec la protéine kinase cellulaire GCN2 impliquée dans la régulation de la traduction des protéines [132]. Cette kinase GCN2 nous a particulièrement intéressées de part son rôle potentiel dans une modification post-traductionnelle de l'intégrase. Nous avons décidé de nous focaliser sur cette protéine cellulaire et son rôle potentiel sur le cycle viral via son interaction avec l'intégrase. Au cours de cette partie nous verrons plus en détail la structure et le rôle de cette protéine cellulaire mais également son rôle potentiel sur les infections virales.

2) Structure et fonction de GCN2

GCN2 (general control nonderepressed 2) est une protéine kinase de 210 kDa qui a été pour la première fois décrite chez la levure en 1984 [179]. Cette kinase est impliquée dans la voie de régulation de la traduction des protéines cellulaire. Avec trois autres protéines kinases (HRI, PKR et PERK), elles forment une famille de protéines kinases de réponse au stress. GCN2 est conservée de la levure aux cellules de mammifères. L'homologue de GCN2 humain a été décrit en 2000 [180]. Les quatre protéines kinases phosphorylent toutes le même substrat eIF2 α (**Figure 37**), en réponse à des conditions de stress différentes : GCN2 lors d'une carence en acides aminés ; HRI (Heme regulated inhibitor) par la privation en hème dans les cellules érythroïdes ; PKR (Protein Kinase R) par les ARNs double brin dans les cellules



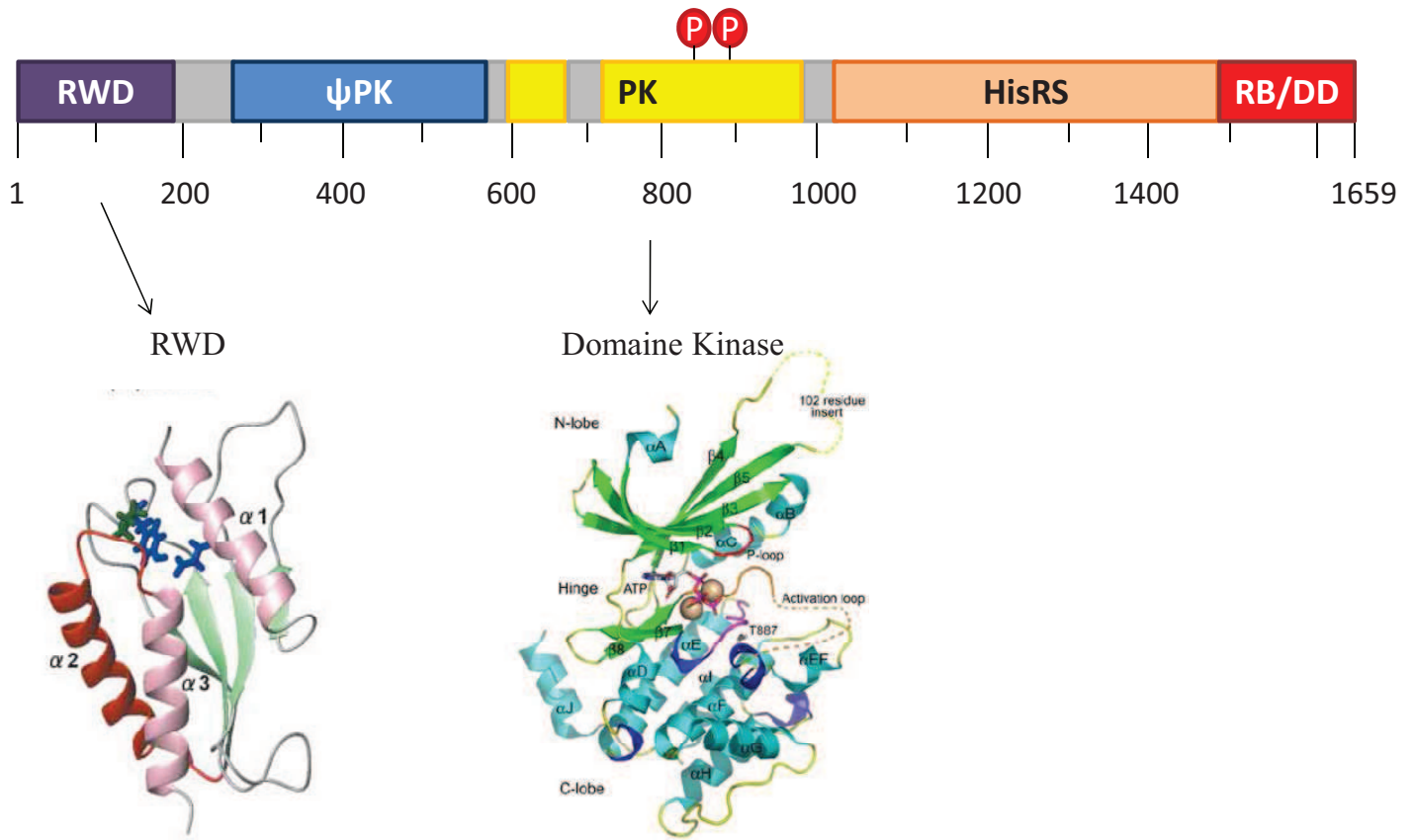


Figure 38. Représentation schématique de la structure de GCN2, et les domaines RWD et kinase résolus par cristallographie [183 ; 185].

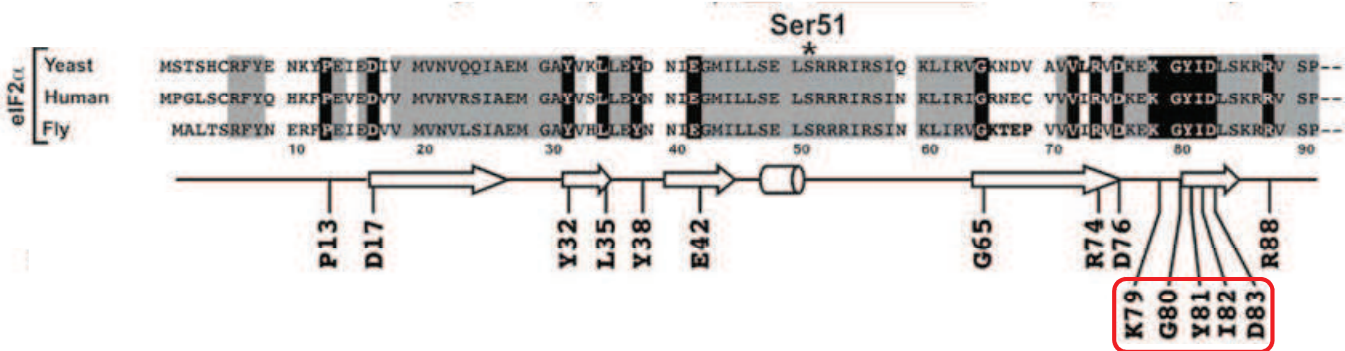


Figure 39. Motif de reconnaissance de GCN2 sur eIF2α [182].

La sérine 51 ainsi que le motif de fixation de GCN2 ${}_{79}\text{KGYIE}_{83}$ est conservé parmi les eIF2a de levure, humaine et mouche. Le motif KGYIE est entouré en rouge ainsi que la mutation D83E qui ne perturbe pas la phosphorylation d'eIF2α.

infectées ; et PERK (Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase) par les protéines mal repliées.

eIF2 α permet de délivrer le tRNA méthionine initiateur (Met-tRNA_i^{Met}) à la sous unité ribosomale 40s. eIF2 α couplée au GTP fixe le tRNA, le transmet au ribosome via une réaction ATP dépendante, ce qui en résulte eIF2 α couplée au GDP. eIF2B ou GEF (guanine nucleotide exchange factor) permet de recycler le GDP en GTP. La phosphorylation d'eIF2 α au niveau de la sérine 51 empêche la fixation du GEF et donc laisse la protéine sous une forme inactive. Il y a donc arrêt de la traduction des protéines [181].

La fonction de GCN2 a été particulièrement étudiée chez la levure. Bien qu'elle ait été décrite chez de nombreux eucaryotes supérieurs, son rôle n'a pas été aussi bien étudié dans ces organismes. Chez la levure, la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 conduit d'une part à l'arrêt de la traduction des protéines et d'autre part à la traduction de l'ARNm GCN4 qui code pour un activateur transcriptionnel de gènes pour les enzymes de biosynthèse des acides aminés.

GCN2 peut être décomposée en cinq domaines (**Figure 38**) : un domaine RWD de liaison au complexe GCN1/GCN20 en N-terminal, un domaine pseudo kinase, un domaine kinase, un domaine histidyl t-RNA synthétase like (HisRD), et un domaine de liaison au ribosome et de dimérisation en C-terminal [182]. L'activation de GCN2 a lieu lors d'une carence en acides aminés. L'absence d'acides aminés entraîne une accumulation de tRNA non chargés qui se fixent au domaine histidyl tRNA synthétase like de GCN2. Le domaine RWD permettrait via son interaction avec le complexe GCN1/GCN20 de faciliter le transfert du tRNA non chargé du ribosome vers le domaine HisRD. La fixation du tRNA va alors induire un changement de conformation de la protéine : le domaine kinase jusqu'alors replié sur lui-même va être beaucoup plus flexible et permettre l'accessibilité du site actif de l'enzyme à l'ATP. L'autophosphorylation au niveau des thréonine 882 et 889 entraîne l'activation de ce domaine kinase [183]. Les structures cristallographiques des domaines kinases en conformation active ou inactive ont été résolues il y a peu [182]. La structure du domaine RWD a également été résolue [184], cependant la structure entière de la protéine n'est pas connue (**Figure 38**).

L'étude de l'interaction entre GCN2 et eIF2 α a permis de déterminer un domaine de reconnaissance. Chez la levure, la reconnaissance se fait par fixation sur une séquence conservée ₇₉KGYID₈₃ du facteur de traduction (**Figure 39**) [182] située à environ 21.5 Å du site de phosphorylation ser51 dans la structure tertiaire de la protéine.



3) Rôle lors d'un stress cellulaire

La voie de phosphorylation d'EIF2 α par GCN2 est également impliquée dans la réponse cellulaire contre les dommages causés par les irradiations aux U.Vs. En effet, lors d'une irradiation de cellules de souris avec des UV-C, la phosphorylation d'EIF2 α par GCN2 est détectée [185]. La phosphorylation d'EIF2 α entraîne l'activation de NF- κ b (Nuclear Factor κ b) et déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau.

D'autre part, il a été montré que dans des conditions hypoxiques (microenvironnement au sein des tumeurs solides), PERK et GCN2 sont activées et conduisent à la phosphorylation d'eIF2 α [186]. Non seulement GCN2 évite aux cellules mises en conditions de cultures hypoxiques d'entrer en apoptose, mais elle leur permet également de mieux récupérer du stress une fois les cellules remises en condition de culture normale.

L'hypoxie est un environnement retrouvé au sein des tumeurs solides, et GCN2 en collaboration avec PERK participent à la survie de ces cellules cancéreuses. Ces deux protéines pourraient donc constituer des cibles potentielles pour développer de nouveaux traitements anticancéreux.

4) Rôle des protéines kinases de réponse au stress au cours d'une infection

a. Rôle de PKR

PKR est la protéine kinase de réponse au stress qui a été la plus étudiée par rapport aux infections virales. En effet cette kinase activée par la fixation d'ARNs doubles brins sert de sensor aux infections pathogéniques. PKR se compose de deux domaines : un domaine N-terminal composé de deux domaines de fixation aux ARNds et un domaine C-terminal constitué du domaine kinase de la protéine. Lors d'une infection, l'ARNds se fixe à un dimère de PKR et entraîne l'activation de la protéine via le domaine kinase [187]. Lorsque la réplication virale augmente, la multiplication de l'ARN viral entraîne alors une monomérisation de PKR et son inhibition.

Ainsi il a été montré lors de l'infection par le VIH-1 que PKR est activée par de faibles quantités de l'ARN TAR. En culture cellulaire, la surexpression de PKR permet d'inhiber efficacement la réplication du VIH-1 [188], mais en dépit de cette activité observée, le VIH-1



```

eIF-2 $\alpha$   PGLS CRFYQH K FPEVE DV VMVN VRS IAEMGA 31
K3L      M L A F C Y S L P N A G D V I K G R V Y - E K D Y A L 26
C8L      M S T M N T L A F C Y G L P N I N D I T Q G I I F - V R N N I F 31

Y V S L L E Y N N I E G M I L L S E L S R R I R S I N - K L I 62
Y I Y L F D Y P H F E A - I L A E S V K M H M D R Y V E Y R D K 57
Y S Y L T D Y - A M E A C I L - N Y I N I R A D K I E D L K K S 61

R I G R N E C V V V I R V D K E K G Y I D L S K R R V S P E E 93
L V G K T V K V K V I R V D Y T K G Y I D V N Y K R M C R H Q 88
L V G K T I S V R V I R V D V L K G Y I D V S I V 86

```

Figure 40. Alignement entre eIF2 α , la K3L du virus de la vaccine et la C8L de la variole porcine [193].
 Les résidus conservés sont entourés en noir.

se réplique efficacement dans de nombreuses lignées cellulaires, ce qui indique une régulation de l'activité de PKR lors de l'infection virale.

Ainsi il a pu être montré que divers facteurs participent à établir une stratégie afin d'empêcher l'activité de PKR. Notamment *in vitro*, des concentrations élevées d'ARN TAR inhibent l'activité kinase de PKR [189]. Dans le cadre de l'infection au Virus Respiratoire Syncytial (RSV), PKR est activée par autophosphorylation et cependant la traduction est maintenue. Il a pu être montré que la protéine N du virus séquestre PKR et l'empêche d'aller phosphoryler eIF2 α favorisant sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A [190].

D'autre part, même si de nombreuses études montrent que PKR joue un rôle clé dans la défense contre certains virus via l'interféron [191, 192], le fait que PKR n'est pas essentielle pour la réponse antivirale lors d'infection à divers virus (Sindbis virus, virus de l'encéphalite et virus de la grippe) prouve l'existence de voies antivirales alternatives.

b. Rôle de GCN2

– Le virus de la vaccine

Le premier lien entre GCN2 et une protéine virale a été découverte en 1996 par l'équipe américaine de R.C. Wek. Cette étude concerne une protéine du virus de la vaccine qui fait partie de la famille des Poxvirus. L'expression de la protéine K3L du virus dans la levure diminue l'autophosphorylation de GCN2 et la phosphorylation d'eIF2 α [193]. K3L est une petite protéine de 88 résidus qui partage 25 % d'homologie avec la partie N-terminale d'eIF2 α . La protéine C8L du virus de la variole porcine possède également les mêmes régions conservées (**Figure 40**). Ainsi K3L agit comme un pseudosubstrat de GCN2.

– Le sindbis virus

Ce travail constitue la première et la seule description de l'activation de GCN2 par une infection virale. Le Sindbis virus (SV) est un virus enveloppé avec un génome composé d'un ARN linéaire simple brin. Il a été montré que GCN2 est activée lors de l'infection par SV de façon spécifique par une séquence de l'ARN viral appelée GAR (GCN2-Activating RNA). GAR se fixe sur la région HisRD de GCN2 et conduit à l'autophosphorylation de la protéine. L'activation de GCN2 entraîne la phosphorylation d'eIF2 α et l'arrêt de la traduction précoce de l'ARN génomique de SV. Chez des souris GCN2^{-/-}, le virus se réplique plus efficacement



et plus rapidement que dans les souris WT. En effet, le SV est retrouvé dans le cerveau avec une augmentation de 4 logs, 4 jours après l'infection. Il semblerait que GCN2 soit un facteur important dans la défense antivirale à des temps courts après l'infection [194]. Le virus de la stomatite vésiculeuse

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) fait partie de la famille des arbovirus. Tout comme le VIH, il est enveloppé et son génome se compose d'un ARN simple brin négatif. Il a été montré que GCN2 et PERK sont des facteurs de restriction à l'infection au VSV dans des cellules de souris [195, 196]. Cependant l'effet sur la réplication du virus est indépendant de la phosphorylation d'EIF2 α . Pour l'instant le mécanisme par lequel GCN2 permet de diminuer l'infection à VSV n'a pas été déterminé.

E. Les objectifs de l'étude

A mon arrivée au laboratoire, l'un des axes de recherche concernait l'identification de modifications post-traductionnelles chez l'intégrase produite chez la levure. Cette enzyme purifiée a été étudiée par spectrométrie de masse LC-MS/MS au pôle protéomique (Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, M. Bonneau). La protéine a été fragmentée par digestion trypsique et a ensuite été analysée par spectre LC-MS/MS. La comparaison avec les banques de données a permis d'identifier l'intégrase avec une couverture de séquence de l'ordre de 80 %. Cette étude a permis de mettre en évidence différentes phosphorylations de l'IN.

D'autre part, un autre axe de recherche de l'équipe est d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de l'IN. Divers facteurs cellulaires en interaction avec IN ont ainsi été identifiés par une technique de double hybride chez la levure. Parmi diverses protéines identifiées, la présence de GCN2, une protéine kinase cellulaire nous a particulièrement intéressées. Une partie de mon travail de thèse a donc consisté en la caractérisation d'une des phosphorylations présentes sur IN afin d'essayer de comprendre le rôle de cette phosphorylation pour le cycle viral.

D'autre part, nous avons cherché à comprendre le rôle de la protéine cellulaire GCN2 sur le cycle viral. Les résultats que nous avons pu obtenir ouvrent de nouvelles et nombreuses



perspectives quand aux mécanismes mis en place par le virus pour détourner la machinerie de réponse au stress dont fait partie GCN2.

En parallèle à ce travail, j'ai participé à un autre projet mis en place auparavant au laboratoire concernant le rôle du facteur de la réparation cellulaire RAD51 [118]. Ainsi j'ai pu développer une approche cellulaire afin de mettre en évidence le potentiel restrictif de ce facteur (Cosnefroy et al, 2011).



MATERIELS ET METHODES



MATERIELS ET METHODES

A. Matériels

1) Culture cellulaire

a. Bactéries

Des bactéries *Escherichia coli* DH5 α ont été utilisées pour réaliser les amplifications de plasmides. Cette souche fournie par Promega™ a le génotype suivant : F-[ϕ 80*lacZ* Δ M75 Δ (*lacZ*YA-*argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*].

Pour la production de l'intégrase de VIH-1 chez la bactérie, nous avons utilisé la souche Rosetta dérivée de BL 21 d'*Escherichia coli* possédant un plasmide pRARE d'expression de tRNA utilisant des codons rares. Ce plasmide porte un marqueur de sélection au chloramphénicol.

Les bactéries B121(DE3)*pLysS* ont été utilisées pour la production d'eIF2 α . Elles contiennent un plasmide pLysS portant un lysozyme de la T7 et un marqueur de sélection au chloramphénicol. Cette souche a le génotype suivant : F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, Cm^r.

b. Levures

Les levures LG 171 C (α , *ura3*⁻, *leu2*⁻, protéase +) ont été utilisées pour produire la RT.

Les levures JSC 310 ont été utilisées pour produire l'IN (*a*, *ura3*⁻, protéase -).

c. Cellules humaines

– Cellules adhérentes HeLa et HeLa P4

Les cellules HeLa sont une lignée de cellules cancéreuses épithéliales humaines de l'utérus. Les cellules HeLa P4 expriment de manière constitutive le récepteur CD4 au niveau de la membrane cytoplasmique et sont transformées de façon stable avec le gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR [62].



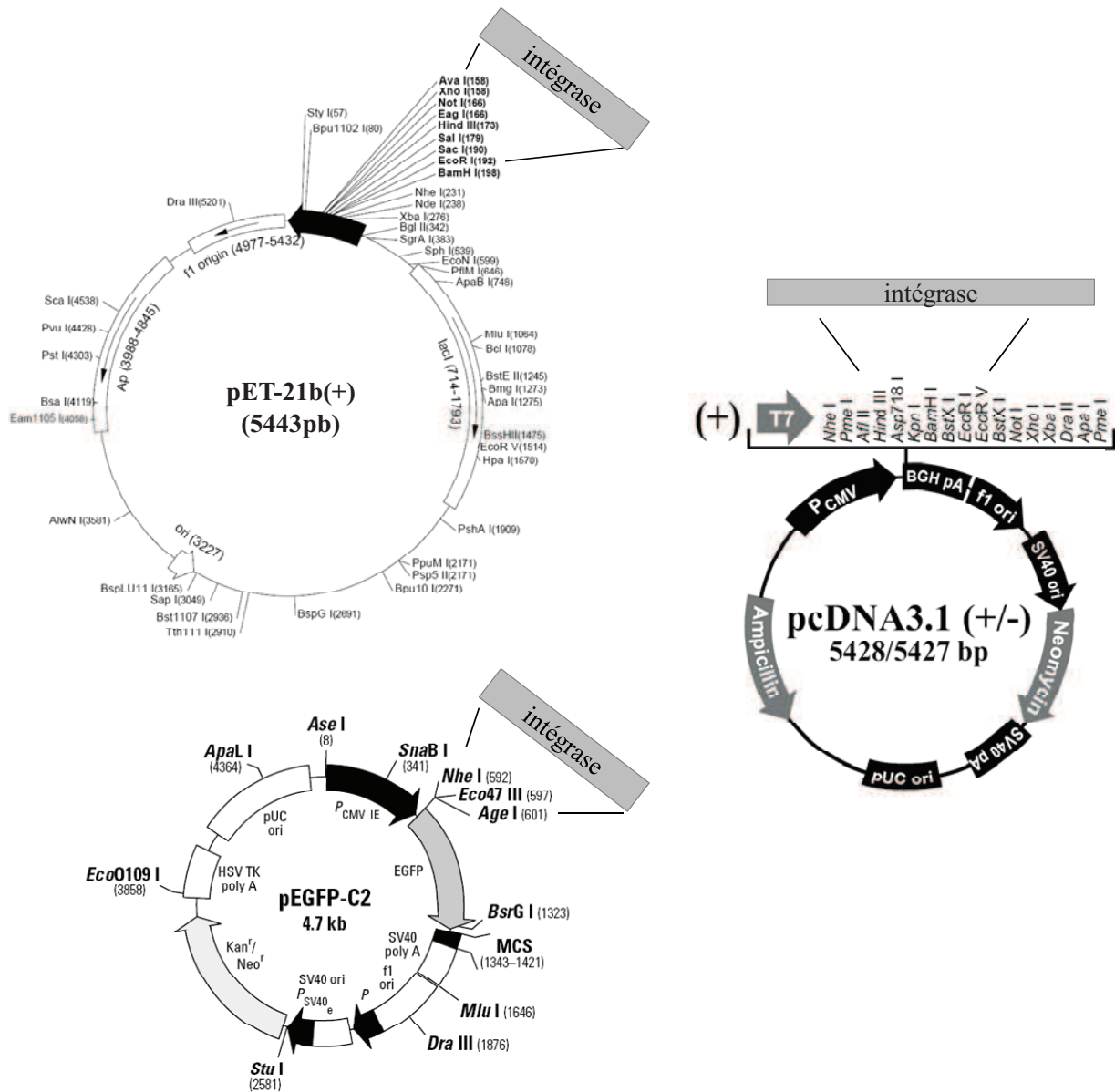


Figure 41. Plasmides utilisés pour la mutagenèse et l'expression de l'intégrase de VIH-1 dans différents modèles.

– Cellules adhérentes 293T

Les cellules 293T (ou HEK) sont une lignée de cellules épithéliales adhérentes issues de cellules embryonnaires de rein humaines 293 possédant l'antigène T du SV40.

– Cellules adhérentes COS

Les cellules COS sont une lignée de cellules épithéliales de rein de singe produisant l'antigène T du SV40.

d. Virus et lentivirus pseudotypés VSV-G

Le VIH-1 utilisé dans ce travail est issu de l'isolat Lai.

Les lentivirus pseudotypés VSV-G utilisés sont des virus recombinants (intégratifs mais non réplicatifs) qui présentent les caractéristiques générales du VIH-1 (gag-pol) mais dont l'ARN génomique est remplacé par un ARN portant un gène rapporteur codant pour l'EGFP sous contrôle d'un promoteur interne CMV. L'enveloppe de ce virus est constituée de la protéine G du VSV. La production a été assurée par la plateforme de Vectorologie de Bordeaux 2.

2) Acides nucléiques

a. Plasmides

– Plasmides d'expression de l'IN

Expression dans la levure

Le plasmide p_{PHIV1SF2IN} porte la région du gène *pol* codant pour l'intégrase de VIH-1 sous contrôle d'un promoteur ADH2/GAPDH ainsi que les marqueurs de sélection URA3 et LEU2. La séquence de l'intégrase de VIH-1 a été obtenue à partir d'un provirus génomique cloné d'un isolat de San Francisco [197, 198].

Expression dans la bactérie

Le plasmide p_{ET-21b-IN} construit au laboratoire porte la région du gène *pol* codant pour l'intégrase de VIH-1 sous le contrôle du promoteur de la T7 RNA polymérase ainsi qu'un marqueur de sélection à l'ampicilline (**Figure 41**). La séquence de l'intégrase de VIH-1 a été obtenue à partir d'un provirus génomique cloné d'un isolat de San Francisco [197, 198].



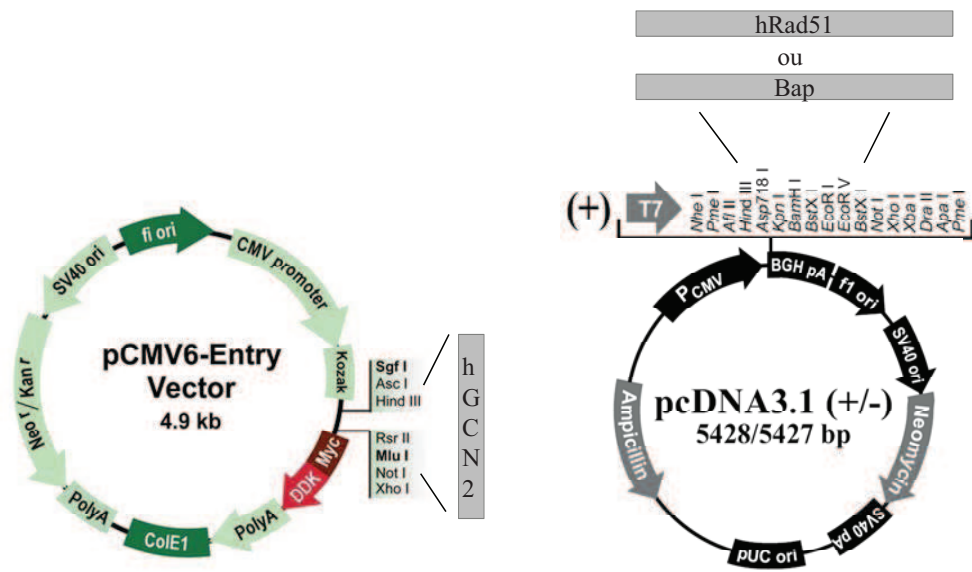


Figure 42. Plasmides utilisés pour l'expression de la protéine GCN2 humaine, hRAD51 et BAP.

Expression dans les cellules humaines

Des expériences de surexpression de l'intégrase dans des cellules humaines ont été effectuées en utilisant le plasmide pcDNA3.1+ (Invitrogen™). Ce vecteur possède un multisite de clonage positionné entre le promoteur constitutif fort CMV et la séquence terminatrice de polyadénylation de l'hormone de croissance bovin (*bgh*-PolyA). La séquence de l'intégrase de VIH-1 obtenue à partir d'un provirus génomique cloné d'un isolat de San Fransisco [197, 198] a été clonée entre les sites de restriction EcoRI et XhoI. (**Figure 41**).

Le plasmide pCEP-INS nous a été gracieusement donné par le Dr. Debyser (Leuven). [199] (**Figure 41**).

– Plasmide d'expression de GCN2

Le plasmide pCMV6-EIF2AK4 vient de chez OriGene™. La séquence de GCN2 (EIF2AK4) humaine est clonée dans le site de clonage entre les sites de restriction SgfI et MluI sous contrôle du promoteur CMV, en fusion en C-terminal avec myc tag et DDK tag. (**Figure 42**).

– Plasmide d'expression d'eIF2 α

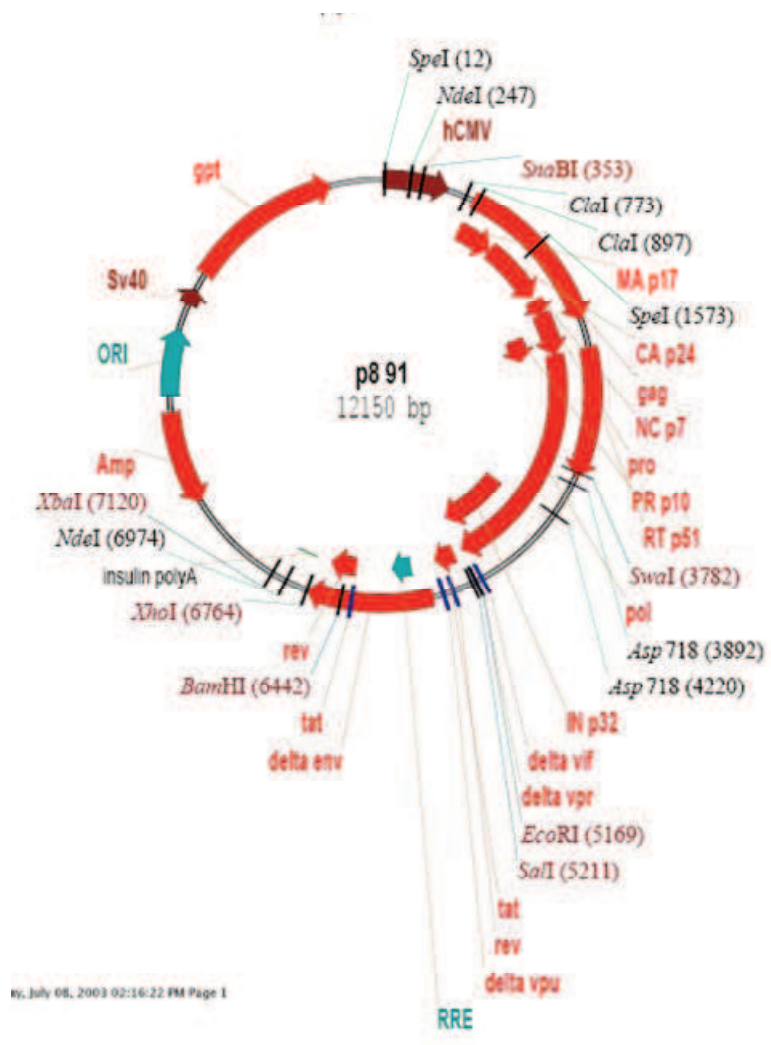
Le plasmide peIF2 α -396 nous a été gracieusement donné par le Dr Konrad (Indiana University School of Medicine). Il contient la séquence d'eIF2 α de levure tronqué de sa partie C-terminale (a.a 199-304), sous contrôle d'un promoteur inductible IPTG, et comportant un tag Histidine en 5'.

– Plasmides d'expression de RAD51

RAD51 est exprimée après transfection transitoire du plasmide pcDNA3.1+hRAD51 sous contrôle du promoteur constitutif fort CMV. (**Figure 42**).

Le plasmide pcDNA3.1+hBAP a été utilisé comme contrôle de transfection.





W, July 08, 2003 02:16:22 PM Page 1

Figure 43. Le plasmide pCMVΔ8.91 permet l'expression des protéines non structurales pour la production des pseudovirus.

Ce plasmide est un vecteur lentiviral contenant les séquences codantes des gènes GAG et POL ainsi que les protéines accessoires virales Tat et Rev. L'expression de ces protéines est sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort CMV. Ce plasmide nous a été donné par la plateforme de Vectorologie de Bordeaux 2.

– Plasmide d'expression de la RT

Le plasmide pAB24/RT-7 contient le gène de la transcriptase inverse obtenu à partir d'un provirus génomique cloné d'un isolat de San Fransisco entre le promoteur de la ADH/GAPDH et le terminateur de la GAPDH de levure.

– Plasmides utilisés pour la production de lentivirus pseudotypés VSV-G

La production des lentivirus pseudotypés VSV-G fait appel à trois plasmides permettant l'expression de tous les constituants nécessaires. Le plasmide de transfert contient un ADN codant pour un ARN mimant l'ARN génomique viral. Cet ARN code pour une protéine rapportrice, l'EGFP sous dépendance du promoteur CMV, encadrée par les LTR viraux, la séquence d'encapsidation ψ et le cPPT. Une délétion au niveau de la région U3 conduit à la production de LTR mutés après la transcription inverse. Ces LTR sont donc toujours reconnus par l'intégrase mais sont déficients pour la transcription. Le vecteur d'emballage (pCMV Δ 8.91) permet l'expression des protéines non structurales excepté ENV et certaines protéines accessoires (Vpr, Vpu, Vif, Nef) (**Figure 43**). Enfin le dernier plasmide constitue le vecteur d'enveloppe et code pour la protéine G du VSV.

b. siRNAs

Les siRNA GCN2(h) sc-45644 et contrôle A sc-37007 ainsi que le siRNA transfection reagent sc-29528 ont été commandés chez Santa cruz biotechnology,INC.

Avant utilisation, les siRNAs sont dilués à 10 μ M final dans de l'eau RNase free.

c. Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides ont été commandés chez Eurofin MWG Operon. Les ODNs utilisés pour la PCR, le séquençage et les tests d'activité de l'IN *in vitro* listés dans le **Tableau 1**, les ODNs utilisés pour réaliser les mutagénèses dirigées sont dans le **Tableau 2**.



Utilisation		ODN	Séquence
Séquençage	pet21b-IN	petFOR	TAAACTTCATATGATGTTTTTTAGATGGAATAGAT
		petREV	GACTAGTGGATCCCTATTAATCCTCATCCTGTCTACTTGCC
		10004	TACAATCTAGTTGCCATAT
	pCMVΔ8.91	Tronolab2830	GAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGA
		Tronolab4230	GTCTACCTGGCATGGGTACCAGCAC
PCR	Cellules infectées	Alu164	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG
		NI-1	CACACACAAGGCTACTTCCCT
		PBS	TTTCAAGTCCCTGTTCGGGCGCCA
		GAG-F	GCCTATTGCACCAGGCCACAT
		GAG-R2	GTGAAGCTTGCTCGGCTCTTAGA
Tests in vitro	Radiomarqués	ODN71	GTGTGGAAAATCTCTAGCA
		ODN70	GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT
		ODN72	ACTGCTAGAGATTTCCACAC

Tableau 1. Liste des ODNs utilisés pour la PCR, le séquençage et les marquages radioactifs.

B. Méthodes

1) Cultures cellulaires

a. Bactérie

– Culture

Les bactéries DH5 α et Rosetta sont cultivées à 37°C sous agitation (220 rpm pour une culture liquide) dans un milieu LB (Luria-Bertani : 1% bactotryptone, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl et 1.5 % agar si milieu de culture solide) avec ou sans pression de sélection (50 μ g/ml d'ampicilline ; 25 μ g/ml chloramphénicol).

Les bactéries BL21(DE3) plysS sont cultivées à 30°C dans les mêmes conditions.

– Transformation

Les bactéries ont été rendues compétentes par méthode chimique selon Hanahan (Hanahan, 1983). La transformation est basée sur un choc thermique des bactéries compétentes en présence de l'ADN plasmidique. 200 μ l de bactéries sont incubées sur la glace pendant 30 min avec 100 ng de vecteur ou 10 ng de mélange de ligation. Ensuite le mélange est mis pendant 2 min à 42°C puis 800 μ l de LB est rajouté. Les bactéries transformées sont incubées 1h à 37°C sous agitation puis étalées sur boîte LB agar complété de l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le plasmide. Les boîtes sont mises à 37°C pendant la nuit, et les clones résistants à l'antibiotique sont sélectionnés le lendemain.

– Extraction et purification de l'ADN plasmidique

Les plasmides ont été produits à partir de différentes quantités de culture de bactéries : 10 ml pour les minipreps, 150 ml pour les midipreps et 500 ml pour les maxipreps.

Les extractions et les purifications ont été réalisées à l'aide des kits commerciaux PureYield™ Plasmid Miniprep System ou PureYield™ Plasmid Midiprep (Promega). Les maxipreps ont été réalisées à l'aide du kit Nucleobon Xtra Maxi Plus EF (Macherey-Nagel).



Utilisation		ODN	Séquence
Mutagenèse dirigée	pCMVΔ8.91	P8.91IN-E85D-S	GGATATATAGACGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAA GAAACAGCA
		P8.91IN-E85D-AS	TACTTCTGCGTCTATATATCCACTGGCTACATGAACTGCTAACC AAGATAAC
		P8.91IN-S24A-S	GCAATGGCTGCTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAAG AAATAGTA
		P8.91IN-S24A-AS	GTAAAAATCAGCAGCCATTGCTCTCCAATTACTGTGATATTTCT CATGTTC
		P8.91IN-E85A-S	TGGATATATAGCAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCA AGAAACAG
		P8.91IN-E85A-AS	GCTGGAATTACTTCTGCTGCTATATATCCACTGGCTACATGAAC TGCTACCAAG
		P8.91IN-S24D-S	ATGGCTGATGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAAGAAA TAG
		P8.91IN-S24D-AS	CAGGTGGTAGGTTAAAATCATCAGCCATTGCTCTCCAATTACTG TGATATTTCT
		P8.91IN-S24C-S	ATGGCTTGTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAAGAAA TAG
		P8.91IN-S24C-AS	CAGGTGGTAGGTTAAAATCACAAGCCATTGCTCTCCAATTACT GTGATATTTCTCATG
	pet21b-IN	Inpet-E85A-S	TGGATATATAGCAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAGACAGGGCAG GAA
		Inpet-E85A-AS	CCCTGTCTCTGCTGGAATAACTTCTGCTGCTATATATCCACTGG CTACATGAAC
		Inpet-S24D-S	GCAATGGTTGATGATTTTAACTGCCACCTGTAGTAGCAAAAAG AAATAGTAGCC
		Inpet-S24D-AS	GCTACTACAGGTGGCAGGTTAAAATCATCAACCATTGCTCTCC AATTACTA
		Inpet-S24A-S	GCAATGGtTGCTGATTTTAACTGCCACCTGTAGTAGCAAAAAGA AATAGTAGCC
		Inpet-S24A-AS	GGCTACTATTTCTTTTGCTACTACAGGTGGCAGGTTAAAATCAG CAaCCATTGC
		Inpet-S24C-S	GCAATGGTTTGTGATTTTAACTGCCACCTGTAGTAGCAAAAAG AAATAGTAGCC
		Inpet-S24C-AS	GCTACTACAGGTGGCAGGTTAAAATCACAACCATTGCTCTCC AATTACTG
		Inpet-E85D-S	GGATATATAGACGCAGAAGTTATTCCAGCAGAGACAGGGCAG GAAACAGC
		Inpet-E85D-AS	AACTTCTGCGTCTATATATCCACTGGCTACATGAACTGCTACCA GGATAATTTTCC

Tableau 2. Liste des ODNs utilisés pour la mutagenèse dirigée.

b. Levure

Milieu de culture YMM : 20 g/l glucose, 7 g/l bacto yeast nitrogène base, 40 pg/l biotine, 2.5 mg/l meso-inositol, 1 mg/l thiamine, 1 mg/l pyridoxine, 1 mg/l acide nicotinique, 1 mg/l acide pantothénique, 1 mg/l acid para-aminobenzoic, 20 mg/l adénine, 20 mg/l uracile, 10 g/l acide succinique, 6 g/l NaOH.

Les levures LG 171 C transformées avec le plasmide pAB24RT-7 sont cultivées sur milieu solide (6.7 g/l bacto yeast nitrogene base sans histidine, méthionine, and tryptophane, 2 % glucose, 2 % bacto-agar) à 28°C puis transférées dans un milieu liquide YMM à 28°C sous agitation.

Les levures JSC 310 sont cultivées sur milieu solide (6.7 g/l yeast nitrogene base sans uracile, 5 g/l d'extrait de caséine, 2 % glucose) pendant 3 jours à 28°C puis transférées dans un milieu liquide YMM.

c. Cellules humaines

Les cellules HeLa, HeLa P4, 293T, COS sont cultivées dans du milieu Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM, Invitrogen) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 500 mg/ml de gentamicine (Invitrogen), et 1 mg/ml de G418 (Invitrogen) (DMEM complet). Les cultures sont réalisées à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Quand les cellules deviennent confluentes, elles sont alors décollées grâce à une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen) puis diluées au 1/10 dans DMEM complet pour que les cellules soient à nouveau confluentes au bout de 3-4 jours.

2) Les virus

a. VIH-1

– Production

Les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 sont obtenus par une co-culture de cellules MT₄ et H₉ chroniquement infectées par le VIH-1 Laï comme décrit dans Ventura et al, 1999 [200].



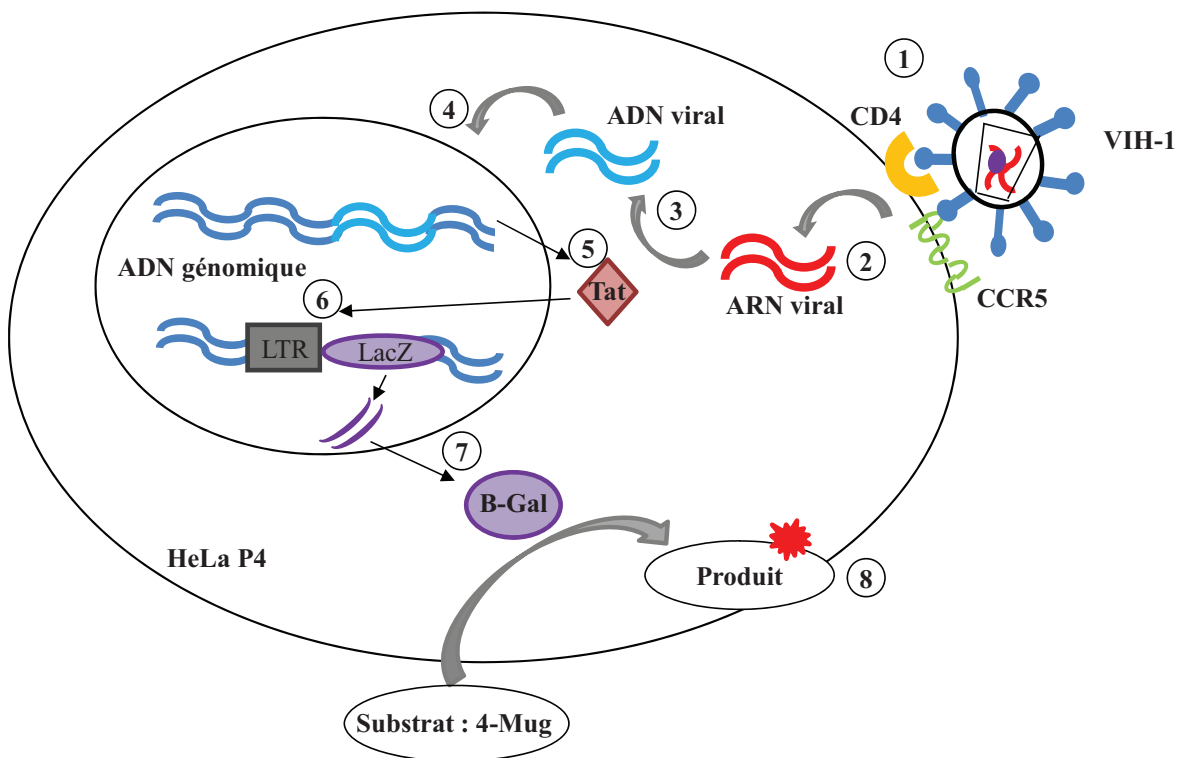


Figure 44. Modèle cellulaire HeLa P4 de quantification de l'infection virale.

Les cellules HeLa P4 expriment de manière constitutive le récepteur CD4 au niveau de la membrane cytoplasmique et sont transformées de façon stable avec le gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR (Charneau et al. 1994). Après reconnaissance de la cellule cible (1), le virus pénètre (2) et l'ARN viral est retro transcrit en ADN viral (3). L'ADN viral est acheminé dans le noyau et intégré au génome cellulaire (4). Les phases de transcription précoces permettent d'obtenir Tat (5) qui va permettre la transactivation du gène LacZ sous contrôle du promoteur LTR (6). S'ensuit la synthèse de β -Galactosidase (7) qui en clivant le substrat 4-MUG permet d'obtenir un produit fluorescent (8) proportionnel au niveau d'infection et quantifiable par cytofluor à 460 nm.

– Titration virale

Les surnageant viraux titrés en quantifiant l'ARN viral par RT-PCR sont à une concentration d'environ 10^9 particules virales par ml. La titration a été réalisée au laboratoire de virologie du Dr. H. Fleury, Bordeaux.

– Infection

Les infections sont réalisées en laboratoire de confinement de type P3.

Les cellules HeLa P4 sont utilisées pour étudier la réplication du VIH-1 (**Figure 44**). Elles expriment le récepteur CD4 à leur surface et elles possèdent le gène LacZ sous la dépendance du LTR viral. Suite à l'infection par le VIH-1, le génome du virus est intégré et la protéine Tat est alors produite. Celle-ci va être capable de transactiver la transcription du gène LacZ codant la protéine β -Galactosidase. L'activité β Galactosidase peut donc être mesurée par ajout d'un substrat de l'enzyme : le 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside ou 4-MUG (Sigma-Aldrich). Ce substrat clivé par la β -Galactosidase devient fluorescent et sera quantifié sur un cytofluor à 460 nm (PerSeptive Biosystems).

Les cellules sont mises en culture à raison de 10 000 cellules / puits dans des plaques 96 puits et en DMEM complet. Après 24 heures de culture, les cellules sont lavées avec du PBS (140 mM NaCl ; 3 mM KCl ; 8 mM Na_2HPO_4 et 1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,4) et infectées avec des dilutions virales sériées dans un volume final de 200 μl de DMEM complet par puits. La révélation de l'infection se fait par ajout du tampon 4-MUG (50 mM Tris pH 8, 5 mM 4-MUG, 100 mM β -Mercatoéthanol, 0,05 % Triton X-100). Après 3 lavages des cellules au PBS, 200 μl du tampon 4-MUG est ajouté par puits. La plaque est incubée 24 h à 37°C, puis la lecture de l'activité β -Galactosidase se fait par mesure de la densité optique (DO) à 460 nm après excitation à 360 nm sur un cytofluor (PerSeptive Biosystems).

b. Les particules lentivirales pseudotypées VSV-G

– Production

Les particules lentivirales pseudotypées VSV-G ont été produites par la plateforme de vectorologie de Bordeaux 2.



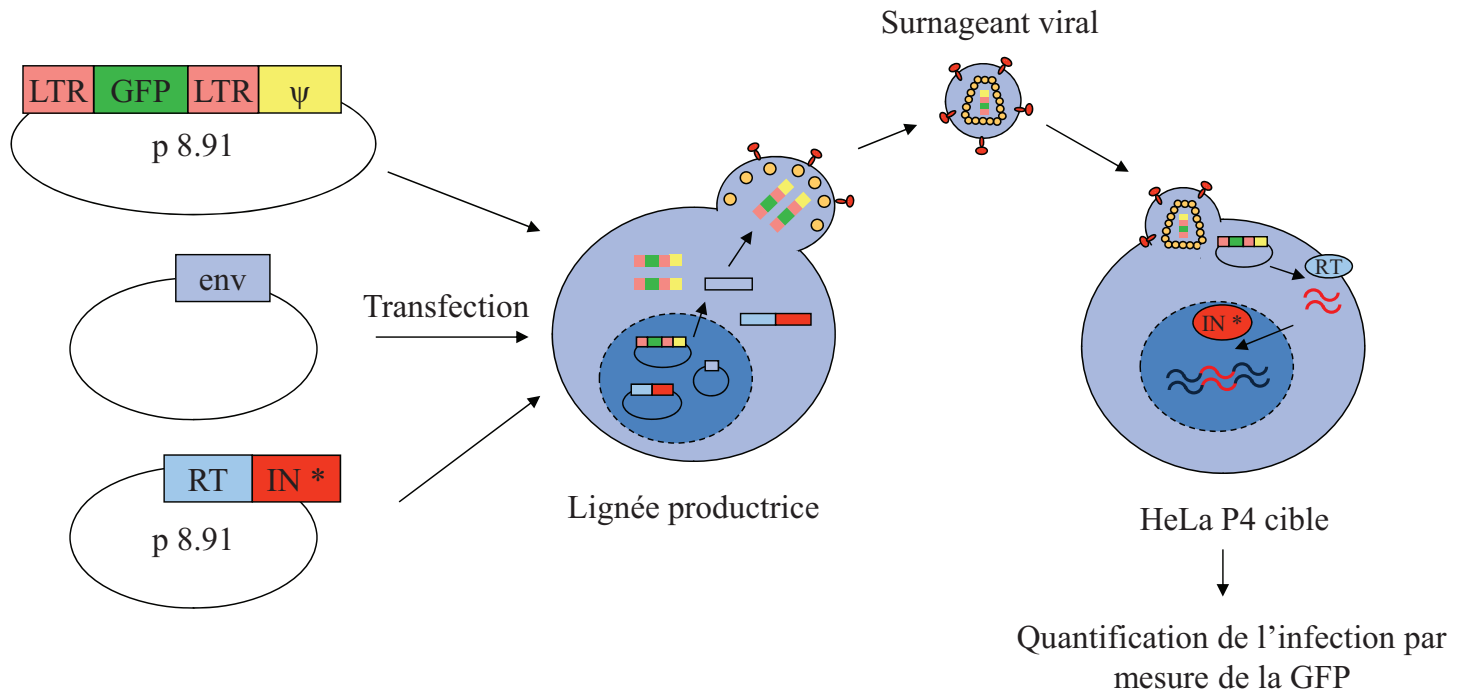


Figure 45. Production des pseudovirus et modèle de quantification de l'infection.

Les cellules 293T sontensemencées dans une boîte de pétri de 10 cm ($6 \text{ à } 7 \cdot 10^6$ cellules) dans 10 ml de DMEM complet. Après 24 heures, les cellules sont transfectées avec les trois plasmides nécessaires à la production des virus (**Figure 45**).

L'ADN (10 μg dans 450 μl d'eau) et du CaCl_2 (50 μl de solution 2.5 M) sont filtrés (0.22 μm) puis versés goutte-à-goutte sur 500 μl de HBS 2X (280 mM NaCl ; 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mM HEPES pH 7.2). Après trois minutes, le mélange est dispersé de façon homogène sur les cellules. Seize heures post-transfection, les cellules sont lavées dans du DMEM puis incubées 8 heures dans du DMEM complet, 20 mM HEPES. Les cellules sont ensuite mises dans du milieu DMEM complété avec 8 ml d'Optimem et 20 mM HEPES pH 7.5. Après 24 heures, le surnageant de culture contenant les produits est récupéré et centrifugé 5 minutes à 2500 rpm. Le surnageant est filtré (0.22 μm) puis ultra-centrifugé à 20000 rpm pendant 2 heures. Le culot viral est repris dans 1 ml de DMEM et aliquoté à raison de 100 μl par tube et conservé à -80°C .

– Titration

La titration des virus est réalisée par la plateforme de vectorologie. Les cellules sont infectées avec des dilutions virales sériées puis la fluorescence de la GFP traduite est mesurée par cytométrie de flux. Le titre est calculé en réalisant une moyenne du pourcentage de fluorescence obtenu pour chaque dilution rapporté au nombre de cellules infectées pour une transduction inférieure à 20 %.

– Infection

Les infections sont réalisées en laboratoire de confinement P2.

Des cellules humaines HeLa P4 ou HEK 293T sont utilisées pour réaliser les infections avec les particules lentivirales pseudotypées VSV-G (**Figure 45**). Les cellules sont mises en culture à raison de 50 000 cellules / puits dans des plaques 48 puits (Corning), et en DMEM complet. Après 24 heures de culture, les cellules sont infectées avec différentes MOI dans un volume final de 400 μl de DMEM par puits. 10 jours après l'infection les cellules sont préparées pour être analysées par cytométrie de flux. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS puis décollées avec de la trypsine et centrifugées 2 min à 2000 rpm. Le culot de cellules est lavé 2 fois avec du PBS suivi d'une centrifugation pendant 2 min à 2000 rpm. Finalement les cellules sont reprises dans 200 μl de PBS/0.2 mM EDTA.



3) Manipulation des acides nucléiques

a. Transfection des siRNA

Les cellules sont mises en culture à raison de 50 000 cellules / puits dans des plaques 48 puits. La transfection est réalisée sur des cellules à 60-80 % de confluence. Les transfactions sont réalisées avec 2 agents de transfection : la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et un agent de transfection sc-29528 pour siRNA (Santa cruz biotechnology, Inc). Différentes quantités de siRNA GCN2 et siRNA contrôle (Santa cruz biotechnology, Inc) allant de 5 à 80 pmoles ont été transfectées. Les siRNA sont dilués dans 50 µl final de DMEM. Les agents de transfection sont dilués à raison de 1 µl dans 50 µl final de DMEM. Les 2 mélanges sont incubés 15 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes siRNA-. Après incubation, 50 µl de DMEM sont ajoutés délicatement au mélange pour obtenir un volume de 150 µl final à déposer sur les cellules préalablement rincées au PBS. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 150 µl de DMEM contenant 20 % de SVF sont ajoutés. Les cellules sont ensuite cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂.

b. Transfection des plasmides

Les cellules sont mises en culture à raison de 50 000 cellules / puits dans des plaques 48 puits. La transfection est réalisée sur des cellules à 60-80 % de confluence. Les transfactions sont réalisées avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Pour 1 µg de plasmide, 1 µl d'agent de transfection est utilisé dans 100 µl de DMEM. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées avec un volume de PBS puis le mélange de transfection est déposé sur les cellules. Après 4 heures d'incubation à 37°C, 150 µl de DMEM contenant 20 % de SVF sont ajoutés. Les cellules sont ensuite cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂.

c. Test de cytotoxicité

La cytotoxicité des cellules est déduite après la mesure de la survie cellulaire à l'aide du kit Promega CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Les cellules sont



incubées pendant 1 heure à 37°C avec une solution contenant un composé tetrazolium qui sera métabolisé par la cellule en un composé coloré si celle-ci est vivante. La mesure de la D.O est réalisée à 490 nm.

d. Extraction des acides nucléiques de cellules infectées

Après l'infection, l'ADN total viral contenu dans les cellules humaines est extrait à l'aide du kit commercial High pure viral nucleic acid kit (ROCHE). Les cellules sont lysées dans un tampon contenant 6 M de guanidine HCl et 0,75 mg/μl de protéinase K, 10 mM de Tris-HCl pH 4,4, 20 % de Triton X100 et 0,02 mg/μl de poly(A). Puis le mélange est incubé 10 min à 72°C. L'ADN extrait est précipité avec de l'isopropanol et purifié sur une colonne. Trois centrifugations d'une minute à 8000 g sont suivies d'ajout de tampon de lavage. La concentration de l'ADN récupéré est mesurée au nanodrop (ND-1000, Spectrophotometer).

L'ARN total contenu dans les cellules infectées est extrait avec le kit commercial Total RNA isolation Reagent (Ademtech). Les cellules sont lysées avec du réactif Ademtech auquel est rajouté du chloroforme. Le mélange est incubé 5 minutes à 4 °C puis centrifugé 5 minutes à 14000 rpm. La phase aqueuse est récupérée et l'ARN est précipité avec de l'isopropanol. Le mélange est incubé 30 min puis centrifugé 30 min à 14000 rpm. Le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 70 %. Après séchage, le culot est repris dans de l'eau DEPC et la concentration est mesurée au nanodrop.

e. Amplification

– Mutagénèses dirigées

Les mutagénèses ont été réalisées sur le pET-21b-IN et le pCMVΔ8.91 à l'aide de l'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Ozyme). Pour cela 100 ng de plasmide sont incubés avec 0.5 μM d'amorces correspondantes, 200 μM dNTPs, 3 % DMSO et 10 μl de tampon HF 5X dans un volume final de 50 μl. Après une étape de dénaturation de 30 secondes à 98 °C, l'amplification est réalisée par 20 cycles (10 sec à 98 °C, 45 sec à 60 °C et 1 min multipliée par le nombre de kb du plasmide à 72 °C c'est-à-dire 6 min pour le pET-21b-IN et 10 min pour le pCMVΔ8.91) et 10 minutes à 72°C.

La population de plasmides amplifiés est incubée avec l'enzyme de restriction DpnI qui va permettre de ne dégrader que les plasmides méthylés donc les plasmides d'origine produits



dans la bactérie. Le produit de mutagenèse est incubé avec 1 µl de DpnI pendant 1 heure à 37 °C puis de nouveau 1 µl de DpnI pendant 30 minutes à 37°C. Les bactéries sont ensuite transformées par les plasmides.

– PCR

Amplification du pet21b-IN pour séquençage

Afin d'amplifier les plasmides pet21b-IN mutés transformés dans la bactérie, nous avons réalisé des PCR sur colonie. L'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Ozyme) a été utilisée. 250 nM d'amorces pet-Rev et pet-For sont incubées avec 200 µM dNTPs, 10 µl de tampon HF 5X dans un volume final de 50 µl. Un cure dent stérilisé est utilisé pour introduire des bactéries dans le tube de PCR et les clones testés sont repiqués sur boîte de culture solide. Après une étape de dénaturation de 12 minutes à 94 °C, l'amplification est réalisée par 30 cycles (1 min à 94 °C, 1 minute à 55°C et 1 min à 72 °C) et 5 minutes à 72°C. Le produit attendu fait 900 pb.

Après vérification de la taille attendue sur gel agarose 1 %, les produits de PCR doivent être purifiés sur colonne S400 (GE Healthcare Life Sciences) pour être séquencés. Cette étape permet d'éliminer les amorces ainsi que le tampon de PCR.

PCR quantitative de l'ADN viral total

Les PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du kit IQ™ Sybergreen Supermix (Biorad). L'ADN viral est quantifié par amplification d'un fragment du gène *gag*. La réaction est réalisée avec 10 µl d'ADN extrait à partir des cellules humaines, 300 µM d'amorces (GAG F et GAG R2) et 12.5 µl de tampon de réaction dans un volume final de 25 µl. Le programme contient une phase de dénaturation à 95°C pendant 1 min 30 suivie de 42 cycles d'amplification (10 '' à 95°C, 20 '' à 60°C et 10 '' à 72°C). L'étalonnage est réalisé en amplifiant des dilutions sérielles du plasmide pNL4-3.

ADN viral intégré

Cellules infectées par le VIH-1

La détection de l'ADN viral intégré se fait par l'amplification entre le PBS viral et les séquences Alu qui sont des séquences répétées du génome. Lors de l'intégration dans le



génomique cellulaire, l'ADN viral se retrouve à proximité de ces séquences. La réaction est faite avec l'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Ozyme), 20 µl d'ADN extrait, 500 nM d'amorces (PBS et Alu-164), 200 nM de dNTP et 10 µl de tampon HF 5X dans un volume final de 50 µl. Après 30 secondes à 98°C, 35 cycles (10 sec à 98°C, 20 sec à 60°C et 2'30 à 72°C) et 5' à 72°C, l'amplification aboutit à l'obtention d'une population d'ADN hétérogène en taille reflétant l'insertion aléatoire dans le génome par rapport aux séquences Alu.

Une seconde PCR nichée permet d'homogénéiser la taille des fragments obtenus. Celle-ci est réalisée à l'aide du couple d'amorce NI-1/NI-2 avec 5 µl du produit de PCR –Alu. L'amplification est assurée par la Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Ozyme), 1X HF Phusion mix, 500 µM dNTP, 500 nM d'amorces. Après 12 min à 94°C, 42 cycles (94°C 1min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) et 5' à 72°C, l'amplification aboutit à l'obtention d'une bande de 351 pb.

Cellules infectées par les virus

La détection de l'ADN intégré après infection avec des virus se fait par PCR quantitative (protocole de la Plateforme de Vectorologie de Bordeaux Segalen). L'ADN viral est extrait des cellules 14 jours après l'infection et 20 ng d'ADN est utilisé. Les PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du kit TaqMan PCR master Mix. L'ADN viral est quantifié par amplification d'un fragment de 69 pb du gène EGFP. La réaction est réalisée avec 20 µM d'amorces (EGFP.F:GCGCACCATCTTCTTCAAGG ; EGFP.R:GTGTGCGCCCTCGAACTT CAC), 5 µM de sonde (CGGCAACTACAAGACCC) et 12.5 µl de tampon de réaction dans un volume final de 25 µl. Le programme contient après une étape initiale à 50°C pendant 2 min, une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 min suivie de 40 cycles d'amplification (15 sec à 95°C, 1 min à 60°C). Pour chaque échantillon, l'amplification est réalisée sur une région spécifique du lentivirus (sonde lenti) et sur le gène de la RNase P utilisé comme contrôle endogène qui permet de normaliser et de vérifier l'efficacité de la PCR. Deux lignées cellulaires contrôles contenant soit un, soit trois provirus intégrés sont employées comme standard et permettent d'estimer le nombre de provirus intégrés par quantification relative. Les résultats sont obtenus par comparaison des ΔCt à la lignée contrôle (1 copie) après normalisation des Ct par rapport au gène endogène (RNase P).



– Séquençage

Les réactions de séquences sont réalisées avec le BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystem). 20 ng du produit de PCR de 900 pb du pet21b-IN ou 200 ng de plasmide est utilisé pour réaliser la réaction. L'ADN est incubé avec 3.5 µl de Sequencing Buffer 5X, 1 µl de Big Dye Terminator 2.5 X et 3.2 pmoles d'amorce dans un volume final de 20 µl. Après une étape de dénaturation de 1 minute à 96 °C, l'amplification est réalisée avec une étape de 25 cycles (10 sec à 96 °C, 5 sec à 55 °C et 4 min à 60°C).

Les séquences sont ensuite précipitées avec 3 mM EDTA, 81 mM sodium acétate et 67 % éthanol pendant 15 minutes à température ambiante suivie d'une centrifugation à 2000 rpm pendant 30 minutes. Les séquences sont ensuite lavées avec de l'éthanol 70 %, à nouveau centrifugées à 2000 rpm pendant 30 minutes puis séchées. Les séquences sont réalisées à la Plateforme de Séquençage de Bordeaux 2. L'analyse des séquences se fait à l'aide du logiciel BioEdit.

f. Electrophorèses

– Tampons

TBE : 100 mM Tris-HCl pH 8 ; 83 mM acide borique ; 1 mM EDTA

Tampon de charge formamide 95 % : 10 mM Tris-HCl pH 8 ; 0.5 mM EDTA ; 7 M urée ; 0.1 % bleu de bromophénol ; 0.1 % xylène cyanol ; 30 % glycérol ; 95 % formamide.

– Gel d'agarose

La concentration du gel d'agarose est déterminée en fonction de la taille des échantillons à séparer : elle varie entre 0.8 % pour les plus grands et 2 % pour les plus petits fragments. La migration est réalisée à 100 Volts dans du TBE et la révélation de l'ADN se fait par visualisation de l'intercalant Sybr Safe (1/10000, Invitrogen) à 470 nm (Safe imager™ Invitrogen). La taille des produits est estimée grâce à la migration du marqueur de taille SmartLadder (Promega).

Si nécessaire, après migration sur gel d'agarose, la bande d'intérêt est découpée puis purifiée à l'aide du kit commercial Wizard SV Gel and PCR clean-Up System (Promega).



– Gel de polyacrylamide

Afin de séparer des fragments de très petites tailles radiomarqués (21 nt), des gels de polyacrylamide 12 %/7 M urée ont été utilisés. L'ADN est dénaturé dans un tampon de charge formamide 95 % et chauffé 3 min à 95°C avant d'être déposé sur gel. La migration est réalisée à 2000 volts pendant 2 heures dans du TBE. La visualisation des produits radioactifs se fait par autoradiographie.

4) Manipulation des protéines

a. Production d'intégrase recombinante

– A partir de bactérie

Une préculture est réalisée en ensemençant une colonie de Rosetta fraîchement transformée avec le pET-21b-IN dans 20 ml de LB + ampicilline (100 µg/ml) + chloramphénicol (34 µg/ml) durant la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, la préculture estensemencée dans 500 ml de LB complété avec de l'ampicilline et du chloramphénicol. La culture se poursuit jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,8. L'induction de la production de l'intégrase se fait par ajout d'IPTG (500 µM). La culture est laissée 3h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite centrifugées 10 min à 4000 rpm à 20°C. Les culots sont congelés à -80°C.

Tampons utilisés pour la cassure :

- Tampon de lyse : 50 mM HEPES pH 7,5 ; 5 mM EDTA pH 8 ; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; inhibiteurs de protéases (Roche).
- Tampon de solubilisation : 50 mM HEPES pH 7,5 ; 1 M NaCl ; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 7 mM CHAPS.

Tampons utilisés pour la purification :

- LSC (low salt concentration) : 50 mM HEPES pH 7,6 ; 0,2 M NaCl ; 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 7 mM CHAPS ; 10 % glycerol.
- HSC (high salt concentration) : 50 mM HEPES pH 7,6 ; 0,2 M NaCl ; 1 M sulfate d'ammonium, 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 7 mM CHAPS.



- Tampon de dilution : 50 mM HEPES pH 7,6 ; 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 7 mM CHAPS ; 10 % glycérol.
Tampon HS : 50 mM HEPES pH 7,6 ; 1 M NaCl ; 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 7 mM CHAPS, 10 % glycérol .

Les culots sont repris dans 20 ml de tampon de lyse, du lysozyme (20 mg/ml) et de la DNase (15 µl/ml RQI RNase free Promega) pour détruire la paroi bactérienne et casser l'ADN. Après sonication à 100 W pendant 20 secondes, une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min est ensuite réalisée. Le surnageant constitue la fraction soluble. Le culot est à nouveau lavé dans 20 ml de tampon de lyse puis centrifugé et repris dans 20 ml de tampon de solubilisation. Les protéines sont solubilisées 1h à 4°C sous agitation et ensuite centrifugées 1 h à 33000 rpm. On obtient un « surnageant 33000 rpm ».

Le surnageant est supplémenté avec du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 1M et agité doucement 5 min à 4°C. On centrifuge 20 min à 10 000 rpm à 4°C.

Le surnageant obtenu est alors chargé sur une colonne HiTrap Butyl Sépharose 4B (1 ml, Pharmacia) préalablement lavée avec 5 volumes de LSC puis équilibrée avec 5 volumes de HSC. L'élution se fait par un « step » de NaCl (1 à 0 M). La densité optique des fractions obtenues (250 µl) est lue à 280 nm. Les fractions qui correspondent au pic de DO sont rassemblées et diluées au 1/3 dans le tampon de dilution. Une deuxième colonne, HiTrap Héparine Sépharose CL-4B (1 ml, Pharmacia) est lavée avec 5 volumes de tampon HS puis équilibrée avec 5 volumes de tampon LSC. L'échantillon dilué est alors chargé sur la colonne. L'élution se fait par un choc ionique de NaCl (1 M). La fraction contenant l'IN (pic de DO) est diluée 4 fois dans du tampon de dilution puis rechargée sur une seconde colonne d'Héparine Sépharose CL-4B. L'élution est faite cette deuxième fois par un gradient de NaCl (0,2 à 1 M). Les fractions contenant l'IN sont conservées à -80°C. Les fractions purifiées sont analysées par SDS-PAGE 12 % suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

– A partir de la levure

L'intégrase produite chez la levure a été précédemment produite en cultivant des levures transformées par pHIVSF2-IN comme décrit dans Caumont et al, 1999 [197]. Après lyse des levures, l'intégrase est purifiée au laboratoire de la même façon que pour l'intégrase produite chez la bactérie.



b. Production de transcriptase inverse recombinante

La RT produite chez la levure LG 171 a été précédemment produite en cultivant les levures transformées par pAB24/RT-7 puis purifiée comme décrit dans Sallafranque-Andreola et al. [201].

c. Production d'eIF2 α recombinant

Une préculture est réalisée en ensemençant une colonie de BL21(DE3) plysS fraîchement transformée avec le peIF2 α -396 dans 10 ml de LB + ampicilline (285 mM) durant la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, la préculture estensemencée dans 500 ml de LB complémentée avec de l'ampicilline et du chloramphénicol La culture se poursuit jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,8. L'induction de la production de eIF2 α se fait par ajout d'IPTG (500 μ M). La culture est laissée 3h à 30°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite centrifugées 5 min à 5000 rpm à 20°C. Les culots sont congelés à -80°C.

Tampon utilisé pour la cassure :

- Tampon de lyse : 20 mM Tris pH 7,5 ; 1 mM DTT; 500 mM NaCl; 10 % Glycérol ; 20 mM imidazole ; inhibiteurs de protéases (Roche).

Les culots sont repris dans 20 ml de tampon de lyse, du lysozyme (20 mg/ml), du PMSF (1 mM final) et de la DNase (15 μ l/ml RQI RNase free Promega) pour détruire la paroi bactérienne et casser l'ADN. Après incubation 15 minutes à 0 °C et sonication 3 fois à 100 W pendant 20 secondes, le surnageant est passé à travers une aiguille de seringue de 1.2 mm de diamètre puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 min.

Tampons de purification

- Tampon 500 mM imidazole : 20 mM Tris pH 7.5 ; 1 mM DTT ; 500 mM NaCl ; 10 % Glycérol ; 500 mM imidazole.
- Tampon 20 mM imidazole : 20 mM Tris pH 7.5 ; 1 mM DTT ; 500 mM NaCl ; 10 % Glycérol, 20 mM imidazole.



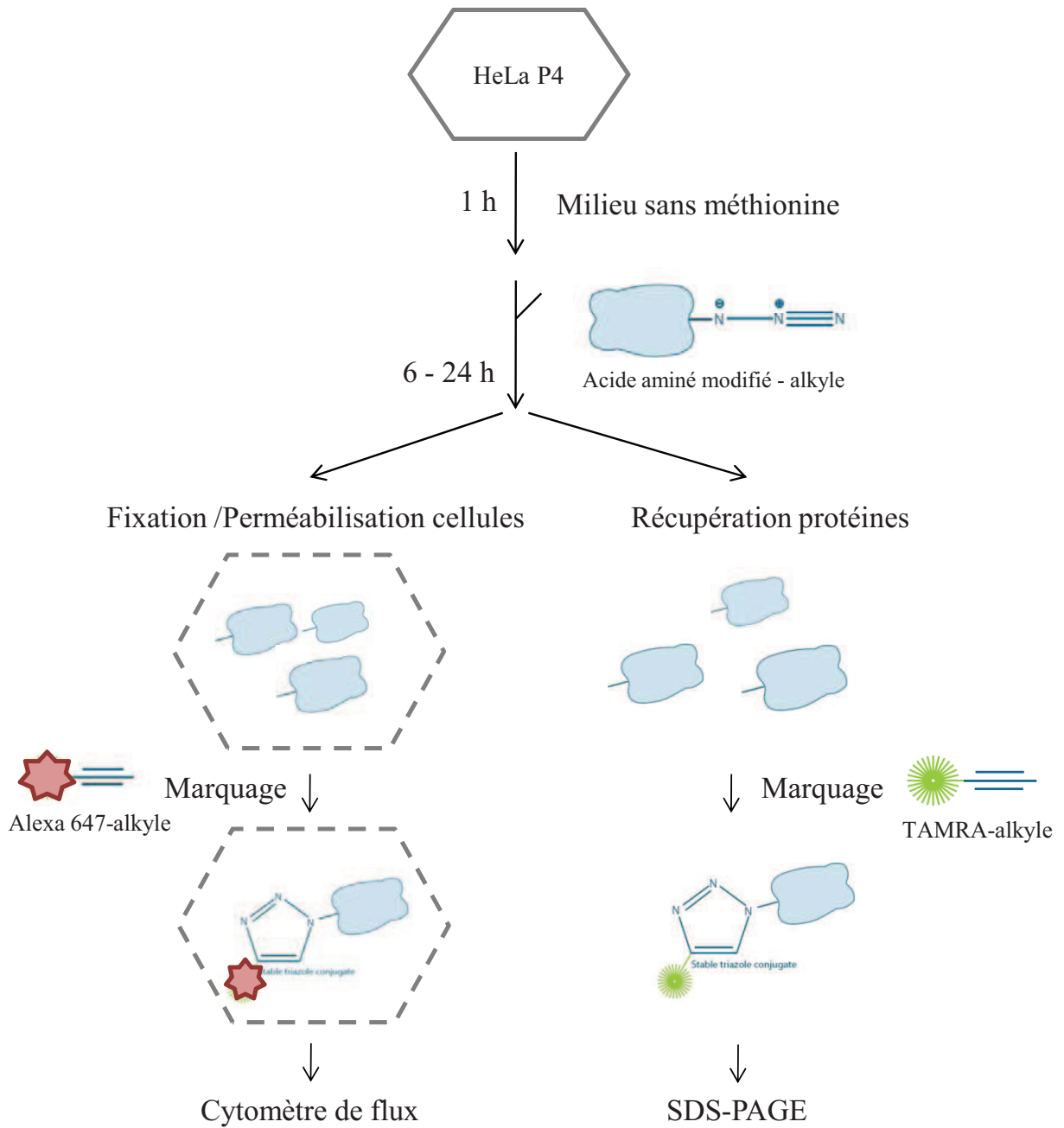


Figure 46. Techniques de détection des protéines néosynthétisées.

Le surnageant est passé sur une colonne His-Trap de 1 ml préalablement lavée avec 5 volumes de colonne de tampon 500 mM imidazole puis équilibrée avec 5 volumes de tampon 0 mM imidazole. L'élution se fait avec un « step » de 250 mM imidazole. La densité optique des fractions obtenues (250 µl) est lue à 280 nm. Les fractions contenant eIF2 α sont conservées à -80°C. Les fractions purifiées sont analysées par migration sur gel SDS-PAGE 12 % suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

d. Détection des protéines néosynthétisées

La détection des protéines néosynthétisées a été réalisée soit à l'aide du Click-it™ protéin analysis detection kit (Invitrogen) pour la détection par SDS-PAGE soit à l'aide du Click-iT® Cell Reaction Buffer Kit (Invitrogen) pour la détection par cytométrie de flux (**Figure 46**). 500 000 cellules HeLa P4 sont ensemencées dans des flasques de 25cm². Le lendemain les cellules sont lavées avec du PBS puis cultivées pendant 1 heure dans un milieu sans méthionine (DMEM sans Methionine, sans leucine, Sigma). Ensuite le milieu est complété avec 25 µM de Click-iT® AHA (L-azidohomoalanine) qui est un analogue d'acide aminé fusionné à un azide. Les cellules sont cultivées à 37°C pendant 6 à 24 h puis lavées 2 fois avec du PBS et décollées avec de la trypsine. Ensuite les cellules sont traitées soit pour être analysées sur SDS-PAGE soit par cytométrie de flux.

Analyse sur SDS-PAGE

Les cellules sont comptées puis lysées dans 50 µl de tampon de lyse (50 mM Tris- HCl pH 8 ; 1 % SDS ; inhibiteurs de protéases ; inhibiteurs de phosphatases). Incuber 15 minutes sur la glace, vortexer et centrifuger 5 minutes à 13000 g.

Ensuite les protéines sont marquées avec du TAMRA-alkyne selon les instructions du fournisseur. 20 µg de protéines est analysé par SDS-PAGE 12 %. Les protéines fluorescentes sont visualisées à 550 nm. Le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de fixer les protéines et de vérifier la quantité de protéine déposée.

Analyse par cytométrie de flux

Les cellules sont lavées avec du PBS. Après trypsinnisation, le culot de cellules est fixé avec 150 µl de paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules



Nom	Clone	Cible	Source	Espèce	Tampon saturation	Dilution WB
Actine	Polyclonal	Partie N-terminale de l'actine (humain, rat, souris, poulet, grenouille).	Sigma (Ref A2103)	Lapin	PBS/BSA 1%	1/2000
DDK	Polyclonal	DDK	Origene (Ref Ta50011)	Souris	PBS/BSA 1%	1/1000
EGFP	Monoclonal	<i>Aequorea victoria</i> green fluorescent protein	Linving Colors® A.v. Monoclonal Antibody (JL-8) (Ref 632381)	Souris	PBS/BSA 1%	1/1000
GCN2	Polyclonal	Partie N-terminale de GCN2 humain	Cell Signaling Technology® (Ref 3302)	Lapin	TBS/Tween 0.1%/Lait 5%	1/1000
GCN2-P	Polyclonal	GCN2 phosphorylée sur la Thréonine 898	Cell Signaling Technology® (Ref 3301)	Lapin	TBS/Tween 0.1%/Lait 5%	1/1000
IN	Polyclonal	Intégrase du VIH-1	BioProduct (Ref AB-INT 100)	Lapin	PBS/BSA 1%	1/2000
RAD51	Polyclonal	Acides aminés 24-41 de rad51 humain	Sigma (Ref R1528)	Lapin	PBS/BSA 1%	1/1000
His-Tag	Monoclonal	Tag 6 histidines	Novagen® (Ref 70796-4)	Souris	PBS/BSA 1%	1/1000

Tableau 4. Liste des anticorps primaires utilisés au cours de ce travail.

sont centrifugées 5 min à 2000 rpm puis perméabilisées avec 150 µl d'un mélange de PBS; saponine 0.1% ; BSA 1% pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot est centrifugé 5 min à 2000 rpm puis lavé avec 500 µl de PBS/BSA 3% et à nouveau centrifugé. Les cellules sont reprises dans 500 µl de Click-iT® reaction cocktail (1X Click-iT® cell reaction buffer; CuSO₄ ; Click-iT® cell buffer additive; Alexa Fluor® 647 alkyne), le mélange est incubé 30 min à l'abri de la lumière. Les cellules sont centrifugées 5 min à 2000 rpm, reprise dans 200 µl de PBS/EDTA 0.2 mM et analysées par cytomètre de flux (Fortessa, Becton Dickinson).

e. Gels de protéines et Western Blot

– Migration sur gel dénaturant

- Tampon d'électrophorèse : 25 mM Tris-HCl pH 8.3 ; 192 mM glycine ; 0.1 % SDS.
- Gel de concentration : 5 % acrylamide ; 0.13 % bis-acrylamide ; 125 mM Tris-HCl pH 6.8 ; 0.1 % SDS.
- Gel de séparation : acrylamide ; bis-acrylamide ; 375 mM Tris-HCl pH 8 ; 0.1 % SDS.
- Tampon de charge protéine : 2 % SDS ; 80 mM Tris pH 6.8 ; 10 % glycérol ; 100 mM DTT ; 0.01 % bleu de bromophénol.

Les échantillons sont dilués dans du tampon de charge protéine et dénaturés 3 minutes à 95°C avant dépôt sur gel. Les protéines sont soit colorées au bleu de Coomassie, au nitrate d'argent compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse le cas échéant (ProteoSilver™, SIGMA), ou soumises à un Western blot.

– Western blot

Après migration, le gel est transféré sur membrane de PVDF. Le transfert à sec est réalisé avec un i-blot™ Dry Blotting System (Invitrogen). Le temps de transfert dépend de la taille de la protéine d'intérêt. La membrane est ensuite saturée 1 heure avec le tampon recommandé par le fabricant, puis incubée la nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine, dilué dans une solution de PBS/BSA 0.3 %. Les dilutions d'anticorps primaires utilisées sont indiquées dans le **Tableau 4**. Après trois lavages avec une solution de PBS, la membrane est incubée 2 heures avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la peroxydase



dilué au 1/5000ème dans une solution de PBS/BSA 0.3 %. La membrane est lavée 3 fois dans du PBS puis peut être révélée par 2 techniques : soit une solution de révélation (0.03 % chloronaphtol ; 8.5 % ethanol ; 0.02 % H₂O₂ ; PBS) qui va produire un composé coloré insoluble, soit par incubation avec le SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific, Pierce) et la visualisation se fait par autoradiographie.

f. Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations entre GCN2h et IN ont été réalisées à partir de lysat de cellules humaines surexprimant GCN2-DDK. Pour cela des cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide pCMV6-EIF2AK4 comme décrit dans le Paragraphe B3b. Les cellules sont lysées 48 h après transfection dans un tampon de lyse froid L (20 mM Tris pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 1 % Triton X-100) supplémenté d'inhibiteur de protéases et de phosphatases. La plaque est laissée 1h sur la glace et les lysats sont ensuite centrifugés 10 min à 13 000 rpm à 4°C pour éliminer les nucléoprotéines.

50 µl de lysat correspondant à 2 puits de plaque 48 (120 000 cellules/puits) est utilisé pour faire une immunoprécipitation. Lors de co-immunoprécipitation avec l'IN, 1 µg d'intégrase recombinante purifiée à partir de la levure est ajouté et incubé 2 heures à 4°C sous légère agitation. Le lysat est incubé avec l'anticorps primaire de souris anti DDK au 1/50 pendant la nuit à 4°C sous légère agitation. Le lendemain est ajouté l'anticorps secondaire anti souris couplé à des billes magnétiques (9 µl pour 50 µl de lysat). L'incubation est réalisée 2 heures à 4°C sous légère agitation. Les billes magnétiques sont lavées 3 fois avec du PBS puis reprises dans 20 µl de tampon de charge pour protéine complémenté avec 5 % urée afin de décrocher les complexes protéiques des billes magnétiques. Les protéines sont chauffées 5 min à 95°C puis déposées sur SDS-PAGE 10 %. Les protéines immunoprécipitées sont ensuite analysées par western blot.

5) Tests in vitro

a. Activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT

L'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT consiste à mesurer l'incorporation de nucléotides radiomarqués sur une matrice-amorce polyA-oligodT₍₁₂₋₁₈₎ (2,4 OD). La RT



recombinante est incubée en présence de 50 mM Tris-HCl pH 7,8 ; 5 mM DTT ; 5 mM MgOAc ; 60 mM KCl ; 0,5 μ Ci de [3 H] TTP (31 Ci / mmol) et de polyA-oligo dT₍₁₂₋₁₈₎, pendant 15 min à 37 ° C dans un volume final de 50 μ l. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de TCA 10%-PPi 0.1 M. Les échantillons sont filtrés sur filtres de nitrocellulose, lavés et la radioactivité est mesurée avec un compteur à scintillation (Wallac 1409).

L'activité ADN polymérase ARN dépendante des lentivirus pseudotypés VSV-G a été mesurée après perméabilisation des particules virales puis ajout d'une matrice-amorce polyA oligodT₍₁₂₋₁₈₎.

- Tampon NTE 10X : 100 mM Tris HCl pH 7.8 ; 1 M NaCl ; 50 mM EDTA.
- Tampon ADN pol : 50 mM Tris pH 8 ; 10 mM DTT ; 5 mM MgOAc ; 0,5 μ Ci de [3 H] TTP (31 Ci / mmol) ; polyA oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ (2.4 DO).

Un volume de virion correspondant à 220 ng de p24 est incubé dans 0.3 % Triton X100 dans du tampon NTE. La perméabilisation se fait pendant 15 minutes à température ambiante.

La réaction est réalisée pendant 30 minutes à 37°C dans le tampon ADN pol (volume final 60 μ l) avec une concentration finale de KCL de 60 Mm. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de TCA 10 %-PPi. Les échantillons sont filtrés sur filtres de nitrocellulose, lavés et la radioactivité est mesurée avec un compteur à scintillation (Wallac 1409).

b. Activités de l'intégrase

– Activité de 3'-end Processing et transfert de brin

Afin de réaliser les tests d'activités *in vitro* de l'intégrase, des ODNs ont été marqués radioactivement (**Tableau 1**). Les ODNs (20 pmoles) sont incubés 1 heure à 37°C avec 5 μ Ci de [γ ³²P] ATP (5000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) en présence de polynucléotide kinase du phage T4 (Promega).

Préparation des ODNs radiomarqués

Le substrat utilisé pour la réaction de 3'-end Processing est un hybride entre les ODN 70 et ODN 72 (**Tableau 1**) correspondant aux 21 nucléotides de la partie U5 du LTR viral. Le



substrat utilisé pour la réaction de transfert de brin est un hybride entre les ODN 70 et ODN 71 (**Tableau 1**) correspondant aux nucléotides de la partie U5 du LTR viral obtenue après réaction de processing. L'ODN 70 est préalablement radiomarqué au [γ - 32 P] ATP (5000 ci/mmmole, Perkin Elmer) pendant 1 h à 37°C par la polynucléotide kinase du phage T4 (Promega). L'ODN 72 (30 pmoles) est ensuite ajouté. Les ODN sont hybridés en chauffant 3 min à 95°C et en faisant baisser lentement la température. Les ODNs sont conservé à -20°C.

Réaction

- Tampon réactionnel : 20 mM HEPES pH 7.6 ; 10 mM DTT ; 0.05 % NP40 ; 7.5 mM MnCl₂.
- Mix urée : 0.78 M urée ; 4.5 mM EDTA ; 0.3 M acétate de sodium ; 0.75X TE ; 0.2 mg/ml glycogène.

40 nM de substrat est incubé dans le tampon réactionnel avec des quantités variables d'intégrase (0 à 500 nM) pendant 1 heure à 37°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 90 μ l de mix urée, puis 100 μ l d'un mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (24/24/1 ; v/v/v). Les échantillons sont vortexés puis centrifugés 5 min à 12000 rpm. La phase aqueuse est récupérée, l'ajout de 250 μ l d'éthanol 100 % permet de précipiter l'ADN pendant 1 nuit à -20 °C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 12000 rpm à 4°C. Puis le surnageant est enlevé et les culots séchés. La radioactivité est mesurée avec un compteur à scintillation (Wallac 1409). Les ODN sont repris dans du tampon formamide 95 %, à raison de 10000 cpm/ μ l.

Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide 12 % urée 7M après chauffage 3 minutes à 95°C. La migration se fait dans du tampon TBE. Ensuite le gel est soumis à une autoradiographie à -80°C avec les films Biomax (Kodak) soit 2 heures pour visualiser les produits de processing, ou 1 nuit pour les produits de transfert de brin.

c. Expériences de pontage au DSS

60 pmoles d'intégrase sont incubées dans un tampon (100 mM HEPES pH7.6 ; DSS 2 mM) pendant 30 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de tampon de charge protéine avec urée 5 %. Les produits sont visualisés après migration sur gel SDS-PAGE 12 %, transfert sur membrane de nitrocellulose et western blot.



d. Tests de phosphorylation

Des cellules stressées par carence en sérum ou cultivées en DMEM complet sont lysées dans du tampon de lyse froid supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases (100 mM NaF, 100 mM Na_3VO_4 , 20 mM β -Glycérophosphate). 20 μg d'extraits cellulaires sont pré-incubés avec 2,5 mM d'ATP pendant 20 min à 30°C. Ensuite 2 μg d'intégrase produite chez la bactérie est incubée en présence d'extraits cellulaires puis du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP est ajouté. La réaction est laissée 1 h à 37°C. Les échantillons sont ensuite analysés sur gel SDS-PAGE 12 % après ajout de 10 μl de tampon de charge protéine. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie et la phosphorylation est révélée par autoradiographie.

Des tests de phosphorylation ont été réalisés entre GCN2, eIF2 α et l'IN recombinante. eIF2 α et IN sont produites au laboratoire. GCN2 recombinante purifiée a été commandée (SignalChem). Les protéines sont incubées dans un mix de phosphorylation (40 mM Tris HCl pH 7.9 ; 12.5 mM NaCl ; 2 mM MgCl_2 ; 0.2 mM DTT ; 2 μM ATP froid ; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (6000 ci/mmmole, Perkin Elmer)) pendant 30 min à 37°C. Les échantillons sont ensuite analysés sur gel SDS-PAGE 12% après ajout de 10 μl de tampon de charge. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie et la phosphorylation est révélée par autoradiographie.



RESULTATS & DISCUSSION



Chapitre 1 : La phosphorylation de l'intégrase



.....
5	15	25	35
<u>MALNGIDKAO</u>	<u>EDHEKYHSNW</u>	<u>RAMV</u> S <u>DFNLP</u>	<u>PVVAKEIVAS</u>
.....
45	55	65	75
<u>CDKQQLKGEA</u>	<u>MHGQVDCSPG</u>	<u>IWQLDCTHLE</u>	<u>GKIILVAVHV</u>
.....
85	95	105	115
<u>ASGYIEAEVI</u>	<u>PAETGOETAY</u>	<u>FLLKLAGRWP</u>	<u>VKTIHTDNGS</u>
.....
125	135	145	155
<u>NFTSTTVKAA</u>	<u>CWWAGIKQEF</u>	<u>GIP</u> Y <u>NPOSQG</u>	<u>VVESMNNELK</u>
.....
165	175	185	195
<u>KIIGQVRDQA</u>	<u>EHLKTAVOMA</u>	<u>VFIHNFKRKG</u>	<u>GIGGYSAGER</u>
.....
205	215	225	235
<u>IVDIIATDIO</u>	<u>TKELQKQITK</u>	<u>IQNFRVYYRD</u>	<u>NKDPLWKGPA</u>
.....
245	255	265	275
<u>KLLWKGEGAV</u>	<u>VIQDN</u> S <u>DIKV</u>	<u>VPRRKAKIIR</u>	<u>DYGKQ MAGDD</u>
.....			
285			
CVASRQDED			

Figure 47. Résultats d'analyse par spectrométrie de masse.

5 µg d'IN issue de purification à partir de la levure sont analysés à la Plateforme de Spectrométrie de Masse de Bordeaux 2. Les différents peptides identifiés par l'analyse sont soulignés. Les modifications correspondant à une phosphorylation sont surlignées en rouge.

Chapitre 1 : La phosphorylation de l'intégrase

A. Objectifs

L'intégrase est impliquée dans différentes étapes où des modifications post-traductionnelles pourraient avoir un rôle à jouer (transcription inverse, transport du PIC vers le noyau, import nucléaire, oligomérisation de l'IN, interaction avec différents partenaires, ou élimination de l'IN après intégration...). Nous avons donc effectué la recherche de modifications post-traductionnelles de l'intégrase recombinante purifiée à partir de la levure par des études de spectrométrie de masse.

Ces études nous ont permis d'identifier plusieurs phosphorylations de l'intégrase de VIH-1. Nous avons recherché la présence de ces phosphorylations dans le contexte de l'infection des cellules humaines et les résultats obtenus nous ont orientés vers l'étude du rôle de la phosphorylation de la sérine 24 au cours du cycle viral. Dans ce but, des virus portant l'intégrase mutée au niveau de la sérine 24 ont été produits et leur infectiosité a été étudiée. Nous avons également regardé l'importance de ces mutations sur l'activité de l'intégrase *in vitro* et nous avons réalisé des tests de phosphorylation de l'intégrase *in vitro*.

B. Identification de la phosphorylation

Pour identifier une phosphorylation sur l'intégrase nous avons tout d'abord effectué une recherche à partir d'intégrase recombinante purifiée au laboratoire exprimée dans la levure. Pour cela 5 µg d'enzyme sont analysés sur SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie puis la bande correspondante est découpée et soumise à une analyse à la Plateforme de Spectrométrie de Masse de Bordeaux 2. L'enzyme a été digérée avec de la trypsine puis soumise à une analyse de type LC/MS-MS.

Les analyses montrent que les peptides identifiés couvrent environ 80 % de la séquence de l'intégrase (**Figure 47**) et que celle-ci présente plusieurs modifications post-traductionnelles notamment 3 phosphorylations sur les résidus suivants : S24, Y143 et S256. Ces



phosphorylations ont été détectées dans deux souches de levures différentes. Nous avons pu montrer la présence de phosphorylation sur l'intégrase produite chez la levure. Si ces phosphorylations ont une importance pour l'infection, celles-ci devraient pouvoir être détectées à un moment du cycle viral. L'intégrase pourrait être phosphorylée lors de l'infection de la cellule entre les étapes d'entrée et d'intégration. L'intégrase traduite après intégration pourrait également être phosphorylée dans la cellule sous la forme du précurseur pr160^{gag} ou bien dans les virions après maturation. L'intégrase pourrait être phosphorylée dans les cellules humaines hors du contexte de l'infection. Nous avons donc analysé par spectrométrie de masse l'intégrase surexprimée dans les cellules humaines, présente dans les cellules lors de l'infection et dans les virions.

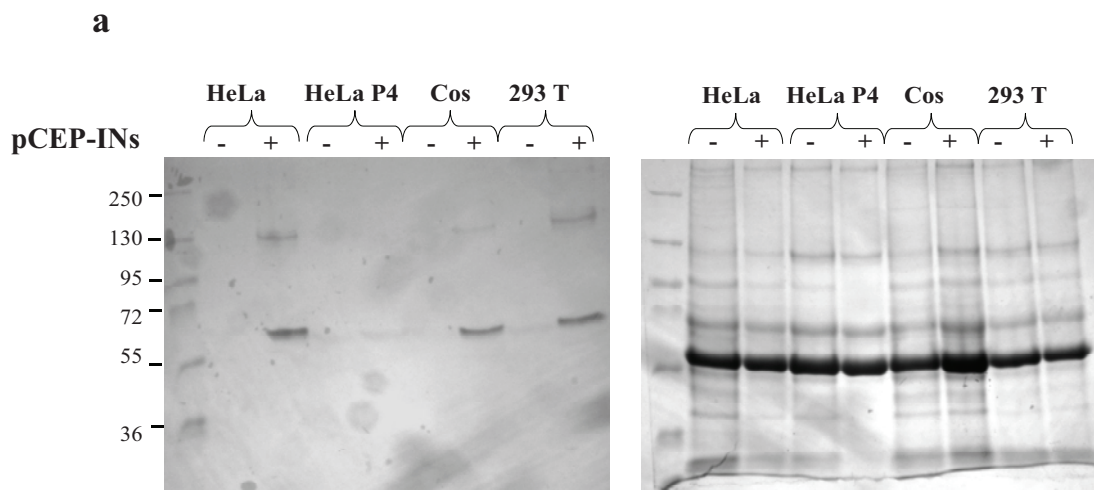
1) Dans les cellules humaines

a. Mise au point de l'expression

Le premier point que nous avons étudié a été de voir si l'IN exprimée dans les cellules humaines en dehors du contexte viral, peut être phosphorylée. Nous avons tout d'abord réalisé la mise au point de l'expression de l'IN dans les cellules humaines au laboratoire. Il n'est pas possible d'exprimer l'intégrase seule dans des cellules humaines. En effet, la séquence des ARN messagers de *pol* et *env* comporte des Cis-Acting repressor sequence (CRS) [202] qui empêchent l'export des ARN produits dans le cytoplasme. Seule la fixation de la protéine Rev sur RRE permet le transport de ces ARNs. Les ARNs messagers étant retenus dans le noyau, il n'y a pas de traduction de protéines. Nous avons utilisé le plasmide pCEP-INS qui nous a été gracieusement donné par le Dr. Debyser. Un gène synthétique de l'intégrase, a été dessiné par l'équipe de Debyser et synthétisé. Les modifications portent au niveau de la séquence en acides nucléiques sur la base wobble afin de conserver la séquence en acides aminés de l'IN mais d'éliminer les cis acting repressor sequence sur l'ARN [199]. Ainsi lorsque l'on procède à un alignement de séquence, l'on observe que la séquence en acides nucléiques présente 30 % de différences alors que la séquence d'acides aminés entre l'IN HXB2 et l'IN codée par le gène synthétique est homologue à 100 %. L'intégrase synthétique (INS) est fusionnée à l'EGFP afin permettre sa détection par cytométrie de flux, ce qui lui donne une taille de 58 kDa.

Afin d'améliorer la surexpression de la protéine dans les cellules humaines, nous avons testé l'expression de l'INS dans 4 types de cellules de mammifères. La surexpression de la protéine





b

	pEGFP-C2	pCEP-INs
HeLa P4	73 %	8 %
293T	74 %	43 %
HeLa	85 %	36 %
Cos	73 %	21 %

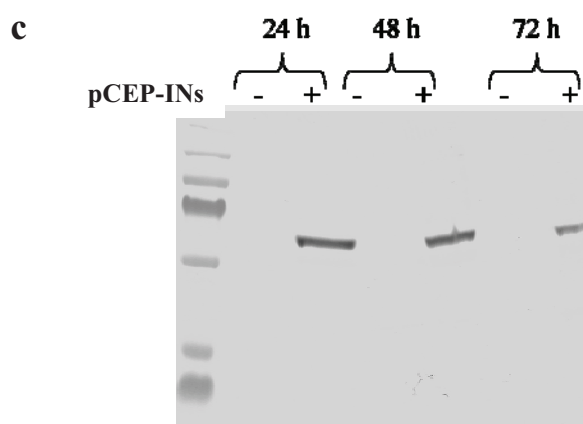


Figure 48. Expression de l'INs-EGFP dans les cellules humaines

(a) 50 000 cellules sont transfectées avec 1 μ g de pCEP-INs puis lysées 24h après. Les protéines sont analysées sur SDS-page 12% coloré au coomassie (**gel de droite**) ou transférées sur membrane puis un western blot est réalisé en utilisant un anticorps anti IN (**gel de gauche**).

(b) 50 000 cellules sont transfectées avec 1 μ g de pCEP-INs ou de pEGFP-C2 puis décollées 24h après. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1X. La fluorescence de la GFP est mesurée sur un Facs Calibur à 450 nm.

(c) Les 293T sont transfectées avec 1 μ g de pCEP-INs puis lysées à 24, 48 et 72h après. Les protéines sont analysées par western blot.

a été analysée par cytométrie de flux afin de contrôler la transfection du plasmide et la quantité de protéine surexprimée et par Western blot afin de visualiser la qualité de l'intégrase. Nous disposons au laboratoire de 4 lignées de cellules de mammifères que nous avons utilisés pour notre étude : les HeLa, les HeLa P4, les HEK 293T et les COS.

Les cellules sont transfectées avec 1 µg de pCEP-INS puis les protéines sont récupérées 24 h après transfection et analysées par western blot avec un anticorps anti-INS. Un contrôle de cellules non transfectées est utilisé pour chaque type cellulaire. L'INS-EGFP est détectée à la taille attendue de 58 kDa pour chaque type cellulaire excepté les HeLa P4 (**Figure 48a gauche**). Le western blot permet de détecter le monomère à 58 kDa mais également une bande aux alentours de 130 kDa qui pourrait être du dimère d'INS-EGFP. Les protéines ont également été analysées par coloration au bleu de Coomassie après migration. Le gel permet de voir qu'une même quantité de protéines a été déposée pour chaque piste (**Figure 48a**).

La fusion entre l'INS et l'EGFP permet de suivre la surexpression de la protéine en mesurant la fluorescence de l'EGFP. Les cellules sont soit transfectées avec le plasmide pCEP-INS soit avec un plasmide contrôle pEGFP-C2. Les cellules sont préparées et analysées par cytométrie de flux 24 h après la transfection. Les analyses montrent que toutes les cellules sont correctement transfectées, entre 73 et 85 % (**Figure 48b**). Pourtant toutes les cellules n'expriment pas autant d'INS-EGFP. En effet, seule 8 % des HeLa P4 expriment de l'INS alors que 43 % des 293T expriment de la protéine. Il n'est donc pas étonnant que nous ne détectons que peu de protéine par western blot. Les HeLa et les COS se situent quand à elles à des niveaux d'expressions intermédiaires.

Nous avons décidé de conserver les 293T puisque c'est le type cellulaire qui est le plus adapté à la traduction de l'INS-EGFP. Afin de connaître les conditions optimales pour l'expression de l'INS, nous avons réalisé une cinétique de surexpression. Les cellules sont transfectées avec le plasmide pCEP-INS ou pEGFP-C2 puis les protéines sont récupérées à 24, 48 et 72 h et une même quantité de protéines de chaque extrait est analysées par western blot.

Nous pouvons voir qu'une quantité importante d'INS est produite dès 24h après transfection (**Figure 48c**). A 48h, la quantité d'INS produite reste égale puis diminue à 72h. Les protéines des cellules transfectées avec le pCEP-INS peuvent donc être récupérées dès 24 h après transfection.



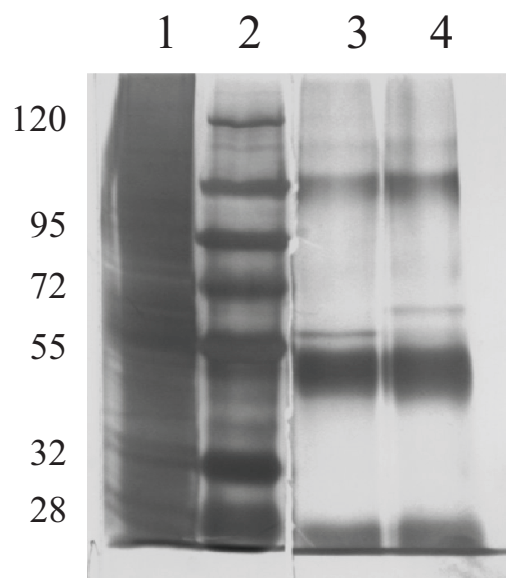


Figure 49. Immunoprécipitation de l'INs-EGFP.

Les 293T sont transfectées avec 1 μg de pCEP-INs puis lysées 24h après avec du tampon de lyse L (20 mM Tris pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 1% Triton X-100). Les protéines sont incubées avec l'anticorps anti EGFP au 1/50 pendant la nuit à 4°C sous légère agitation. Puis des anticorps secondaires couplés à des billes magnétiques sont rajoutés et laissés incubés pendant 2 heures. Les protéines sont analysées sur SDS-PAGE 12% coloré au nitrate d'argent compatible avec la spectrométrie de masse.

(1) Lysat cellulaire ; (2) Marqueur de taille ; (3) Immunoprécipitation sur lysat de 293T transfectées avec le pCEP-INs ; (4) Immunoprécipitation sur lysat de 293T non transfectées.

b. Phosphorylation dans les 293T

Nous avons réalisé des immunoprécipitations de l'INs-EGFP à partir des protéines récupérées 24h après transfection. Celles-ci sont incubées avec l'anticorps anti EGFP au 1/50 pendant la nuit à 4°C sous légère agitation. Le lendemain, des anticorps secondaires couplés à des billes magnétiques sont rajoutés et laissés incuber pendant 2 heures. Les protéines sont analysées sur SDS-PAGE 12% coloré au nitrate d'argent. Nous pouvons voir que l'immunoprécipitation permet d'éliminer une grande partie des protéines cellulaires contaminantes (**Figure 49, lignes 1 et 3**). D'autre part, nous détectons une protéine aux alentours de 55 kDa dans la piste des cellules transfectées (**Figure 49, ligne 3**) que nous ne détectons pas dans la piste des cellules transfectées avec le plasmide contrôle (**Figure 49, ligne 4**). Nous supposons donc que cette bande correspond à l'INs, et celle-ci a donc été découpée et envoyée pour analyse par spectrométrie de masse.

L'étude a permis de montrer que la bande découpée correspond effectivement à l'INs couplée à l'EGFP qui fait une taille de 58 kDa. Après plusieurs analyses, il n'a pas pu être mis en évidence de phosphorylation de l'intégrase. Cependant il semblerait que la quantité de protéines analysées soit trop faible pour permettre la détection des phosphorylations par spectrométrie de masse.

2) Phosphorylation dans les virions

Il est possible que l'intégrase soit phosphorylée dans les virions. Afin de détecter une phosphorylation de l'intégrase nous avons utilisé $25 \cdot 10^9$ particules de VIH-1 issues de 25 ml de surnageant viral produit par co-culture de cellules MT4 et H9 [200]. Le surnageant est décongelé et centrifugé sur un coussin de sucrose 20 % afin de concentrer les particules virales pendant 1 h à 30000 rpm puis le culot est repris dans du tampon de charge protéine. La totalité des protéines virales sont déposées sur SDS-PAGE 12 % afin de ne perdre aucun matériel puis le gel est coloré au nitrate d'argent compatible avec la spectrométrie de masse. Une bande de protéine est alors découpée au niveau de la taille attendue pour l'intégrase et analysée par spectrométrie de masse. Les analyses ont permis d'identifier l'intégrase avec une couverture de séquence d'environ 71 %, cependant aucune phosphorylation n'a pu être détectée.



3) Phosphorylation dans les cellules infectées

Nous avons utilisé notre modèle cellulaire d'infection, des HeLa P4, pour réaliser la détection de la phosphorylation de l'intégrase. Pour cela $0,5 \cdot 10^6$ cellules sont ensemencées dans 20 flasques 75 cm² puis infectées à 70 % de confluence avec une M.O.I de 10. Les cellules sont cultivées pendant 6 heures puis récupérées après trypsinisation. Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse L froid (20 mM Tris pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 1% Triton X-100) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases puis une immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps anti IN. Les protéines sont séparées sur SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent compatible avec la spectrométrie de masse. Une bande de protéine est alors découpée au niveau de la taille attendue pour l'intégrase et analysée par spectrométrie de masse. Les résultats des analyses ont permis d'identifier plusieurs peptides correspondant à l'intégrase. Un peptide comprenant la sérine 24 a été identifié avec un delta de masse. Cependant l'analyse n'a pu montrer si ce delta de masse correspond à une phosphorylation. Il s'avère que la quantité de protéine n'est pas suffisante. Ces résultats sont donc très encourageants et il est nécessaire de répéter l'expérience en augmentant la quantité de protéines analysées. Cependant, étant donné les limites de la spectrométrie de masse, nous avons décidé de regarder par d'autres approches si la phosphorylation de la sérine 24 a un rôle au cours du cycle viral.

C. Rôle de la phosphorylation

Un alignement des séquences de plusieurs intégrase de VIH-1 issues de patients infectés montre que la sérine 24 est un acide aminé très conservé parmi ces différents isolats. Afin de déterminer l'importance de la phosphorylation sur le cycle viral, des mutations au niveau de la sérine 24 ont été introduites soit pour mimer une phosphorylation (D) soit pour mimer une non phosphorylation (A ou C). Les mutations ont dans un premier temps été introduites sur un plasmide permettant de produire des virus dont l'intégrase est mutée afin d'étudier le rôle sur le cycle viral. D'autre part, les mutations ont été introduites dans la séquence codant l'IN sur un plasmide permettant de produire et surexprimer l'intégrase recombinante afin d'étudier l'effet des mutations sur l'activité de l'enzyme *in vitro*.



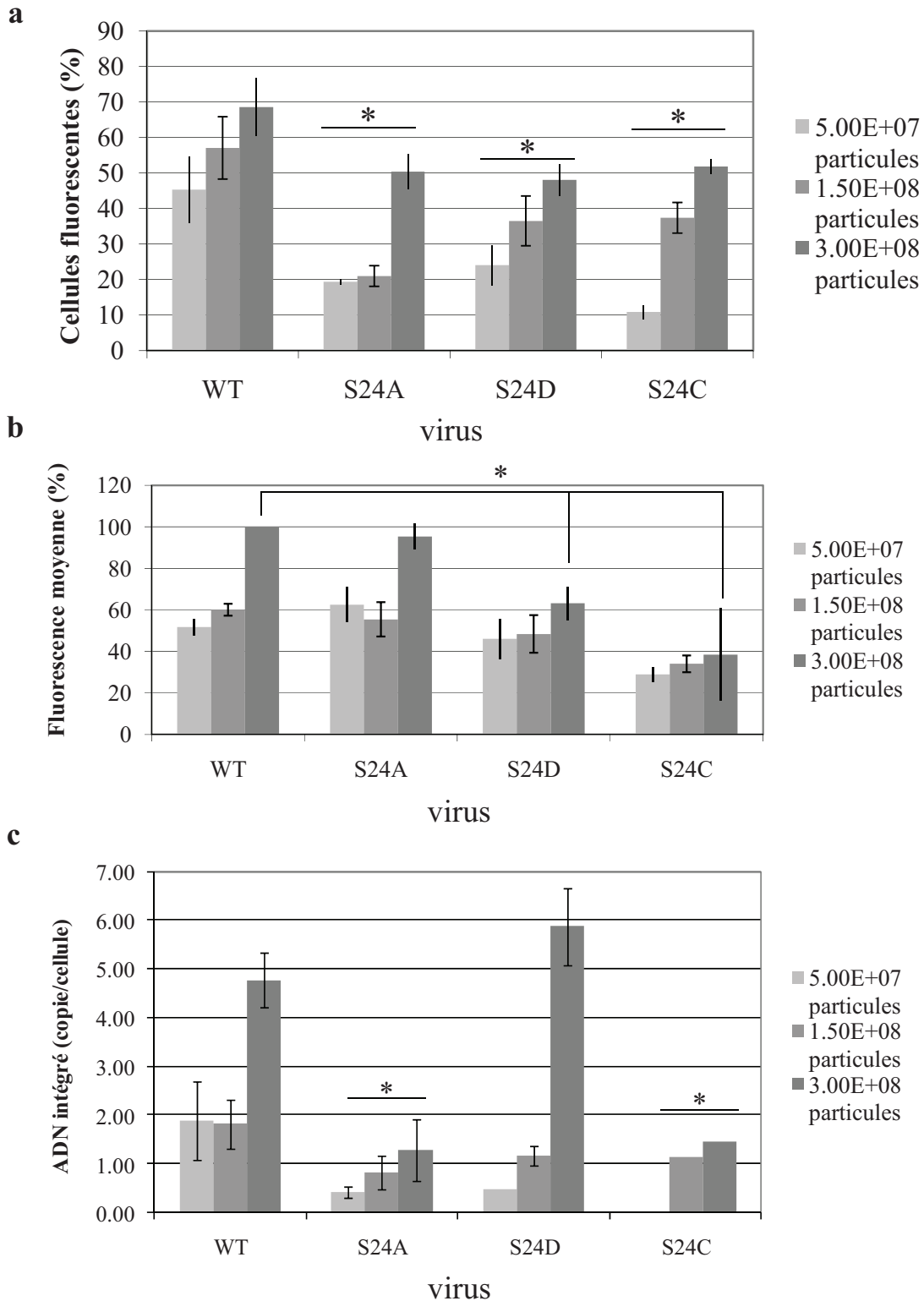


Figure 50. Infectiosité des virus WT, S24C, S24D et S24A.

Les 293T sont infectées avec $5.0E+07$; $1.5E+08$ et $3E+08$ particules virales pendant 10 jours puis les cellules sont décollées et lavées 3 fois avec du PBS1X. L'infection est mesurée par analyse de la fluorescence des cellules infectées par cytométrie de flux. Au moins 3 expériences indépendantes ont été utilisées pour calculer la fluorescence moyenne (a) et le pourcentage de cellules fluorescentes (b). Les cellules infectées sont cultivées pendant 14 jours puis l'ADN viral total est extrait. La quantité d'ADN intégré est quantifiée par PCR quantitative à partir de 25 ng d'ADN extrait (c). Tests de student significatifs < 0.05 .

1) Rôle de la phosphorylation sur le cycle viral

a. Obtention des particules virales

Les mutations S24C, S24A et S24D ont été introduites dans la région du gène *pol* codant l'intégrase par mutagenèse dirigée sur le plasmide pCMVΔ8.91. De par la grande taille du plasmide (≥ 12 kb) et la présence de séquences de recombinaisons, le plasmide doit être multiplié et extrait rapidement des bactéries afin d'éviter les recombinaisons. Les plasmides ont été séquencés afin de vérifier la présence de la mutation et l'absence d'autres mutations indésirables puis les plasmides corrects ont été utilisés pour la production de particules virales mutées. Les lentivirus pseudotypés VSV-G portant la mutation S24A, S24D et S24C sur l'intégrase seront appelés S24A, S24D et S24C.

La production des particules virales a été réalisée par la Plateforme de Vectorologie de Bordeaux 2 comme décrit dans le **Matériels et Méthodes**. Le dosage des particules infectieuses a été déterminé ainsi que le dosage de protéine p24 par ELISA. A partir de la quantité de p24, la quantité de particules est déterminée. En effet il y a approximativement 10000 particules de VIH pour 1 pg de p24 (<http://tronolab.epfl.ch/page58122.html>).

b. Infectiosité des virus wt et mutants

Des cellules 293T sont utilisées pour réaliser les infections avec les virus wt et mutants. Les cellules sont infectées avec différentes quantités de particules déterminées à partir du dosage de la p24 par ELISA: entre $5 \cdot 10^7$ et $3 \cdot 10^8$ particules pour 50000 cellules 293T. Après l'infection, les cellules sont cultivées pendant au moins 10 jours afin d'éliminer les plasmides contaminants portant le gène de l'EGFP apportés par les virus. Une partie des cellules est récupérée et analysée par cytométrie en flux sur un FACS Canto, l'autre partie est utilisée pour extraire l'ADN afin de réaliser des PCR. L'infectiosité est déterminée par mesure de la fluorescence de l'EGFP à environ 450 nm. Le pourcentage de fluorescence permet de visualiser la quantité de cellules infectées alors que la fluorescence moyenne permet de quantifier la quantité d'EGFP produite en moyenne par chaque cellule. Les cellules infectées avec des quantités croissantes de virus wt présentent une augmentation du pourcentage de fluorescence (**Figure 50 a**) et de la fluorescence moyenne (**Figure 50 b**). L'infectiosité des virus S24A, surtout pour les deux plus faibles quantités est moindre que celle des virus wt



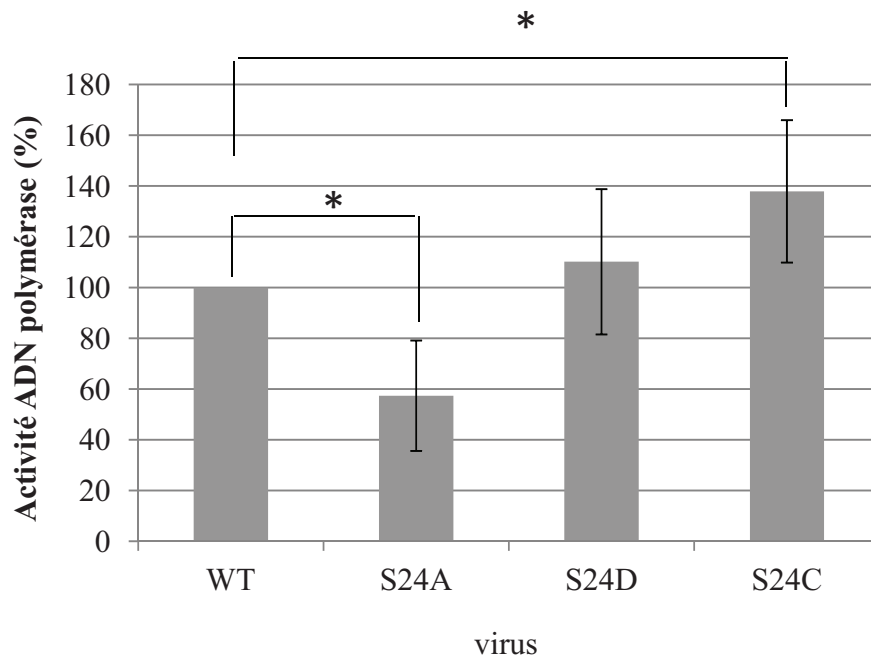


Figure 51. Activité ADN polymérase ARN dépendante des virus.

L'activité ADN polymérase ARN dépendante est mesurée après perméabilisation des particules virales et ajout d'une matrice polyA oligodT. La radioactivité est mesurée et le pourcentage d'activité ADN polymérase est calculé par rapport à l'activité du virus WT. Tests de student significatifs < 0,05.

Intégrase WT

Intégrase S24A

Intégrase S24C

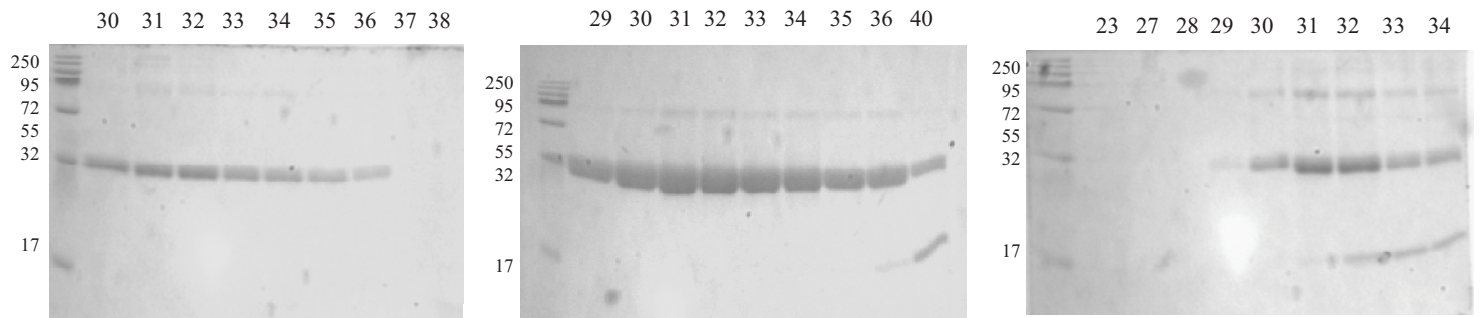


Figure 52. Résultats de purification des intégrases S24A et S24C.

5 μ l de chacune des fractions de la dernière colonne de chromatographie (**Matériels et Méthodes**) sont analysées sur SDS-PAGE 12 % coloré au coomassie.

(**Figure 50 a**), alors que la fluorescence moyenne est très proche du wt (**Figure 50 b**). Les virus S24D sont légèrement moins infectieux que les virus WT et présentent une fluorescence moyenne plus faible que le wt et les virus S24A (**Figure 50 a et b**). Les virus S24C présentent eux une baisse importante de la fluorescence moyenne (**Figure 50 b**) alors que le pourcentage de cellules infectées est peu différent, excepté pour la plus faible quantité de virus utilisée (**Figure 50 a**). Les diminutions d'infectivité et de fluorescence moyenne observées peuvent être aussi bien causées par un défaut d'intégration ou bien par un défaut d'une étape en amont comme la transcription inverse. Nous avons donc réalisé les PCR quantitatives correspondantes afin d'identifier l'étape touchée par cette diminution.

c. ADN intégré

Nous avons réalisé des PCR quantitatives afin de quantifier l'ADN intégré dans les cellules infectées par les virus wt et mutés. L'ADN récupéré 10 jours après l'infection est utilisé pour réaliser les PCR quantitatives. Les cellules infectées avec les virus WT présentent une augmentation du nombre de copies d'ADN intégré de 2 à 5 par cellules (**Figure 50 c**). Les cellules infectées avec les virus S24A présentent une diminution d'environ 5 fois du nombre de copie d'ADN intégré par rapport au WT (**Figure 50 c**). On observe également une baisse de l'intégration pour les virus S24C. L'intégration est diminuée avec le virus S24D pour les plus faibles quantités, mais la mutation S24D permet de conserver un niveau d'intégration similaire voire plus élevé que le WT à un nombre élevé de virions. (**Figure 50 c**). Cependant, nous ne pouvons pas savoir à ce stade si la baisse de quantité d'ADN intégré est liée à un défaut d'intégration ou bien à une diminution de l'ADN proviral. Nous avons donc regardé l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT des virus.

d. Activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT

L'activité ADN polymérase ARN dépendante des particules virales a été mesurée après perméabilisation des virus et ajout d'une matrice/amorce polyA-oligodT. L'incorporation de TTP tritié est mesurée en utilisant des quantités équivalentes de particules wt et mutées. Nous pouvons observer que le virus S24A présente une baisse d'activité ADN polymérase de l'ordre de 40 % par rapport au WT (**Figure 51**). L'activité ADN polymérase du S24D ne diffère pas du WT (**Figure 51**). Enfin le virus S24C présente une augmentation de l'activité



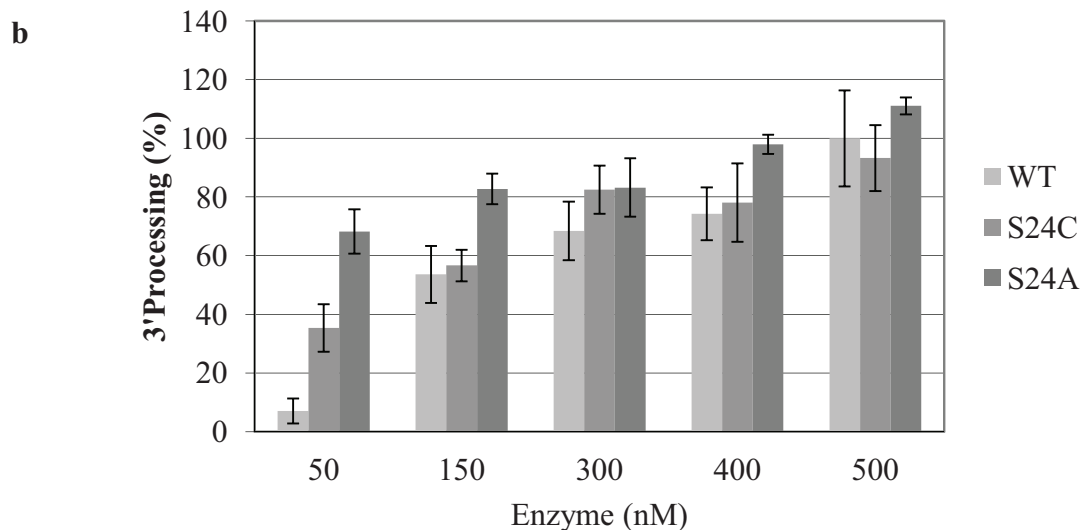
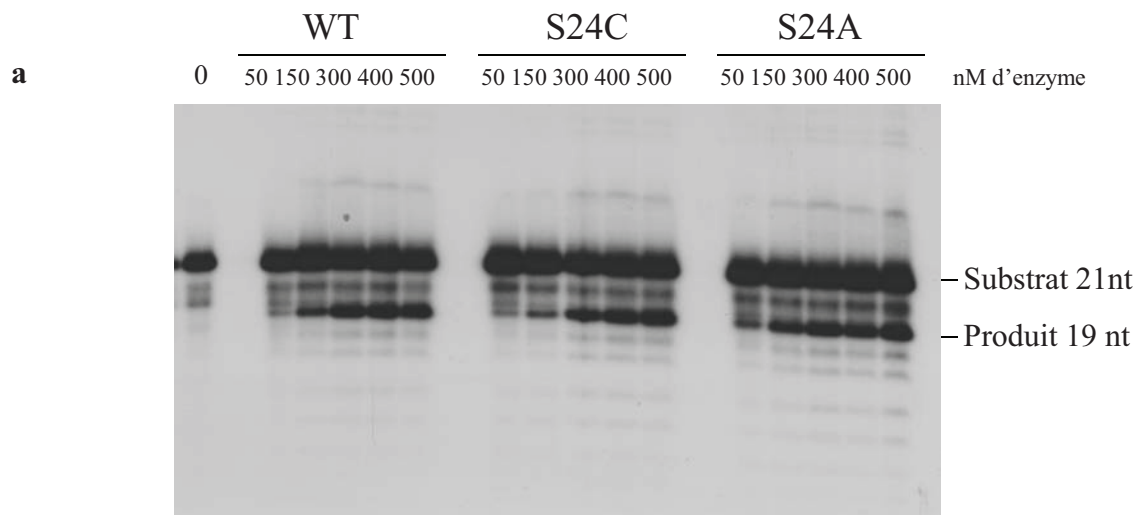


Figure 53. Test d'activité de 3'end Processing *in vitro* avec les IN S24A, S24C et WT.

Le substrat marqué de 21 pb est clivé par l'activité 3' Processing de l'intégrase pour donner un produit de 19 pb. Les échantillons sont ensuite analysés par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 12% 7M urée en TBE. Pour chacun des mutants une gamme d'enzyme entre 50 et 500 nM est réalisée (a). Les produits d'activités sont quantifiés avec le logiciel image J à partir des autoradiographies. Le 100 % d'activité correspond à la concentration la plus forte d'IN WT. Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes (b). Tests student > 0.05.

significative, ce qui suggère que la baisse de la quantité d'ADN intégré observée chez ce virion n'est pas due à une perte de l'activité de la RT (**Figure 51**). La baisse d'infectiosité des virus S24A est donc probablement liée au moins en partie à une diminution de l'activité de la RT alors que la baisse d'infectiosité observée pour les virus S24C n'est pas liée à l'activité RT. Les virus S24D sont quant à eux quasiment identiques aux virus WT. Afin de savoir si l'activité d'intégration est responsable de la baisse d'ADN intégré observée pour les virus S24C, et de savoir si l'intégration pourrait aussi être touchée dans le cas du virion S24A, nous avons voulu voir si les mutations affectent l'activité de l'IN *in vitro*.

2) Effet des mutations sur l'activité de l'IN *in vitro*

a. Obtention des IN mutées

Les mutations S24C ou A ont été introduites par mutagenèse dirigée dans la région codant l'intégrase du plasmide pET21b. Les plasmides ont été séquencés pour la totalité du gène de l'intégrase comme indiqué dans le **Matériels et méthodes** puis les plasmides corrects ont été utilisés pour la production d'intégrase recombinante mutée. Malgré de nombreuses tentatives, il nous a été impossible d'obtenir la mutation S24D par mutagenèse dirigée.

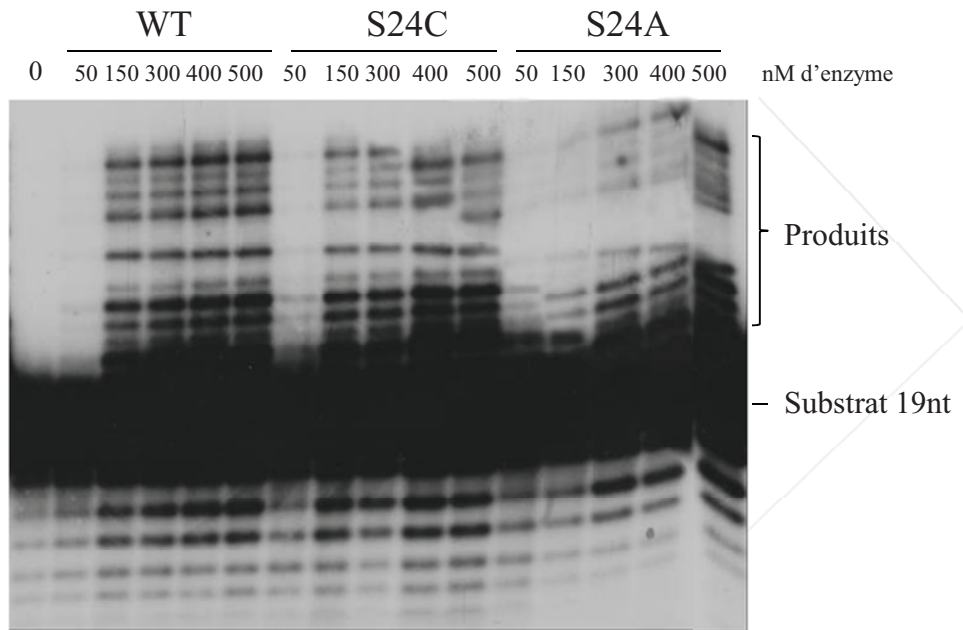
La production des intégrases WT, S24A, S24C a été effectuée dans la souche Rosetta d'*E.coli* comme décrit dans le **Matériels et Méthodes**. Les fractions contenant l'intégrase sont analysées sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 12 % puis le gel est coloré au bleu de Coomassie afin d'évaluer la pureté de la purification (**Figure 52**). Nous avons obtenu des préparations contenant majoritairement de l'IN.

b. Propriétés enzymatiques

Nous avons voulu vérifier l'activité des différentes intégrases exprimées chez la bactérie *in vitro*. Des gammes d'enzymes entre 50 et 500 nM ont été réalisées afin de comparer les activités de 3'-end processing et de transfert de brin des 3 protéines (**Figure 53 et 54**). Le test de 3'-end processing est réalisé en utilisant comme substrat un ODN correspondant aux 21 nt du LTR viral et marqué en 5' (**Figure 53 a piste 1**) apparié à sa séquence complémentaire. L'intégrase va catalyser le clivage de 2 nucléotides en 3' du substrat et ainsi donner un



a



b

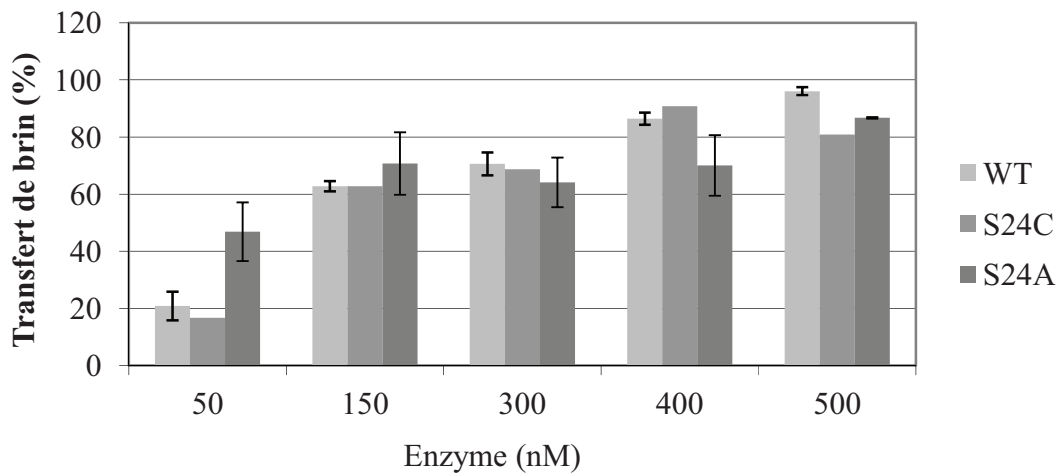


Figure 54. Test d'activité de transfert de brin *in vitro* avec les IN S24A, S24C et WT.

Le substrat de 19 pb est intégré dans d'autres substrats par l'activité de transfert de brin de l'enzyme. Les échantillons sont ensuite analysés par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 12% 7M urée en TBE. Pour chacun des mutants une gamme d'enzyme entre 50 et 500 nM est réalisée (a). Les produits d'activités sont quantifiés avec le logiciel image J à partir des autoradiographies. Le 100 % d'activité correspond à la concentration la plus forte d'IN WT. Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes (b). Tests student > 0.05.

produit de 19 nt radiomarqué. L'enzyme WT montre une augmentation du produit de 19 nt corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme (**Figure 53 a WT**). De façon comparable au WT, les deux enzymes mutantes présentent une augmentation du produit de 19 nt corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme (**Figure 53 a S24C et S24A**). La quantification des gels avec le logiciel image J permet de déduire un pourcentage d'activité par rapport à la concentration la plus forte d'IN WT (**Figure 53 b**) et montre que globalement, l'activité des enzymes mutées est comparable à celle de l'IN WT.

La seconde activité de l'enzyme permet le transfert de brin du substrat de 19 nt dans d'autres substrats de 19nt. On voit donc l'apparition de fragment de différentes tailles notamment supérieures à celle du substrat de 19 nt. Comme précédemment l'apparition des produits est corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme WT (**Figure 54 a**). De façon comparable au WT, les deux enzymes mutantes présentent une augmentation du produit de transfert de brin (**Figure 54 a S24C et S24A**). La quantification des gels avec le logiciel image J permet de déduire un pourcentage d'activité par rapport à la concentration la plus forte d'IN WT (**Figure 54 b**).

Bien que ces tests ne soient pas suffisamment fins pour détecter une différence d'activité subtile entre les enzymes, l'analyse permet de dire que les activités entre les enzymes mutantes et l'enzyme sauvage sont tout à fait comparables.

c. Oligomérisation des enzymes

Il a été montré lors de l'infection virale que l'activité d'intégration fait intervenir de nombreux paramètres, notamment l'interaction entre l'IN et les protéines virales et cellulaires au sein du CPI mais également l'état oligomérique de l'IN elle-même. En effet il est convenu que lors de l'infection, l'intégrase catalyse le 3'-end Processing sous forme dimérique puis se tétramérise afin de réaliser l'étape de transfert de brin de façon concertée. *In vitro*, les dimères d'IN sont capables de catalyser à la fois les réactions de 3'-end Processing et de transfert de brin d'une seule extrémité virale. Nous avons vu que les virus mutés portant les mutations de l'intégrase S24A et S24C sont déficients pour l'intégration. Cependant les études d'activités *in vitro* que nous avons réalisées montrent que les mutations n'ont pas d'effet majeur sur les activités de 3'Processing et transfert de brin des intégrases mutées *in vitro*. Il est donc possible que l'oligomérisation de l'enzyme et notamment la dimérisation ne soit pas modifiée mais qu'au contraire la tétramérisation qui est importante pour l'intégration *in vivo* soit



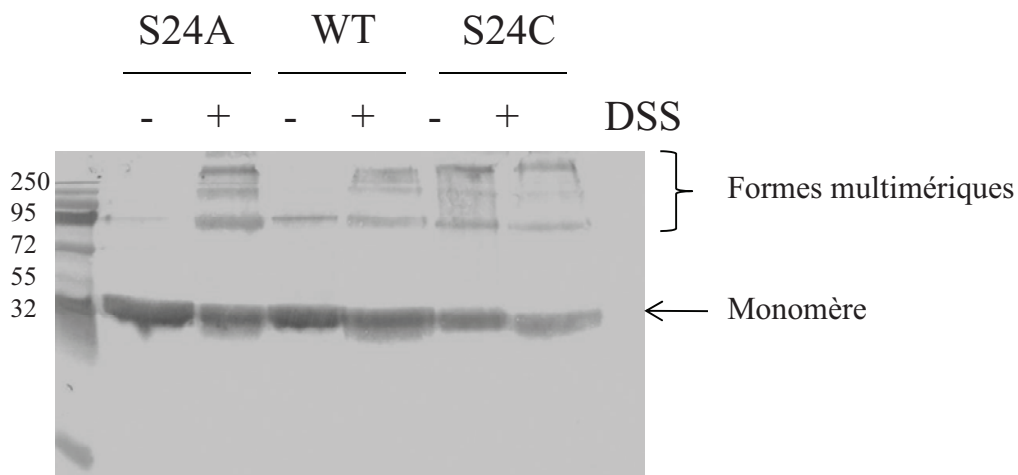


Figure 55. Propriétés oligomériques des enzymes purifiées.

60 pmoles de chaque protéine est analysée sur SDS-PAGE 12 % avec ou sans pontage préalable avec du DSS, puis un western blot est réalisé avec l'anticorps anti IN et révélé au chloronaphtol.

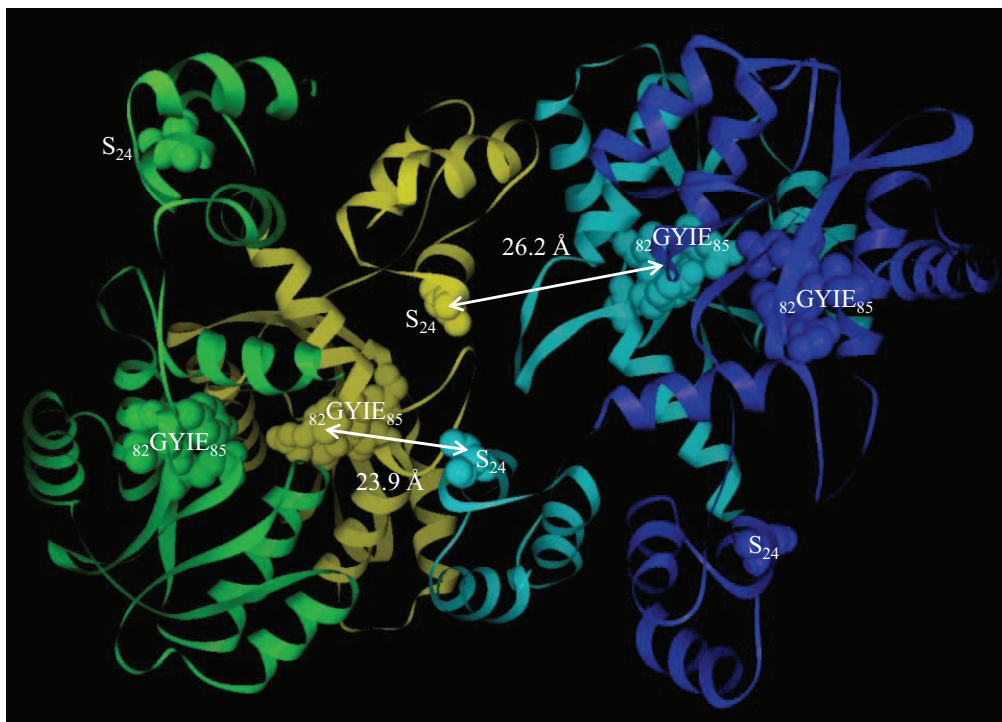


Figure 56. Structure tridimensionnelle d'un tétramère des domaines N-terminal et Core-catalytique de l'IN du VIH-1.

La structure 1K6Y a été retravaillée à l'aide de SPDB viewer. Chaque monomère d'IN est représenté par une couleur. Le résidu S24 ainsi que le motif 82GYIE_{85} de chaque monomère est indiqué. Les distances indiquées entre le S24 et le motif 82GYIE_{85} sont celles compatibles avec une reconnaissance et fixation de GCN2.

touchée par ces mutations. Nous avons donc réalisé des études préliminaires de l'oligomérisation des enzymes mutées.

L'analyse des protéines après pontage au DSS permet de visualiser les différentes formes oligomériques. 60 pmole de chaque protéine est incubée avec une concentration de 1 mg/ml de DSS pendant 30 minutes à température ambiante afin de figer les oligomères naturellement présents dans la préparation. Les protéines sont ensuite séparées sur SDS-PAGE puis analysées par western blot (**Figure 55**). L'intégrase WT sans pontage se compose principalement de monomères à une taille de 32 kDa ainsi que de formes minoritaires aux alentours de 95 kDa. Après pontage apparaissent des formes oligomériques plus hautes (**Figure 55**). Cependant alors que les intégrases WT et S24A présentent un profil tout à fait comparables, l'intégrase S24C présente des différences (**Figure 55**). En effet, celle-ci est beaucoup plus oligomérisée que les 2 autres enzymes sans pontage préalable. Il est donc possible que l'introduction d'une cystéine entraîne la création de ponts disulfures et l'agrégation de l'enzyme. La modification du profil oligomérique de l'enzyme S24C pourrait donc expliquer le défaut d'activité d'intégration observée pour les virus mutés S24C. Par contre, par pontage au DSS, nous n'observons pas de modification de l'oligomérisation de l'IN qui pourrait expliquer facilement le défaut d'activité d'intégration des virus S24A.

D. GCN2 et la phosphorylation de l'IN

Nos travaux ont permis de mettre en évidence la phosphorylation de la serine 24 sur l'intégrase exprimée chez la levure. L'analyse de l'infektivité des virus mutés au niveau de ce résidu de l'IN montre que cet acide aminé est important pour l'infektivité virale : en effet la mutation en alanine, résidu non phosphorylable entraîne une diminution de l'infektivité virale. Par contre, la mutation phosphomimétique S24D permet de conserver en grande partie les propriétés infectieuses des virions mutés. Lors d'un travail antérieur, nous avons mis en évidence l'interaction entre IN et la protéine kinase de levure GCN2.

Chez la levure, la reconnaissance d'eIF2 α par GCN2 se fait par fixation sur une séquence conservée KGYID du facteur de transcription située à environ 21.5 Å du site de phosphorylation ser51 dans la structure tertiaire de la protéine [203]. Nous avons recherché dans la séquence de l'intégrase la présence d'un motif similaire Une séquence SGYIE a été identifiée et celle-ci pourrait être un site putatif de reconnaissance de IN par GCN2. Nous avons donc réalisé une étude sur la structure tertiaire d'un tétramère de la partie N-terminale



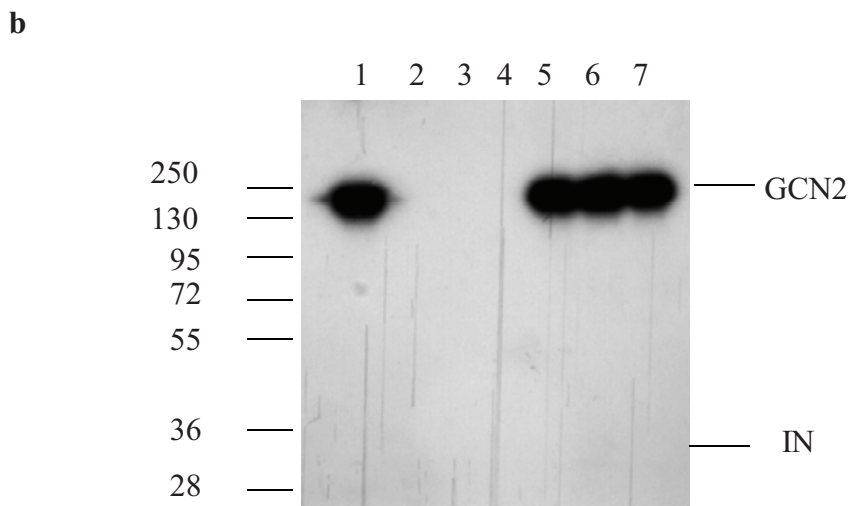
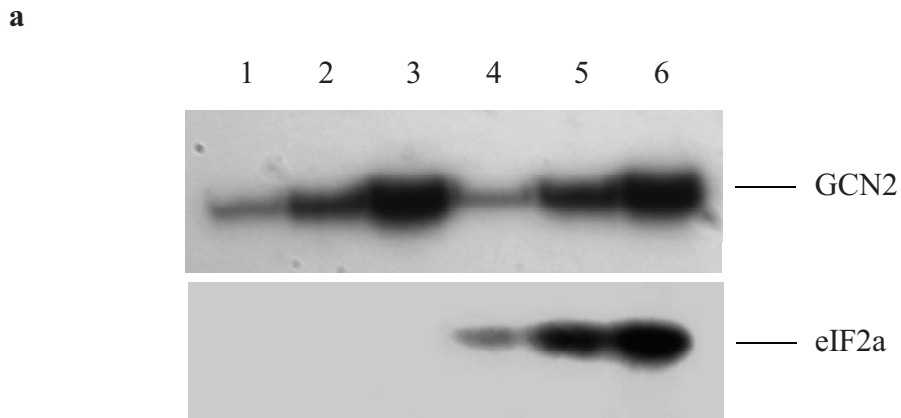


Figure 57. Test de phosphorylation d'EIF2 α par GCN2 et effet de l'intégrase.

(a) Les protéines sont incubées dans un mix de phosphorylation pendant 30 min à 30 °C. 125, 250 et 500 ng de GCN2 est incubée seule (pistes 1, 2, 3) ou avec 1 μ g d'eIF2 α (pistes 4, 5, 6). (b) 500 ng de GCN2 est incubée seule (piste 1). 1, 2 ou 4 μ g d'IN WT est incubée seule (pistes 2, 3, 4) ou avec GCN2 (pistes 5, 6, 7). Les protéines sont séparées sur SDS-PAGE 12 % et la radioactivité est visualisée par autoradiographie.

et Core catalytique de l'intégrase. Il se trouve que la distance entre le motif SGYIE d'un monomère d'IN et la sérine 24 d'un même monomère n'est pas compatible avec cette distance de 21 Å, mais que la distance entre le motif SGYIE d'un monomère et la sérine 24 d'un second monomère est proche de 21.5 Å (**Figure 56**). La reconnaissance du motif de fixation par GCN2 au niveau d'un monomère d'IN pourrait donc entraîner la phosphorylation de la sérine 24 d'un autre monomère.

Nous avons donc essayé de voir si GCN2 peut être responsable de la phosphorylation de l'intégrase. Nous avons réalisé deux types de test de phosphorylation de l'intégrase *in vitro* par GCN2. Nous avons utilisé soit GCN2 recombinante (SignalChem), soit des extraits de cellules humaines contenant GCN2 préalablement activée par autophosphorylation.

1) A partir de protéines purifiées

Afin de réaliser des essais de phosphorylation de l'IN par GCN2, nous avons essayé de purifier la kinase au laboratoire. Malgré de nombreuses tentatives, nous n'y sommes pas parvenus. Nous avons alors utilisé la protéine kinase GCN2 recombinante commerciale. Afin de disposer d'un contrôle positif, nous avons purifié le facteur d'initiation eIF2 α au laboratoire comme décrit dans le **Matériels et Méthodes**. Le test de phosphorylation est réalisé en incubant GCN2 dans un tampon de phosphorylation (40 mM Tris Hcl pH 7.9 ; 12.5 mM NaCl ; 2 mM MgCl₂ ; 0.2 mM DTT ; 2 μ M ATP ; [γ -³²P] ATP (6000 ci/mmmole, Perkin Elmer)) pendant 30 min à 30 °C. La réaction est ensuite stoppée par ajout de tampon de charge pour protéine. Les protéines sont ensuite séparées sur SDS-PAGE 10% puis autoradiographie. Lorsque des concentrations croissantes de GCN2 sont incubées seules avec le mix de phosphorylation, nous pouvons voir que GCN2 s'autophosphoryle, et que cette réaction est proportionnelle à quantité de GCN2 (**Figure 57 a pistes 1 à 3**). Lorsqu'une concentration fixe d'eIF2 α est incubée avec des concentrations croissantes de GCN2, on retrouve l'autophosphorylation de GCN2, mais on peut également observer une phosphorylation d'eIF2 α . Cette phosphorylation est proportionnelle à la quantité de GCN2 incubée (**Figure 57 a pistes 4 à 6**). Ce résultat montre bien que le domaine kinase de GCN2 est activé, et que cela permet à GCN2 de phosphoryler eIF2 α dans nos conditions *in vitro*.

Nous avons ensuite regardé si GCN2 peut phosphoryler l'IN. Pour cela, nous avons utilisé l'IN de VIH-1 produite chez la bactérie comme substrat. En effet, des analyses de



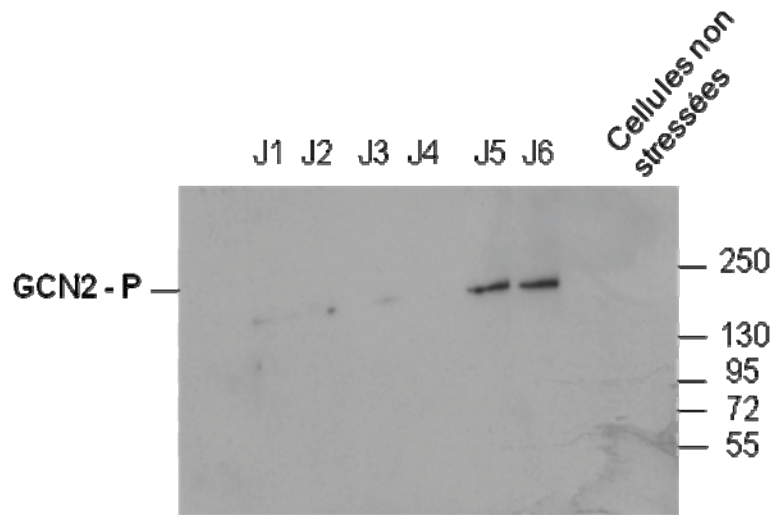


Figure 58. Détection de GCN2 phosphorylée dans des lysats de cellules cultivées en absence de sérum de veau foetal.

Les cellules HeLa P4 sont cultivées en milieu DMEM sans sérum pendant 1 à 6 jours. Les cellules sont lysées. Un contrôle de cellules non stressées cultivées 6 jours est utilisé. 20 μ g d'extraits protéiques sont analysés sur SDS-PAGE 10% et les protéines transférées sur membrane. La phosphorylation de GCN2 est recherchée en utilisant des anticorps dirigés contre la thréonine 889 phosphorylée de GCN2.

spectrométrie de masse n'ont pas montré de phosphorylation portée par cette enzyme. Nous avons donc utilisé l'intégrase produite dans ces conditions pour nos tests de phosphorylation. GCN2 seule s'autophosphoryle (**Figure 57 b piste 1**), alors que l'IN seule ne fixe pas l'ATP quelque soit sa concentration (**Figure 57 b pistes 2 à 4**). Lorsque des concentrations croissantes d'IN sont incubées avec une quantité fixe de GCN2, on observe l'autophosphorylation de GCN2 mais l'IN n'est pas phosphorylée par GCN2 (**Figure 57 b pistes 5 à 7**). Dans nos conditions de test *in vitro* nous ne sommes donc pas en mesure de détecter une phosphorylation de l'IN par GCN2. Il est cependant possible qu'un autre partenaire soit nécessaire à la phosphorylation de l'IN par GCN2, nous avons donc décidé d'utiliser un lysat de cellules humaines dans lesquelles GCN2 est activée afin de réaliser les tests de phosphorylation *in vitro*.

2) A partir de lysat cellulaire

a. Activation de GCN2

L'activité kinase de GCN2 *in vivo* est activée en condition de stress telle qu'une carence nutritionnelle de la cellule. *Ex vivo*, cette activation peut être réalisée en cultivant les cellules en absence de sérum de veau fœtal ou alors en irradiant les cellules aux U.V [204]. Cette activation se traduit par une autophosphorylation de GCN2 sur la thréonine 889.

Afin de procéder à des essais de phosphorylation de l'IN recombinante *in vitro* à partir d'extraits cellulaires contenant GCN2 phosphorylée, des cellules HeLa P4 sont cultivées en milieu DMEM sans SVF pendant plusieurs jours. Puis les cellules sont lysées et les extraits protéiques analysés sur SDS-PAGE. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane et la phosphorylation de GCN2 est recherchée en utilisant des anticorps dirigés contre la thréonine 889 phosphorylée de GCN2. Pour l'extraction des protéines totales nous avons utilisé un tampon de lyse supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases. Nous avons pu détecter une activation de GCN2 dès le premier jour de culture, mais l'activation est nette à partir de 5 jours de culture sans sérum. (**Figure 58 ; J5**). Aucune phosphorylation de GCN2 n'est détectée dans les limites de détection des anticorps dans des extraits de cellules cultivées 6 jours en présence de SVF (ligne cellules non stressées).

Nous avons également essayé d'activer GCN2 dans des extraits de cellules soumises à irradiation aux UV ce qui permettrait peut être notamment de réduire le temps d'obtention des



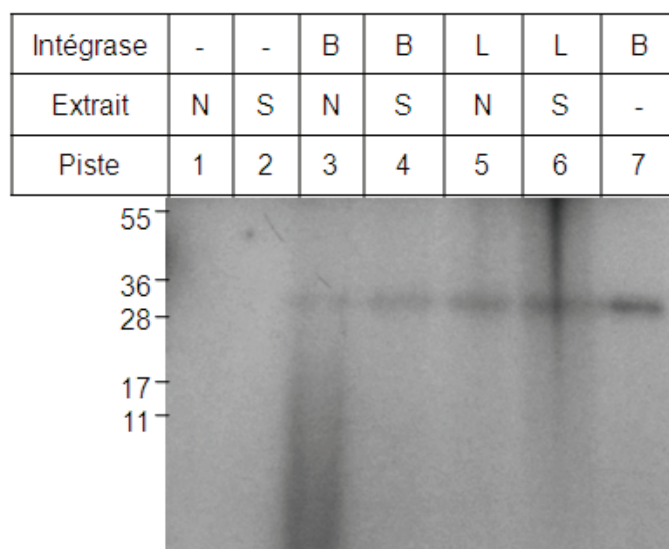


Figure 59. Test de phosphorylation de l'intégrase *in vitro*.

Après pré-incubation des extraits cellulaires avec de l'ATP froid, 2 µg d'intégrase exprimée chez la bactérie ou la levure sont ajoutés en présence de [γ - 32 P] ATP. La réaction est laissée 2 h à 37°C puis les échantillons sont analysés sur gel SDS-PAGE 12 % coloration au Coomassie et révélation par autoradiographie. N : cellules non stressées S : cellules stressées B : Intégrase de bactérie L : Intégrase de levure.

extraits, mais pour l'instant les essais d'irradiation n'ont pas permis de détecter GCN2 phosphorylée.

b. Test de phosphorylation

Afin de montrer s'il existe une relation entre la phosphorylation de l'intégrase et GCN2, nous avons incubé l'intégrase produite chez la bactérie en présence de différents extraits de cellules ayant subi un stress (GCN2 phosphorylée) ou non stressées (GCN2 non phosphorylée). Pour cela, 5 μ l des extraits cellulaires sont préalablement incubés avec de l'ATP froid pendant 20 min. 2 μ g d'intégrase sont ajoutés au mélange et mis en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. L'incubation est réalisée 2 h à 37°C. Les mélanges réactionnels sont ensuite analysés par migration sur gel SDS-PAGE 12 %, coloration au bleu de Coomassie puis révélation par autoradiographie.

Les deux premières lignes montrent les deux extraits de cellules stressées ou non stressées incubés seuls en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (**Figure 59 pistes 1 et 2**). Il n'y a pas de marquage d'une protéine à la taille de 32 kDa dans les extraits seuls. Lorsque l'IN purifiée à partir de la bactérie est incubée avec les extraits de cellules stressées ou non stressées, on observe un marquage qui se superpose à l'IN colorée au Coomassie. L'IN est donc marquée, cependant on ne remarque pas de différence significative entre le marquage obtenu en présence d'extraits de cellules ayant ou non subi un stress. Nous avons aussi incubé l'IN exprimée chez la levure avec les deux extraits cellulaires. De la même façon que dans les puits précédents, on observe un marquage de l'IN qui ne diffère ni du marquage obtenu avec l'IN de bactérie, ni du marquage obtenu en présence de GCN2 phosphorylée dans l'extrait. Enfin, le même marquage est observé lorsque l'IN exprimée à partir de la bactérie est incubée sans extrait cellulaire en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (**Figure 59 piste 7**).

Nous n'avons donc pas pu lors de ces résultats mettre en évidence de lien entre GCN2 et la phosphorylation de l'intégrase *in vitro*. Cependant nous avons observé un marquage de l'intégrase même en absence d'extrait cellulaire. Ceci est à rapprocher des travaux de Drake [205] qui a montré que l'IN a un site de fixation de nucléotides. Il se peut que le marquage que nous observons soit la liaison de l'ATP sur l'intégrase.



3) Phosphorylation dans des levures GCN2^{-/-}

Nous avons utilisé une troisième approche afin de voir si GCN2 est capable de phosphoryler l'IN ou non. Nous avons exprimé et purifié l'intégrase à partir de la même souche de levure où le gène de GCN2 a été ou non délété. Ces levures W801 GCN2^{-/-} et W800 GCN2^{+/+} nous ont été fournies par R. Wek, (Indiana University School of Medicine). La culture des levures et la purification de l'intégrase a été réalisée comme décrit dans le **Matériels et Méthodes**. 10 µg d'IN purifiée soit à partir de la souche W800 GCN2^{+/+} soit de la souche W801 GCN2^{-/-} sont analysée par SDS-PAGE, la bande de IN est découpée et analysée par spectrométrie de masse. Une bande d'IN produite dans les JSC 310, notre souche de levure habituelle [206] est utilisée comme contrôle de la détection des phosphorylations. Les peptides identifiés lors de l'analyse couvrent 78 % de la séquence de l'intégrase. L'intégrase produite dans la souche W800 GCN2^{+/+} présente 3 phosphorylations sur les résidus suivants : S24, Y143 et S256 comme dans la souche habituelle. Ces modifications sont retrouvées à l'identique dans la souche W801 GCN2^{-/-}. Cette étude montre donc que la phosphorylation de l'IN sur le résidu S24 n'est soit pas catalysée par GCN2 soit qu'une autre kinase est capable de phosphoryler cette sérine en plus de GCN2.

E. Conclusion et discussion

Identification de la phosphorylation

L'analyse par spectrométrie de masse de l'intégrase produite chez la levure nous a permis d'identifier plusieurs phosphorylations de l'enzyme sur les résidus S24, Y143 et S256.

Afin de voir si l'IN est phosphorylée à un moment donné de l'infection, nous avons recherché la présence d'une phosphorylation dans le contexte de l'infection virale. Après l'entrée du virus dans la cellule, après la traduction des protéines virales ou bien dans les virions. L'intégrase pourrait être phosphorylée aussi bien sous forme de protéine mature entre les étapes d'entrée et d'intégration mais aussi sous forme du précurseur pr160^{gag} après traduction des protéines virales à partir de l'ADN intégré. Nous avons effectué la recherche d'une phosphorylation de l'IN à partir de cellules infectées par le VIH-1 et à partir de virions VIH-1. La phosphorylation de l'IN pourrait également avoir lieu dans la cellule humaine hors du contexte infectieux. Pour cela l'IN exprimée à partir d'un plasmide exprimant l'IN après



transfection transitoire de cellules humaines a été analysée. Les résultats n'ont pas permis de mettre clairement en évidence de phosphorylation de l'enzyme, principalement à cause de la quantité de protéine insuffisante. Cependant, à partir des protéines récupérées lors de l'infection de cellules humaines, les études ont permis de détecter un delta de masse sur le peptide de l'IN portant la sérine 24 qui pourrait correspondre à une phosphorylation. Ces résultats sont donc prometteurs et il est nécessaire de répéter l'expérience en augmentant significativement la quantité de protéines analysées.

La phosphorylation de l'IN pourrait avoir divers effets, notamment jouer sur l'interaction avec l'ADN ou l'ARN viral, des partenaires protéiques cellulaires ou viraux. Il a notamment été montré récemment le rôle de la phosphorylation de la sérine 57 de l'IN du VIH-1 sur la stabilité de la protéine [178]. Nos études n'ont pas permis de retrouver la modification identifiée par l'équipe de Giacca. M concernant la phosphorylation de la sérine 57 [178]. Cependant cette phosphorylation a été décrite uniquement dans des Lymphocytes T CD4+ activés, ce qui pourrait expliquer que nous ne retrouvons pas cette modification dans des cellules HeLa P4.

Rôle de la phosphorylation de l'IN

Par la suite nous nous sommes focalisés sur l'étude de la phosphorylation de la sérine 24 de l'intégrase. Différentes mutations permettant de mimer une phosphorylation (S24D) ou une non phosphorylation (S24C/A) ont été introduites afin de voir l'effet de cette modification sur le cycle viral et sur l'activité *in vitro* de l'enzyme.

Concernant la mutation S24C, l'insertion d'une cystéine en position 24 dans l'intégrase du virus montre une diminution de l'intégration. Même si les études d'activité de l'enzyme *in vitro* ne montrent pas de réelle différence entre l'IN S24C et l'IN WT, les études de pontage montrent quant à elles que l'IN S24C est beaucoup plus agrégée que l'enzyme sauvage. Il est donc possible que dans ce cas, la mutation S24C entraîne des modifications biochimiques de la protéine. En effet, l'insertion d'un résidu cystéine peut entraîner la formation d'un pont disulfure et modifier le repliement des protéines. Nous prendrons donc les résultats obtenus avec cette mutation avec précaution.



Nous avons pu obtenir des résultats intéressants avec les virus portant les mutations de l'intégrase S24A et S24D. Nous avons pu voir que les virus S24A présentent une diminution à la fois de l'infectiosité, de la quantité d'ADN intégré et même de l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT. La mutation de cette sérine en résidu non phosphorylable entraîne donc clairement une diminution de l'infectiosité. Par contre, la mutation S24A n'affecte pas l'activité de l'enzyme *in vitro*, ni son oligomérisation par rapport à l'enzyme WT. Ces résultats montrent l'importance de ce résidu sérine 24 pour le cycle viral. On peut penser également que la phosphorylation de ce résidu lors des étapes précoces du cycle viral est importante pour la réplication du virus. Le pourcentage de cellules infectées par le virus S24D est moins affectée que dans le cas du virus S24A. On observe une diminution de la quantité d'ADN intégré mais l'intégration est restaurée lorsque de grandes quantités de virus sont utilisées. Nous n'avons pas été en mesure d'introduire la mutation S24D afin de produire et purifier l'intégrase recombinante pour réaliser les tests d'activités *in vitro*. Il sera donc nécessaire d'obtenir cette protéine mutée afin de vérifier son activité *in vitro*. La phosphorylation/déphosphorylation peut réguler par exemple l'oligomérisation d'une protéine, l'interaction avec d'autres facteurs, l'import nucléaire et ces aspects pourront être étudiés par la suite étant donné que l'activité enzymatique *in vitro* n'est pas touchée par la présence d'un résidu non phosphorylable.

La différence entre virus wt et mutés est plus importante lors des plus faibles quantités de virus utilisées et il serait sans doute intéressant de refaire ces expériences avec des MOI plus faibles que ce que nous avons utilisé, c'est-à-dire en dessous de 30 % de cellules infectées quand l'infection par les lentivirus pseudotypés VSV-G est linéaire.

La mutation de l'intégrase au niveau du résidu S24 phosphorylé conduit donc à différents effets sur le cycle viral alors que l'activité de l'enzyme *in vitro* n'est pas touchée. De nombreuses études ont montré que des mutations de l'IN ont des effets pléiotropiques sur le cycle infectieux : la décapsidation, l'étape de transcription inverse, l'intégration, le transport et l'import nucléaire...[125-127] [129] [128] [134]. Nos études ont permis de montrer que la mutation de l'intégrase au niveau du résidu S24 en résidu non phosphorylable entraîne non seulement une diminution de l'intégration mais également de l'activité de la transcriptase inverse. Il serait donc intéressant d'étudier par la suite plus en détail le rôle de cette mutation de l'intégrase sur l'activité de transcription inverse, sur l'interaction entre les deux protéines ainsi que l'affinité à l'ARN viral et au tRNA^{Lys3}. En effet, il a été montré que l'IN stimule



l'initiation de la transcription inverse *in vitro* [125] en permettant une bonne structuration du complexe de reverse transcription.

GCN2 et la phosphorylation de l'IN

L'interaction entre la protéine kinase cellulaire GCN2 et l'intégrase a été observée par double hybride et immunoprécipitation. Des études de la structure tertiaire de l'IN réalisées avec les structures de IN dont nous disposons aujourd'hui ont montré que la distance entre le motif SGYIE de fixation putatif de GCN2 et la sérine 24 sur l'IN est compatible avec une phosphorylation par cette kinase puisque la distance est proche de celle observée entre le motif KGYID d'eIF2 α et la sérine 51 du facteur de traduction phosphorylée par la kinase. Nous avons envisagé la possibilité que l'IN puisse être phosphorylée par GCN2. A cet effet, des tests de phosphorylation *in vitro* ont été réalisés entre GCN2 et l'IN. Deux types de tests de phosphorylation ont été mis en place au laboratoire.

En premier lieu, nous avons utilisé des protéines recombinantes purifiées. Cependant aucune phosphorylation de l'IN par GCN2 n'a pu être observée dans nos conditions.

Par la suite nous avons utilisé des extraits de cellules humaines contenant GCN2 préalablement activée afin de fournir un éventuel cofacteur cellulaire nécessaire à la phosphorylation de l'IN par GCN2. Même si nous avons pu obtenir des extraits protéiques contenant GCN2 autophosphorylée, aucune phosphorylation de l'IN par GCN2 n'a pu être observée lors de ces expériences préliminaires. Cependant nous avons observé un marquage de l'intégrase même en absence d'extraits cellulaires. Ce marquage pourrait être lié à l'activité phosphatidyltransférase de l'IN. Afin de mieux comprendre ce phénomène, l'IN pourra être incubée avec de l'ATP marqué au ^{32}P sur le phosphate en position gamma ou alpha, ou avec d'autres radioéléments que l'ATP. D'autre part, l'intégrase incubée avec de l'ATP pourra être analysée par spectrométrie de masse afin d'identifier le site de fixation de l'ATP ou du phosphate.

Finalement, l'IN a été surexprimée dans une souche de levure GCN2 $^{-/-}$ puis analysée par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus permettent de montrer que la phosphorylation de la S24 de l'IN est détectée même en l'absence de GCN2. Cela ne veut pas dire que GCN2 n'est pas capable de phosphoryler l'IN quand elle est présente. Cependant cela signifie que la



phosphorylation peut être réalisée par d'autres protéines kinases de levure. Dans les cellules de mammifères, eIF2 α est par exemple phosphorylée par GCN2 et par PKR (ainsi que HRI et PERK). D'ailleurs les sites de reconnaissances d'eIF2 α par GCN2 et PKR se recouvrent.

Nous avons alors poursuivi ce travail afin d'essayer de comprendre si l'interaction IN/GCN2 a une réalité physiologique et quel peut être le rôle de cette interaction dans la réplication du VIH-1.



Chapitre 2 : Le rôle de GCN2 sur le cycle viral

Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation (Chapitres 2 et 3)



Le rôle de GCN2 sur le cycle viral

A. Objectifs

Dans cette seconde partie, l'objectif était de caractériser le rôle de GCN2 sur le cycle viral. Bien que nous n'ayons pas pu montrer de relation entre la phosphorylation de l'IN et GCN2, il nous a semblé intéressant de caractériser le rôle de ce nouveau partenaire cellulaire. Dans un premier temps nous avons confirmé l'interaction entre GCN2 humaine et l'intégrase qui avait été décrite par un double hybride chez la levure. Pour cela nous avons employé une technique d'immunoprécipitation à partir de lysat de cellules humaines. Ensuite afin de décrire le rôle de GCN2 sur le cycle viral nous avons modulé la quantité de protéine GCN2 dans des cellules humaines infectées soit en inhibant la traduction de GCN2 par ARN interférence soit en augmentant la quantité de GCN2 par transfection transitoire d'ADN plasmidique. Après avoir décrit le rôle de la kinase sur l'infection virale, il nous a paru essentiel de décrire le rôle de l'infection sur la traduction des protéines cellulaire via GCN2. Nous avons donc regardé l'effet de l'infection virale sur l'activation de GCN2 et sur la traduction des protéines cellulaires.

Pour étudier le rôle de l'interaction entre GCN2 et l'IN sur le cycle viral, nous avons décidé de réaliser différentes mutations sur le gène de l'intégrase permettant d'étudier le rôle de l'interaction entre GCN2 et l'intégrase. Les mutations ont été introduites dans le plasmide permettant la production de virus mutés afin d'observer l'effet des mutations sur l'infection virale. Les mutations ont été également introduites dans le plasmide permettant de produire les intégrases mutées afin d'étudier l'effet des mutations sur l'activité enzymatique de la protéine *in vitro*. Enfin, nous avons également observé l'effet des virus mutés sur la traduction des protéines cellulaires.



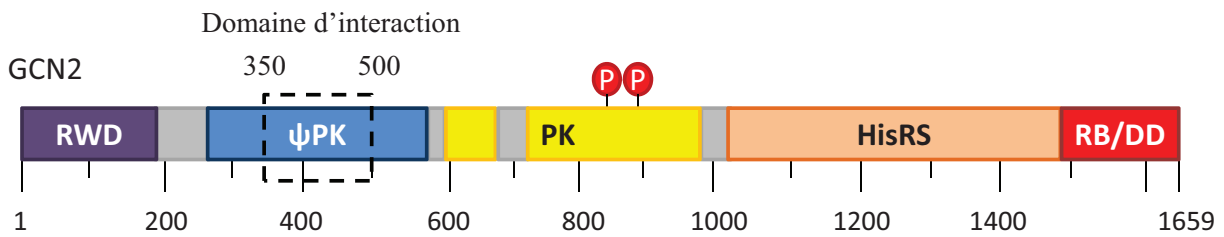


Figure 60. Représentation schématique du domaine d'interaction de GCN2 avec l'IN.
La zone d'interaction avec l'intégrase est entourée en trait pointillé.

	YNB - W-L	YNB -W-L-His	YNB -W-L + X alfa Gal	YNB -W-L + Auréobasidine
Positive control	+++	+++	+++	+++
Negative control	+++	-	-	-
IN	+++	++	-	+
INΔNt	+++	-	-	-
INcore	+++	-	-	-
INCt	+++	-	-	-
INNt	+++	-	-	-

1 52 220 288

48

1 55

Figure 61. Double hybride réalisé dans la levure entre le peptide de GCN2 et l'intégrase entière et ses différents domaines.
Les différents domaines de l'IN sont représentés schématiquement à gauche.

B. Interaction entre l'intégrase et GCN2

1) Par double hybride

L'interaction entre l'intégrase et GCN2 a été identifiée à l'origine en 2002 grâce à un travail effectué au laboratoire dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de l'enzyme virale. Pour cela, un double hybride a été réalisé entre l'intégrase entière et ses différents domaines et la banque d'ADN génomique de levure. Il a été montré que l'intégrase peut interagir avec des protéines de la famille des MAPs (Microtubules Associated Proteins) comme DYN2 et STU2, avec diverses protéines impliquées dans la transcription ainsi qu'avec des protéines impliquées dans la régulation de la traduction des protéines comme la protéine kinase cellulaire GCN2 [132]. Les résultats ont permis de montrer une interaction entre l'intégrase entière et la séquence des résidus 350 à 500 de GCN2 c'est-à-dire au niveau du domaine pseudo-kinase de la protéine (**Figure 60**).

Nous avons répété l'expérience de double hybride entre le peptide de GCN2 et l'intégrase entière ainsi que des constructions codant pour les différents domaines de l'intégrase : N-terminale (INNt), core catalytique (INcore), C-terminal (INcT), Intégrase délétée du N-terminal (INΔNt) (**Figure 61**). Nous avons utilisé un gène de sélection supplémentaire par rapport à ceux employés en 2002, l'auréobasidine, qui a permis de confirmer l'interaction entre l'IN entière et GCN2. Cependant, cette expérience n'a pas permis d'identifier un domaine particulier de l'intégrase interagissant avec GCN2. Il est possible que seule la protéine entière soit capable d'interagir avec GCN2, ou bien que les domaines de l'intégrase utilisés ne soit pas suffisants seuls (**Figure 61**).

2) Par co-immunoprécipitation

L'interaction de l'IN a été observée par double hybride avec GCN2 de levure. Afin de montrer l'interaction de l'IN avec la protéine kinase GCN2 de cellules humaines, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation. Pour cela des extraits cellulaires surexprimant GCN2 humaine comportant une étiquette DDK (DDK-GCN2) et l'intégrase recombinante purifiée exprimée chez la levure ont été utilisés. Afin d'obtenir de la protéine GCN2 humaine surexprimée, nous avons réalisé des transfections de cellules humaines 293T/HEK avec le plasmide pCMV6-EIF2AK4 (Origen™). Les cellules sont lysées 24 h après transfection avec du tampon de lyse L et 12 pmoles d'intégrase sont rajoutées. Les



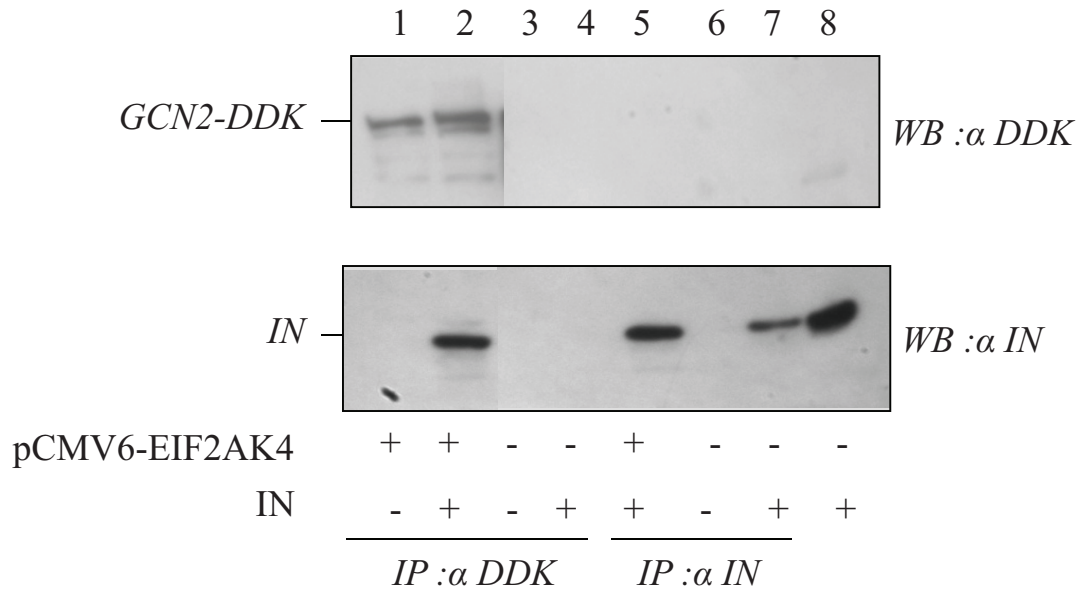


Figure 62. Co-immunoprécipitation entre GCN2 et l'intégrase.

50 000 293T sont transfectées avec 1 µg de pCMV6-EIF2AK4 puis les cellules sont lysées dans un tampon de lyse L 48 heures après. Les protéines sont incubées avec l'anticorps anti DDK au 1/50 pendant la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire couplé à des billes magnétiques est ensuite ajouté pendant 2 heures à 4°C. Les billes magnétiques sont lavées 3 fois avec du PBS à l'aide d'un portoir magnétique puis reprises dans 50 µl de tampon de lyse L. GCN2-DDK immunoprécipitée est incubée avec 1µg d'intégrase recombinante pendant 2 heures à 4°C. La totalité est analysée sur SDS-PAGE 10 %, puis un western blot est réalisé avec les anticorps dirigés contre les 2 protéines.

lysats sont incubés avec l'anticorps anti DDK ou l'anticorps anti intégrase pendant la nuit. Le lendemain, des anticorps secondaires couplés à des billes magnétiques sont rajoutés et laissés incubés pendant 2 heures. Les protéines sont analysées sur SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose et un western blot est réalisé.

Nous pouvons voir que DDK-GCN2 est immunoprécipitée par l'anticorps anti-DDK lorsque GCN2 est surexprimée (**Figure 62 piste 1 et 2**). Aucune bande n'est reconnue lorsque GCN2 n'est pas surexprimée (**Figure 62 piste 3**). Lorsque l'IN est ajoutée au lysat, elle est immunoprécipitée par l'anticorps anti IN (**Figure 62 piste 5**) mais pas par l'anticorps anti DDK (**Figure 62 piste 4**). Lorsque l'IN est rajoutée à l'extrait cellulaire surexprimant GCN2, les deux protéines interagissent et sont immunoprécipitées par l'anticorps anti-DDK (**Figure 62 piste 2**). Cependant lorsque l'immunoprécipitation est réalisée en utilisant l'anticorps anti IN, GCN2 n'est pas co-immunoprécipitée (**Figure 62 piste 5**). Ceci peut s'expliquer par l'affinité ou le site de reconnaissance des anticorps primaires. En effet la fixation de l'anticorps anti IN sur l'intégrase peut masquer le site de fixation de GCN2 sur l'IN.

Néanmoins nous avons pu montrer une interaction spécifique entre l'IN et GCN2 de cellules humaines.

C. Rôle de GCN2 sur l'infection

Nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait avoir la protéine GCN2 sur le cycle viral. Pour cela nous avons modulé la quantité de protéine GCN2 dans des cellules humaines soit en inhibant la traduction de GCN2 par ARN interférence, soit en augmentant la quantité de GCN2 par transfection transitoire d'ADN plasmidique codant pour GCN2. L'infection virale a été ensuite mesurée.

1) Extinction de GCN2 par ARN interférence

Une technique d'ARN interférence a été utilisée pour inhiber la traduction de GCN2. La transfection de siRNA complémentaires à l'ARN messager de GCN2 permet la formation d'ARN doubles brins que la cellule va éliminer via le système DICER/RISC. Nous avons dû déterminer les meilleures conditions d'extinction de la protéine mais également trouver un agent de transfection efficace permettant d'infecter les cellules par la suite.



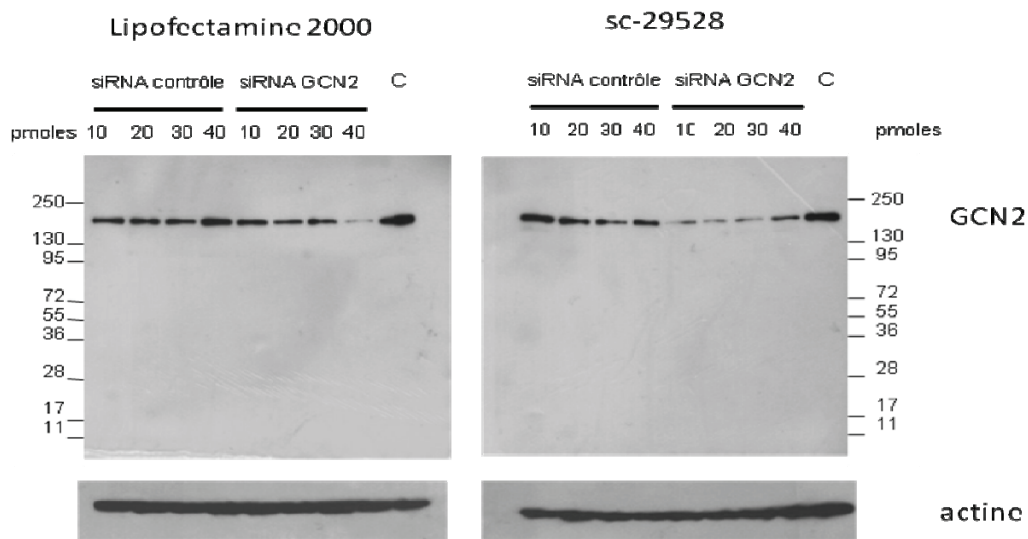


Figure 63. Extinction de GCN2 en fonction de la quantité de siRNA GCN2.

Les cellules sont transfectées avec différentes quantités de siRNA GCN2 et siRNA contrôle. 24 h après transfection, les cellules sont lysées comme décrits dans Matériels et Méthodes, puis 15 µg d'extraits cellulaires sont analysés sur gel SDS-PAGE. Les protéines sont transférées sur membrane PVDF, puis GCN2 est détectée avec des anticorps anti GCN2. Deux agents de transfection sont utilisés : lipofectamine 2000 à gauche, sc-29528 à droite. C : extrait de cellules non transfectées. Dans un second temps, l'actine est révélée avec un anticorps anti actine.

a. Mise au point de l'ARN interférence

La mise au point de l'ARN interférence a été réalisée dans les cellules HeLa P4, notre modèle d'étude pour l'infection par le VIH-1. Nous avons tout d'abord recherché la quantité de siRNA à transférer nécessaire pour « éteindre » GCN2. Pour cela nous avons transféré différentes quantités de siRNA GCN2 (**Figure 63**). Nous avons également réalisé en parallèle la transfection d'un siRNA contrôle pour lequel l'extinction d'aucune protéine cellulaire connue n'a été rapportée. Nous disposions au laboratoire de plusieurs agents de transfection utilisés auparavant. Nous avons choisi de tester la lipofectamine 2000 (Invitrogen) précédemment utilisée pour transférer des petits ODN. Celle-ci est peu toxique pour les cellules et permet une infection correcte par le VIH-1. Nous avons également choisi d'utiliser l'agent de transfection sc-29528 (Santa cruz biotechnology, Inc) qui permet lui la transfection de petits siRNA. Cependant on ne connaît pas l'effet de cet agent de transfection sur l'infection virale.

Les protéines totales sont récupérées par lyse des cellules 24 h après la transfection dans un tampon de lyse L (20 mM Tris pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 1% Triton X-100). Une quantité égale de protéines est analysée sur SDS-PAGE puis transférée sur membrane PVDF et la membrane est incubée dans l'anticorps anti GCN2. Un extrait de cellules non transfectées a été déposé comme contrôle. L'anticorps anti GCN2 détecte une bande d'environ 190 kDa correspondant à la taille attendue pour GCN2. On peut observer une extinction de GCN2 avec les deux agents de transfection 24 h après transfection (**Figure 63**). Cependant on observe une meilleure extinction de GCN2 avec l'utilisation de sc-29528. Dès 10 pmoles, on observe une extinction très nette. Il y a une légère augmentation à 40 pmoles mais qui reste inférieure aux cellules non transfectées. La quantité de GCN2 reste constante pour la transfection avec le siRNA contrôle. L'actine a été choisie comme gène de ménage afin de confirmer que la quantité de protéines totales déposée est bien similaire pour tous les extraits. On peut voir que la quantité d'actine reste constante dans les différents extraits.

Au vu des résultats obtenus, nous avons choisi de transférer les cellules avec 30 pmoles de siRNA GCN2 avec sc-29528 comme agent de transfection.

Dans une seconde étape, nous avons voulu étudier l'extinction de GCN2 en fonction du temps après transfection. Pour cela nous avons effectué une transfection de 30 pmoles de siRNA avec sc-29528 et extrait par la suite les protéines totales entre 24 h et 144 h après transfection. Une quantité égale de protéines a été ensuite analysée sur SDS-PAGE suivi d'une détection



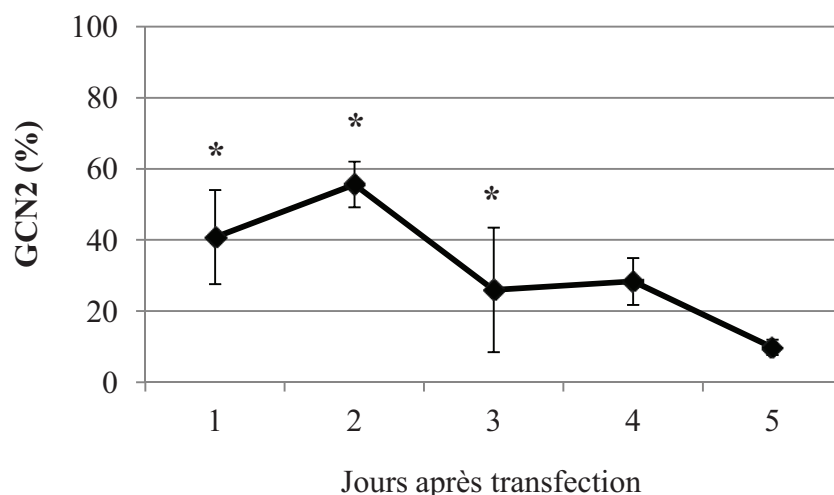


Figure 64. Analyse de l'extinction de GCN2 entre 1 et 6 jours post transfection.

Les cellules sont transfectées avec 30 pmoles de siRNA GCN2 avec sc-29528, puis lysées entre 1 et 5 jours après transfection. Les bandes révélées par l'anticorps anti GCN2 sur immunoblot sont quantifiées par logiciel informatique image J. Le 100% correspond à la quantité de GCN2 détectée à J1 post transfection dans les cellules non transfectées. Test de student significatif < 0.05.

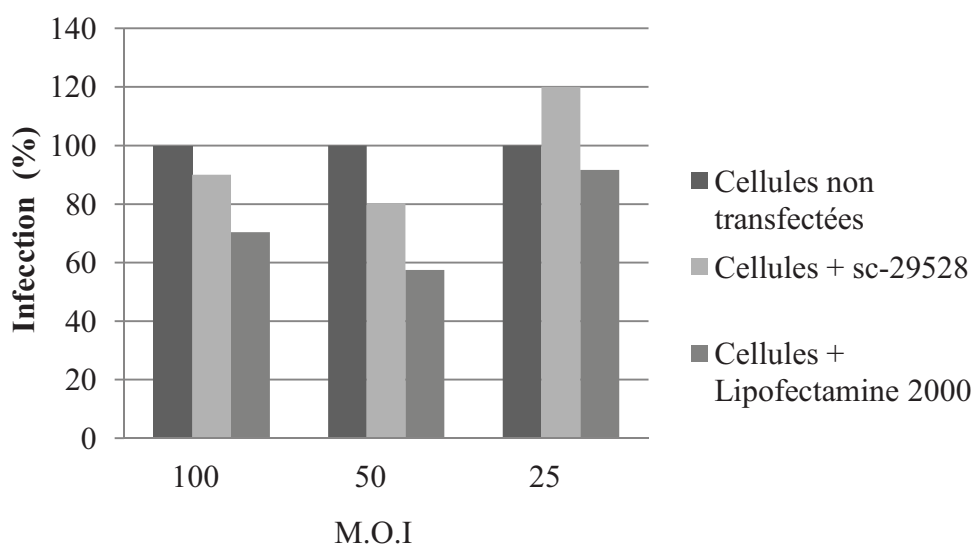


Figure 65. Effet des agents de transfection sur l'infection virale.

Les cellules sont infectées 24 h après avoir été transfectées avec 2 types d'agents de transfection ou sans transfection. L'infectivité est mesurée 24h post transfection. Le 100% correspond à l'activité β Gal des cellules non transfectées puis infectées.

de GCN2 sur membrane PVDF. Les bandes révélées sur le blot ont ensuite été quantifiées par logiciel informatique Image J. On peut observer que l'extinction est efficace dès le lendemain de la transfection et est de 80 % le 3^{ème} jour (**Figure 64**). Une transfection de 30 pmoles de siRNA avec l'agent de transfection sc-29528 permet une extinction efficace de GCN2 jusqu'à 5 jours après transfection.

b. Infections virales après transfection

Après avoir déterminé les meilleures conditions de transfection, nous avons regardé si l'infection est possible après transfection avec sc-29528. 24 h après transfection avec la lipofectamine 2000 ou sc-29528 (**Figure 65**), les cellules sont infectées avec 3 M.O.I. La mesure de l'infectivité a été réalisée 24 h après infection par ajout du tampon 4-MUG et lecture du résultat 24 h après. On remarque que les deux agents de transfection permettent tout deux l'infection. On observe une légère augmentation de l'infectivité pour une M.O.I de 25 avec sc29528 par rapport aux cellules non transfectées. Sc-29528 permet une infectivité d'environ 80 % pour les deux M.O.I de 50 et 100.

Nous avons donc choisi d'utiliser 30 pmoles de siRNA avec sc-29528. Les infections seront réalisées 24 h après-transfection et pendant différents temps comme indiqué dans la légende des figures ci-dessous. L'addition du 4-MUG se fera entre 24 h et 72 h. après infection (p.i), soit 2 ou 4 jours après-transfection. .

c. Effet de l'extinction de GCN2 sur l'infection virale

En utilisant les conditions de transfection que nous avons mis au point, nous avons regardé l'effet de l'extinction de GCN2 sur l'infection virale par le VIH-1 Laï. L'interprétation des résultats sera différente selon le temps après infection. En effet si l'on infecte pendant 24 heures, les étapes précoces de l'infection à savoir l'entrée, la reverse transcription, l'intégration, et la transcription de protéines virales précoces comme Tat seront effectuées. Par contre il y aura peu de production de nouvelles particules virales. Les résultats obtenus reflèteront donc les étapes précoces du cycle. Par contre, si l'on maintient l'infection pendant des temps plus longs comme 72 heures, on aura alors production de nouvelles particules virales qui pourront aller réinfecter des cellules saines. On observe alors tous les événements du cycle viral.



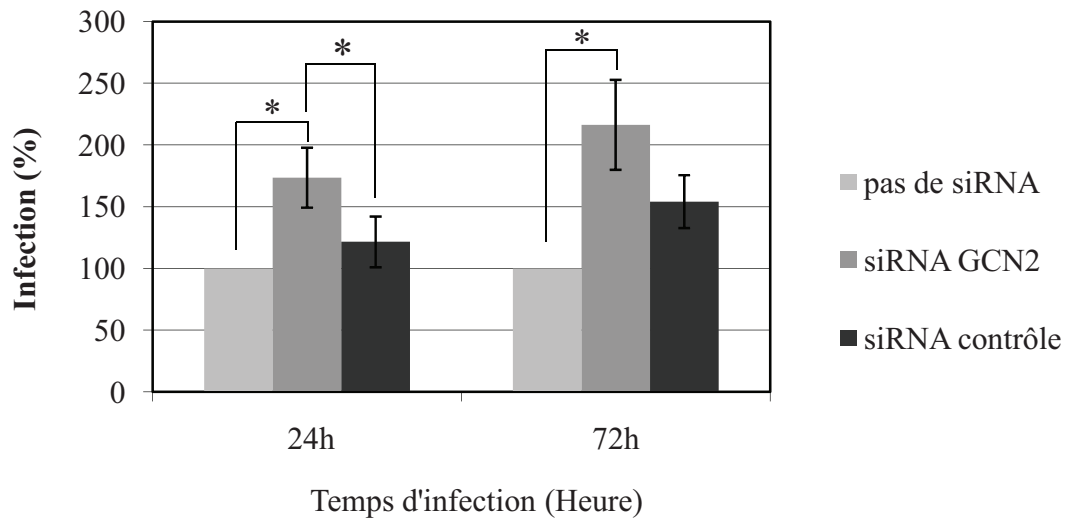


Figure 66. Effets de l’extinction de GCN2 sur le cycle viral à 24 h et 72 h après transfection.

Les cellules sont transfectées avec 30 pmoles de siRNA GCN2 ou siRNA contrôle par sc-29528. 24 h. p.i les cellules sont infectées puis le 4-MUG est ajouté respectivement 24 h ou 72 h après infection. Le 100% correspond à l’activité β Gal des cellules non transfectées puis infectées. Les résultats sont la moyenne de 6 expériences indépendantes. Dans chaque expérience, les points sont réalisés en triplicate. Test de student significatif < 0.05 .

24h après avoir mis en culture 50 000 cellules/puits dans des plaques 48 puits, nous avons transfecté les cellules avec 30 pmoles de siRNA GCN2 ou 30 pmoles de siRNA contrôle avec sc-29528. Nous avons ensuite infecté les cellules 24 h après transfection avec une M.O.I de 50 et révélé cette infection en ajoutant le substrat de la β Galactosidase 24 h après (**Figure 66**). Les cellules non transfectées puis infectées sont un contrôle de l'infection et cette valeur a été ramenée à 100 %. On peut observer une augmentation significative de 1.8 fois de l'infectivité virale pour les cellules transfectées avec le siRNA GCN2. L'infection des cellules transfectées avec le siRNA contrôle montre une augmentation significative de 1.3 fois.

Pour regarder l'effet des siRNA sur l'infection virale à 72 h.p.i, l'infection des cellules a été réalisée avec une M.O.I de 10 (**Figure 66**). En effet la production virale est très importante après 3 jours de production et l'activité β Galactosidase atteignait un plateau avec une M.O.I de 50. On observe une augmentation de 2.5 fois de l'infection des cellules transfectées avec les siRNA GCN2. On observe également une augmentation de l'infection des cellules transfectées avec les siRNA contrôle. Cependant, les tests de student réalisés montrent que la différence entre les siRNA contrôles et GCN2 n'est pas significative.

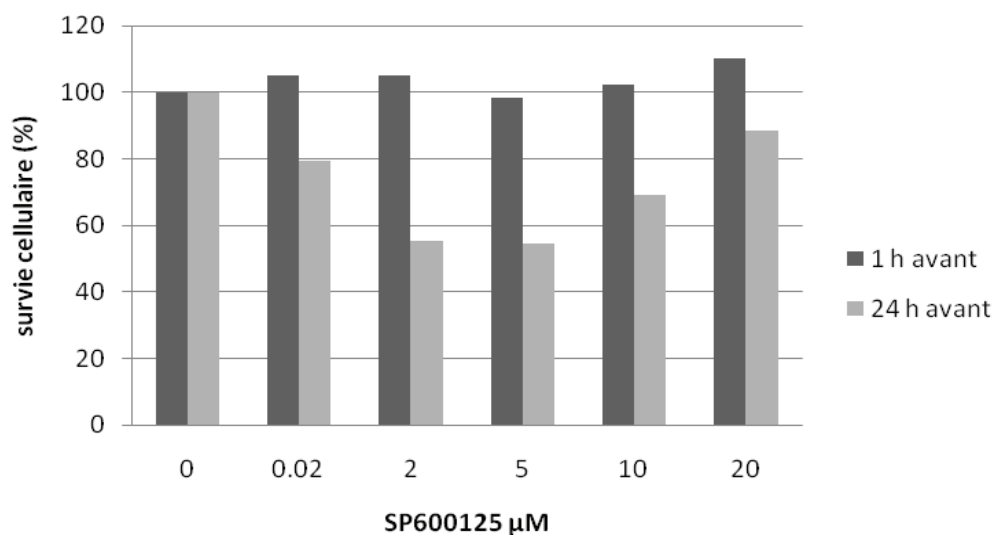
On observe donc dans les cellules HeLa P4 transfectées avec les siRNA GCN2 une augmentation de l'infection par le VIH-1 24 h après l'infection. Nous pouvons faire l'hypothèse que la présence de GCN2 dans la cellule infectée par le VIH-1 pourrait donc diminuer l'infectivité soit par une action directe sur une étape du cycle viral de par son activité kinase soit par une interaction avec un élément viral ou cellulaire. Sur un temps très court tel que 24 h, nous pouvons supposer que GCN2 a un rôle sur les étapes précoces du cycle viral tel que l'entrée, la transcription inverse ou l'intégration. Même si un effet de GCN2 est confirmé, on ne peut pas dire quelle(s) étape(s) est touchée par cette protéine, ni si l'effet observé est direct ou indirect.

d. Inhibition de l'activité kinase de GCN2

Afin de mieux comprendre le rôle de GCN2 sur le cycle viral, nous avons également utilisé un inhibiteur de l'activité kinase de GCN2, le SP600125 (SIGMA). Cette molécule a été initialement décrite comme inhibitrice de la kinase JunK, puis a récemment été décrite comme capable d'inhiber la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 [207] à partir de 10 μ M. Ainsi nous avons utilisé cette molécule et regardé son rôle sur l'infection virale en complément des résultats précédemment obtenu avec les siRNAs.



a



b

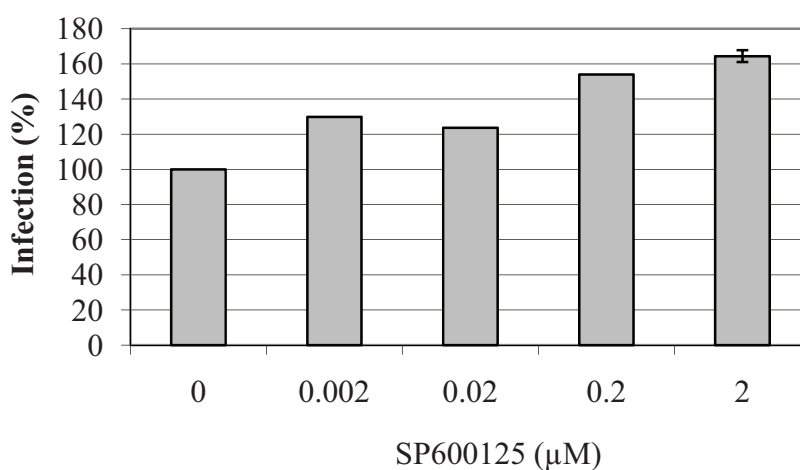


Figure 67. Effet de SP600125 sur l'infection virale.

Les HeLa P4 sont incubées avec du SP600125 pendant 1 et 24 heures puis la mesure de la survie cellulaire est réalisée à l'aide du kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (a). Les cellules sont ensuite infectées avec le VIH-1 1h après avoir été incubées avec la molécule. La mesure de l'infection est réalisée 24h après, par ajout du substrat 4-MUG (b).

Dans un premier temps, nous avons regardé l'effet de cette molécule sur la survie cellulaire en réalisant un test de cytotoxicité. Pour cela, des cellules HeLa P4 ont été incubées avec des concentrations croissantes de la molécule pendant 1h ou 24h avant de réaliser la mesure de la cytotoxicité (**Figure 67 a**). Les résultats montrent que SP600125 n'a pas d'effet cytotoxique après une heure d'incubation, et que l'on observe jusqu'à 50 % d'effet cytotoxique à 24 h pour 2 μ M d'inhibiteur.

Les infections de cellules incubées avec le SP600125 ont donc été réalisées 1 h après avoir mis la molécule sur les cellules. Nous remarquons que les cellules infectées avec des quantités croissantes d'inhibiteur présentent une augmentation de l'infection virale jusqu'à 1.6 fois pour une concentration de 2 μ M (**Figure 67 b**). Cependant, étant donné la toxicité du produit notamment à 2 μ M on peut penser que l'augmentation de l'infectivité observée est peut être sous estimée. L'effet de l'inhibiteur est comparable à l'effet observé avec les siRNA à 24 h puisque l'on observe également une augmentation de l'infection virale. Il est donc probable que l'augmentation de l'infection virale soit liée à l'inhibition de l'activation de GCN2 par autophosphorylation. Cependant, les résultats doivent être pris avec précaution puisque SP600125 est aussi un inhibiteur de JunK.

2) Surexpression de GCN2

a. Dans les cellules humaines

Afin de confirmer le rôle de GCN2 sur l'infection virale, nous avons surexprimé GCN2 dans des cellules que nous avons par la suite infectées. La première étape a consisté en la mise au point de la surexpression de la protéine dans les cellules humaines.

Nous avons regardé l'efficacité de surexpression de GCN2 dans deux types de cellules humaines : les HeLa P4 et les 293T. En effet les cellules HeLa P4 que nous utilisons comme modèle d'infection surexpriment parfois de façon moins efficace les protéines après transfection d'ADN. Les deux types cellulaires ont été transfectés avec une même quantité de plasmide pCMV6-EIF2AK4 qui code GCN2-DDK ou pEGFP-C2 qui code pour l'EGFP comme contrôle de transfection. Les cellules sont lysées 24 h ou 48 h après transfection et les protéines extraites analysées sur Western Blot avec un anticorps dirigé contre DDK. Les résultats montrent que les 293T expriment GCN2-DDK dès 24h (**Figure 68 a piste 3**) et 48h avec une plus faible intensité (**Figure 68 a piste 9**). La protéine n'est pas détectée dans les extraits de HeLa P4 que ce soit à 24 ou 48h (**Figure 68 a piste 6 et 12**). Nous remarquons des



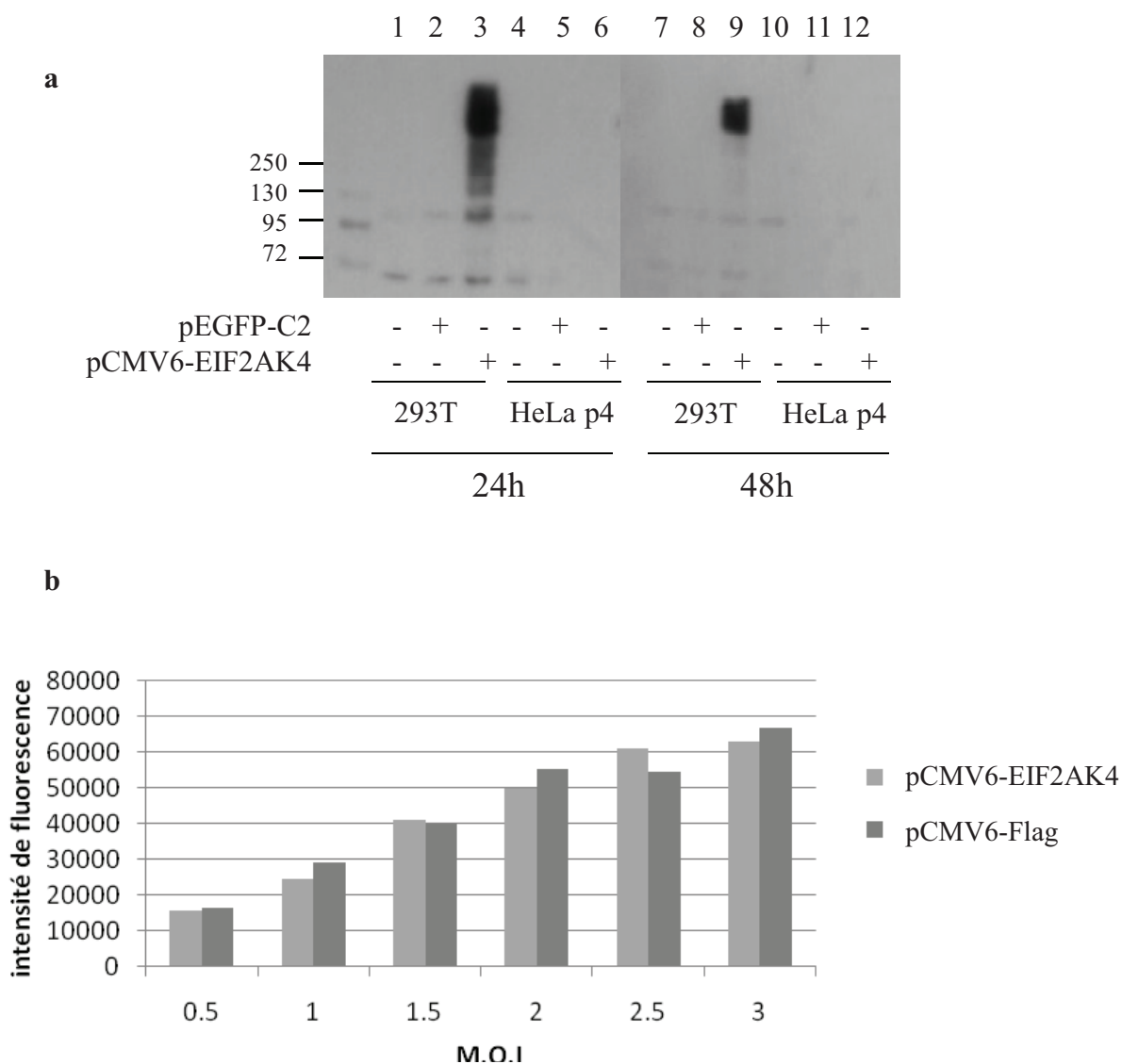


Figure 68. Effet de la surexpression de GCN2 sur l'infection virale.

GCN2h est surexprimée dans différents types cellulaires après transfection du plasmide pCMV6-EIF2AK4 ou pEGFP-C2. Les cellules sont lysées 24h ou 48h après transfection puis 15 μ g d'extraits cellulaires sont analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre DDK (a). Les 293T sont transfectées avec le plasmide pCMV6-EIF2AK4 ou pCMV6-Flag puis infectées 24h après et la mesure de l'infection des virus est réalisée par cytométrie en flux (b).

bandes de plus faible poids moléculaire révélées par l'anticorps anti DDK qui sont probablement le résultat d'une réaction croisée avec l'anticorps primaire puisqu'elles sont détectées dans les cellules non transfectées (**Figure 68 pistes 1, 4, 7 et 10**). Les cellules 293T expriment donc efficacement GCN2 dès 24h après leur transfection, nous utiliserons ces conditions pour regarder l'effet de la surexpression de GCN2 sur l'infection par le VIH-1.

b. Effet de la surexpression sur l'infection

Les cellules 293T ne peuvent pas être infectées avec le VIH-1 puisqu'elles n'expriment pas le récepteur CD4 à leur surface. Afin de quantifier l'infection virale dans des cellules 293T, des particules lentivirales pseudotypées VSV-G sont utilisées. L'infection est quantifiée par mesure de la fluorescence de l'EGFP par cytométrie de flux. Les 293T sont transfectées avec le plasmide pCMV6-EIF2AK4 ou pCMV6-Flag comme contrôle puis infectées 24 h après avec des concentrations croissantes de virus entre 0.5 et 3 virus par cellule. Le pEGFP-C2 ne peut pas être utilisé comme contrôle négatif ici puisqu'il code pour l'EGFP. Les cellules sont préparées pour être analysées par cytométrie de flux 10 jours après l'infection.

L'augmentation du nombre de virus utilisés par cellule transfectées avec le pCMV6-Flag entraîne une augmentation du signal de fluorescence (**Figure 68 b**). On observe le même résultat pour les cellules transfectées avec le plasmide pCMV6-EIF2AK4 (**Figure 68 b**). Nous avons vu que l'extinction de GCN2 entraîne une augmentation de l'infection virale. Ainsi nous pensons que la surexpression de GCN2 entrainerait l'effet inverse, c'est-à-dire une diminution de l'infection virale. Pourtant, les résultats obtenus ne permettent pas de montrer d'effet de la surexpression de GCN2 sur l'infection des virus.

Cependant, ce résultat est explicable. En effet, nous savons que GCN2 est présente dans la cellule sous forme non phosphorylée et donc inactivée. Cette activation est peut-être nécessaire au rôle de GCN2 dans le cycle viral. Il est tout à fait possible que la protéine GCN2 surexprimée ne soit pas phosphorylée dans nos conditions. En effet, nous ne savons pas si GCN2 est activée lors de l'infection virale, ni lors de l'infection par les virus. De plus, les virus ne contiennent pas tous les éléments de la particule virale, notamment l'ARN génomique viral complet ni certaines des protéines accessoires. Il est donc possible que les conditions d'infection après surexpression soient très différentes de ce que l'on observe lors de l'infection après ARN interférence.



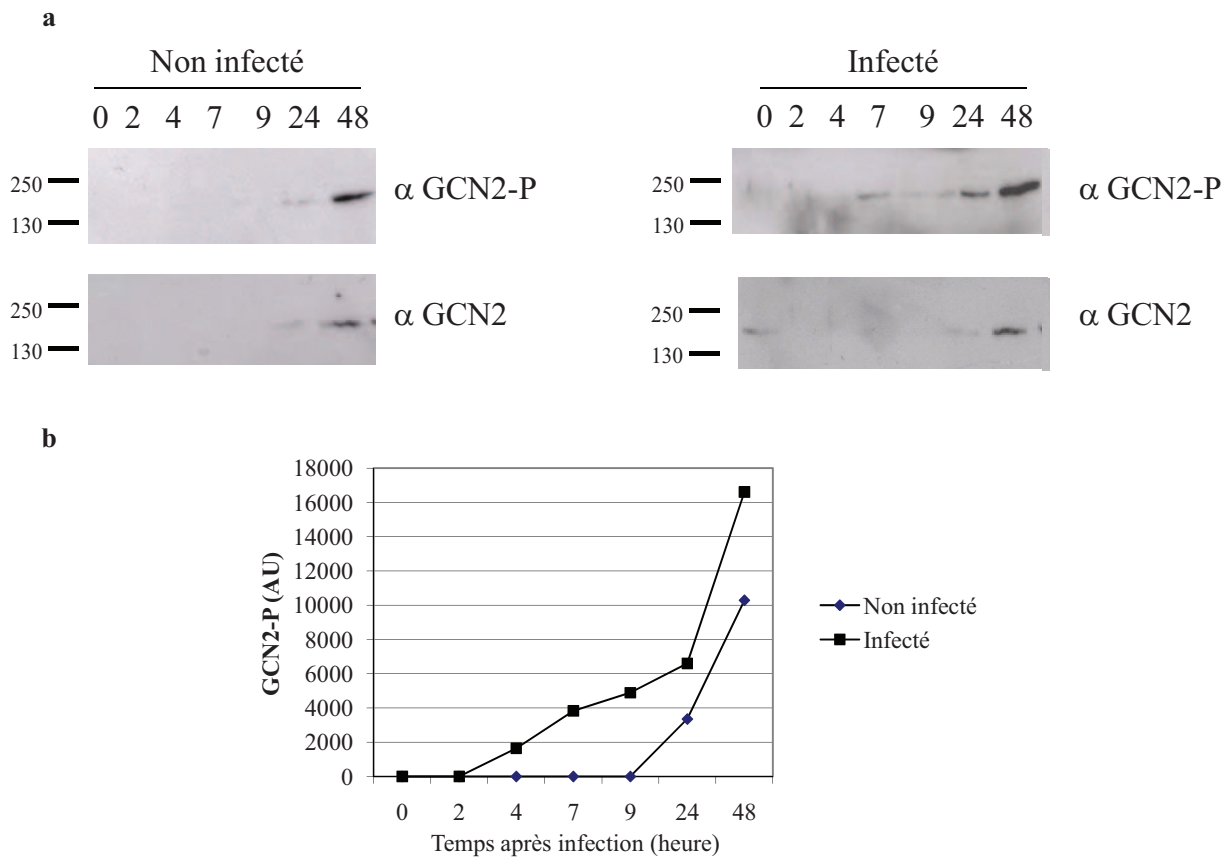


Figure 69. Effet de l'infection virale sur la phosphorylation de GCN2.

Les cellules infectées ou non infectées sont lysées entre 2 et 48 heures après l'infection dans du tampon de lyse L. 20 μ g de protéine est analysée par western blot pour chaque temps. GCN2 est révélée par un anticorps anti GCN2 et GCN2 phosphorylée est révélée par l'anticorps anti GCN2-PhosphoT889 (a). Les westerns blot sont quantifiés à l'aide du logiciel image J (b).

D. Rôle de l'infection sur la traduction des protéines

1) Activation de GCN2 lors de l'infection

Nous avons vu que GCN2 semble avoir un rôle lors de l'infection virale. L'extinction de la protéine entraîne une augmentation de l'infection virale. GCN2 est une protéine kinase de réponse au stress qui est activée par une carence en acides aminés mais également lors d'une infection par un virus à ARN le Sindbis Virus [194]. L'activation de GCN2 se traduit par son autophosphorylation au niveau de la thréonine 889. S'ensuit la phosphorylation d'eIF2 α et l'arrêt de la traduction des protéines. L'effet de GCN2 sur l'infection virale pourrait se faire de la même manière que pour le Sindbis Virus, c'est-à-dire par son autophosphorylation et l'arrêt de la traduction des protéines cellulaires.

Nous avons donc voulu voir si l'infection par le VIH-1 pouvait constituer un facteur d'activation de GCN2 qui se traduirait par son autophosphorylation.

Dans ce but, des cellules HeLaP4 sont infectées cette fois avec le VIH-1 Laï puis lysées à différents temps après infection. Afin de quantifier la proportion de GCN2 phosphorylée, les cellules sont lysées entre 2 et 48 h après l'infection puis les protéines sont séparées sur SDS-PAGE 8 % puis analysées par western blot. L'utilisation d'un anticorps spécifique du peptide de GCN2 phosphorylée sur la thréonine 889 permet de détecter spécifiquement cette phosphorylation. La phosphorylation de GCN2 est détectée dans les cellules infectées dès 4 heures après infection (**Figure 69 a partie droite**). En revanche, aucune phosphorylation de GCN2 n'est détectée et ce jusqu'à 24 h dans les cellules non infectées. (**Figure 69 a partie gauche**). A des temps plus longs, 24 et 48 heures, GCN2 est phosphorylée dans les cellules infectées et non infectées. La quantification de GCN2 phosphorylée avec le logiciel Image J nous permet de dire que la phosphorylation de GCN2 est toujours plus importante dans les cellules infectées que dans les cellules non infectées, même à 24 et 48 h (**Figure 69 b**). Nous avons également détecté GCN2 endogène dans les extraits et nous pouvons voir qu'une même quantité de protéine a été déposée pour chaque temps d'observation entre les cellules infectées et non infectées. La détection de la phosphorylation de GCN2 dans les cellules non infectées à partir de 24 h peut s'expliquer par les conditions de culture. En effet le milieu de culture n'est pas renouvelé pendant l'expérience, il y a donc un épuisement des acides aminés et donc une activation de GCN2. Les résultats montrent que GCN2 est phosphorylée de façon précoce, dès



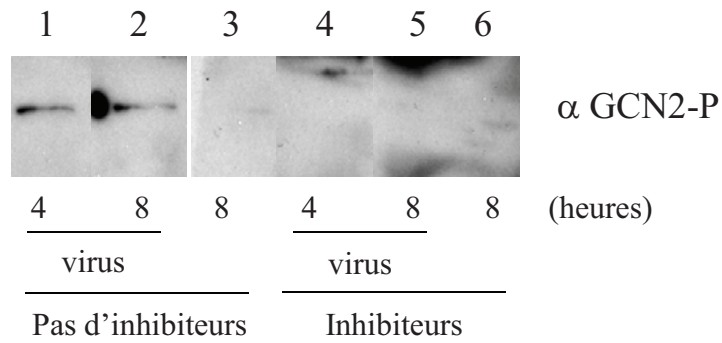


Figure 70. Effet de l'infection virale sur la phosphorylation de GCN2 en présence d'inhibiteurs du VIH-1.

Les cellules sont infectées en présence de 10 μ M d'AZT et de 20 μ M du dikétoacide L731, 988. Les protéines sont extraites à 4 et 8 heures après l'infection avec du tampon de lyse L. 20 μ g de protéine est analysée par western blot. La quantité de GCN2 phosphorylée est révélée par l'anticorps anti GCN2-PhosphoT889.

4 heures après l'infection (**Figure 69 b**). Cette phosphorylation observée à un temps si court n'est évidemment pas liée aux conditions de culture, mais à l'infection virale.

Nous avons réalisé la même expérience en présence d'inhibiteurs des étapes précoces de la réplication du VIH-1. Pour cela nous avons utilisé de l'AZT, inhibiteur nucléosidique de la RT, à une concentration de 10 μM , ainsi qu'un dikétoacide le L731,988, inhibiteur de l'intégration, à une concentration finale de 20 μM . Ces concentrations ont été déterminées au préalable comme inhibant totalement la réplication virale dans nos conditions (non montré). Les inhibiteurs sont rajoutés ensemble au moment de l'infection. En l'absence d'inhibiteurs, les résultats obtenus permettent de confirmer la phosphorylation de GCN2 dès 4 heures après l'infection (**Figure 70 pistes 1 et 2**). Les cellules infectées en présence des 2 inhibiteurs ne présentent plus aucune phosphorylation de GCN2 (**Figure 70 pistes 4 et 5**). En absence d'infection virale, aucune activation de GCN2 n'est observée (**Figure 70 pistes 3 et 6**). Nous voyons que lorsque les étapes de transcription inverse et d'intégration sont inhibées, il n'y a plus de phosphorylation de GCN2 à des temps courts. Ceci suggère que les étapes précoces du cycle sont nécessaires à l'activation de GCN2 et que la simple entrée du virion dans la cellule ne suffit pas. Certains travaux indiquent que des particules virales entières sont amenées vers le noyau et que ce n'est qu'après achèvement de la synthèse d'ADN que se fait la décapsidation et l'import nucléaire [49]. Il est donc possible qu'en présence d'AZT, la capsid virale ne soit pas démantelée et que les facteurs viraux responsables de l'activation de GCN2 ne soient pas exposés.

2) Etude de l'infection sur la traduction des protéines cellulaires

a. Effet de l'infection

Nous avons donc pu montrer que l'infection de cellules humaines par le VIH-1 entraîne une activation de GCN2 par autophosphorylation de la protéine. Lorsque GCN2 est activée dans une cellule non infectée, celle-ci est capable de phosphoryler le facteur de traduction eIF2 α ce qui va entraîner un arrêt de la traduction des protéines cellulaires. Nous nous sommes donc demandé si l'activation de GCN2 dans des cellules infectées entraîne un arrêt de la traduction des protéines cellulaires. Afin de marquer spécifiquement les protéines néosynthétisées, nous avons utilisé le Click-it protein analysis detection Kit (Invitrogene) qui repose sur l'utilisation d'un analogue de l'alanine couplé à un azide (L-AHA) qui sera couplé à un fluorophore après



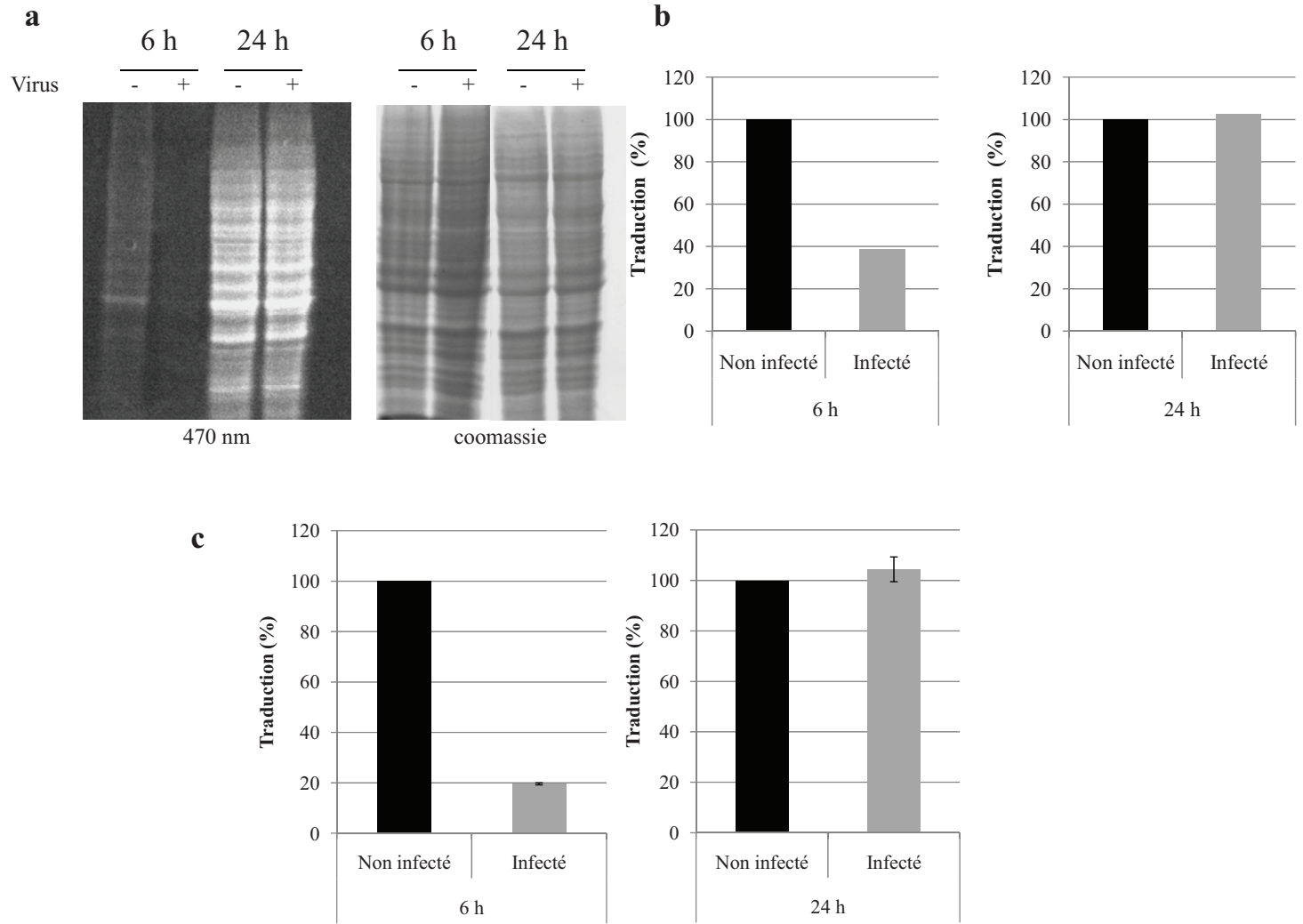


Figure 71. Effet de l'infection virale sur la traduction des protéines cellulaires.

Visualisation sur SDS-PAGE des protéines néosynthétisées dans des cellules non infectées et des cellules infectées à 6 heures et 24 heures après infection. Le gel de droite correspond à la coloration des protéines au Coomassie (a). Les protéines fluorescentes sont quantifiées avec le logiciel Image J. La quantité de protéines néosynthétisées dans les cellules infectées a été rapportée à la quantité de protéines néosynthétisées dans des cellules non infectées pour chaque temps (b). Les protéines néosynthétisées ont également été quantifiées par mesure de la fluorescence de l'Alexa-647 par cytomètre de flux 6 h et 24 h après l'infection. La quantité de protéines néosynthétisées dans les cellules infectées a été rapportée à la quantité de protéines néosynthétisées dans des cellules non infectées (c).

récupération des protéines grâce à un groupement alkyne (**Matériels et Méthodes Figure 46**). Les protéines néosynthétisées sont donc fluorescentes après marquage. Les cellules sont cultivées pendant 1 heure dans un milieu sans méthionine. Ensuite les cellules sont infectées en présence de L-AHA puis récupérées à différents temps après l'infection. Les protéines sont marquées soit par du TAMRA-alkyne pour séparation sur SDS-PAGE, soit par de Alexa Fluor[®] 647 alkyne pour analyse par cytométrie de flux.

La visualisation des protéines néosynthétisées sur gel SDS-PAGE permet de voir que les cellules infectées présentent une diminution importante de la synthèse des protéines par rapport aux cellules non infectées 6 heures après infection (**Figure 71 a, gel de gauche**). 24 h après l'infection, le niveau des protéines néosynthétisées est le même que pour les cellules non infectées. La quantification de la fluorescence des protéines séparées sur gel à l'aide du logiciel Image J permet de confirmer que l'infection virale entraîne un arrêt de la production des protéines cellulaires dès 6 h après l'infection (**Figure 71 b, gauche**) tandis que la synthèse des protéines est restaurée 24 h après infection (**Figure 71 b, droite**). La coloration du gel au bleu de Coomassie permet de vérifier qu'une quantité de protéine équivalente a été déposée pour chaque extrait (**Figure 71 a, gel de droite**). L'expérience a été répétée en réalisant l'analyse des protéines par cytométrie de flux qui permet de quantifier plus précisément la fluorescence. Nous obtenons les mêmes résultats que précédemment avec une baisse de la traduction des cellules infectées à 6 h après infection puis un niveau identique entre cellules infectées et cellules non infectées à 24 h après infection (**Figure 71 c**).

Il semble donc qu'un ou plusieurs facteurs viraux conduisent à l'arrêt de la traduction des protéines rapidement après l'entrée du virus et qu'un autre facteur viral ou cellulaire permette de relancer la machinerie.

b. Effet de l'intégrase

La traduction des protéines cellulaires est modifiée lors de l'infection par le VIH-1. Nous avons essayé de comprendre quels peuvent être le ou les facteurs responsables de la modulation de la traduction. Comme nous avons montré une interaction entre GCN2 et l'intégrase, nous avons décidé de regarder l'effet de la transfection de l'intégrase dans les cellules. Pour cela nous avons utilisé des cellules cultivées dans un milieu carencé en cystéine afin d'induire l'activation spécifique de GCN2 et pas d'une autre protéine kinase de réponse au stress, particulièrement PKR qui est connue pour être activée lors de l'infection au VIH-1. Les cellules sont cultivées pendant 1 heure en absence de méthionine dans un milieu avec ou



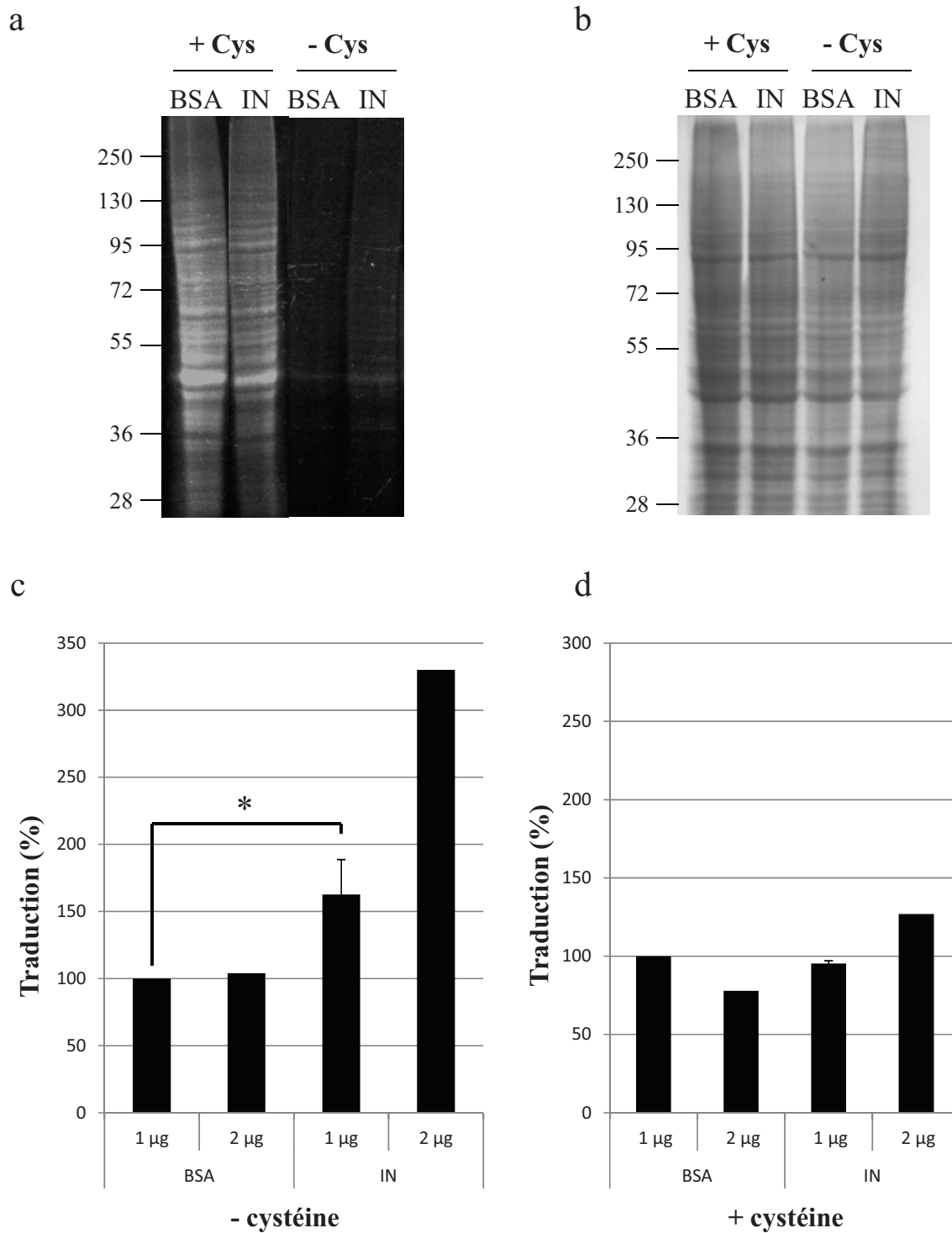


Figure 72. Effet de l'Intégrase sur la traduction des protéines dans des conditions de carence en acide aminé.

Les cellules sont cultivées dans un milieu sans Méthionine, + / - cystéine pendant 1h. La transfection de la BSA ou d'IN est réalisée à l'aide du Chariot comme agent de transfection et l'AHA est ajouté aux cellules. Six heures après la transfection, l'e marquage des protéines néosynthétisées est fait avec le TAMRA-alkyne. La visualisation des protéines après migration sur SDS-PAGE est effectuée sous exposition de l'illuminateur Safe Light blue (**a**) ou après coloration au bleu de Coomassie (**b**). Les cellules sont transfectées avec 1 et 2 µg de BSA ou d'IN et cultivées pendant 6 heures dans un milieu plus AHA, sans méthionine ni cystéine (**c**) ou sans méthionine plus cystéine (**d**). Le marquage des protéines est fait en utilisant l'Alexa Fluor 647 alkyle et la mesure de la traduction des protéines est suivie par cytométrie de flux. pvalue 0,053

sans cystéine. L'absence de cystéine va entraîner l'accumulation de tRNA non chargés qui vont activer GCN2 en se fixant sur son domaine Histidyl tRNA synthétase. Ensuite les cellules sont transfectées avec de l'IN ou de la BSA comme contrôle en utilisant un peptide chariot. Le milieu des cellules est supplémenté en L-AHA au moment de la transfection. Les cellules sont cultivées pendant 6 heures puis les protéines fluorescentes sont analysées sur SDS-PAGE (**Figure 72 a et b**) ou par cytométrie en flux (**Figure 72 c et d**).

Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu avec cystéine, la traduction des protéines est efficace. De plus, aucune diminution de la traduction n'est observée lorsque les cellules sont transfectées avec l'intégrase par rapport au contrôle BSA (**Figure 72 a**). Les cellules cultivées dans un milieu sans cystéine présentent une diminution de la traduction, quelque soit la protéine transfectée (**Figure 72 a**). Cependant la baisse de traduction semble moins importante pour les cellules transfectée avec l'IN (**Figure 72 a**). Le gel coloré au coomassie permet de vérifier qu'une même quantité de protéines a été déposée (**Figure 72 b**).

Afin de confirmer ce résultat, les cellules sont transfectées avec deux quantités d'IN ou de BSA et la fluorescence est mesurée par cytométrie de flux (**Figure 72 c et d**). Lorsque les cellules sont cultivées en absence de cystéine, la synthèse des protéines est diminuée de 80 % (non montré). Lorsque les cellules sont transfectées avec différentes quantités d'intégrase, la traduction des protéines est augmentée alors que la transfection de la BSA n'a aucun effet (**Figure 72 c**). L'effet de la transfection de l'intégrase sur la traduction des protéines cellulaires est dose-dépendante et permet d'augmenter la traduction de 3 fois pour 2 µg d'IN. Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu non carencé en acide aminé, la synthèse des protéines n'est pas affectée (**Figure 72 d**). La transfection d'IN dans des cellules cultivées en présence de cystéine ne permet pas d'augmenter la traduction des protéines (**Figure 72 d**).

Il semblerait donc que la transfection d'intégrase ne conduise pas à une activation de GCN2 puisque nous n'observons pas d'arrêt de la traduction des protéines des cellules cultivées en milieu non carencé. L'intégrase n'est pas le facteur viral ou alors n'est pas suffisante pour conduire à l'activation de GCN2.

Par contre, l'intégrase est capable de restaurer la traduction des protéines dans des cellules dans lesquelles GCN2 est préalablement activée.





Figure 73. Alignement de séquence entre l'intégrase de VIH-1, eif2 α humaine et la K3L du virus de la vaccine.

L'alignement a été réalisé avec BioEdit. Les séquences homologues sont entourées en noir.

E. Rôle du domaine d'interaction entre GCN2 et IN

Nous avons pu montrer que l'intégrase restaure la traduction des protéines dans des cellules où GCN2 a été activée. Nous avons montré une interaction entre GCN2 et l'IN, et donc nous nous sommes demandé quel est le rôle de cette interaction sur le cycle viral.

Chez la levure, la reconnaissance d'eIF2 α par GCN2 se fait par fixation sur une séquence conservée $_{79}\text{KGYID}_{83}$. Puisque l'IN interagit avec GCN2, nous avons recherché dans la séquence de l'intégrase la présence d'un motif similaire. Une séquence $_{81}\text{SGYIE}_{85}$ a été identifiée et celle-ci pourrait être un site putatif de reconnaissance par GCN2 (**Figure 73**).

Nous savons que chez eIF2 α de levure, des études de mutagenèse ont montré que le résidu D de la séquence $_{79}\text{KGYID}_{83}$ est essentiel pour la phosphorylation d'eIF2 α et que seule une mutation D en E conserve la phosphorylation [181]. Nous avons donc réalisé des mutations sur le gène de l'IN au niveau du résidu E $_{85}$ qui est le résidu homologue du D83 chez eIF2 α .

Les mutations E85A et E85D ont été choisies pour respectivement empêcher l'interaction avec GCN2 et conserver cette interaction. Des virus portant l'IN mutée au niveau du résidu E85 ont été produits. L'effet des mutations sur la réplication virale et sur la traduction des protéines a été observé.

1) Production des pseudovirus

Pour étudier l'effet des mutations, nous avons travaillé avec des lentivirus pseudotypés VSV-G infectieux mais non répliatifs (« single cycle assay »). Pour cela, nous avons introduit les mutations E85A et E85D par mutagenèse dirigée dans le plasmide pCMV Δ 8.91 codant les protéines des virions. Après séquençage, les plasmides corrects ont été utilisés pour la production de particules virales mutées.

La production des particules virales a été réalisée par la Plateforme de Vectorologie de Bordeaux 2 comme décrit dans le **Matériels et Méthodes**. Le dosage des particules infectieuses a été déterminé ainsi que le dosage de protéine p24 par ELISA. A partir de la quantité de p24, la quantité de particules totales (infectieuses et non infectieuses) est déterminée en considérant 10000 particules de VIH-1 pour 1 pg de p24 (Tronolab).



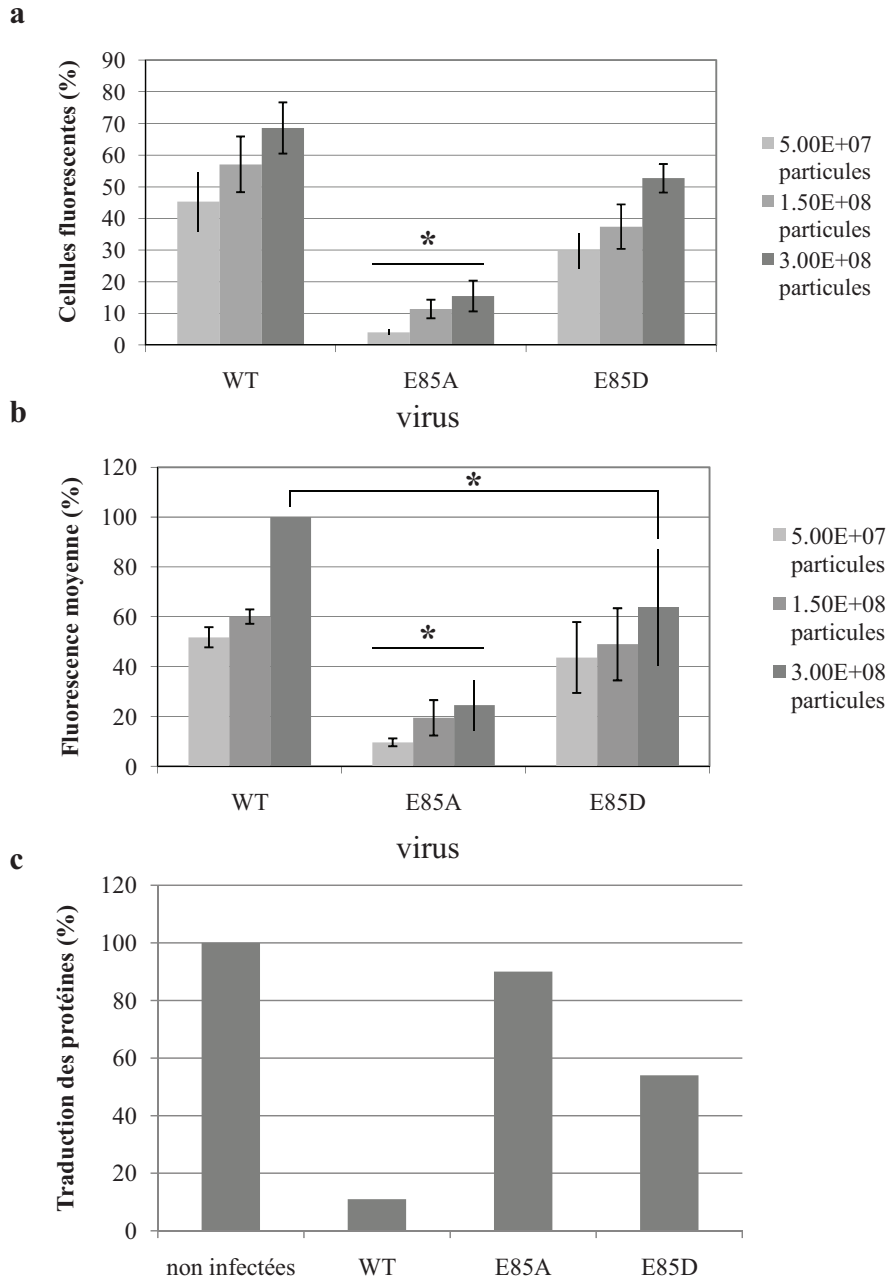


Figure 74. Infectiosité des virus WT, E85A, et E85D et effet sur la traduction.

Les cellules 293T sont infectées avec $5.0E+07$; $1.5E+08$ et $3E+08$ particules virales pendant 10 jours puis les cellules sont décollées et lavées 3 fois avec du PBS. L'infection est mesurée par analyse de la fluorescence des cellules infectées par cytométrie de flux. Au moins 3 expériences indépendantes ont été utilisées pour calculer le pourcentage de cellules fluorescentes (a) et la fluorescence moyenne (b). Les protéines néosynthétisées dans des cellules non infectées et des cellules infectées à 6 heures après infection sont visualisées sur SDS-PAGE à 470 nm puis quantifiées avec le logiciel Image J. La quantité de protéines néosynthétisées a été rapportée à la quantité de protéines néosynthétisées dans des cellules non infectées (c).

Tests de student significatifs < 0.05 .

2) Infectiosité des virus

Avant de regarder l'effet des mutations E85A et E85D de l'IN sur la traduction des protéines cellulaires, nous avons tout d'abord vérifié l'infectiosité des virus.

Dans ce but, des cellules 293T sont infectées avec différentes quantités de particules estimées à partir du dosage de la p24: entre 5.10^7 et 3.10^8 particules pour 50 000 293T. Après l'infection, les cellules sont cultivées pendant un minimum de 10 jours afin d'éliminer les plasmides contaminants. Puis les cellules sont récupérées et analysées par cytométrie en flux sur un FACS Canto (**Figure 74 a**). L'infectiosité est déterminée par mesure de la fluorescence de l'EGFP à environ 450 nm. Le pourcentage de fluorescence permet de visualiser la quantité de cellules infectées (**Figure 74 a**) alors que la fluorescence moyenne permet de quantifier la quantité d'EGFP produite en moyenne par chaque cellule (**Figure 74 b**).

Les cellules infectées avec des quantités croissantes de virus WT présentent une augmentation du pourcentage de fluorescence (**Figure 74 a**) et de la fluorescence moyenne (**Figure 74 b**). Les virus portant la mutation E85A au niveau de l'IN (que nous appelleront E85A) infectent beaucoup moins de cellules (**Figure 74 a**), et la fluorescence moyenne est également très diminuée (**Figure 74 b**). Les virus portant la mutation E85D sur l'IN (E85D) présentent un pourcentage d'infection et de fluorescence moyenne légèrement inférieur au WT (**Figure 74 a et b**). Cependant après calcul du test de student, il s'avère que la différence observée n'est pas significative exceptée pour la quantité la plus importante de virus utilisée et pour la mesure de l'intensité moyenne de fluorescence. La mutation E85A de l'IN a donc un effet extrêmement délétère pour l'infection des virus.

3) Effet des mutations sur la traduction

Nous avons ensuite déterminé l'effet des mutations de l'intégrase sur la synthèse des protéines. Pour cela, les cellules sont cultivées pendant 1 heure dans un milieu sans méthionine puis infectées avec les virus WT ou mutés en présence de L-AHA. Les protéines sont récupérées 6 heures après l'infection. Après le marquage, les protéines sont séparées sur SDS-PAGE 10 % coloré au bleu de Coomassie. Les protéines marquées avec le TAMRA-alkyne sont visualisées avec l'Illuminateur Safe Light blue à 450 nm. La fluorescence est quantifiée avec le logiciel Image J. Nous pouvons voir que de la même manière que lorsque les cellules sont infectées avec le VIH-1, les cellules infectées avec les lentivirus pseudotypés



VSV-G WT présentent une diminution de la traduction des protéines cellulaires (**Figure 74 c**). Lorsque les cellules sont infectées avec les virus E85A, la traduction des protéines cellulaires est peu perturbée (**Figure 74 c**). Au contraire les pseudovirus E85D présentent une inhibition d'environ 50 % de la traduction par rapport aux cellules non infectées (**Figure 74 c**).

Nous pouvons donc voir que la traduction des cellules infectées par les virus portant des mutations de l'IN en position E85 est moins diminuée que dans les cellules infectées avec les virus WT. Cependant, nous avons vu que les virus E85A sont très peu infectieux. Il est donc possible que les virus E85A n'activent pas GCN2. Nous ne pouvons donc pas interpréter ce résultat concernant la traduction des protéines cellulaires. D'autre part, alors qu'à un temps court après l'infection la traduction des cellules infectées avec les virus WT est très faible, celle des cellules infectées avec les virus E85D est moins diminuée. Nous pouvons donc supposer que la mutation E85D qui rétablit le motif GYID présent chez eIF2 α pour l'interaction avec GCN2, permet de maintenir l'interaction de l'IN sur GCN2, et inhibe la traduction bien qu'à un degré moindre que le virus WT.

F. Conclusion et discussion

Interaction entre l'intégrase et GCN2

L'interaction entre l'IN et GCN2 a tout d'abord été identifiée dans le cadre d'un double hybride réalisé à partir d'une banque génomique de la levure. GCN2 est une protéine kinase de réponse au stress qui est conservée de la levure aux cellules de mammifères. La première étape de ce travail a été de voir si GCN2 interagit avec l'IN dans les cellules humaines. Nous avons pu effectivement montrer une interaction entre GCN2h et l'IN grâce à une technique d'immunoprécipitation. Les études de double hybride ont été réalisées avec différents domaines de l'intégrase mais seule l'IN entière est capable d'interagir avec GCN2. Il serait intéressant de déterminer plus précisément le ou les domaines de l'IN impliqués dans cette interaction en réalisant des découpes différentes du gène de l'IN pour réaliser des doubles hybrides. En effet la connaissance de ces sites pourrait permettre d'identifier des inhibiteurs de cette interaction, ce qui pourrait diminuer la restauration de la synthèse des protéines observée en présence de l'IN et donc diminuer la réplication virale.



Rôle de GCN2 sur l'infection virale

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de GCN2 sur le cycle viral. Nous avons pu montrer que l'inhibition de la traduction de GCN2 par ARN interférence permet d'augmenter le pourcentage d'infection dès 24 h après transfection des siRNA dans des cellules HeLa P4, ce qui suggère un rôle restrictif de GCN2 sur l'infection du VIH-1. D'autre part, l'utilisation d'une molécule inhibitrice de l'activité kinase de GCN2 permet également d'augmenter l'infection du VIH-1. Il est donc possible que l'inhibition de l'infection virale soit liée à l'activité kinase de GCN2.

Par ailleurs, la transfection d'ADN plasmidique permettant la surexpression de GCN2 a été réalisée dans des cellules 293T infectées par des virus pseudotypés VSV-G. Aucun effet n'a été détecté sur l'infection virale. Cependant nous ne savons pas quels sont les déterminants de la restriction de GCN2 sur le cycle viral. Il est possible que GCN2 interagisse avec une protéine virale qui n'est pas présente dans les virus pseudotypés VSV-G. Il est possible que GCN2 doive être activée par phosphorylation mais nous n'avons pas vérifié si GCN2 est activée lors de l'infection par les lentivirus pseudotypés VSV-G, ni si GCN2 surexprimée est phosphorylée.

D'autre part, la quantification des acides nucléiques viraux suite à l'infection de cellules surexprimant GCN2 activée ou après l'extinction de GCN2 par ARN interférence permettrait de déterminer le ou les étape(s) virale(s) concernée(s).

Activation de GCN2 par l'infection virale

Après l'identification du rôle restrictif de GCN2 sur le cycle viral, nous avons regardé si le domaine kinase de GCN2 est activé lors de l'infection par le VIH-1. Dans les cellules non infectées, le domaine kinase de GCN2 est activé par autophosphorylation de GCN2 sur la thréonine 889. Nous avons pu détecter une phosphorylation de GCN2 sur ce résidu dès 4 h après l'infection ainsi qu'une augmentation de la quantité de GCN2 phosphorylée 24 h après l'infection par rapport à des cellules non infectées. GCN2 est donc activée dans nos conditions d'infection de cellules humaines par le VIH-1. Les études préliminaires utilisant des inhibiteurs des étapes précoces de l'infection virale (AZT, dikétoacide) montrent que lorsque la transcription inverse et l'intégration sont inhibées, la phosphorylation de GCN2 n'est pas observée. Ceci permet de dire que la simple entrée du virus dans la cellule ne suffit pas à activer la protéine kinase et que certains facteurs déterminants présents lors des étapes précoces du cycle sont nécessaires à l'activation de GCN2. Ces éléments pourraient être une



ou plusieurs protéines virales contenues dans le CPI ou encore l'ARN ou l'ADN viral. Dans le cadre de l'infection au Sinbis Virus, des séquences non adjacentes de l'ARN viral appelées GAR (GCN2-Activating RNA) conduisent à l'activation spécifique de GCN2. [194]. Des expériences devront donc être réalisées afin de déterminer le ou les facteurs viraux responsables de l'activation spécifique de GCN2, par exemple en transfectant différentes constructions de l'ARN génomique viral.

Nous avons vu précédemment que la surexpression de GCN2 dans des cellules 293T n'a pas d'effet sur l'infection des virus. Cependant nous ne savons pas si le domaine kinase de GCN2 est activé lors de l'infection avec les pseudovirus. Si les virus ne contiennent pas l'élément nécessaire à l'activation de GCN2, ce résultat négatif pourrait s'expliquer. Il serait donc nécessaire de regarder si l'infection avec les virus entraîne l'activation de GCN2.

D'autre part, il serait intéressant de regarder l'effet de la surexpression de GCN2 activée sur l'infection virale. L'équipe de Hinnebusch a pu montrer que les mutations R794G et F842L, situées dans le domaine kinase de GCN2, permettent d'activer constitutivement le domaine kinase de la protéine [208]. L'introduction de ces mutations par mutagenèse dirigée dans le plasmide pCMV6-EIF2AK4 permettrait de préciser le rôle de l'activité kinase de GCN2 sur l'infection du VIH-1.

Rôle de l'infection sur la traduction des protéines

Il a été montré dans les cellules non infectées que l'activation de GCN2 par carence en acides aminés entraîne la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α puis un arrêt de la traduction [181]. Puisque l'infection par le VIH-1 s'accompagne de la phosphorylation de GCN2, nous avons regardé la traduction dans les cellules humaines lors de l'infection par le VIH-1.

L'infection par le VIH-1 entraîne une sévère diminution de la traduction à un temps court après l'infection puis le niveau de traduction est restauré 24 h après l'infection par rapport à des cellules humaines non infectées. Il semble donc qu'un facteur viral soit capable d'entraîner l'arrêt de la traduction des protéines, mais également qu'un second facteur, viral ou cellulaire, soit en mesure de relancer cette traduction. Le rôle de GCN2 sur l'infection virale indique que celle-ci pourrait être impliquée dans l'arrêt de la traduction lors de l'infection puisque GCN2 est activée lors de l'infection virale



Afin de déterminer le mécanisme responsable de l'arrêt de la traduction à un temps court après l'infection au VIH-1, il faudrait regarder si le taux de phosphorylation d'eIF2 α est affecté lors de l'infection virale. En effet, dans le cas de virus autres que le VIH-1, certains travaux [195, 196] rapportent que la phosphorylation de kinases de réponse au stress suite à l'infection virale du Virus de la Stomatite Vésiculaire ne passerait pas par la voie de phosphorylation d'eIF2 α . D'autres mécanismes que la phosphorylation de eIF2 α ont également été rapportés. Ainsi l'infection virale par le virus respiratoire syncytial entraîne une augmentation de la déphosphorylation de eIF2 α qui relance la traduction inhibée lors de l'infection. Nous pourrions regarder l'effet de l'infection sur la traduction des protéines après extinction de GCN2 par ARN interférence, ou en utilisant le SP600125, inhibiteur de l'activité kinase de GCN2.

D'autre part, des études ont pu montrer un rôle restrictif de PKR sur l'infection du VIH-1 qui est activée par de faibles quantités d'ARN viral [188], c'est-à-dire lorsque la réplication virale est modérée. En revanche, lorsque la réplication virale est plus importante, la quantité d'ARN viral augmente et l'effet sur PKR est inverse, la kinase est inhibée. Notre modèle cellulaire (HeLa P4) requiert l'utilisation de M.O.I assez importante (50) pour quantifier correctement l'infection virale dans des temps courts après l'infection. Il est donc possible que les grandes quantités de virus utilisées lors de nos infections n'entraînent pas d'activation de PKR. Cependant il sera nécessaire de regarder si nos conditions d'infections conduisent à l'activation de PKR. Des études précédentes ont également montré l'implication de plusieurs protéines de réponse au stress lors d'une infection virale. En effet lors de l'infection au VSV, GCN2 et PERK sont toutes les deux impliquées dans la restriction de l'infection [195]. Il ne serait donc pas étonnant qu'il y ait une complémentarité entre GCN2 et PKR lors de l'infection au VIH-1. Cependant, si le rôle de PKR lors des infections virales est bien connu, l'implication de GCN2 dans l'infection par le VIH-1 n'a jamais été décrite à notre connaissance.

D'autre part, nous avons uniquement regardé l'effet de l'infection sur la traduction en général sans distinction entre la traduction des protéines cellulaires ou des protéines virales. Il est possible que l'infection entraîne une diminution de la traduction des protéines virales mais que le virus soit toujours capable de traduire ses protéines. En effet il a été montré que la traduction du VIH-1, et particulièrement de l'ARN codant tat peut se faire via plusieurs IRES situés dans la séquence non traduite du 5'UTR [209]. Le facteur de traduction eIF2 α est impliqué dans la voie de traduction eucaryotique cap-dépendante. Le VIH-1 pourrait donc être



en mesure de traduire ses protéines malgré la phosphorylation d'eIF2 α . En effet, il a été montré que lors de l'infection au Sinbis Virus, l'activation de PKR entraîne une inhibition de la traduction des protéines cellulaires. Pourtant, la traduction des protéines virales est maintenue, grâce à la présence d'une structure en tige boucle présente sur l'ARN viral, qui permet l'initiation de la traduction par l'intervention d'un autre facteur d'initiation que eIF2 α [210]. Même si nous n'observons pas de diminution de la traduction à 24 h post infection, il se peut que la traduction des protéines cellulaires soit diminuée au profit de la traduction des protéines virales. Pour vérifier ce point, nous pourrions utiliser des virus où la séquence codant la GFP est ajoutée par exemple en C terminal de la région du gène pol qui code IN [211]. Après intégration, la traduction de l'IN-EGFP serait suivie par cytométrie en flux parallèlement à la traduction des protéines cellulaires.

Effet de l'intégrase sur la phosphorylation d'eIF2 α

L'interaction entre GCN2 et l'intégrase nous fait penser que l'IN pourrait être impliquée dans l'arrêt ou la relance de la traduction. Afin de déterminer le rôle de l'IN sur ces mécanismes, la transfection d'IN a été réalisée dans des cellules cultivées dans des conditions normales ou préalablement activées pour GCN2. Les résultats obtenus montrent que l'IN n'est pas le facteur viral qui conduit à l'arrêt de la traduction mais que l'IN est capable de relancer la traduction dans des cellules préalablement activées pour GCN2. Nous avons essayé de comprendre par quel mécanisme l'IN peut relancer la traduction.

Notre hypothèse est que l'IN pourrait agir comme un pseudosubstrat de GCN2. La fixation de l'IN sur GCN2 lors de l'infection empêcherait la kinase de phosphoryler eIF2 α . Cela permettrait de maintenir la traduction des protéines cellulaires et surtout virales.

Afin de vérifier cette hypothèse nous allons réaliser des tests de phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 en présence d'IN *in vitro*. Pour cela, nous avons purifié eIF2 α exprimé chez E. coli et montré qu'eIF2 α est phosphorylé par GCN2. Différents contrôles comme l'utilisation de SP600125 qui permettrait de contrôler la spécificité de phosphorylation d'eIF2 α par GCN2, ou encore une IN mutée au niveau du site catalytique seront réalisés. Différentes IN de rétrovirus autres que VIH-1 (PFV, HIV-2, dont nous disposons au laboratoire), MLV ou encore AMV pourront être utilisées.



Rôle du domaine d'interaction entre GCN2 et l'intégrase

Nous travaux ont permis d'identifier un motif SGYIE sur l'IN de VIH-1 qui pourrait être une région d'interaction entre IN et GCN2. Nous avons regardé l'importance de ce motif sur l'infection virale et sur la traduction. Pour cela, des virus portant l'IN mutée au niveau du motif SGYIE ont été produits. Par homologie avec eIF2 α nous avons choisi de produire le mutant E85A de l'IN susceptible d'inhiber l'interaction avec GCN2 ainsi que le mutant E85D afin de conserver l'interaction. L'analyse des mutants a permis de montrer l'importance du résidu E85 pour l'infectiosité. Lorsque le résidu est muté en A, les virus ne sont plus infectieux alors que lorsque le résidu est muté en D, l'infectiosité est conservée. De la même manière, les effets des virus sur la traduction sont également divers. Les virus E85A qui ne sont plus infectieux, sont incapables d'entraîner un arrêt de la traduction de protéine. Au contraire les virus E85D induisent une diminution de la traduction, mais celle-ci est moindre que pour les WT. Nous pouvons donc supposer que l'arrêt de la traduction des protéines liée à l'infection virale est étroitement lié au déroulement des étapes de l'infection ce qui va dans le sens des résultats obtenus lorsque l'activation de GCN2 n'est plus observée en présence d'AZT et d'acides dicétoniques (**Chapitre 2. D. a**).

Dans un premier temps il sera nécessaire de confirmer les interactions entre les IN recombinantes mutées et GCN2. La transfection d'IN recombinante E85A et E85D sur la traduction sera étudiée. On s'attendrait à ce que la restauration de la traduction observée lors de la transfection de l'IN WT ne soit pas observée avec la transfection de l'IN E85A. D'autre part, il serait intéressant de regarder l'effet des mutations de l'intégrase sur l'activation de GCN2 lors de l'infection par des virus mutés.

L'effet de l'addition d'IN recombinantes mutées sur la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 lors de tests de phosphorylation *in vitro* évoqués ci-dessus sera intéressant à observer.



*Chapitre 3 : Caractérisation des virus
portant les mutations E85A et E85D de
l'intégrase*



Chapitre 3 : Caractérisation des virus portant les mutations E85A et E85D de l'intégrase

A. Objectifs

Afin de mieux comprendre le rôle de l'interaction GCN2/IN sur le cycle viral et sur la traduction des protéines cellulaires, les mutations E85A et E85D ont été introduites dans le gène de l'IN pour produire des virus mutés. Nous avons pu montrer que ces mutations ont un effet sur l'arrêt de la traduction des protéines. En effet, les virus E85D inhibent également la traduction, mais deux fois moins que les virus WT. Le rôle de la mutation E85A sur la traduction des protéines n'a pu être déterminé puisque celle-ci entraîne une inhibition quasi complète de l'infectiosité. Néanmoins le rôle de cet acide aminé de l'IN pour le cycle viral est clairement essentiel.

Il nous a paru intéressant de réaliser une caractérisation plus complète du rôle de ces mutations sur le cycle viral et sur l'activité de l'enzyme. En effet de nombreuses questions se posent quand à l'effet de ces mutations. Notamment le ou les étapes du cycle viral concernées par ces mutations qui conduisent à la diminution de l'infectiosité du virus E85A. L'intégration ou une étape en amont pourrait être responsable. D'autre part, la mutation E85A/D est-elle une mutation catalytique de l'IN ? Nous avons cherché à mettre en évidence l'étape du cycle touchée par la mutation. D'autre part, les mutations ont été introduites dans un plasmide permettant la production d'intégrase recombinante au laboratoire afin d'étudier l'effet des mutations *in vitro* sur l'activité enzymatique de la protéine.

B. Effet des mutations sur l'infectiosité

Comme nous l'avons vu dans la **Figure 74 a et b**, la mutation E85A a un effet extrêmement délétère pour l'infection des virus alors que les virus portant la mutation de l'IN E85D sont semblables aux WT. Un défaut d'intégration ou bien un défaut d'une étape en amont comme la transcription inverse pourraient entraîner les diminutions d'infectiosité observées.



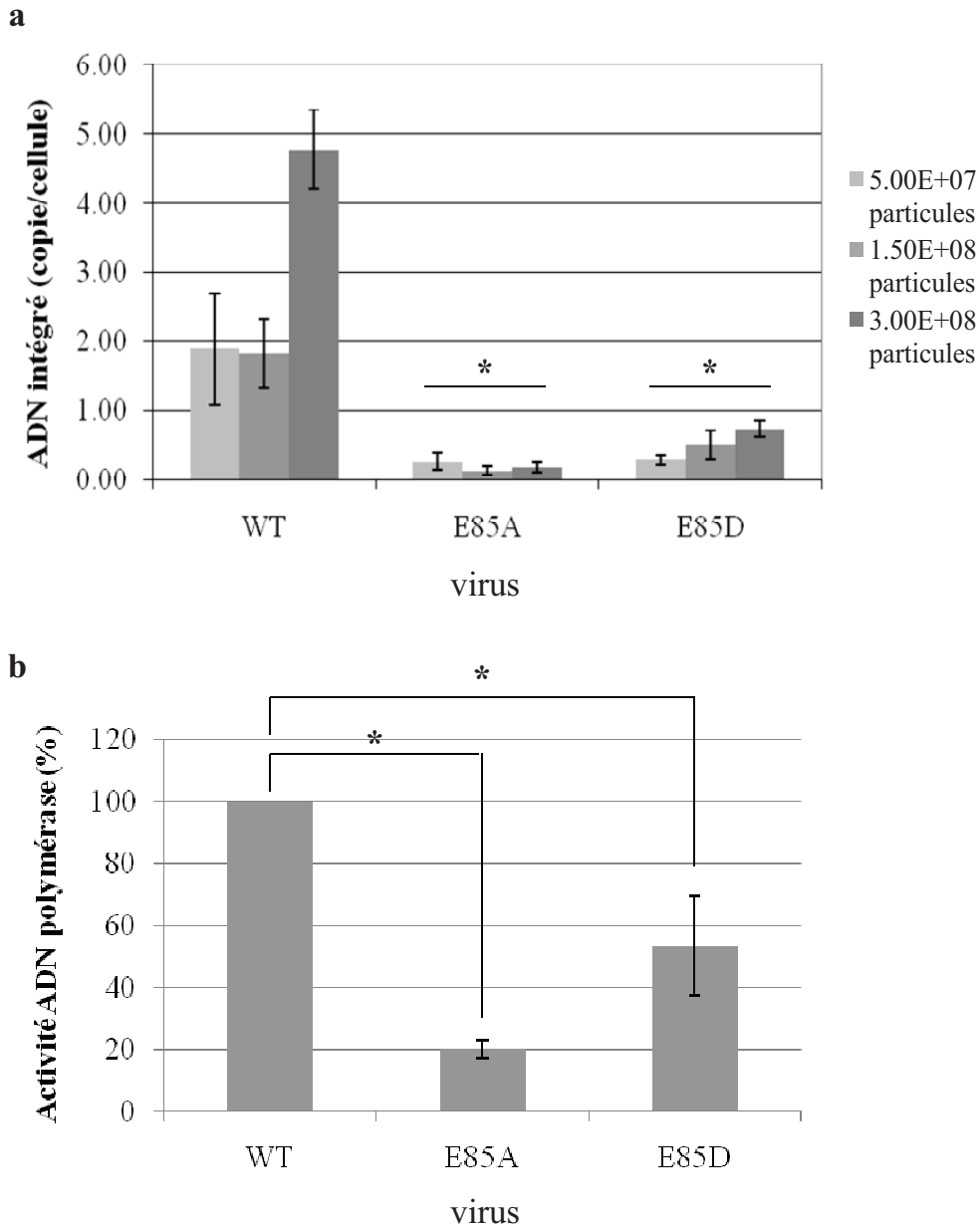


Figure 75. Activités d'intégration et ADN polymérase ARN dépendante des virus E85A, E85D et WT.

Les 293T sont infectées avec $5.0E+07$; $1.5E+08$ et $3E+08$ particules virales pendant 10 jours puis les cellules sont décollées et lavées 3 fois avec du PBS puis l'ADN viral total est extrait. La quantité d'ADN intégré est quantifiée par PCR quantitative à partir de 25 ng d'ADN extrait (a). L'activité ADN polymérase ARN dépendante est mesurée après perméabilisation des particules virales et ajout d'une matrice polyA oligodT en présence de TTP tricié. La radioactivité est mesurée et le pourcentage d'activité ADN polymérase est calculé par rapport à l'activité du virus WT (b).

Des PCR quantitatives spécifiques de chaque étape ont été réalisées afin de déterminer l'étape responsable de cette diminution.

1) Quantification de l'ADN intégré

Nous avons quantifié l'ADN intégré dans les cellules infectées par les virus WT, E85A et E85D. Pour cela, les cellules sont infectées avec des quantités croissantes de virus, et les PCR quantitatives sont réalisées 10 jours après l'infection. Les cellules infectées avec les virus WT présentent une augmentation du nombre de copies d'ADN intégré de 2 à 5 par cellule qui est corrélée avec les quantités de particules virales utilisées (**Figure 75 a**). Les cellules infectées avec les virus E85A présentent une diminution quasiment totale du nombre de copie d'ADN intégré (**Figure 75 a**), ce qui est en accord avec la fluorescence moyenne observée chez les cellules infectées et confirme l'importance du résidu E85 pour l'infectiosité virale. Les virus E85D présentent eux aussi une diminution importante du nombre de copie d'ADN intégré (**Figure 75 a**). Cependant, ces résultats ne reflètent pas a priori ce que nous avons pu voir concernant aussi bien le pourcentage de cellules infectées que la moyenne de fluorescence. Cependant, nous ne pouvons pas savoir à ce stade si la baisse de quantité d'ADN intégré est liée à un défaut d'intégration ou bien à une diminution de la quantité d'ADN proviral. Nous avons donc regardé si les mutations affectent l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT des virus.

2) Quantification de l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT

L'activité ADN polymérase des particules virales a été mesurée après perméabilisation de quantités équivalentes de virus en présence de Triton X100 (quantité non inhibitrice de l'activité de la transcriptase inverse *in vitro*) sur une matrice/amorce polyA/oligodT. Nous pouvons observer que les virus E85A présentent une baisse d'activité ADN polymérase ARN dépendante de l'ordre de 80 % par rapport au virus WT (**Figure 75 b**). La baisse d'infectiosité des virus E85A est donc probablement liée à la fois à une diminution de la synthèse d'ADN et de l'intégration. L'activité ADN polymérase ARN dépendante du E85D est diminuée significativement de 50 % par rapport au WT (**Figure 75 b**). De la même manière que pour le virus E85A, nous observons une baisse de l'activité RT des virus E85D même si celle-ci est



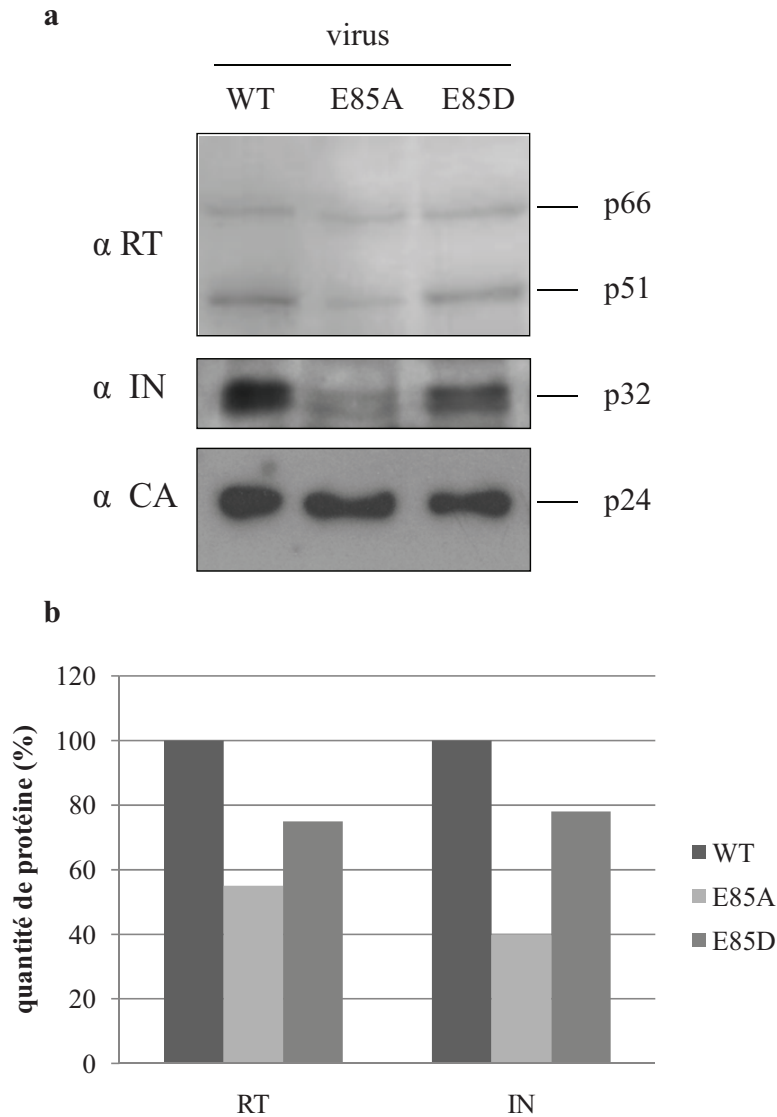


Figure 76. Contenu protéique des lentivirus pseudotypés VSV-G.

(a) L'équivalent de 220 ng de p24 a été déposé sur SDS-PAGE 12 % pour chaque virus. Puis les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées par western blot avec un anticorps anti RT, anti IN et anti capsid. La révélation est effectuée par incubation avec le SuperSignal West Pico Substrate suivie d'une autoradiographie. **(b)** La quantité de protéine a ensuite été quantifiée à l'aide du logiciel image J.

moindre. La baisse de la quantité d'ADN intégré mesurée est certainement due en partie à la baisse de synthèse d'ADN viral. Cependant les résultats obtenus pour le virus E85D sont étonnants puisque le pourcentage de cellules infectées (**Figure 75 a**) et la moyenne de fluorescence (**Figure 75 b**) sont peu différents du WT. Le pourcentage de fluorescence traduit le nombre de cellules infectées, il est possible qu'un même nombre de cellule soit infecté par les virus E85D et WT, même si la quantité d'ADN intégré par cellule est moindre. Par contre la moyenne de fluorescence est corrélée à la quantité d'EGFP traduite par la cellule et découle du nombre de copie d'ADN intégré. Donc si la traduction des cellules est augmentée lors de l'infection avec les virus E85D par rapport aux virus WT, cela pourrait expliquer le rétablissement de la quantité d'EGFP produite par rapport à la baisse d'ADN intégré observé. Ceci est en accord avec les résultats de la figure 74 où l'on voit que la traduction dans les cellules infectées avec le virus E85D est moins diminuée que dans les cellules infectées avec le virus wt.

3) Détection des protéines virales contenues dans les virions

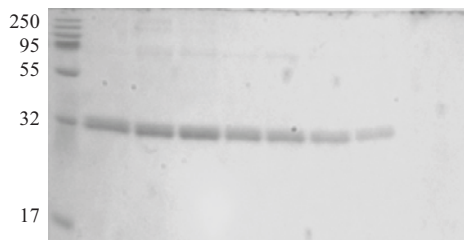
L'infectiosité des virus E85A est fortement diminuée. Cette infectiosité s'explique par une diminution de la synthèse d'ADN viral ainsi que de l'ADN intégré. Nous avons voulu savoir si le défaut d'activité observé dans les virus mutés pouvait être la conséquence d'une absence d'intégrase et de transcriptase inverse dans ces virus. Des quantités équivalentes de protéines issues de virus WT et mutés sont séparées par gel SDS-PAGE puis analysées par immunoblot. La RT, l'IN et la p24 sont détectées à l'aide d'anticorps spécifique de chacune de ces protéines.

220 ng de p24 ont été déposées sur SDS-PAGE pour chaque virus. L'anticorps anti-CA permet de détecter une bande à 24 kDa, la taille attendue de la capsid. Une même quantité de p24 a effectivement été déposée pour chaque virus (**Figure 76 a**). Le virus sauvage contient de la transcriptase inverse ainsi que de l'intégrase, en effet nous pouvons détecter les hétérodimères p51 et p66 de la RT ainsi que la p32 correspondant à l'intégrase (**Figure 76 a**). En comparaison, le virus E85D contient des quantités similaires de RT et d'IN alors que le virus E85A présente une baisse importante de la quantité des 2 enzymes (**Figure 76 a**). La quantification du western blot à l'aide du logiciel Image J permet de confirmer que les virus E85A contiennent environ 2 fois moins d'intégrase et de RT par rapport au sauvage alors que les quantités de protéines du E85D sont équivalentes à 80 % de celles du WT (**Figure 76 b**).



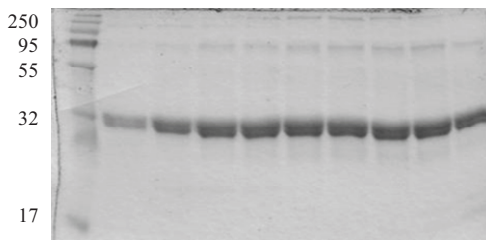
Intégrase WT

30 31 32 33 34 35 36 37



Intégrase E85A

27 28 29 30 31 32 33 34 35



Intégrase E85D

28 29 30 31 32 33 34 35 36

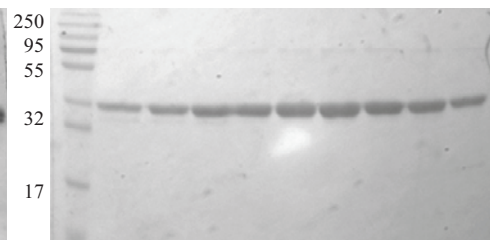


Figure 77. Purification des intégrases WT, E85A et E85D.

5 μ l de chacune des fractions de la dernière colonne de chromatographie est analysée sur SDS-PAGE 12 % coloré au coomassie comme indiqué dans le **Matériels et Méthodes**.

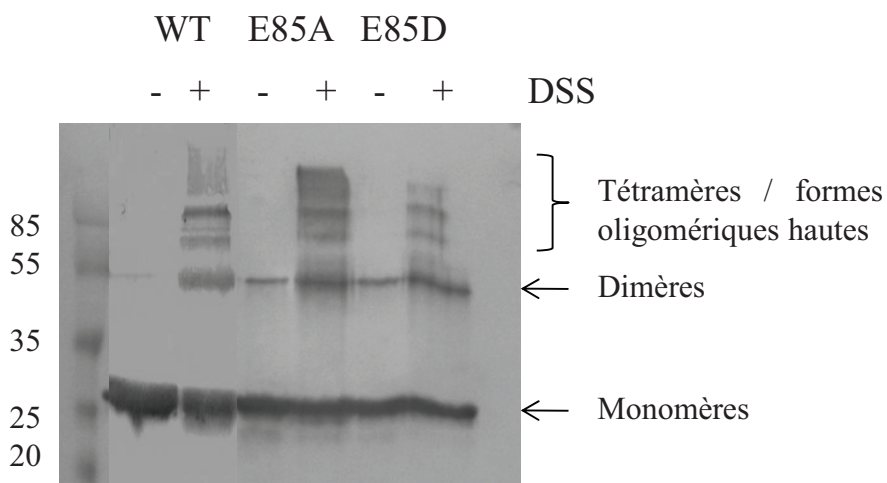


Figure 78. Propriétés oligomériques des enzymes purifiées.

60 pmoles de chaque protéine est analysée sur SDS-PAGE 12 % avec ou sans pontage préalable avec du DSS, puis un western blot est réalisé avec l'anticorps anti IN et révélé au chloronaphtol.

Le défaut d'activité de synthèse d'ADN et d'intégration du virus E85D ne s'explique donc pas par l'absence des protéines. Par contre, les résultats obtenus permettent d'expliquer l'absence d'infectiosité des virus E85A.

C. Effet des mutations sur l'activité de l'IN *in vitro*

Nous avons vu que les mutations réalisées sur le résidu E85 de l'IN entraînent des effets importants sur le cycle viral. Les activités de synthèse d'ADN et d'intégration sont diminuées pour les deux virus mutés. Nous avons pu expliquer l'absence d'infectiosité du virus E85A par la diminution de quantité de protéines virales dans les virions. Cependant en ce qui concerne le virus E85D, les baisses d'activités observées ne s'expliquent pas par une absence de protéines. Afin de mieux comprendre l'effet de ces mutations de l'IN sur le cycle viral, nous avons introduit les mutations dans le gène de l'intégrase afin d'exprimer et purifier l'intégrase au laboratoire et d'étudier l'activité de l'enzyme *in vitro*.

1) Expression et purification des IN

Les mutations E85A et E85D ont été introduites dans un vecteur d'expression de l'intégrase par mutagenèse dirigée. Après séquençage, les plasmides ont été utilisés pour la production d'intégrase recombinante mutée.

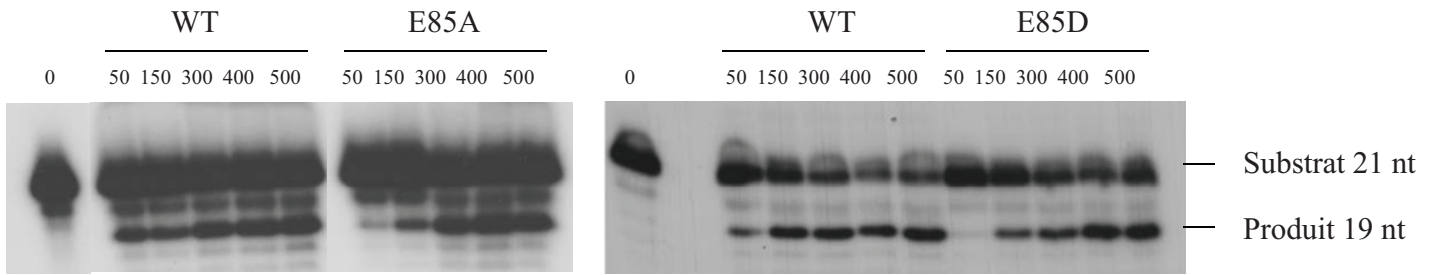
La production a été effectuée dans la souche Rosetta d'*E.coli* comme décrit dans le **Matériels et Méthodes** ainsi que dans le **Chapitre 1**. Les fractions contenant l'intégrase sont analysées sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 12% puis le gel est coloré au bleu de Coomassie (**Figure 77**). Les concentrations de protéines pour les fractions du pic de purification ont été déterminées par mesure au nanodrop.

2) Oligomérisation des enzymes

Comme nous l'avons vu précédemment pour l'enzyme mutée S24C, l'introduction d'une mutation peut modifier l'oligomérisation de l'intégrase et influencer sur son activité *in vivo* lors de l'infection. Afin de savoir si le défaut d'intégration et de synthèse d'ADN peut être lié à un changement oligomérique des IN mutées, 60 pmoles de chaque protéine ont été incubées avec une concentration de 1 mg/ml de DSS pendant 30 minutes à température ambiante afin de



a



b

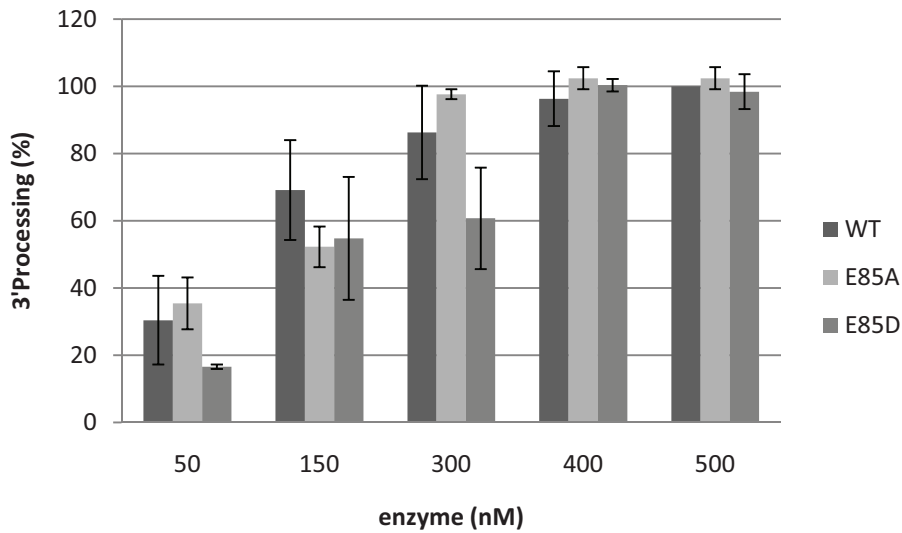


Figure 79. Test d'activité de 3'end Processing *in vitro* avec les IN E85A, E85D et WT.

(a) Le substrat marqué de 21 pb est clivé par l'activité 3' Processing de l'intégrase pour donner un produit de 19 pb. Les échantillons sont ensuite analysés par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 12% 7M urée en TBE. Pour chacun des mutants une gamme d'enzyme entre 50 et 500 nM est réalisée. (b) Les produits d'activités sont quantifiés avec le logiciel image J à partir des autoradiographies. Le 100 % d'activité correspond à la concentration la plus forte d'IN WT. Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes. Tests student > 0.05.

figer les oligomères naturellement présents dans la préparation. Les protéines sont ensuite séparées sur SDS-PAGE puis analysées par western blot (**Figure 78**). L'intégrase WT non pontée se présente principalement sous la forme de monomères à une taille de 32 kDa. Après pontage apparaissent des formes oligomériques plus hautes (**Figure 78**). En absence de pontage, les deux enzymes mutées présentent le même profil que le WT avec une quantité plus importante de ce qui pourrait être un dimère à la taille de 55 kDa (**Figure 78**). Après pontage au DSS, on observe les mêmes formes de haut poids moléculaire entre les trois enzymes. En conclusion, il n'y a pas de différences significatives observables avec cette simple technique de DSS entre les enzymes WT et mutées concernant l'oligomérisation des enzymes.

3) Propriétés enzymatiques

Nous avons voulu vérifier l'activité des différentes intégrases exprimées chez la bactérie *in vitro*. Des gammes d'enzymes entre 50 et 500 nM ont été réalisées afin de comparer les activités de 3'-end Processing et de transfert de brin des 3 protéines (**Figures 79 et 80**). Le test de processing est réalisé en utilisant comme substrat un ODN double brin correspondant aux 21 nt du LTR viral et marqué en 5' (**Figure 79 a piste 1**). L'intégrase va catalyser le clivage de 2 nucléotides en 3' du substrat et ainsi donner un ODN de 19 nt marqué. L'enzyme WT montre une augmentation du produit de 19 nt corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme (**Figure 79 a**). De façon comparable au WT, les deux enzymes mutantes présentent une augmentation du produit de 19 nt corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme. La quantification des gels avec le logiciel image J permet de déduire un pourcentage d'activité par rapport à la concentration la plus forte d'IN WT (**Figure 79 b**). Les activités de 3'Processing des trois enzymes sont similaires, bien que l'activité de l'enzyme E85D semble un peu plus faible notamment pour les concentrations les plus basses d'enzyme. Des études plus poussées seraient nécessaires pour confirmer ceci (cinétiques par exemple) .

La seconde activité de l'enzyme permet le transfert de brin du substrat de 19 nt précédemment obtenu dans d'autres fragments d'ADN. On voit l'apparition de fragments de différentes tailles supérieures et inférieures à celle du substrat de 19 nt. Comme précédemment l'apparition des produits est corrélée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme WT (**Figure 80 a**). De façon comparable au WT, les deux enzymes mutantes



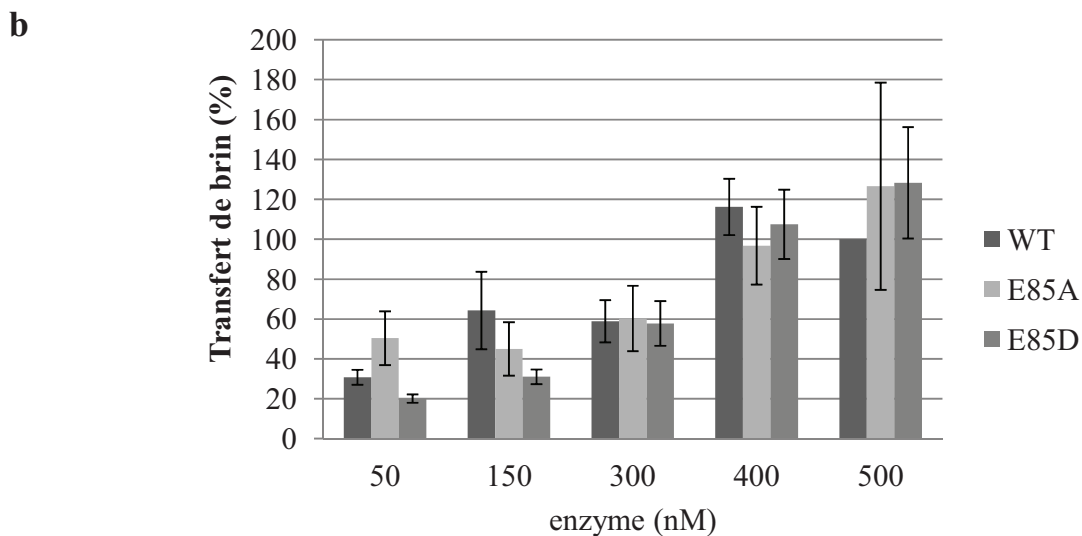
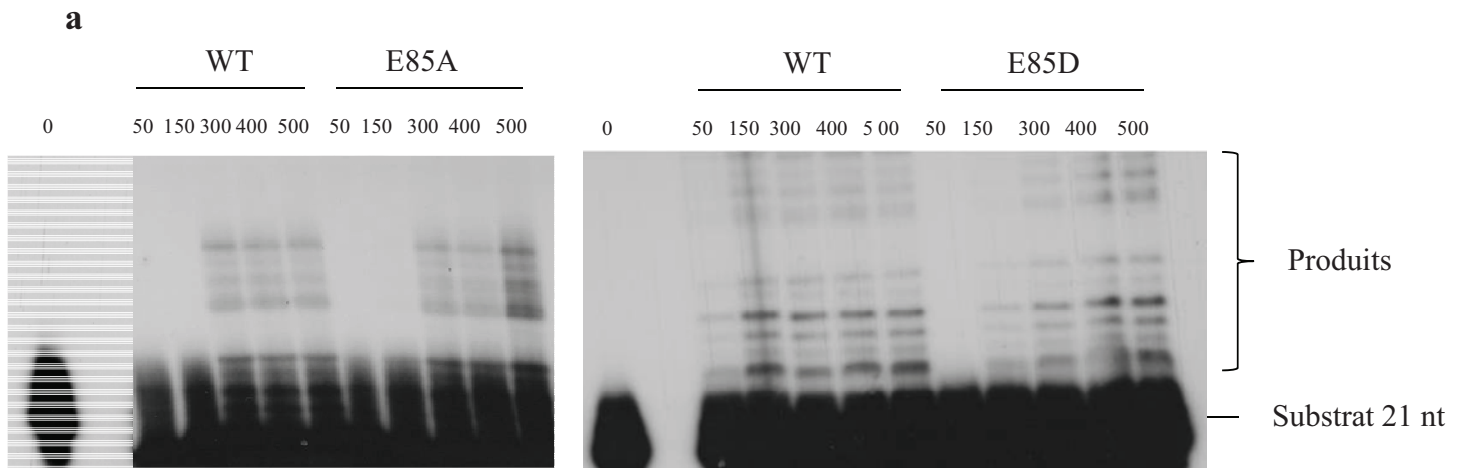


Figure 80. Test d'activité de transfert de brin *in vitro* avec les IN E85A, E85D et WT.

(a) Le substrat de 19 pb est intégré dans d'autres substrats par l'activité de transfert de brin de l'enzyme. Les échantillons sont ensuite analysés par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 12% 7M urée en TBE. Pour chacun des mutants une gamme d'enzyme entre 50 et 500 nM est réalisée. (b) Les produits d'activités sont quantifiés avec le logiciel image J à partir des autoradiographies. Le 100 % d'activité correspond à la concentration la plus forte d'IN WT. Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes. Tests student > 0.05.

présentent une augmentation du produit de transfert de brin (**Figure 80 a**). La quantification des gels avec le logiciel image J permet de déduire un pourcentage d'activité par rapport à la concentration la plus forte d'IN WT (**Figure 80 b**).

Bien que ces tests ne soient pas suffisamment fins pour détecter une différence d'activité subtile entre les enzymes, l'analyse permet de dire que les mutations n'entraînent pas au moins *in vitro*, une perte d'activité catalytique qui pourrait expliquer à elle seule la baisse de la quantité d'ADN intégré observée dans les cellules infectées avec les virus mutés.

D. Conclusion et discussion

Effet des mutations sur l'infectiosité

Dans la seconde partie de ce travail, le rôle du domaine putatif d'interaction de l'intégrase avec GCN2 a été étudié. Dans ce but nous avons réalisé deux mutations susceptibles de conserver cette interaction (E85D) ou de l'abolir (E85A). La production des virus mutés correspondants a été réalisée. Le virus E85A présente une infectiosité très diminuée. Les activités d'intégration et de synthèse d'ADN ont été mesurées et montrent que le défaut d'infectiosité du virus E85A découle d'un défaut de synthèse d'ADN viral de l'ordre de 80 % ainsi qu'une inhibition quasi totale de l'intégration.

L'infectiosité des virus E85D est similaire à celle observée pour les virus WT. Contrairement à ce qu'il aurait pu être attendu, l'activité de synthèse d'ADN est diminuée de 50 % environ, et l'activité d'intégration est également perturbée par rapport au WT. Malgré cette baisse du nombre de copie d'ADN intégré, la moyenne de fluorescence observée est similaire au WT. Cette restauration de la quantité d'EGFP traduite peut s'expliquer par la restauration du motif GYID d'interaction avec GCN2, par homologie avec eIF2 α . En effet, nous avons vu précédemment que la traduction des cellules infectées par les virus E85D est deux fois plus importante que celle observée lors de l'infection par les WT. Notre hypothèse est donc confirmée par ces résultats. L'interaction entre l'IN et GCN2 permettrait d'inhiber la phosphorylation d'eIF2 α et donc l'arrêt de la traduction des protéines.

La mutation E85A conduit à une inhibition sévère l'infectiosité des virus mutés. Nous n'avons donc pas pu tirer de conclusions quant à son rôle sur la traduction des protéines.



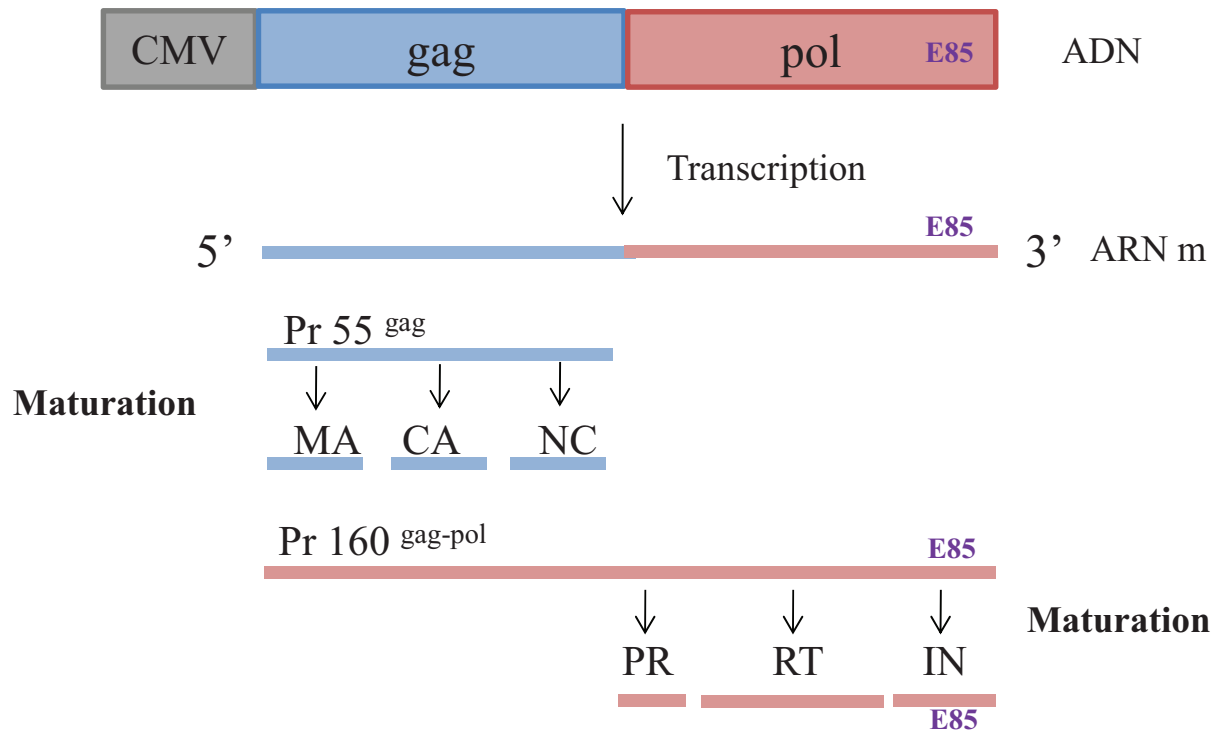


Figure 81. Représentation schématique des précurseurs protéiques issus du pCMV Δ 8.91 et localisation du résidu E85 de l'intégrase.

Cependant, ces virus pseudotypés VSV-G sont probablement capables d'entrer dans les cellules et l'inhibition de l'infection est sans doute due à l'inhibition des étapes post entrée. Cette inhibition étant corrélée à une absence d'inhibition de la traduction, ce résultat est encore une fois en accord avec le fait que l'utilisation de l'AZT par exemple s'accompagne de l'absence de phosphorylation de GCN2. (**Chapitre 2**).

La quantité de protéines virales contenue dans les virions a été quantifiée et il apparaît que le défaut d'activité observé pour les virus E85A est lié à une diminution importante des quantités de RT et d'IN dans les virus, de l'ordre de 50 %. La quantité de protéines virales contenues dans les virus E85D est quant à elle de 80 % de celle des virus WT.

Les protéines virales sont issues du clivage de différents précurseurs par la protéase dans les virions formés (**Figure 81**). La faible quantité de RT et d'IN dans les virus E85A pourrait donc être la conséquence de l'absence de maturation du précurseur gag-pol par la protéase, le défaut d'encapsidation du précurseur polyprotéique ou encore la dégradation des protéines virales. La traduction dans les cellules productrices des virus mutés pourrait également être modifiée puisque les mutations introduites pourraient modifier l'interaction avec GCN2 qui est capable de moduler la traduction via la phosphorylation d'eIF2 α . La traduction dans les cellules lors de la production de virus pseudotypés VSV-G a donc été mesurée et les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre les cellules produisant les virus mutés ou le WT. Afin de comprendre pourquoi la quantité de RT et d'IN est plus faible dans le virus E85A, l'étude des précurseurs polyprotéiques pourra être effectuée. Il serait intéressant de quantifier la quantité de pr160^{gag-pol} produite, son encapsidation, sa stabilité ainsi que la stabilité de l'ARN portant la mutation par rapport à l'ARN sauvage. Récemment, il a été montré chez PFV (Prototype Foamy Virus) que la formation d'un dimère de précurseurs pol via l'interaction entre les domaines IN est nécessaire à l'activation de la protéase [212]. La mutation E85A pourrait affecter la dimérisation du précurseur pr160 affectant l'activité de la protéase dans les virions. Dans ce cas on doit s'attendre à ce que la maturation du précurseur pr55^{gag} soit également affectée (**Figure 81**). La détection de l'incorporation des protéines issue du précurseur pr55^{gag} devrait apporter des réponses à ces questions comme par exemple la protéine MA ou la NC.



Effet des mutations sur l'activité de l'enzyme

Même si en présence d'un virus portant la mutation E85D, la diminution de la traduction dans les cellules infectées semble moins affectée que lors de l'infection par le virus WT, cette mutation conduit à une baisse de la synthèse d'ADN et d'intégration. Nous avons donc voulu voir si cette mutation, de même que la mutation E85A affecte l'activité de l'enzyme *in vitro*. Les activités de 3'-end Processing et de transfert de brin ont été quantifiées, l'état oligomérique des enzymes a été visualisé de façon préliminaire. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les enzymes mutées et la WT. Il semble donc que ces mutations n'affectent pas directement l'activité de l'enzyme.

Cependant de nombreuses études caractérisant les mutations de classe II de l'intégrase montrent des effets indirects des mutations lors de l'infection notamment via la perturbation d'interaction avec différents cofacteurs importants pour l'intégration comme LEDGF/P75 [213] ou encore sur d'autres étapes du cycle viral comme la transcription inverse [125]. Nous avons notamment vu que la synthèse d'ADN viral par la RT est diminuée lors de l'infection avec les virus mutants. Afin de déterminer le rôle des IN mutées sur la RT, il faudrait quantifier l'activité de transcription inverse des virus WT complétés avec de l'IN E85A ou E85D. De la même manière l'activité de transcription inverse des virus mutés complétés avec de l'IN WT pourra être mesurée.

Des travaux préliminaires ont été réalisés afin de déterminer le rôle de la RT sur l'activité de 3'-end Processing de l'IN E85A *in vitro*. La réaction de 3'-end Processing de l'enzyme WT est inhibée en présence de RT à un ratio moléculaire 0.5/1 (RT/IN). Par contre la réaction de 3'-end Processing de l'enzyme E85A n'est inhibée qu'en présence de plus grandes quantités de RT à un rapport de 2/1 (RT/IN). Cet effet peut s'expliquer par une modification de l'interaction entre l'intégrase et l'ADN, une modification de l'interaction entre les 2 enzymes ou encore un changement d'interaction entre le complexe IN/ADN et la RT.



Chapitre 4 : Le rôle de RAD51 sur l'infection virale

Ce travail a donné lieu à une publication présentée en annexe :

Cosnefroy et al. (2011)

“Stimulation of hRAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration
in vitro and in infected cells”

Journal of Virology, Sous presse



Chapitre 4 : Le rôle de RAD51 sur l'infection virale

A. Objectifs

Dans le cadre de l'étude de partenaires cellulaires de la réplication du VIH-1, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine de réparation RAD51 sur le cycle du VIH-1. La dernière étape d'intégration consiste en la réparation du locus d'intégration. Les facteurs impliqués dans ces processus demeurent inconnus à ce jour. Cependant, plusieurs candidats ont été proposés : l'endonucléase FEN-1, les systèmes de réparation par jonction des terminaisons non-homologues, NHEJ [114, 115], ou la recombinaison homologue, HR. L'interaction entre l'IN et la protéine humaine RAD51, facteur impliqué dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, a pu être montrée au laboratoire. RAD51 inhibe l'activité d'intégration *in vitro*, mais également dans un modèle d'intégration dans la levure [118]. Le mécanisme moléculaire de l'inhibition a été déterminé *in vitro*. La formation d'un nucléofilament actif de RAD51 est requise pour une inhibition optimale qui passe par la dissociation du complexe IN/DNA (Cosnefroy et al. 2011).

Nous avons alors regardé le rôle de RAD51 sur la réplication virale dans des cellules humaines infectées par le VIH-1. Mon implication dans ce travail, que je décris ci-dessous, a été dans un premier temps de regarder l'effet de la surexpression de la protéine sur le cycle viral. Pour cela nous avons utilisé notre modèle d'infection dans les HeLa P4 et nous avons également quantifié les différentes formes d'ADN virales présentes au cours de l'infection. Par la suite nous avons utilisé un composé chimique qui a été identifié comme capable de stimuler l'activité de polymérisation de RAD51 sur l'ADN et donc son activité de réparation [214]. Nous avons donc regardé l'effet de ce composé sur l'infection virale ainsi que sur les formes d'ADN virales.



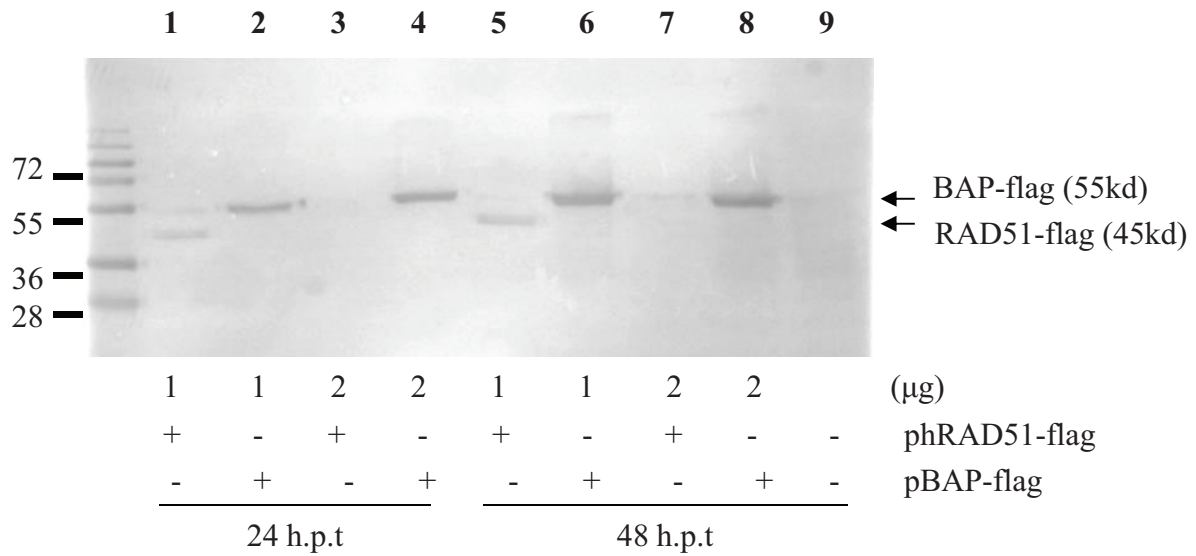


Figure 82. Surexpression de hRAD51 dans les HeLa P4.

Les cellules sont transfectées avec 1 ou 2 µg de plasmide phrad51-flag ou pbap-flag puis les protéines sont extraites au bout de 24 ou 48h avec un tampon de lyse L. 20 µg de protéine est utilisé pour chaque condition. Les protéines sont analysées sur SDS-PAGE 12 % puis transférées sur membrane. Un western blot est réalisé en utilisant un anticorps anti flag. La révélation est réalisée au chloronaphtol 3%.

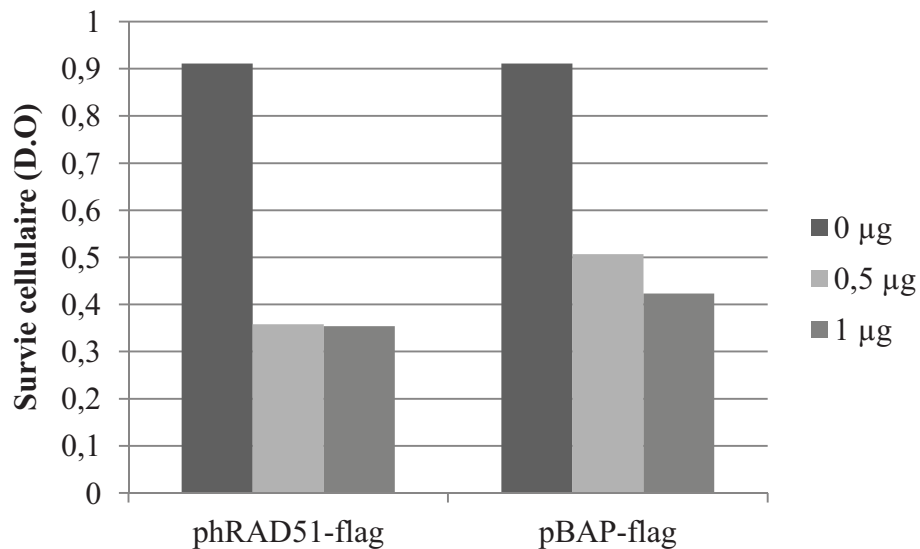


Figure 83. Test de cytotoxicité des cellules transfectées surexprimant hRAD51.

Les HeLa P4 sont transfectées avec 0,5 ou 1 µg de plasmide puis le test de cytotoxicité est réalisé 24h après come décrit dans le **Matériels et Méthodes**.

B. Effet de la surexpression de RAD51 sur la réplication virale

1) Mise au point de la surexpression

Dans un premier temps, afin de voir le rôle de RAD51 sur le cycle viral, nous avons modulé la quantité de RAD51 présente dans la cellule. Pour ce faire, nous avons réalisé une surexpression de la protéine puisque l'extinction de celle-ci est décrite comme létale pour la cellule [116]. Il nous a tout d'abord fallu mettre au point la surexpression dans les cellules humaines. Pour cela nous disposons d'un plasmide dans lequel hRAD51 est fusionnée à la protéine flag. Nous disposons également d'un plasmide contrôle composé de la protéine BAP (bagpipe protéine de liaison à l'ADN de *Drosophila melanogaster*) fusionnée à la protéine flag. 1 ou 2 µg de plasmide est transfecté avec de la lipofectamine 2000 dans des cellules HeLa P4. Les protéines sont extraites 24 et 48 h après transfection et analysées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose et un western blot est réalisé en utilisant un anticorps anti flag.

Nous pouvons voir que nous détectons la protéine BAP à la taille attendue de 55 kDa pour chacune des conditions où le plasmide correspondant a été transfecté (**Figure 82**). La quantité la plus importante de protéine détectée est à 48 h pour 1 µg de plasmide transfecté (**Figure 82 piste 6**). La protéine RAD51 est également détectée à la taille attendue de 45 kDa mais seulement dans les pistes correspondant à une transfection de 1 µg de plasmide (**Figure 82 pistes 1 et 5**). Aucune protéine n'est détectée lorsque 2 µg de plasmide a été transfecté. Cela peut s'expliquer par un effet toxique d'une trop grande quantité de protéine pour les cellules. Cependant nous pouvons voir une légère augmentation de la quantité de RAD51 à 48h (**Figure 82 piste 5**). Enfin aucune bande n'est détectée dans le contrôle de cellules non transfectées (**Figure 82 piste 9**).

2) Mesure de la cytotoxicité

La cytotoxicité liée à la surexpression de RAD51 dans les cellules humaines a été mesurée. Les cellules sont transfectées avec le plasmide puis la cytotoxicité est mesurée au bout de 24 h. On observe qu'il y a une cytotoxicité liée à la transfection que ce soit avec le plasmide phRAD51 ou le plasmide contrôle (**Figure 83**). Cependant il n'y a pas de cytotoxicité liée à la surexpression de la protéine, puisqu'il n'y a pas de différence entre l'expression de RAD51 et BAP.



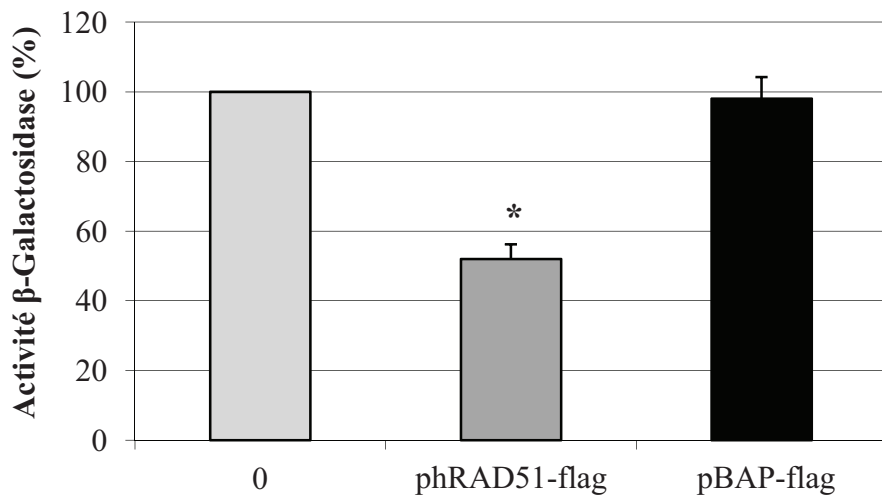


Figure 84. Effet de la surexpression de hRAD51 sur l'infection virale.

Les HeLa P4 sont transfectées avec 1 µg de plasmide puis infectées avec du VIH-1 à une M.O.I de 50, 48 h après transfection. La révélation de l'infection se fait par ajout du substrat 4-MUG 24h après. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes. Test de student significatif < 0.05.

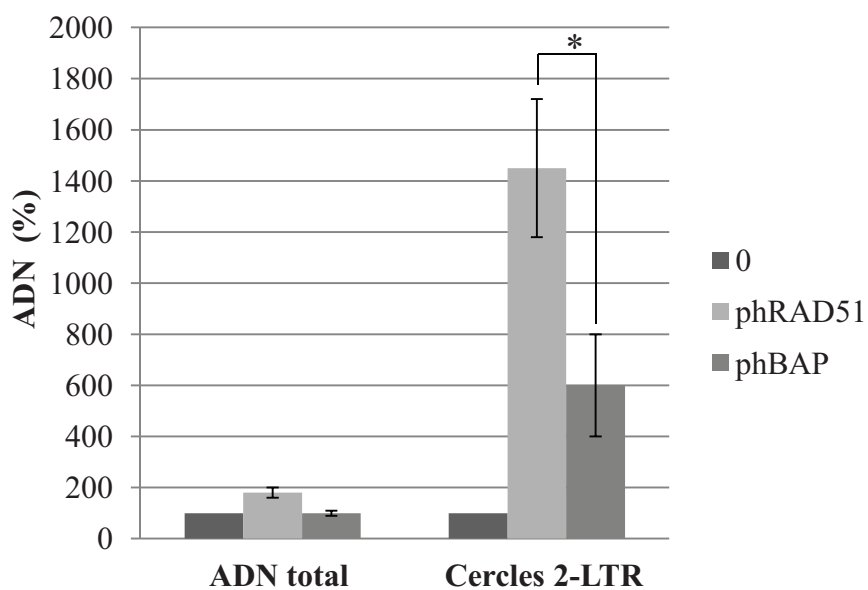


Figure 85. Effet de la surexpression de hRAD51 sur les formes d'ADN total et 2-LTR.

Les HeLa P4 sont transfectées avec 1 µg de plasmide puis infectées avec le VIH-1 à une M.O.I de 50, 48h après. Les acides nucléiques sont extraits 24h après et utilisés pour réaliser les PCR quantitatives correspondantes. Le 100 % correspond aux cellules non transfectées. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes. Test de student significatif < 0.05.

3) Infection virale

Nous avons alors regardé l'effet de la surexpression de RAD51 sur l'infectiosité virale. Les infections sont réalisées 48 h après la transfection puisque c'est là que l'on peut observer la surexpression de hRAD51 la plus importante (**Figure 84**). Les cellules sont donc transfectées avec 1 µg de plasmide et infectées avec une M.O.I de 50, 48 h après. La mesure de l'infection se fait 24h après avec l'ajout de substrat de la β-Galactosidase, le 4-MUG. Le signal d'infection est directement corrélé avec la D.O liée au clivage du 4-MUG. Les résultats montrent que les cellules surexprimant hRAD51 présente une diminution de l'infection virale de l'ordre de 50 % alors que les cellules surexprimant BAP ne présentent pas de modification de l'infection par rapport aux cellules non transfectées (**Figure 84**). Par ces résultats, nous confirmons les résultats obtenus par les études réalisées au laboratoire *in vitro* (Cosnefroy et al. 2011).

4) Rôle de RAD51 sur l'intégration

Puisque le rôle cellulaire de RAD51 concerne la réparation des coupures d'ADN, nous présumons que l'effet négatif de la surexpression de la protéine pourrait concerner l'étape d'intégration. En effet *in vitro*, RAD51 inhibe la réaction d'intégration concertée. Cependant cette hypothèse doit être validée dans un contexte cellulaire. L'inhibition de l'étape d'intégration conduit à une augmentation du rapport ADN 2LTR/ADN total puisqu'une accumulation des formes circulaires 2-LTR est observée dans la cellule infectée [215]. Afin de voir si l'inhibition de la réplication causée lors de la surexpression de RAD51 touche l'étape d'intégration, nous avons quantifié les deux formes d'ADN. Les cellules sont transfectées avec 1 µg de plasmide et infectées 48 h après avec le VIH-1. Les acides nucléiques sont extraits 24 h après infection puis utilisés pour réaliser les PCR quantitatives. L'ADN total est amplifié en utilisant des amorces dans le gène gag. On observe peu de différence entre les cellules non transfectées et les cellules transfectées avec le plasmide contrôle. La quantité d'ADN total augmente dans les cellules exprimant RAD51, mais la différence observée n'est pas significative après calcul du test de student (**Figure 85, gauche**). La mesure des formes circulaires 2-LTR amplifiées en utilisant des amorces de part et d'autre de la jonction montre clairement une augmentation significative pour les cellules surexprimant hRAD51 de 14 fois (**Figure 85, droite**). Les cellules surexprimant BAP



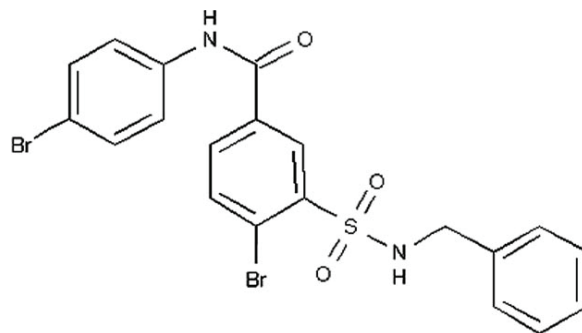


Figure 86. Structure du composé RS-1.

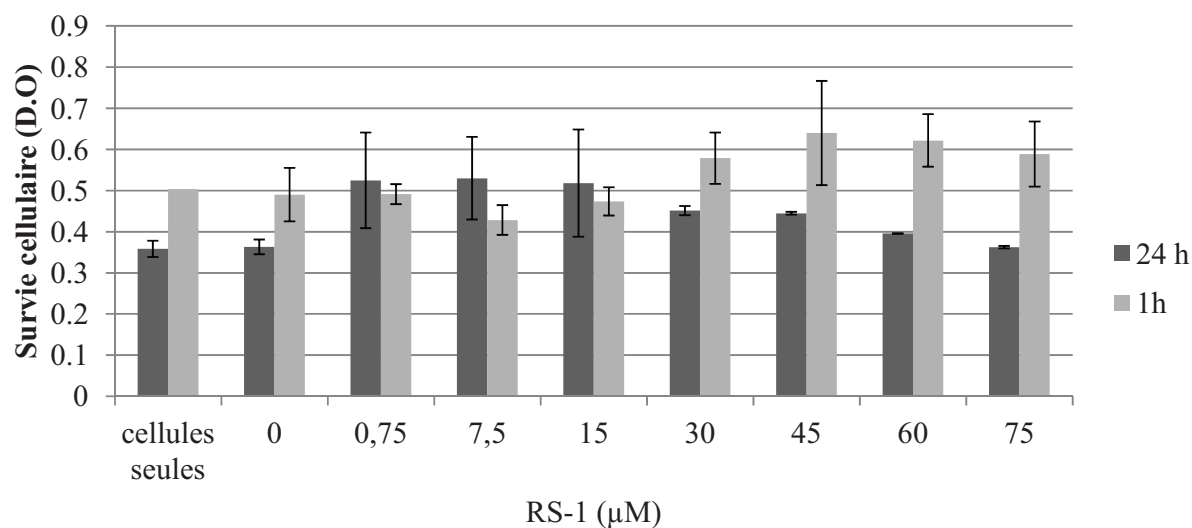


Figure 87. Effet cytotoxique du composé RS-1 sur les HeLa P4.

Les cellules sont incubées 1 ou 24 h avec des concentrations croissantes de RS-1 puis la cytotoxicité est mesurée. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes.

présentent elles aussi une augmentation de ces formes mais moindre (5 fois). Ainsi l'augmentation des formes 2-LTR est deux fois plus importante dans les cellules surexprimant RAD51 alors que l'ADN total ne varie pas. La surexpression de RAD51 entraîne donc une inhibition de l'intégration. L'augmentation que nous mesurons 24 h après l'infection est modérée, cependant le pic de quantité des cercles 2-LTR est observé généralement 72 h après l'infection [215].

C. Effet de RS-1 sur l'infection virale

Il a été montré que la formation du nucléofilament de hRAD51 sur l'ADN peut être améliorée par des composés chimiques, comme le composé de stimulation 1, RS-1 (**Figure 86**). Ce composé agit vraisemblablement comme un effecteur allostérique de la formation d'un nucléofilament actif et stimule spécifiquement l'activité de hRAD51 à la fois *in vitro* et dans des cellules de fibroblastes [214].

Nous avons donc décidé d'utiliser ce composé dans notre modèle d'infection afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de l'intégration. Ce composé va nous permettre de savoir si l'inhibition est directement liée à l'activité de formation du nucléofilament de RAD51.

1) Cytotoxicité du composé RS-1

La première étape a été de vérifier que l'ajout de cette molécule sur les cellules n'a pas d'effet cytotoxique. De plus, dans la mesure où RS-1 est soluble dans le DMSO et afin de réduire les effets du DMSO sur les cultures cellulaires, nous avons réalisé des préparations de molécules de manière à être à 1 % final de DMSO dans le milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 1 et 24 h avec des quantités croissantes de RS-1 puis un test de cytotoxicité est réalisé (**Figure 87**). On peut voir que l'ajout de 1 % de DMSO n'a pas d'effet sur les cellules par rapport au contrôle de cellules seules (**Figure 87, point 0 / cellules seules**). On peut voir que le composé n'a pas d'effet cytotoxique à 1h ou 24 h d'incubation. On observe une légère augmentation de la survie cellulaire à 1 h pour des concentrations supérieures à 30 μM . Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité de réparation de RAD51 permettant une meilleure résistance des cellules.



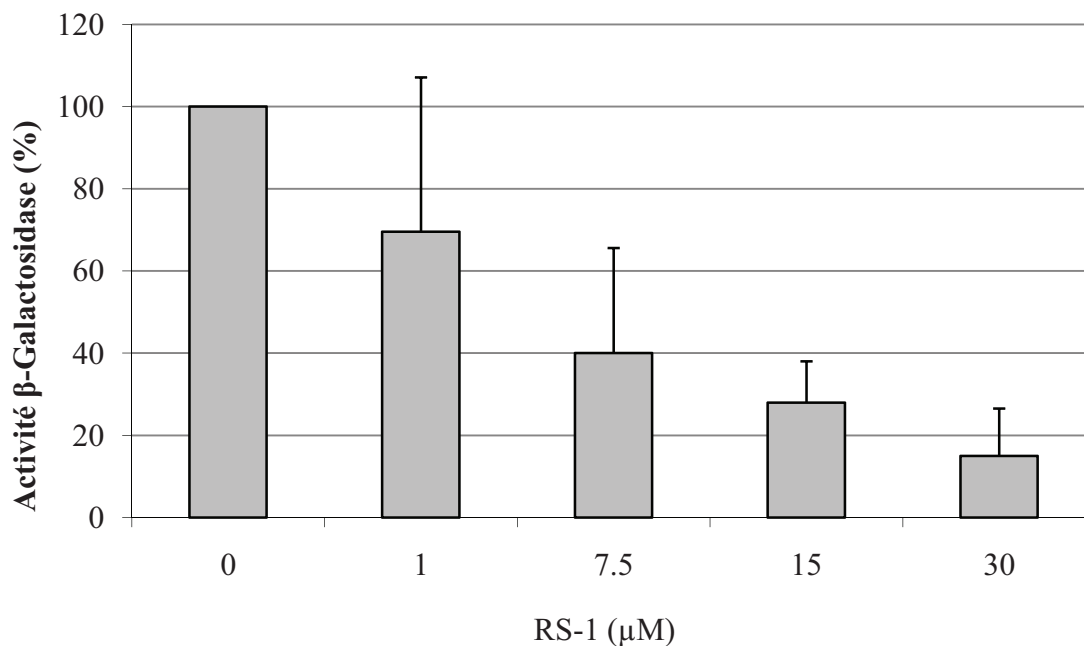


Figure 88. Effet de RS-1 sur l'infection virale.

Les HeLa P4 sont incubées avec des concentrations croissantes de RS-1 puis infectées avec du VIH-1 à une M.O.I de 50. La révélation de l'infection se fait 24h après avec l'ajout de 4-MUG. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes.

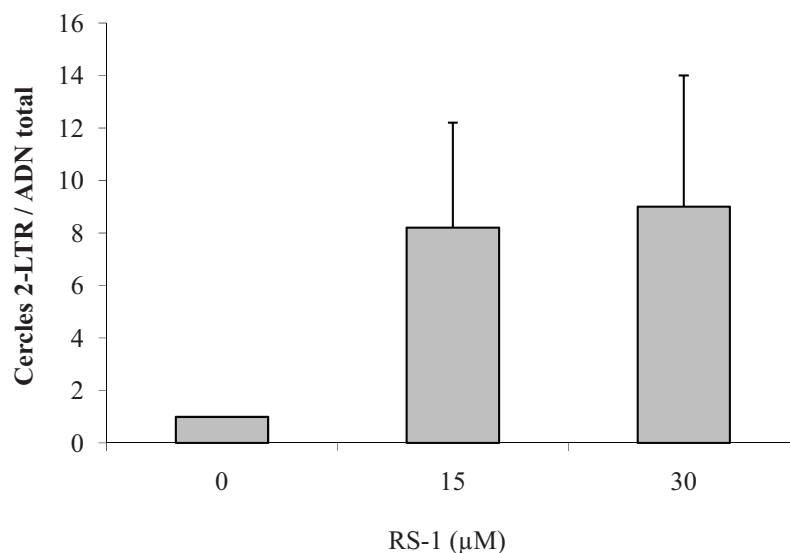


Figure 89. Effet de RS-1 sur les formes d'ADN total et 2-LTR.

Les HeLa P4 sont incubées avec RS-1 pendant 24h puis infectées avec du VIH-1 à une M.O.I de 50. Les acides nucléiques sont extraits 24h après et utilisés pour réaliser les PCR quantitatives correspondantes. Le 100 % correspond aux cellules sans RS-1. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes.

2) Effet de RS-1 sur l'infection virale

L'entrée et l'effet sur la survie cellulaire du composé RS-1 a été vérifiée par test de résistance au cis-platine par l'équipe de Connell. P. Des concentrations croissantes de RS-1 incubées sur des cellules permettent d'augmenter jusqu'à 2 fois la survie cellulaire. Afin de voir l'effet de RS-1 sur le cycle viral nous avons infecté les cellules 24 h après avoir rajouté le composé dans le milieu de culture. Les HeLa P4 sont donc incubées avec des concentrations croissantes de RS-1 puis infectées pendant 24 h avec le VIH-1. La révélation de l'infection se fait avec l'ajout de substrat de la β -Galactosidase, le 4-MUG. Le signal d'infection est directement corrélé avec la D.O liée au clivage du 4-MUG.

On peut voir que l'infection virale diminue en fonction de la quantité croissante de RS-1 rajoutée (**Figure 88**). On peut voir que la diminution de l'infection virale est supérieure à ce que l'on a obtenu en surexprimant hRAD51 (**Figure 82**). L'effet négatif de hRAD51 est donc lié à l'activité de polymérisation sur l'ADN directement stimulée par RS-1.

3) Effet de RS-1 sur l'intégration

Comme précédemment, afin de voir quelle étape du cycle est inhibée, nous avons quantifié les différentes formes d'ADN viral lors de l'infection en présence de RS-1. Nous avons tout d'abord quantifié le rapport entre ADN total et ADN circulaire 2-LTR. Pour cela les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de RS-1, infectées 24h après puis les acides nucléiques viraux sont extraits 24h après. Le rapport ADN 2-LTR sur ADN total en présence de 15 et 30 μ M de RS-1, les deux valeurs de RS-1 pour lesquelles on observe une diminution maximale de l'infection, augmente de 8 à 10 fois. (**Figure 89**). L'inhibition de l'infection est bien liée à une inhibition de l'étape d'intégration.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons également quantifié l'ADN intégré des cellules infectées en présence de RS-1. Pour cela les acides nucléiques ont été utilisés pour réaliser 2 PCR successives. Tout d'abord une PCR Alu permettant d'amplifier l'ADN intégré à l'aide d'une amorce située dans les séquences Alu du génome et une amorce située dans le génome viral. Puis une PCR nichée afin d'amplifier une bande d'une taille unique du génome viral. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1,2 %. Les bandes sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J (**Figure 90**). Les résultats montrent qu'il y a effectivement une diminution de la quantité d'ADN intégré dans les cellules incubées avec RS-1.



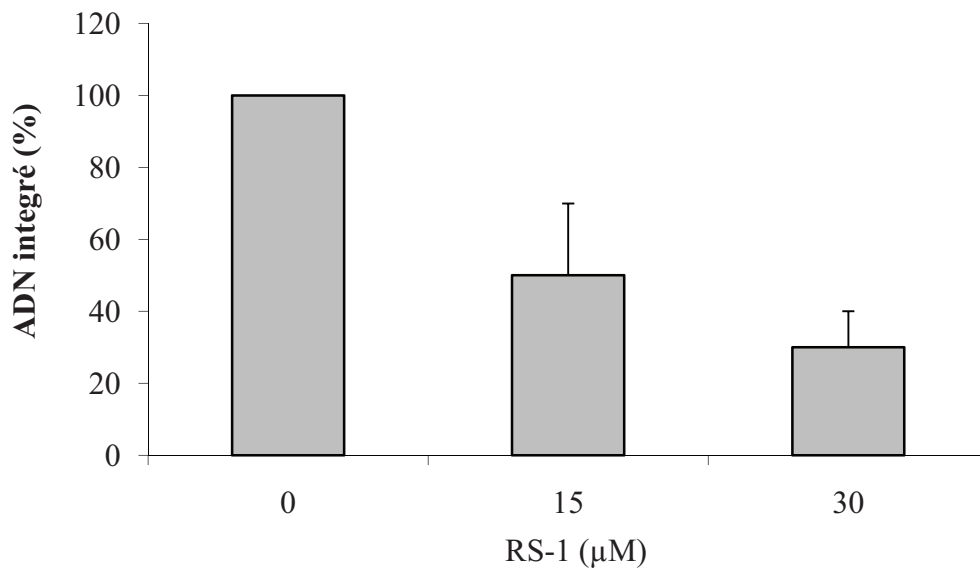


Figure 90. Quantification des formes d'ADN intégré dans les cellules incubées avec RS-1.

Les HeLa P4 sont incubées avec RS-1 pendant 24h puis infectées avec du VIH-1 à une M.O.I de 50. Les acides nucléiques sont extraits 24h après et utilisés pour réaliser les deux PCR nécessaires pour amplifier l'ADN intégré. Les produits amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose 1% puis quantifiés à l'aide du logiciel Image J. Le 100 % correspond aux cellules sans RS-1. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes.

RS-1 permet donc d'inhiber l'intégration lors de l'infection au VIH-1. Nous avons vu que l'ajout de RS-1 sur les cellules est corrélé avec une augmentation de résistance au cis-platine, caractéristique d'une augmentation de la réparation de l'ADN. Ainsi le composé RS-1 permet d'améliorer la formation du nucléofilament de RAD51, ce qui confère à la cellule une meilleure résistance aux cassures de l'ADN et à l'intégration du VIH-1 qui est probablement reconnu comme un événement mutagène dans la cellule infectée.

D. Conclusion et Discussion

Effet de RAD51 sur l'infection virale

La première étape de ce travail a été d'étudier le rôle de RAD51 sur la réplication virale. Toutes les données que nous avons pu obtenir *in vitro* montrent que l'interaction entre le facteur de réparation RAD51 et l'intégrase conduit à l'inhibition de l'activité d'intégration. Cette inhibition passe par la formation d'un nucléofilament actif qui dissocie spécifiquement les complexes d'IN actifs de l'ADN cellulaire. Ainsi nous avons voulu voir l'effet de RAD51 dans le contexte de l'infection de cellules humaines. Pour cela, la protéine a été surexprimée par transfection transitoire. Nous avons pu montrer une inhibition de l'infection virale 48h après transfection. Les ADN viraux quantifiés par PCR quantitatives montrent que la synthèse d'ADN n'est pas perturbée, alors qu'une accumulation des cercles 2-LTR est observée. L'accumulation de ces formes circulaires est corrélée à l'inhibition de l'intégration.

Effet de RS-1 sur l'infection virale

Puisque la surexpression de RAD51 entraîne une inhibition de l'intégration *in cellulo*, une molécule chimique sélectionnée pour sa capacité à améliorer la polymérisation de RAD51 sur l'ADN a été utilisée. De plus RS-1 n'a pas d'effet sur l'intégration *in vitro* seule. RS-1 a été utilisée sur des cellules infectées et de la même manière que précédemment, l'infection virale et les acides nucléiques viraux ont été quantifiés. La présence de quantités croissantes RS-1 dans les cellules au moment de l'infection conduit à une inhibition de l'infection virale. Cette diminution est reliée à l'inhibition de l'intégration puisque le rapport cercles 2-LTR/ADN total est augmenté en présence de la molécule. D'autre part, l'ADN intégré a également été quantifié afin de confirmer ce résultat et il apparaît que celui-ci diminue effectivement.



Nous avons pu démontrer clairement que l'activité de polymérisation de RAD51 sur l'ADN entraîne une inhibition de l'intégration dans la cellule infectée. RS-1 n'a pas d'effet ni sur l'entrée et la transcription inverse du VIH-1. De plus, RS-1 a également été testée sur d'autres types cellulaires (293T, MT4) et particulièrement sur des cellules primaires (PBMC) ce qui montre que cette inhibition est retrouvée dans un modèle de cellule plus physiologique.

L'effet de RAD51 sur l'infection virale pourrait être expliqué par différents modèles. La polymérisation précoce de RAD51 sur l'ADN cellulaire au moment de l'infection pourrait chasser l'IN du site d'intégration et l'empêcher d'intégrer le génome viral. Au contraire, une interaction entre RAD51 et l'IN au niveau du site d'intégration après que la réaction de transfert de brin ait eu lieu pourrait conduire à la dissociation de l'IN de l'ADN cellulaire et favoriser le processus de réparation [216, 217]. Cet effet tardif de RAD51 pourrait conduire à une insertion stable du génome viral dans le génome cellulaire. Les résultats obtenus dans nos conditions suggèrent fortement que l'effet négatif de RAD51 puisse être promu dans les cellules infectées par le virus nous menant à proposer un nouveau concept d'inhibition de la réplication du VIH-1 par la stimulation de l'activité de RAD51.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Conclusions et Perspectives

Le virus de l'immunodéficience humaine est l'agent responsable du SIDA. Cette maladie apparue au début des années 80 s'est rapidement transformée en épidémie mondiale. De part la faible fidélité de la transcriptase inverse qui synthétise le génome viral et le taux de multiplication très important du virus dans les cellules infectées, le développement d'un vaccin s'est soldé par un échec. Cependant, grâce à l'implication de toute la communauté scientifique, les malades disposent d'un certain nombre d'inhibiteurs. Ces molécules ciblent différentes étapes du cycle de réplication du virus. Pourtant, la pression de sélection imposée par les molécules utilisées entraîne toujours l'apparition de virus mutés résistants.

L'intégrase est une enzyme clé du cycle viral du VIH-1 puisque celle-ci catalyse l'insertion stable du génome viral dans celui de la cellule infectée. Il n'existe pourtant à l'heure actuelle que deux molécules utilisées chez les patients dirigées contre l'intégrase du VIH-1, le Raltégravir et l'Elvitégravir. Cette faiblesse s'explique en partie par l'inexistence d'une structure fonctionnelle de l'intégrase de VIH-1. L'année dernière, la structure de l'intasome du Prototype Foamy Virus a été résolue et permettra certainement d'améliorer le développement d'inhibiteurs de l'intégrase.

D'autre part, l'intégrase catalyse non seulement l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire mais participe également à de nombreuses étapes du cycle viral, notamment la transcription inverse, le transport, l'import du CPI et le bourgeonnement des virions nouvellement formés. L'étape d'intégration elle-même fait intervenir de nombreux partenaires cellulaires et viraux interagissant avec l'intégrase. Certains sont connus et étudiés (LEDGF/P75, TNPO3...), mais il est très probable qu'un très grand nombre de ces partenaires soient encore méconnus malgré leur importance. Depuis quelque année, le rôle des modifications post-traductionnelles de l'intégrase a commencé à être étudié. En effet plusieurs études montrent que la régulation de l'activité de l'intégrase pourrait se faire via de telles modifications. Même si plusieurs modifications ont été décrites (phosphorylation, acétylation, ubiquitination, sumoylation), très peu de travaux sont publiés.

Au laboratoire, l'étude de l'intégrase a débuté il y a 15 ans et les études ont permis de bien décrypter le mécanisme de fonctionnement de l'enzyme *in vivo* et *in vitro*. C'est au début de ma thèse que le laboratoire a décidé de s'orienter vers la caractérisation de modifications post-traductionnelles de l'enzyme ainsi que la recherche de nouveaux partenaires cellulaires



d'interaction de l'intégrase. Nous avons identifié plusieurs phosphorylations de l'intégrase recombinante produite chez la levure au laboratoire. Nous avons décidé de caractériser le rôle de cette modification. Par ailleurs, la recherche de partenaire d'interaction par une technique de double hybride chez la levure avait permis d'identifier une protéine kinase cellulaire GCN2 [132]. Le rôle de cette protéine kinase a donc été étudié.

En parallèle, j'ai pu participer à l'étude du rôle du facteur de réparation RAD51 sur le cycle viral.

La phosphorylation de l'intégrase

La recherche de modifications post-traductionnelles de l'intégrase a été réalisée par spectrométrie de masse. L'analyse de l'intégrase recombinante purifiée au laboratoire a permis l'identification de trois phosphorylations sur les résidus S24, Y143 et S256. Nous avons recherché la présence de ces phosphorylations dans les cellules humaines ainsi que dans le contexte de l'infection. Nous n'avons pas pu mettre clairement en évidence de phosphorylation, due à une quantité limitée de matériel, mais nous avons pu identifier un delta de masse pouvant correspondre à une phosphorylation sur le peptide de l'IN portant le résidu S24 dans les cellules infectées par du VIH-1. L'obtention de plus grande quantité de matériel étant difficile, nous avons décidé d'étudier le rôle de la phosphorylation de la sérine 24 sur le cycle viral et sur l'activité de l'enzyme *in vitro*. Des virus mutés ont été produits et nous avons pu montrer un rôle important de ce résidu et de la phosphorylation sur le cycle viral. En effet les virus S24A mimant une non phosphorylation sont moins infectieux que les virus WT. L'activité d'intégration et de synthèse d'ADN est perturbée *in vivo*. Au contraire les virus S24 mimant une phosphorylation ont une infectiosité identique aux WT. Les intégrases mutées correspondantes ont été produites et purifiées. Nous avons pu montrer que l'activité des enzymes *in vitro* n'est pas perturbée. De même des études préliminaires montrent que l'oligomérisation des enzymes n'est pas modifiée. Enfin, nous avons essayé de voir si GCN2 pouvait être responsable de cette phosphorylation sur la S24. Les tests de phosphorylation *in vitro* n'ont pas permis d'identifier de phosphorylation spécifique de l'IN par GCN2. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de l'IN produite dans une souche de levure délétée pour GCN2. L'IN produite dans cette souche présente les mêmes phosphorylations que dans la souche comportant GCN2.



Notre étude a donc permis de mettre en évidence un rôle de la phosphorylation de la S24 de l'IN sur le cycle viral du VIH-1. Cependant, même si nous avons pu montrer un effet sur la synthèse d'ADN et l'intégration dans les cellules infectées, nous ne savons pas clairement le mécanisme mis en jeu. Il sera nécessaire de déterminer clairement le rôle de la phosphorylation, mais également la kinase cellulaire responsable de cette modification. Récemment le rôle de la phosphorylation de l'IN dans les LTCD4⁺ activés a été étudié [178]. La phosphorylation de l'IN par JnK conduit à l'inhibition de sa dégradation par le protéasome. Cette étude montre que la modification de l'IN amène à l'interaction avec de nouveaux partenaires cellulaires. C'est pourquoi il est important d'étudier le rôle de la phosphorylation sur la S24 que nous avons identifié. La découverte de nouveaux partenaires de l'IN nécessaires à la réplication virale pourrait permettre de développer de nouveaux inhibiteurs.

D'autre part, nous avons identifié deux autres phosphorylations de l'IN, sur les résidus Y143 et S256. Il est intéressant de noter que le résidu Y143 est l'un des résidus mutés identifiés impliqués dans la résistance au Raltégravir. Les mutations Y143C/R ont notamment été bien étudiées au laboratoire [96]. Ces mutations entraînent un défaut d'activité de l'enzyme *in vitro*. L'introduction des mutations Y143A/D permettraient d'identifier le rôle d'une phosphorylation sur le cycle viral.

L'étude des modifications post-traductionnelles de l'intégrase est donc essentielle à une meilleure compréhension de la régulation de l'activité de l'enzyme au cours du cycle viral. Cette études ouvre donc de nombreuses possibilités de recherche quand au rôle des modifications identifiées.

Le rôle de GCN2 sur le cycle viral

L'interaction entre l'IN et GCN2 a tout d'abord été identifiée dans le cadre d'un double hybride réalisé à partir d'une banque génomique de la levure [132]. GCN2 est une protéine kinase de réponse au stress qui est conservée de la levure aux cellules de mammifères. Nous avons ensuite confirmé l'interaction entre l'IN et GCN2 humaine.

Les études réalisées ont permis de montrer un effet restrictif de GCN2 sur le cycle viral. En effet l'infection de cellules où la traduction de GCN2 est inhibée par ARN interférence est



augmentée. De plus l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase de GCN2 permet également d'augmenter l'infection.

Dans la cellule GCN2 est présente à l'état inactif. Lors d'un stress comme une carence en acide aminé, le domaine kinase de GCN2 est activé par autophosphorylation et conduit à la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α . La traduction des cellules est alors arrêtée. Nous avons donc regardé si l'infection virale pouvait constituer un facteur d'activation de GCN2. Effectivement, nous avons pu voir que l'infection par le VIH-1 entraîne la phosphorylation de GCN2.

L'analyse de la traduction des protéines suite à l'infection virale montre que la traduction est fortement diminuée 6 h après l'infection, puis que celle-ci est restaurée 24 h après. Il semble donc qu'un facteur viral induise l'arrêt de la traduction, possiblement via l'activation de GCN2. D'un autre côté il est aussi possible qu'un facteur viral ou cellulaire entraîne la restauration de la traduction. Etant donné l'interaction identifiée entre l'IN et GCN2, nous avons regardé si l'IN pouvait être ce facteur viral. La transfection de l'IN dans des cellules n'entraîne pas de diminution de traduction. L'IN n'est donc pas le facteur qui inhibe la traduction, ou n'est pas suffisante. Au contraire, la transfection d'IN dans des cellules préalablement activées pour GCN2 conduit à une augmentation de la traduction. L'IN est donc le ou l'un des facteurs permettant de restaurer la traduction des cellules infectées par le VIH-1.

Notre hypothèse est que l'IN pourrait jouer le rôle de leurre et empêcher la kinase de phosphoryler eIF2 α . Des études *in vitro* de phosphorylation de eIF2 α par GCN2 en présence de l'IN seront entreprises. Il est possible aussi que IN stimule la déphosphorylation d'eIF2 α . Le rôle de phosphatases sera donc aussi envisagé.

Pour déterminer plus précisément le rôle de l'interaction entre GCN2 et l'IN sur le cycle viral, nous avons réalisé différentes mutations de l'IN sur le site de fixation de GCN2 par homologie avec eIF2 α . La mutation E85A choisie pour empêcher l'interaction avec GCN2 entraîne une inhibition quasi-totale de l'infectiosité des virions. Au contraire, les virus E85D, mutés pour conserver l'interaction avec GCN2, conservent une infectiosité comparable avec les virus WT. L'effet de l'infection des virus mutés sur la traduction a été étudié. Les virus E85A, non infectieux n'entraînent pas de diminution de traduction. Les virus E85D, toujours infectieux entraînent eux une inhibition de la traduction. Il semble donc que l'inhibition de la traduction soit liée au déroulement des étapes de l'infection virale.



Cette étude a donc permis d'identifier une protéine ayant un effet restrictif sur l'infection virale. Il apparaît cependant que le VIH soit capable de contourner les moyens de défense de la cellule et que l'interaction entre l'IN et GCN2 inhibe la phosphorylation d'eIF2 α (ou augmente sa déphosphorylation ?) et donc relance la traduction des protéines. Il est possible aussi que l'infection virale entraîne une réponse cellulaire qui en activant GCN2 conduise à l'inhibition de la traduction des protéines cellulaires, mais que le virus « se débrouille » pour que la synthèse des protéines virales soit maintenue. Mieux comprendre ce mécanisme permettrait peut être d'identifier des inhibiteurs de l'interaction entre l'IN et GCN2 et de limiter la traduction des protéines virales.

Caractérisation des virus portant les mutations E85A/D de l'IN

Les virus mutés portant les mutations E85A et E85D de l'IN ont été produits afin de caractériser le rôle de l'interaction avec GCN2. Ces mutations nous ont permis d'identifier ce résidu comme essentiel à l'infection virale, ce qui à notre connaissance n'avait jamais été montré.

L'étude réalisée montre que ce résidu est essentiel à l'étape de synthèse d'ADN et d'intégration dans les cellules infectées. Les virus E85A ont un défaut très important de ces deux activités. Les virus E85D qui ont une infectiosité similaires aux WT présentent pourtant également une baisse de ces deux activités même si elle est moindre. Il semble donc que la restauration du motif d'interaction de GCN2 permette de maintenir un niveau de traduction dans les cellules infectées.

Les intégrases mutées ont été produites et purifiées et leurs activités enzymatiques ont été quantifiées. Les mutations n'entraînent pas de modification d'activité *in vitro*, ni de changement d'oligomérisation des enzymes visible par pontage. Il semble donc que le défaut d'activité lors de l'infection ne soit pas lié à un défaut catalytique de l'enzyme mais plus probablement à une modification d'interaction avec un partenaire viral ou cellulaire. Cette diminution d'interaction pourrait ensuite jouer à différents niveaux, défaut de maturation protéolytique, perturbation de la transcription inverse, baisse du transport vers le noyau, d'import nucléaire, modification du ciblage, etc.



Afin de commencer à répondre à cette question, nous avons regardé l'effet de la RT sur l'activité de l'IN puisqu'il a été montré *in vitro* et *in vivo* un rôle de chacune des deux enzymes sur l'activité de l'autre. Il apparaît que l'enzyme E85A est beaucoup moins inhibée en présence de RT que ne l'est l'enzyme WT. L'interaction entre l'IN WT, les mutées et la RT est peut être modifiée ou encore l'affinité des protéines aux acides nucléiques viraux.

Ce travail a donc permis d'identifier un résidu de l'intégrase essentiel probablement impliqué dans l'interaction avec des facteurs cellulaires ou viraux. La poursuite de ce travail devrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme dans la cellule et la régulation de son activité.

Le rôle de RAD51 sur l'infection virale

Une interaction entre RAD51 humaine et l'intégrase du VIH-1 a été identifiée. Il a pu être montré que RAD51 est capable d'inhiber l'intégration *in vivo* dans la levure [118], et *in vitro* dans les conditions du test d'intégration concerté. Afin de comprendre ce mécanisme d'inhibition, des études biochimiques ont été entreprises au laboratoire. Ainsi il a pu être montré que l'inhibition de l'intégration nécessite la formation d'un nucléofilament actif de RAD51 sur l'ADN. En effet l'absence d'ATP ou l'utilisation d'un mutant de RAD51 incapable de se polymériser n'a pas d'effet sur l'intégration. Ce filament actif est alors capable de dissocier le complexe actif IN/ADN viral de l'ADN cellulaire. Nous avons donc voulu étudier le rôle de RAD51 sur la réplication virale dans des cellules humaines *in vivo*.

Nous avons pu montrer une inhibition de l'infection virale liée à la surexpression transitoire de RAD51 dans les cellules. Les ADN viraux quantifiés par PCR quantitatives montrent que la synthèse d'ADN n'est pas perturbée, alors qu'une accumulation des cercles 2-LTR est observée. L'accumulation de ces formes circulaires est corrélée à l'inhibition de l'intégration.

Puisque la surexpression de RAD51 entraîne une inhibition de l'intégration *in vivo*, RS-1, une molécule chimique sélectionnée pour sa capacité à améliorer la polymérisation de RAD51 sur l'ADN a été utilisée. La présence de quantités croissantes RS-1 dans les cellules au moment de l'infection conduit à une inhibition de l'infection virale qui est causée par une inhibition spécifique de l'intégration. En effet nous avons quantifié les formes d'ADN totale et 2-LTR et nous avons pu montrer une augmentation du ratio cercles 2-LTR/ADN total. Nous avons



également quantifié la quantité d'ADN intégré et nous avons pu montrer une diminution de celle-ci.

Cette étude nous a permis d'identifier un nouveau facteur restrictif de l'IN ainsi qu'une molécule RS-1 capable d'inhiber l'intégration dans les cellules infectées. La poursuite de cette étude pourrait donc permettre de développer un nouvel inhibiteur de l'infection au VIH-1.



BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie

1. Benit, L., P. Dessen, and T. Heidmann, *Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11709-19.
2. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 67.
3. Cimarelli, A. and J.L. Darlix, *Assembling the human immunodeficiency virus type 1*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(7): p. 1166-84.
4. Dulude, D., M. Baril, and L. Brakier-Gingras, *Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(23): p. 5094-102.
5. Gelderblom, H.R., M. Ozel, and G. Pauli, *Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations*. Arch Virol, 1989. **106**(1-2): p. 1-13.
6. Grunewald, K. and M. Cyrklaff, *Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 437-42.
7. Balasubramaniam, M. and E.O. Freed, *New insights into HIV assembly and trafficking*. Physiology (Bethesda). **26**(4): p. 236-51.
8. Teixeira, C., et al., *Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug*. Eur J Med Chem. **46**(4): p. 979-92.
9. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
10. Hill, C.P., et al., *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3099-104.
11. Alfadhli, A., R.L. Barklis, and E. Barklis, *HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate*. Virology, 2009. **387**(2): p. 466-72.
12. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
13. Pornillos, O., et al., *X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1282-92.
14. Gamble, T.R., et al., *Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1285-94.
15. Morellet, N., et al., *Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 3059-65.
16. Clapham, P.R. and A. McKnight, *Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 8): p. 1809-29.
17. Darlix, J.L., et al., *First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses*. J Mol Biol, 1995. **254**(4): p. 523-37.
18. Levin, J.G., et al., *Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2005. **80**: p. 217-86.
19. Grohmann, D., et al., *HIV-1 nucleocapsid traps reverse transcriptase on nucleic acid substrates*. Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 12230-40.



20. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
21. Selig, L., et al., *Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 592-600.
22. Morellet, N., et al., *Helical structure determined by NMR of the HIV-1 (345-392)Gag sequence, surrounding p2: implications for particle assembly and RNA packaging*. Protein Sci, 2005. **14**(2): p. 375-86.
23. Hill, M.K., et al., *Alteration of the proline at position 7 of the HIV-1 spacer peptide p1 suppresses viral infectivity in a strain dependent manner*. Curr HIV Res, 2007. **5**(1): p. 69-78.
24. Lapatto, R., et al., *X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes*. Nature, 1989. **342**(6247): p. 299-302.
25. Robbins, A.H., et al., *Structure of the unbound form of HIV-1 subtype A protease: comparison with unbound forms of proteases from other HIV subtypes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **66**(Pt 3): p. 233-42.
26. Wang, J., et al., *Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7242-6.
27. Rodgers, D.W., et al., *The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1222-6.
28. Seckler, J.M., et al., *Solution structural dynamics of HIV-1 reverse transcriptase heterodimer*. Biochemistry, 2009. **48**(32): p. 7646-55.
29. Li, L., et al., *Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions*. Cell Res, 2005. **15**(11-12): p. 923-34.
30. Bukrinsky, M. and A. Adzubei, *Viral protein R of HIV-1*. Rev Med Virol, 1999. **9**(1): p. 39-49.
31. Camaur, D. and D. Trono, *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6106-11.
32. Kotov, A., et al., *Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8824-30.
33. Laguette, N., S. Benichou, and S. Basmaciogullari, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef incorporation into virions does not increase infectivity*. J Virol, 2009. **83**(2): p. 1093-104.
34. Stoddart, C.A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 2124-33.
35. Laguette, N., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(5): p. 418-33.
36. Yin, L., D. Braaten, and J. Luban, *Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6430-6.
37. VerPlank, L., et al., *Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7724-9.
38. Yu, Q., et al., *Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(5): p. 435-42.



39. Cartier, C., et al., *Active cAMP-dependent protein kinase incorporated within highly purified HIV-1 particles is required for viral infectivity and interacts with viral capsid protein.* J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35211-9.
40. Priet, S., et al., *Differential incorporation of uracil DNA glycosylase UNG2 into HIV-1, HIV-2, and SIV(MAC) viral particles.* Virology, 2003. **307**(2): p. 283-9.
41. Gurer, C., A. Cimarelli, and J. Luban, *Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions.* J Virol, 2002. **76**(9): p. 4666-70.
42. Suzuki, Y. and Y. Koyanagi, [*Modulation of HIV replication by cellular factors*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2007. **52**(10 Suppl): p. 1207-13.
43. Furuta, R.A., et al., *Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41.* Nat Struct Biol, 1998. **5**(4): p. 276-9.
44. Chan, D.C., et al., *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.* Cell, 1997. **89**(2): p. 263-73.
45. Bowerman, B., et al., *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA.* Genes Dev, 1989. **3**(4): p. 469-78.
46. Arhel, N., *Revisiting HIV-1 uncoating.* Retrovirology. **7**: p. 96.
47. Bukrinsky, M., *A hard way to the nucleus.* Mol Med, 2004. **10**(1-6): p. 1-5.
48. Warrilow, D., G. Tachedjian, and D. Harrich, *Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together.* Rev Med Virol, 2009. **19**(6): p. 324-37.
49. Iordanskiy, S., et al., *Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin.* Retrovirology, 2006. **3**: p. 4.
50. Levin, J.G., et al., *Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription.* RNA Biol. **7**(6): p. 754-74.
51. Kleiman, L., C.P. Jones, and K. Musier-Forsyth, *Formation of the tRNALys packaging complex in HIV-1.* FEBS Lett. **584**(2): p. 359-65.
52. Saadatmand, J., et al., *Interactions of reverse transcriptase sequences in Pol with Gag and LysRS in the HIV-1 tRNALys3 packaging/annealing complex.* Virology, 2008. **380**(1): p. 109-17.
53. Dufour, E., et al., *Cross-linking localization of a HIV-1 reverse transcriptase peptide involved in the binding of primer tRNALys3.* J Mol Biol, 1999. **285**(4): p. 1339-46.
54. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses.* 1997, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
55. Bukrinskaya, A., et al., *Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton.* J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2113-25.
56. Iordanskiy, S.N. and M.I. Bukrinsky, *Analysis of viral and cellular proteins in HIV-1 reverse transcription complexes by co-immunoprecipitation.* Methods Mol Biol, 2009. **485**: p. 121-34.
57. McDonald, D., et al., *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells.* J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 441-52.
58. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex.* J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13347-52.
59. Yamashita, M. and M. Emerman, *The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements.* PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. e18.
60. Krishnan, L., et al., *The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase.* J Virol. **84**(1): p. 397-406.



61. Matreyek, K.A. and A. Engelman, *The Requirement for Nucleoporin NUP153 during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is Determined by the Viral Capsid*. J Virol. **85**(15): p. 7818-27.
62. Charneau, P., et al., *HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome*. J Mol Biol, 1994. **241**(5): p. 651-62.
63. Dvorin, J.D., et al., *Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12087-96.
64. Fassati, A., et al., *Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3675-85.
65. Zielske, S.P. and M. Stevenson, *Importin 7 may be dispensable for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus infection of primary macrophages*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11541-6.
66. Brass, A.L., et al., *Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen*. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
67. Woodward, C.L., et al., *Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6522-33.
68. Logue, E.C., et al., *The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import*. J Virol.
69. Harrich, D., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 TAR element revertant viruses define RNA structures required for efficient viral gene expression and replication*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4906-13.
70. Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-7.
71. Zimmel, R.W., et al., *Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element*. J Mol Biol, 1996. **258**(5): p. 763-77.
72. Murakami, T. and E.O. Freed, *The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 343-8.
73. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
74. Im, Y.J., et al., *Crystallographic and functional analysis of the ESCRT-I /HIV-1 Gag PTAP interaction*. Structure. **18**(11): p. 1536-47.
75. Aldovini, A. and R.A. Young, *Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 1920-6.
76. Berkowitz, R., J. Fisher, and S.P. Goff, *RNA packaging*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 177-218.
77. Hurley, J.H., *The ESCRT complexes*. Crit Rev Biochem Mol Biol. **45**(6): p. 463-87.
78. Wieggers, K., et al., *Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2846-54.
79. Mascarenhas, A.P. and K. Musier-Forsyth, *The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors*. FEBS J, 2009. **276**(21): p. 6118-27.
80. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.



81. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
82. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
83. Clavel, F., et al., *Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2*. Nature, 1986. **324**(6098): p. 691-5.
84. Chen, Z., et al., *Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3617-27.
85. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
86. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
87. Simon-Lorière, *Caractéristiques mécanistiques de la recombinaison chez le virus de l'immunodéficience humaine*. virologie, 2006. **10**(6): p. 431-42.
88. Arhel, N. and F. Kirchhoff, *Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets*. Biochim Biophys Acta. **1802**(3): p. 313-21.
89. Cihlar, T. and A.S. Ray, *Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine*. Antiviral Res. **85**(1): p. 39-58.
90. Cahn, P. and M.A. Wainberg, *Resistance profile of the new nucleoside reverse transcriptase inhibitor apricitabine*. J Antimicrob Chemother. **65**(2): p. 213-7.
91. Prajapati, D.G., et al., *The search for potent, small molecule NNRTIs: A review*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(16): p. 5744-62.
92. Wensing, A.M., N.M. van Maarseveen, and M. Nijhuis, *Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance*. Antiviral Res. **85**(1): p. 59-74.
93. Kuritzkes, D.R., *HIV-1 entry inhibitors: an overview*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 82-7.
94. Eckert, D.M., et al., *Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket*. Cell, 1999. **99**(1): p. 103-15.
95. Hare, S., et al., *Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer*. Nature, 2010.
96. Reigadas, S., et al., *The HIV-1 integrase mutations Y143C/R are an alternative pathway for resistance to Raltegravir and impact the enzyme functions*. PLoS One. **5**(4): p. e10311.
97. Reigadas, S., et al., *Structure-analysis of the HIV-1 integrase Y143C/R raltegravir resistance mutation in association with the secondary mutation T97A*. Antimicrob Agents Chemother. **55**(7): p. 3187-94.
98. Christ, F., et al., *Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication*. Nat Chem Biol. **6**(6): p. 442-8.
99. Pendri, A., et al., *New first and second generation inhibitors of human immunodeficiency virus-1 integrase*. Expert Opin Ther Pat.
100. Li, M.H., et al., *The 3D structures of G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors: molecular dynamics simulations in aqueous solution and in the gas phase*. J Mol Model. **16**(4): p. 645-57.
101. Eijkelenboom, A.P., et al., *The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(9): p. 807-10.



102. Zheng, R., T.M. Jenkins, and R. Craigie, *Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13659-64.
103. Bushman, F.D., et al., *Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3428-32.
104. Engelman, A., et al., *Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 2729-36.
105. Yang, W. and T.A. Steitz, *Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H*. Structure, 1995. **3**(2): p. 131-4.
106. Dyda, F., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases [see comments]*. Science, 1994. **266**(5193): p. 1981-6.
107. Fitzkee, N.C., et al., *Solution conformation and dynamics of the HIV-1 integrase core domain*. J Biol Chem. **285**(23): p. 18072-84.
108. Moreau, K., et al., *Analysis of conserved and non-conserved amino acids critical for ALSV (Avian leukemia and sarcoma viruses) integrase functions in vitro*. Arch Virol, 2002. **147**(9): p. 1761-78.
109. Chen, J.C., et al., *Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding [In Process Citation]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8233-8.
110. Van Maele, B., et al., *Cellular co-factors of HIV-1 integration*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 98-105.
111. Faure, A., et al., *HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(3): p. 977-86.
112. Guiot, E., et al., *Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22707-19.
113. Lesbats, P., et al., *In vitro initial attachment of HIV-1 integrase to viral ends: control of the DNA specific interaction by the oligomerization state*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(22): p. 7043-58.
114. Daniel, R., R.A. Katz, and A.M. Skalka, *A role for DNA-PK in retroviral DNA integration*. Science, 1999. **284**(5414): p. 644-7.
115. Li, L., et al., *Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection*. Embo J, 2001. **20**(12): p. 3272-81.
116. Lau, A., et al., *Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein*. Embo J, 2004. **23**(16): p. 3421-9.
117. Mulder, L.C. and M.A. Muesing, *Degradation of HIV-1 integrase by the N-end rule pathway [In Process Citation]*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29749-53.
118. Desfarges, S., et al., *Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(21): p. 6215-24.
119. Panther, L.A., et al., *Unintegrated circular HIV-1 DNA in the peripheral mononuclear cells of HIV-1-infected subjects: association with high levels of plasma HIV-1 RNA, rapid decline in CD4 count, and clinical progression to AIDS*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **17**(4): p. 303-13.
120. Delelis, O., et al., *Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 114.
121. Herschhorn, A., I. Oz-Gleenberg, and A. Hizi, *Quantitative analysis of the interactions between HIV-1 integrase and retroviral reverse transcriptases*. Biochem J, 2008. **412**(1): p. 163-70.



122. Wilkinson, T.A., et al., *Identifying and characterizing a functional HIV-1 reverse transcriptase-binding site on integrase*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7931-9.
123. Oz, I., O. Avidan, and A. Hizi, *Inhibition of the integrases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 by reverse transcriptases*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 3): p. 557-66.
124. Hehl, E.A., et al., *Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5056-67.
125. Wu, X., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2126-35.
126. Tsurutani, N., et al., *Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4795-806.
127. Zhu, K., C. Dobard, and S.A. Chow, *Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5045-55.
128. Ao, Z., et al., *Contribution of the C-terminal tri-lysine regions of human immunodeficiency virus type 1 integrase for efficient reverse transcription and viral DNA nuclear import*. Retrovirology, 2005. **2**: p. 62.
129. Hamamoto, S., et al., *Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5670-7.
130. Nishitsuji, H., et al., *Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7825.
131. Arhel, N., et al., *Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 817-24.
132. de Soultrait, V.R., et al., *HIV-1 integrase interacts with yeast microtubule-associated proteins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1575**(1-3): p. 40-8.
133. Poeschla, E.M., *Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(9): p. 1403-24.
134. Fassati, A., *HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 74.
135. Petit, C., O. Schwartz, and F. Mammano, *The karyophilic properties of human immunodeficiency virus type 1 integrase are not required for nuclear import of proviral DNA*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 7119-26.
136. Chow, A.S., et al., *Reversal of Integration and DNA Splicing Mediated by Integrase of Human Immunodeficiency Virus*. Science, 1992. **255**: p. 723-726.
137. Mirambeau, G., S. Lonnais, and R.J. Gorelick, *Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function*. RNA Biol. **7**(6): p. 724-34.
138. Zeinalipour-Loizidou, E., et al., *HIV-1 integrase: from biology to chemotherapeutics*. Curr HIV Res, 2007. **5**(4): p. 365-88.
139. Lin, C.W. and A. Engelman, *The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 5030-6.
140. Lee, M.S. and R. Craigie, *Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9823-7.



141. Yan, N., et al., *HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration*. Proc Natl Acad Sci U S A.
142. Li, L., et al., *Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 10965-74.
143. Hindmarsh, P. and J. Leis, *Retroviral DNA integration*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(4): p. 836-43, table of contents.
144. Kalpana, G.V., et al., *Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5*. Science, 1994. **266**(5193): p. 2002-6.
145. Lesbats, P., et al., *Functional coupling between HIV-1 integrase and the SWI/SNF chromatin remodeling complex for efficient in vitro integration into stable nucleosomes*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001280.
146. Shinohara, T., D.P. Singh, and N. Fatma, *LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes*. Prog Retin Eye Res, 2002. **21**(3): p. 341-58.
147. Meehan, A.M., et al., *LEDGF/p75 proteins with alternative chromatin tethers are functional HIV-1 cofactors*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000522.
148. Maertens, G., et al., *LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33528-39.
149. Ciuffi, A., *Mechanisms governing lentivirus integration site selection*. Curr Gene Ther, 2008. **8**(6): p. 419-29.
150. Mitchell, R.S., et al., *Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences*. PLoS Biol, 2004. **2**(8): p. E234.
151. Wang, G.P., et al., *HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications*. Genome Res, 2007. **17**(8): p. 1186-94.
152. Cherepanov, P., et al., *HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 372-81.
153. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
154. Towers, G.J., *Control of viral infectivity by tripartite motif proteins*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(10): p. 1125-32.
155. Stremlau, M., et al., *Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5514-9.
156. Forshey, B.M., J. Shi, and C. Aiken, *Structural requirements for recognition of the human immunodeficiency virus type 1 core during host restriction in owl monkey cells*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 869-75.
157. Alce, T.M. and W. Popik, *APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34083-6.
158. Schafer, A., H.P. Bogerd, and B.R. Cullen, *Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor*. Virology, 2004. **328**(2): p. 163-8.
159. Borman, A.M., et al., *A highly defective HIV-1 group O provirus: evidence for the role of local sequence determinants in G-->A hypermutation during negative-strand viral DNA synthesis*. Virology, 1995. **208**(2): p. 601-9.
160. Kilzer, J.M., et al., *Roles of host cell factors in circularization of retroviral dna*. Virology, 2003. **314**(1): p. 460-7.
161. Parissi, V., et al., *The lethal phenotype observed after HIV-1 integrase expression in yeast cells is related to DNA repair and recombination events*. Gene, 2003. **322**: p. 157-68.



162. Symington, L.S., *Focus on recombinational DNA repair*. EMBO Rep, 2005. **6**(6): p. 512-7.
163. Schiff, R.D. and D.P. Grandgenett, *Partial phosphorylation in vivo of the avian retrovirus pp32 DNA endonuclease*. J Virol, 1980. **36**(3): p. 889-93.
164. Horton, R., S. Mumm, and D.P. Grandgenett, *Avian retrovirus pp32 DNA endonuclease is phosphorylated on Ser in the carboxyl-terminal region*. J Virol, 1988. **62**(6): p. 2067-75.
165. Horton, R., S.R. Mumm, and D.P. Grandgenett, *Phosphorylation of the avian retrovirus integration protein and proteolytic processing of its carboxyl terminus*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1141-8.
166. Mumm, S.R. and D.P. Grandgenett, *Defining nucleic acid-binding properties of avian retrovirus integrase by deletion analysis*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1160-7.
167. Dai, J., et al., *Phosphorylation regulates integration of the yeast Ty5 retrotransposon into heterochromatin*. Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 289-99.
168. Beauregard, A., M.J. Curcio, and M. Belfort, *The take and give between retrotransposable elements and their hosts*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 587-617.
169. Cereseto, A., et al., *Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration*. Embo J, 2005. **24**(17): p. 3070-81.
170. Topper, M., et al., *Posttranslational acetylation of the human immunodeficiency virus type 1 integrase carboxyl-terminal domain is dispensable for viral replication*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 3012-7.
171. Terreni, M., et al., *GCN5-dependent acetylation of HIV-1 integrase enhances viral integration*. Retrovirology. **7**: p. 18.
172. Allouch, A., et al., *The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration*. Cell Host Microbe. **9**(6): p. 484-95.
173. Mousnier, A., et al., *von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13615-20.
174. Zamborlini, A., et al., *Impairment of human immunodeficiency virus type-1 integrase SUMOylation correlates with an early replication defect*. J Biol Chem. **286**(23): p. 21013-22.
175. Tyagi, N., K. Anamika, and N. Srinivasan, *A framework for classification of prokaryotic protein kinases*. PLoS One. **5**(5): p. e10608.
176. Chiu, Y.L., et al., *Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 108-14.
177. Stevenson, M., et al., *HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration*. Embo J, 1990. **9**(5): p. 1551-60.
178. Manganaro, L., et al., *Concerted action of cellular JNK and Pin1 restricts HIV-1 genome integration to activated CD4+ T lymphocytes*. Nat Med. **16**(3): p. 329-33.
179. Hinnebusch, A.G., *Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(20): p. 6442-6.
180. Sood, R., et al., *A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha*. Genetics, 2000. **154**(2): p. 787-801.
181. Dey, M., et al., *PKR and GCN2 kinases and guanine nucleotide exchange factor eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B) recognize overlapping surfaces on eIF2alpha*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3063-75.
182. Padyana, A.K., et al., *Structural basis for autoinhibition and mutational activation of eukaryotic initiation factor 2alpha protein kinase GCN2*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29289-99.



183. de Haro, C., R. Mendez, and J. Santoyo, *The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis*. FASEB J, 1996. **10**(12): p. 1378-87.
184. Nameki, N., et al., *Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein*. Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 2089-100.
185. Jiang, H.Y. and R.C. Wek, *GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 371-80.
186. Liu, Y., et al., *Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation*. Neoplasia. **12**(1): p. 61-8.
187. Lemaire, P.A., et al., *Mechanism of PKR Activation by dsRNA*. J Mol Biol, 2008. **381**(2): p. 351-60.
188. Adelson, M.E., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication in SupT1 cells transduced with an HIV-1 LTR-driven PKR cDNA construct*. Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 806-15.
189. Carpick, B.W., et al., *Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9510-6.
190. Groskreutz, D.J., et al., *Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication*. J Biol Chem. **285**(31): p. 24023-31.
191. Balachandran, S., et al., *Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 129-41.
192. Stojdl, D.F., et al., *The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9580-5.
193. Qian, W., et al., *Expression of vaccinia virus K3L protein in yeast inhibits eukaryotic initiation factor-2 kinase GCN2 and the general amino acid control pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13202-7.
194. Berlanga, J.J., et al., *Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses*. EMBO J, 2006. **25**(8): p. 1730-40.
195. Krishnamoorthy, J., et al., *The eIF2alpha kinases inhibit vesicular stomatitis virus replication independently of eIF2alpha phosphorylation*. Cell Cycle, 2008. **7**(15): p. 2346-51.
196. Neznanov, N., et al., *Different effect of proteasome inhibition on vesicular stomatitis virus and poliovirus replication*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1887.
197. Caumont, A.B., et al., *Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast Saccharomyces cerevisiae leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening*. Curr Genet, 1996. **29**(6): p. 503-10.
198. Sanchez-Pescador, R., et al., *Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)*. Science, 1985. **227**(4686): p. 484-92.
199. Cherepanov, P., et al., *High-level expression of active HIV-1 integrase from a synthetic gene in human cells*. FASEB J, 2000. **14**(10): p. 1389-99.
200. Ventura, M., et al., *Effect of nucleoside analogs and non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase on cell-free virions*. Arch Virol, 1999. **144**(3): p. 513-23.
201. Sallafranke-Andreola, M.L., et al., *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in transformed yeast cells. Biochemical properties and interactions with bovine tRNALys*. Eur J Biochem, 1989. **184**(2): p. 367-74.
202. Cochrane, A.W., et al., *Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression*. J Virol, 1991. **65**(10): p. 5305-13.
203. Dhaliwal, S. and D.W. Hoffman, *The crystal structure of the N-terminal region of the alpha subunit of translation initiation factor 2 (eIF2alpha) from Saccharomyces*



- cerevisiae* provides a view of the loop containing serine 51, the target of the eIF2alpha-specific kinases. *J Mol Biol*, 2003. **334**(2): p. 187-95.
204. Deng, J., et al., *Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation*. *Curr Biol*, 2002. **12**(15): p. 1279-86.
205. Drake, R.R., et al., *Identification of a nucleotide binding site in HIV-1 integrase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(8): p. 4170-5.
206. Caumont, A., et al., *High affinity interaction of HIV-1 integrase with specific and non-specific single-stranded short oligonucleotides*. *FEBS Lett*, 1999. **455**(1-2): p. 154-8.
207. Robert, F., et al., *Blocking UV-induced eIF2alpha phosphorylation with small molecule inhibitors of GCN2*. *Chem Biol Drug Des*, 2009. **74**(1): p. 57-67.
208. Qiu, H., et al., *Mutations that bypass tRNA binding activate the intrinsically defective kinase domain in GCN2*. *Genes Dev*, 2002. **16**(10): p. 1271-80.
209. Charnay, N., et al., *Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 74.
210. Ventoso, I., et al., *Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR*. *Genes Dev*, 2006. **20**(1): p. 87-100.
211. Levy, D.N., et al., *Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(12): p. 4204-9.
212. Lee, E.G., et al., *Foamy retrovirus integrase contains a Pol dimerization domain required for protease activation*. *J Virol*. **85**(4): p. 1655-61.
213. Emiliani, S., et al., *Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(27): p. 25517-23.
214. Jayathilaka, K., et al., *A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(41): p. 15848-53.
215. Zhu, W., et al., *Rapid turnover of 2-LTR HIV-1 DNA during early stage of highly active antiretroviral therapy*. *PLoS One*. **6**(6): p. e21081.
216. Brin, E., et al., *Modeling the late steps in HIV-1 retroviral integrase-catalyzed DNA integration*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39287-95.
217. Yoder, K.E. and F.D. Bushman, *Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates*. *J Virol*, 2000. **74**(23): p. 11191-200.



Publications

Stimulation of hRAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration in vitro and in infected cells. *Journal of Virology* (2011) Cosnefroy O, Tocco A, Lesbats P, Thierry S, Calmels C, Wiktorowicz T, Reigadas S, Kwon Y, De Cian A, Desfarges S, P. Bonot, San Filippo J, Litvak S, Le Cam E, Rethwilm A, Fleury H, Connell PP, Sung P, Delelis O, Andréola ML and Parissi V. (PMID: 22013044)

Evolution of 2-long terminal repeat (2-LTR) episomal HIV-1 DNA in raltegravir-treated patients and in vitro infected cells. *The journal of antimicrobial chemotherapy* (2010) Reigadas S, Andréola ML, Wittkop L, Cosnefroy O, Anies G, Recordon-Pinson P, Thiébaud R, Masquelier B, Fleury H. (PMID: 20051476)

Inhibition of Hepatitis C virus RNA polymerase by DNA aptamers: inhibition mechanism of in vitro RNA synthesis and effect on HCV infected cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008) Pantxika Bellecave, Christian Cazenave, Julie Rumi, Cathy Staedel, Ophélie Cosnefroy, Marie-Line Andreola, Michel Ventura, Laura Tarrago-Litvak and Thérèse Astier-Gin. (PMID: 18347106)



Regulator Role of Protein Kinase GCN2 in HIV-1 Replication

Authors : Ophélie Cosnefroy^{1,§, Ψ}, Anaïs Jaspard^{1,§, Ψ}, Christina Calmels^{1,§}, Véronique Guyonnet-Dupérat^{2,§}, Vincent Parissi^{1,§}, Michel Ventura^{1,§}, Marie-Line Andréola^{1, §,*}

Ψ These two authors contributed equally to the work.

Address:

¹UMR 5234 CNRS; Université Bordeaux Segalen; 146 rue Léo Saignat; 33076 Bordeaux cedex France.

²INSERM 217 Plateforme vectorologie, Bordeaux, France.

[§]Structure Fédérative de Recherche "TransbioMed" Bordeaux, France.

*To whom correspondence should be addressed:

Marie-Line Andréola UMR 5234 CNRS; Université Bordeaux Segalen; 146 rue Léo Saignat; 33076 Bordeaux cedex France.

Tel: + 33 5 57 57 17 40. FAX: + 33 5 57 57 17 66;

E-mail: marie-line.andreola@reger.u-bordeaux2.fr

Soumis à publication

Abstract

In mammals, four different protein kinases responding to an environmental stress have been described: heme-regulated inhibitor (HRI), double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), general control non-derepressible-2 (GCN2) and PKR-like endoplasmic reticulum kinase. These enzymes regulate protein synthesis in response to environmental stress by phosphorylation of the alpha subunit of the initiation factor 2 (eIF2 α). We now report that mammalian GCN2 is activated by phosphorylation upon infection of human cells by HIV-1 in the very first hours following infection. HIV-1 infection of cells after extinction of GCN2 by RNA silencing showed a moderate increase in viral replication. This suggests a role of GCN2 in the regulation of HIV-1 replication, probably through regulation of translation, since GCN2 is phosphorylated upon infection. We have shown using the two-hybrid strategy that GCN2 interacts with HIV-1 integrase (IN), as confirmed by an immunoprecipitation experiment. This observation led us to study here the possible involvement of GCN2 in the integration step of the retroviral cycle. Cell culture in conditions of amino acid starvation, an environmental stress that specifically activates GCN2, led to a decrease in cellular translation. After transfection of IN in amino acid-starved cells, the protein synthesis level was increased. These results point to a hitherto unrecognized role of GCN2 as an early mediator in the cellular response to HIV-1 infection, suggesting that the virus is able to overcome the involvement of GCN2 in the cellular response by eliciting methods to maintain protein synthesis.



Stimulation of the Human RAD51 Nucleofilament Restricts HIV-1 Integration *In Vitro* and in Infected Cells

O. Cosnefroy,^a A. Tocco,^a P. Lesbats,^a S. Thierry,^b C. Calmels,^a T. Wiktorowicz,^c S. Reigadas,^a Y. Kwon,^d A. De Cian,^e S. Desfarges,^{a*} P. Bonot,^a J. San Filippo,^g S. Litvak,^a E. Le Cam,^e A. Rethwilm,^c H. Fleury,^a P. P. Connell,^h P. Sung,^d O. Delelis,^b M. L. Andréola,^a and V. Parissi^a

Laboratoire MFP, UMR 5234, CNRS-Université Victor Segalen Bordeaux 2, IFR 66 Pathologies Infectieuses et Cancers, Bordeaux, France^a; LBPA, CNRS UMR8113, Ecole Normale Supérieure, Cachan, France^b; Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, Würzburg, Germany^c; Yale University School of Medicine, Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, New Haven, Connecticut, USA,^d Laboratoire de Microscopie Cellulaire et Moléculaire, UMR 8126, Univ. Paris Sud—CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France^e; Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, California, USA,^g and Department of Radiation and Cellular Oncology, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA^h

Stable HIV-1 replication requires the DNA repair of the integration locus catalyzed by cellular factors. The human RAD51 (hRAD51) protein plays a major role in homologous recombination (HR) DNA repair and was previously shown to interact with HIV-1 integrase (IN) and inhibit its activity. Here we determined the molecular mechanism of inhibition of IN. Our standard *in vitro* integration assays performed under various conditions promoting or inhibiting hRAD51 activity demonstrated that the formation of an active hRAD51 nucleofilament is required for optimal inhibition involving an IN-DNA complex dissociation mechanism. Furthermore we show that this inhibition mechanism can be promoted in HIV-1-infected cells by chemical stimulation of the endogenous hRAD51 protein. This hRAD51 stimulation induced both an enhancement of the endogenous DNA repair process and the inhibition of the integration step. Elucidation of this molecular mechanism leading to the restriction of viral proliferation paves the way to a new concept of antiretroviral therapy based on the enhancement of endogenous hRAD51 recombination activity and highlights the functional interaction between HIV-1 IN and hRAD51.

DNA double-strand breaks (DSBs) arise during normal DNA metabolism [e.g., replication, meiosis, V(D)J recombination, etc.]. DNA-damaging agents, such as ionizing radiation and chemical compounds generating replication-blocking lesions like *cis*-platinum, also cause DSBs. Retroviral integration involving a cut of the genomic DNA can also be considered a potentially mutagenic event. The cellular DNA repair machinery could thus be required either for cell defense against viral infection or, inversely, for the stable integration of the viral genome. Since these machineries are not completely defined at present, they require better characterization. Retroviral integration is catalyzed by the virally encoded integrase (IN) in concert with other viral and cellular factors forming the preintegration complex (PIC). As a final step, stable integration of retroviral DNA requires the repair of the DNA gaps remaining after the reaction catalyzed by IN. Several cellular repair mechanisms, including base excision repair (3, 14, 43, 44), homologous recombination (HR) (19), and nonhomologous end-joining (NHEJ) (9–11, 26), are thought to be involved in the integration step. Direct interactions between HIV-1 IN and human RAD18 have been reported (31), and cell-based studies have indicated that RAD18 and RAD52 can inhibit HIV-1 infection (22, 27). These data suggest that cellular RAD DNA repair machineries can play a dual role by preventing or restricting retroviral viral replication/parasitism and/or participating directly in the stability of the integrated viral DNA, a crucial step of the infection process.

Human RAD51 (hRAD51), belonging to the HR DNA repair RAD52 epistasis group, has been previously shown to interact functionally with HIV-1 IN both *in vitro* and in a yeast integration model (12). A downregulation of HIV-1 IN activity by hRAD51 was also reported in *in vitro* integration assays, but the inhibition mechanism remained unsolved. Since the enhancement of this

inhibition could constitute a new antiviral approach as well as signify an original restriction pathway, we focused our work here on the molecular mechanism underlying this process both *in vitro* and *in vivo*. We especially studied whether this hRAD51-mediated IN inhibition could be promoted in HIV-1-infected cells.

Using standard *in vitro* integration assays under conditions promoting or inhibiting hRAD51 activity (hRAD51 mutants, presence or absence of ATP, addition of a hRAD51 stimulatory compound), we show that the formation of an active hRAD51 presynaptic nucleofilament corresponding to the nucleocomplex formed on the two homologous DNA strands during HR is required for inhibition. An IN-DNA dissociation system was also set up in order to better determine the effect of the hRAD51 nucleofilament on the active integration complex. Using this system we show that this nucleofilament can dissociate IN from its substrate. Finally, the availability of RS-1, a chemical compound able to stimulate hRAD51 activity, allowed us to demonstrate that the stimulation of the hRAD51-mediated DNA repair process in HIV-1-infected cells can lead to the inhibition of retroviral replication by decreasing integration efficiency.

Received 17 June 2011 Accepted 4 October 2011

Published ahead of print 19 October 2011

Address correspondence to V. Parissi, vincent.parissi@reger.u-bordeaux2.fr.

* Present address: Institute of Microbiology (IMUL), Bugnon 48—CHUV, Lausanne, Switzerland.

O.C. and A.T. contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.05425-11

The authors have paid a fee to allow immediate free access to this article.

In addition to elucidating the molecular mechanism underlying IN inhibition by hRAD51, our data reveal an original intrinsic integration restriction property of hRAD51 that paves the way for a new concept of antiretroviral therapy based on the stimulation of the endogenous hRAD51 recombination activity in HIV-1-infected cells.

MATERIALS AND METHODS

In vitro procedures. (i) Proteins, antibodies, and chemical compounds.

HIV-1 IN was purified from a yeast expression system using the IN_{Hybrid} methods described previously (24). Prototype foamy virus (PFV) integrase was purified according to the method reported before (41). Wild-type (wt), K133A, and K133R human hRAD51s were purified from an *Escherichia coli* expression system as described before (6). HIV-1 reverse transcriptase (RT) was purified according to the protocol previously described (1). Human HMG1A and bacterial RecA proteins were purchased from Sigma. RS-1 was previously selected from a 10,000-compound library (Chembridge DIVERSet); compounds were screened for their ability to affect the DNA binding property of hRAD51 (18). Cisplatin and monoclonal anti-FLAG and polyclonal anti-hRAD51 antibodies were purchased from Sigma. Anti-HIV-1 IN antibodies were purchased from Bio Products.

(ii) *In vitro* concerted integration assay. Standard concerted integration reactions were performed as described previously (24) with some modifications. Briefly, purified HIV-1 IN (600 nM) was preincubated with both 5'-end-labeled donor DNA (15 ng) containing the unprocessed U3 and U5 long terminal repeat (LTR) sequences and the target DNA plasmid pBSK⁺ (150 ng) at 0°C for 20 min in a total volume of 5 μ l. Then the reaction mixture (20 mM HEPES [pH 7.5], 10 mM dithiothreitol [DTT], 10 mM MgCl₂, 15% dimethyl sulfoxide [DMSO], 8% polyethylene glycol [PEG], 30 mM NaCl) was added, and the reaction proceeded for 120 min at 37°C in a total volume of 10 μ l. Purified wt or mutated hRAD51 was added at different concentrations and under different conditions, as reported in the text. Incubation was stopped by adding a phenol-isoamyl alcohol-chloroform mix (24/1/25 [vol/vol/vol]). The aqueous phase was loaded on a vertical 1% agarose gel in the presence of 1% bromophenol blue and 1 mM EDTA. After separation of the products, the gel was treated with 5% trichloroacetic acid (TCA) for 20 min, dried, and autoradiographed. All IN activities were quantified by scanning the bands (half-site plus full-site integration products) after gel electrophoresis and autoradiography using Image J software. Both target DNA and donor plasmids were kind gifts from K. Moreau (Université Claude Bernard-Lyon I, France). The target corresponds to the plasmid pBSK⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) carrying the zeocin resistance-encoding gene. The 296-bp unprocessed donor was generated by cloning a donor containing ScaI ends into a pGEM-T vector (Promega). The resulting pGEM-T-SupFScal vector was cleaved by ScaI, and the substrate fragment was purified and 5' radiolabeled. For the PFV concerted integration assay, the 296-bp unprocessed donor DNA containing the PFV viral ends was generated by PCR using pGEM-T-SupFScal as the template and primers PFV-SupF5' (5'-ATTGTCATGGAAATTTTGTATATTGATTATCCTTTA ACGTTGCCGGATCCGGTCGCGC) and PFV-SupF3' (5'-ATTGTCA TGGAAATTTTGTATATTGATTATCCTGCGCGCGTCATTGATATGA TGCG). The integration reaction was performed using purified PFV-IN (600 nM), 5'-end-labeled donor DNA (15 ng), and target DNA plasmid pBSK⁺ (150 ng) under the same conditions as those listed above.

(iii) hRAD51 *in vitro* activity. hRAD51 activity was evaluated according to the previously reported strand exchange reaction (40) adapted to our concerted integration conditions. The 59-mer single-stranded DNA (ssDNA; 100 nM) was incubated with hRAD51 (0 to 0.5 μ M) for 30 min at 37°C in the presence of 100 μ M ATP and 20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 15% DMSO, 8% PEG, and 30 mM NaCl in a total volume of 10 μ l. Then the homologous 32-mer double-stranded DNA (dsDNA; 10 nM) was added. The reaction products were separated by electrophoresis on nondenaturing 12% polyacrylamide gel. Strand ex-

change products were quantified after autoradiography of the gel using Image J software.

(iv) HIV-1 RT RNase H activity. The RNA-DNA hybrid substrate was prepared as follows. Calf thymus DNA (10 μ g) (Sigma) was incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM DTT, 5 mM Mg²⁺, 100 mM KCl, 500 μ M (each) ATP, GTP, and CTP, 30 μ Ci [³H]UTP (31 Ci/mmol), and 1 unit of *E. coli* RNA polymerase for 1 h at 37°C (final volume, 50 μ l). RT was preincubated with increasing amounts of RAD51 (or RS-1) for 15 min at 37°C in the presence of 100 μ M ATP. Then the RNase H activity was measured by incubation in the presence of 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, and the RNA-DNA hybrid (20,000 cpm) for 20 min at 37°C in a 50- μ l final volume. The reaction was stopped by addition of 1 ml cold 10% TCA. Samples were filtered on nitrocellulose filters and washed with 10% TCA, and the radioactivity was determined in a scintillation counter.

(v) HIV-1 RT DNA-dependent DNA polymerase activity. RT was preincubated with increasing amounts of hRAD51 (or RS-1) for 10 min at 37°C in the presence of 100 μ M ATP. Then the DNA-dependent DNA polymerase activity was measured for 15 min at 37°C (36). The reaction mixture contained, in a final volume of 50 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 50 μ M (each) dATP, dCTP, and dGTP, 20 μ M dTTP, 0.5 μ Ci [³H] TTP (31 Ci/mmol), and 20 μ g/ml activated DNA. The reaction was stopped by addition of 1 ml cold 10% TCA. Samples were filtered on nitrocellulose filters and washed, and the radioactivity was determined in a scintillation counter.

(vi) *In vitro* IN-DNA dissociation assay. A schematic view of the method is provided in Fig. 4A. A 5'-biotinylated unprocessed donor DNA was generated by PCR using the pGEM-T-SupFScal vector as the template and 5'-biotinylated U3 (5'-TATGGAAGGGCTAATCACT-3') and U5 (5'-TATGCTAGAGATTTCCACA-3') as the primers. The biotinylated fragments (100 ng) were coupled to streptavidin magnetic beads (10 μ l; Ademtech) for 30 min at room temperature. After a washing with H₂O, the amount of DNA bound to the beads was checked by SyberSafe-stained agarose gel analysis of the supernatant after magnetization of the beads. IN (40 pmol) was then added to the DNA-activated beads, and the coupling was performed for 20 min at 4°C in a total volume of 5 μ l. After a washing, hRAD51 proteins (wt or mutated enzymes) were added for 60 min in a reaction buffer (20 mM HEPES [pH 7.5], 10 mM DTT, 7.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 8% PEG, 30 mM NaCl) with or without ATP. Beads were then washed and subjected to magnetization. The bead pellet was treated with 3.5 M urea and 5% SDS and, in addition to the supernatant fraction, was subjected to SDS-PAGE analysis. After SDS-PAGE, HIV-1 IN and hRAD51 proteins were detected by Western blotting using a mixture of anti-IN and anti-hRAD51 polyclonal antibodies. For the integration assay on IN-DNA-coupled beads, a 32-bp double-stranded 5' radioactively labeled acceptor oligodeoxynucleotide (ODN) (5'-CCATCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAAGGA-3'; hybridized to the homologous strand) was incubated with the activated beads for 1 h at 37°C under integration conditions (20 mM HEPES [pH 7.5], 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 15% DMSO, 8% PEG, 30 mM NaCl). The integration activity was measured by quantifying the radioactivity remaining covalently bound to the washed beads after their magnetization. The structure of the integration products was previously checked on polyacrylamide gels.

Electron microscopy analysis. Microscopy analysis was performed using HIV-1 IN (750 nM) (or the corresponding storage buffer) preincubated with the 296-bp donor DNA (1.5 μ M) containing the 20 final bases of U3 and U5 LTR sequences at 0°C for 20 min in Tris-HCl (10 mM, pH 7.6), NaCl (30 mM), and EDTA (1 mM). Binding and control reaction mixtures were supplemented with the same volume of a solution containing hRAD51 (500 nM) (or the corresponding storage buffer) in HEPES-NaOH (40 mM, pH 7.6), NaCl (30 mM), magnesium acetate [Mg(OAc)₂; 15 mM], DMSO (20%), DTT (1 mM), and ATP (100 μ M). The reaction was carried out for 30 min at 37°C. Before the integration reaction buffer was added, 5 μ l of binding reaction mixture was deposited on a 600-mesh copper grid (Delta Microscopies) covered with a thin carbon film acti-

vated by glow-discharge in the presence of pentylamine and positively stained with aqueous uranyl acetate (2% [wt/vol]), as previously described (2). Reaction mixtures with or without hRAD51 were diluted 10-fold in 20 mM HEPES (pH 7.5), NaCl (30 mM), and Mg(OAc)₂ (7.5 mM) before positive staining carried out for binding or without further dilution on 200-mesh copper grids (Delta Microscopies) covered with a collodion-carbon film freshly glow-discharged and negatively stained with 2% uranyl acetate. Samples were observed in the annular dark-field mode for positive staining or in bright-field mode for negative staining using a Zeiss 902 transmission electron microscope. Images were captured at magnifications of $\times 85,000$ and $\times 140,000$ with a MegaviewIII charge-coupled device (CCD) camera and iTEM software for acquisition (Olympus Soft Imaging Solution).

Cellular procedures. (i) Viral infectivity. Viral infectivity was assayed on peripheral blood mononuclear cells (PBMC), HeLa cells, or HeLa P4 cells expressing CD4 and CXCR4 receptors and carrying the stably integrated lacZ gene under the control of the HIV-1 LTR (8). Under this system the activity of β -galactosidase, whose expression is linked to the expression of the Tat protein, is proportional to HIV-1 integration. In the infection experiments, HeLa or HeLa P4 cells were plated in 48-well plates at 50,000 cells/well using 400 μ l of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% (vol/vol) fetal calf serum (FCS; Invitrogen) and 50 μ g/ml of gentamicin (Invitrogen). For RS-1 treatments, cells were incubated for 24 h prior to infection with increasing concentrations of RS-1. After overnight incubation at 37°C, medium was replaced with 400 μ l of fresh DMEM containing either HIV-1 Lai (1 $\times 10^8$ particles/ml; multiplicity of infection [MOI] = 0.4), produced as described in reference 29, or PFV at a MOI of 0.4 (pMD9 vector [16]) and the 4-plasmid system, as described in references 38 and 32, using codon-optimized expression constructs for PFV Gag, Pol, and Env. After 24 h at 37°C, cells were washed three times with 400 μ l of 0.9% NaCl. For HeLa P4 cells each well was refilled with 400 μ l of a reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM β -mercaptoethanol, 0.05% Triton X-100, and 5 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (4-MUG) (Sigma, St. Louis, MO). The level of the reaction was measured in a fluorescence microplate reader (Cytofluor II; Applied Biosystems, Foster City, CA) at 360/460 nm (excitation/emission wavelengths) after 24 h of incubation. PFV replication was measured by flux cytometry after infection of HeLa cells.

PBMC were isolated from blood samples using Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. After separation, PBMC were pelleted by centrifugation. The cell culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, 5% interleukin-2 (IL-2), and 50 μ g gentamicin/ml. PBMC (2 $\times 10^6$) isolated from whole blood were incubated with various concentrations of RS-1 (0, 15, 30, 75, and 100 μ M) for 24 h at 37°C. Next, PBMC were harvested (7 min, 400 \times g) and resuspended in 500 μ l culture medium. Ten microliters of HIV-1 subtype B virus (MOI = 0.1) was added to PBMC, and cells were incubated at 37°C for 3 h. Then, the medium was removed, and 10 ml of RPMI 1640 was added to wash the cells. The cells were harvested at low speed (400 \times g), and the washed-cell pellet was resuspended in 2 ml of supplemented RPMI 1640. The cell suspension was added to wells of a 24-well tissue culture plate and incubated at 37°C. HIV-1 RNA from plasma samples was determined 24, 48, and 72 h postinfection. Replication in PBMC was quantified by HIV-1 RNA determination in cellular supernatant using AmpliCor HIV Cobas TaqMan, version 2 (Roche, Basel, Switzerland), with a lower limit of detection of 20 copies/ml of plasma.

(ii) Quantification of HIV-1 DNA population. Cells were harvested 48 h postinfection by centrifugation of 2 $\times 10^6$ - to 10 $\times 10^6$ -cell aliquots, and cell pellets were kept frozen at -80°C until further analysis. Total DNA (including integrated HIV-1 DNA and episomal HIV-1 DNA) was extracted using the QIAamp blood DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 50 μ l of elution buffer. The total HIV-1 DNA was amplified by quantitative real-time PCR using the

Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification was performed in a 20- μ l reaction mixture containing 1 \times Light Cycler Fast Start DNA master hybridization probes (Roche Diagnostics), 3 mM MgCl₂, 500 nM forward primer LTR152 (5'-GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'), and 500 nM reverse primer LTR131 (5'-GGCGCCACTGCTAGAGATTTT-3'), located in an LTR region with highly conserved fluorogenic hybridization probe LTR1 (50 nM; 5'-6-carboxyfluorescein [FAM]-AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTT[AG]T[GT]TGACT-3'-6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]). After an initial denaturation step (95°C for 10 min), total HIV-1 DNA was amplified for 45 cycles (95°C for 10 s, 60°C for 30 s), followed by 1 cycle at 40°C for 60 s. The copy number of total HIV-1 DNA was determined using the 8E5 cell line. The 8E5/LAV cell line, used for a standard curve, was derived from a CEM cellular clone containing a single, integrated, defective (in the *pol* open reading frame), constitutively expressed viral copy. 8E5 DNA (5 to 5 $\times 10^4$ copies) was amplified. Results were expressed as the copy number of total HIV-1 DNA per 10⁶ cells.

The 2-LTR DNA circles were amplified with primers HIV-F and HIV-R1, spanning the LTR-LTR junction, as described elsewhere (4). Briefly, amplification was performed in a 20- μ l reaction mixture containing 1 \times Light Cycler Fast Start DNA master hybridization probes (Roche Diagnostics), 4 mM MgCl₂, 300 nM forward and reverse primers spanning the LTR-LTR junction, and 200 nM each fluorogenic hybridization probe. Copy number of 2-LTR circles was determined in reference to a standard curve prepared by amplification of quantities ranging from 10 to 1 $\times 10^6$ copies of a plasmid comprising the HIV_{LAI} 2-LTR junction (4) by using Light Cycler quantification software, version 4.1 (Roche Diagnostics). Results are expressed as copy number of 2-LTR circles per 1 $\times 10^6$ cells.

Integrated DNA in HeLa P4 cells was first amplified by Alu PCR performed in a 50- μ l reaction mixture containing 200 ng total DNA, 1 \times HF Phusion mix, 200 nM deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 500 nM primer PBS (5'-TTTCAAGTCCCTGTTCGGGCGCCA-3'), located in the PBS sequence of the viral genome, and 500 nM primer Alu-164 (5'-TCCCAGTACTGGGGAGGCTGAGG-3'), located in the Alu sequence of the cellular genome. After an initial denaturation step (98°C for 30 s), the heterogeneously sized population of integrated DNA was amplified for 35 cycles (98°C for 10 s, 60°C for 20 s, 72°C for 2 min 30 s). A second nested PCR was then performed in a 50- μ l reaction mixture containing 5 μ l of Alu PCR product, 1 \times HF Phusion mix, 500 nM dNTP, 500 nM primer NI-1 (5'-CACACACAAGGCTACTTCCCT-3'), and 500 nM primer NI-2 (5'-GCCACTCCCCAGTCCCGCCC-3'); primer sequences match sequences localized in the viral genome. After an initial denaturation step (94°C for 12 min), the expected 351-bp fragment of integrated DNA was amplified for 42 cycles (94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min). Results were analyzed on 1.2% agarose SYBR safe stain gel. A first-round PCR control was ran in the absence of polymerase in order to quantify any unspecific amplification during the second round. Quantification of the integrated DNA in PBMC was done by standard quantitative PCR as previously reported (5). Briefly, in a first round of PCR, integrated HIV-1 sequences were amplified with the two outward-facing Alu primers reported above and then the amplified products were subjected to quantitative PCR using the NI-1 and NI-2 primers mentioned above in the Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). The copy number of integrated HIV-1 DNA was determined in reference to a standard curve generated by concomitant two-stage PCR amplification of a serial dilution of the standard HeLa R7 Neo cell DNA mixed with uninfected-cell DNA to yield 50,000 cell equivalents.

(iii) Quantification of cisplatin resistance. Determination of the effect of protein overexpression and RS-1 treatment on hRAD51-mediated homologous recombination in HeLa and HeLa P4 cells was performed by a standard cisplatin resistance assay described previously (18). Forty-eight hours after transfection with the expression vector or 24 h after RS-1 treatment, the cells were incubated for 24 h with increasing concentrations of cisplatin. After removal of the drug, the cells were allowed to grow in complete media for an additional 6 days. Cell survival experiments were

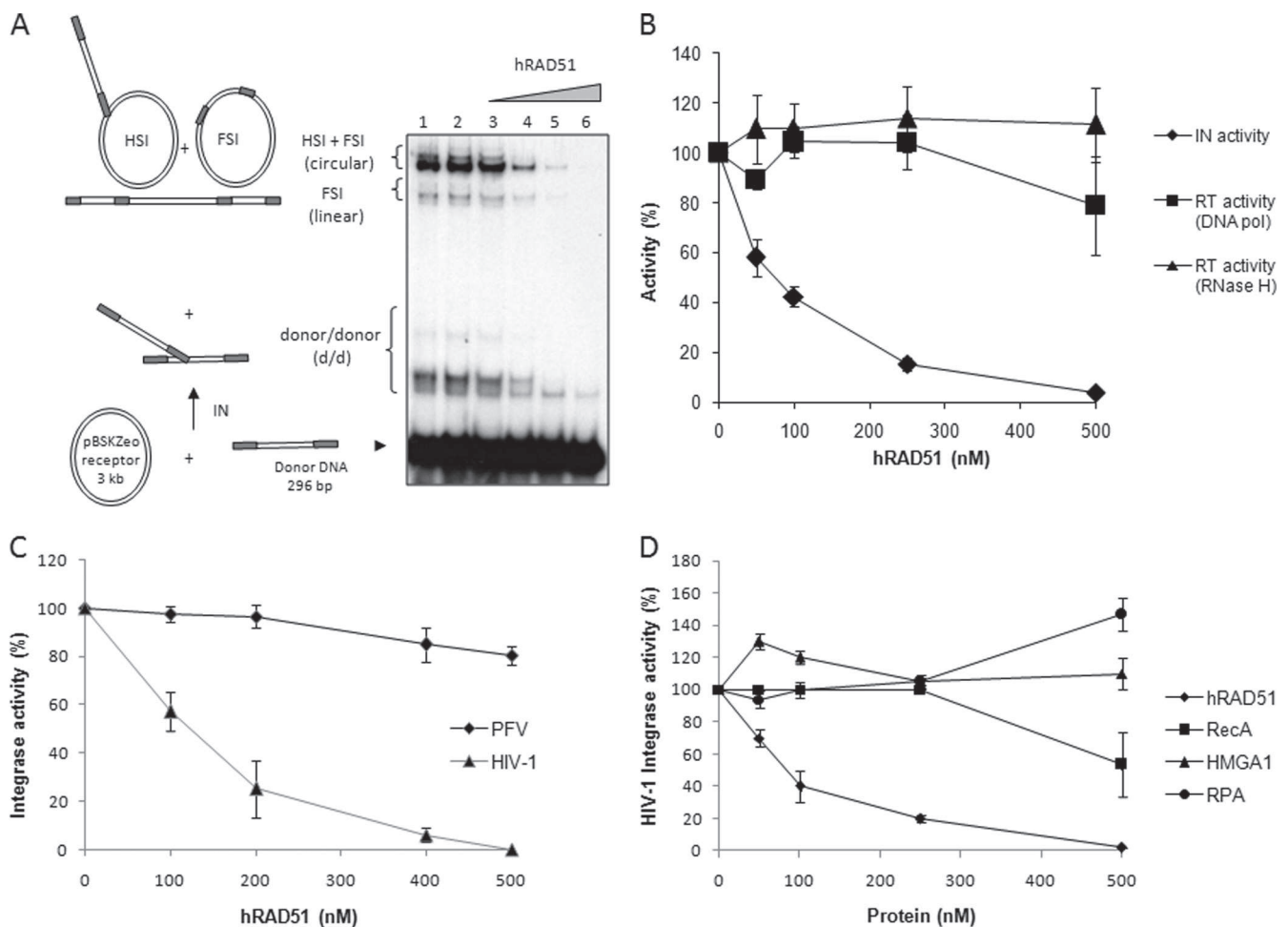


FIG 1 HIV-1 integrase-specific inhibition by hRAD51. (A) Effect of hRAD51 on *in vitro* concerted integration catalyzed by HIV-1 integrase. The concerted integration assay was performed using 600 nM IN, 150 ng of acceptor plasmid, 15 ng of unprocessed donor DNA without ATP (lane 1), and 100 μM ATP in the absence (lane 2) or in the presence of 50, 100, 250, or 500 nM recombinant hRAD51 (lanes 3 to 6). The reaction products were loaded on 1% agarose gel. The positions and the structures of the different products obtained after half-site (HSI), full-site (FSI), and donor/donor integration are reported. (B) Comparison of hRAD51 effects on HIV-1 IN and reverse transcriptase *in vitro* activities. The concerted integration assay was performed as reported for panel A, and integration products (circular HSI and FSI plus linear FSI forms) were quantified. The hRAD51 *in vitro* effect on the HIV-1 reverse transcriptase activity was checked in standard DNA-dependent DNA polymerase (DNA pol) and RNase H reactions and compared to the IN inhibition. (C) Comparison of hRAD51 effect on HIV-1 and PFV retroviral integrase *in vitro* integration activity. The concerted integration assay and quantification of integration products were performed as reported for panel A. The PFV integration assay was performed under the same conditions as for HIV-1 but using specific 296-bp PFV donor substrate, as reported in Materials and Methods. (D) Comparison of effects of several DNA binding proteins on HIV-1 IN *in vitro* activity. The concerted integration assay was performed as for panel A but using increasing concentrations of either bacterial hRAD51 counterpart RecA, human HMGA1, human RPA, or hRAD51 proteins. Integration products were quantified on gel as reported before. All the quantifications shown in panels B, C, and D are reported as the means from at least three independent experiments ± standard deviations (error bars). In the quantification data reported in panels B, C, and D, 100% activity corresponds to the activity observed in the absence of hRAD51 or DNA binding proteins.

then performed using a sulforhodamine B assay (34). Nine hundred cells were plated in a 96-well plate (one well per condition; each condition was tested in triplicate). Sulforhodamine B-stained cells were quantified with a Synergy (BioTek) plate reader. Survival was reported as optical density (OD) at 564 nM for the experimental wells divided by that for control well (cells without cisplatin treatment).

To quantify cisplatin resistance in the PBMC, an alternative procedure was chosen owing to poor viability of the cells. After 24 h of RS-1 treatment, the cells were incubated for 24 h with increasing concentrations of cisplatin. The viability was then directly evaluated by measuring the production of formazan catalyzed by the mitochondrial reductase in living cells from the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) substrate. Survival was reported as the OD at 492 nM (Synergy [BioTek] plate reader) for the cisplatin-treated cell fraction (preincubated or not with RS-1) divided by that for untreated cells.

Ethics statement. Human PBMC were obtained from an HIV-1-seronegative donor from Etablissement Français du Sang (EFS) Aquitaine-Limousin. EFS has approved the study, and a written informed consent was provided by study participants.

RESULTS

hRAD51 specifically inhibits HIV-1 IN *in vitro*. Increasing concentrations of purified human hRAD51 added to a concerted integration reaction mixture (24) under conditions allowing the formation of an active nucleofilament (presence of 100 μM ATP, as previously determined [6]) induce a strong inhibition of all the activities (autointegration and half-site and full-site concerted integration) catalyzed by the recombinant HIV-1 IN (50% inhibitory concentration [IC₅₀] in the 75 to 125 nM range) (Fig. 1A;

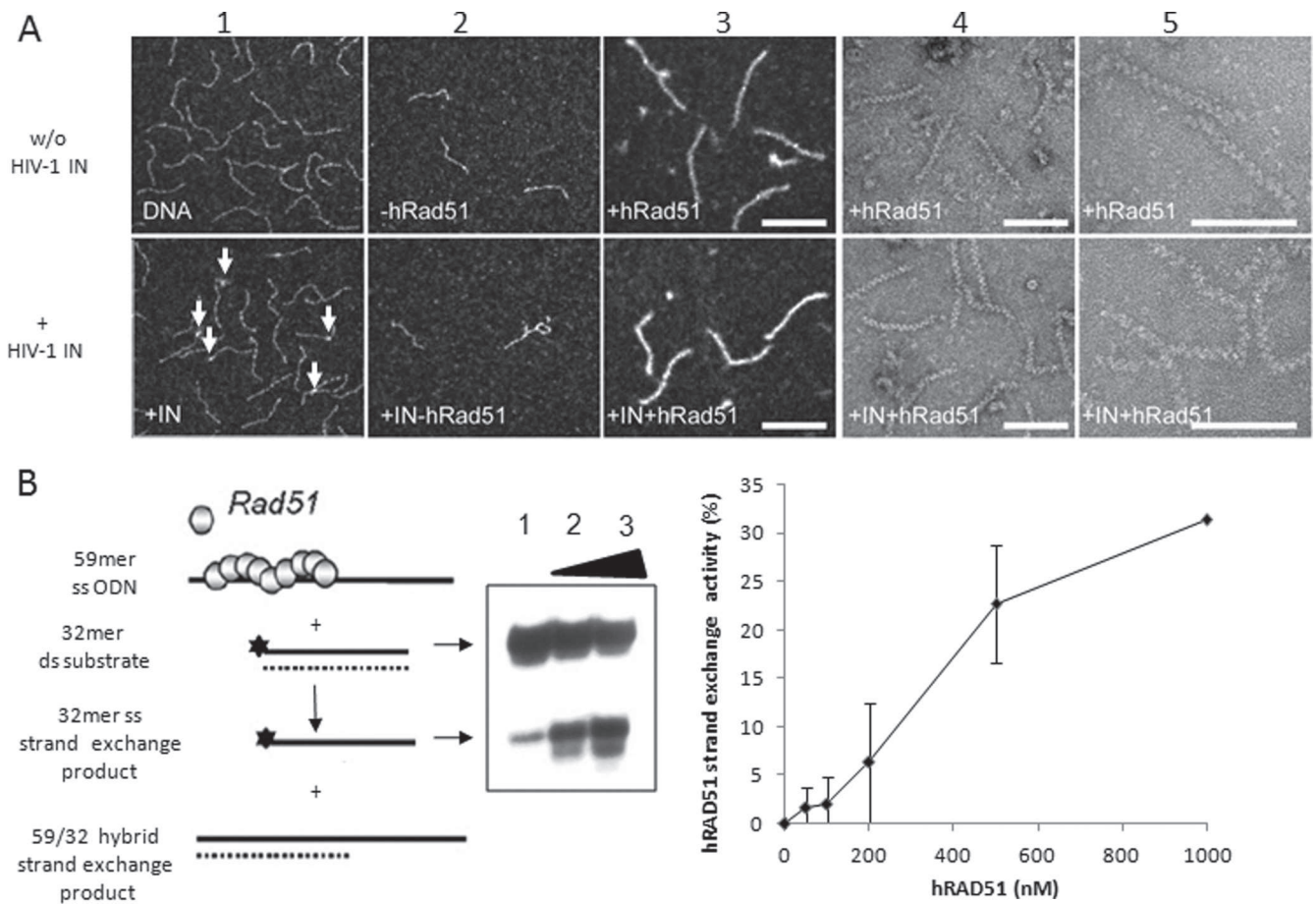


FIG 2 hRAD51 forms active nucleofilaments under *in vitro* integration conditions. (A) Transmission electron microscopy analysis of IN-hRAD51-DNA complexes. Electron microscopy analysis was performed as reported in Materials and Methods in the presence (+ HIV-1 IN) or absence (w/o HIV-1 IN) of HIV-1 IN (600 nM) (or the corresponding storage buffer). Preincubation was with the 296-bp donor DNA (1.5 μ M) containing the 20 final nucleotides from U3 and U5 LTR sequences. (1) Control DNA before reaction in the presence (bottom) or absence (top) of IN after 20 min on ice. Samples were observed in the annular dark-field mode for positive staining. Magnification, $\times 85,000$. Discrete nucleoprotein complexes could be observed (some examples are indicated by arrows). (2) DNA after reaction (top) and in the presence of IN (bottom) (a few figures corresponding to possible integration events could be observed, but binding could no longer be seen, as it seems quite dynamic and does not support dilution in our hands). Samples were observed in the annular dark-field mode for positive staining. Magnification, $\times 85,000$. (3 to 5) DNA after reaction in the presence of hRAD51 (top) and in the presence of IN and RAD51 (bottom). (4 and 5) Samples were observed in the bright-field mode for negative staining. Magnifications, $\times 85,000$ (3) and $\times 140,000$ (4 and 5). Bars, 100 nm. (B) Strand exchange activity of hRAD51 nucleofilament. A standard strand transfer activity was performed in the presence of 100 μ M ATP and in the absence (lane 1) or presence of 250 (lane 2) or 500 nM (lane 3) hRAD51 (a schema of the reaction is provided). Products were loaded on nonreducing 12% polyacrylamide gel. The single-stranded (ss) strand-exchanged product is shown as well as the double-stranded (ds) 32-mer substrate. Quantifications from three representative strand exchange reactions performed with increasing concentrations of hRAD51 are shown at the right as means \pm standard deviations (error bars) of percentages of 32-mer ss strand exchange product formed.

quantification in Fig. 1B). No direct inhibition of IN was observed with ATP (Fig. 1A, lane 2 compared to lane 1). The specificity of this *in vitro* inhibition was analyzed by testing the effect of hRAD51 on other HIV-1 enzymes acting on DNA. Since the core domain of IN and the RNase H domain of the HIV-1 reverse transcriptase (RT) have closely related structures (42), we assayed the effect of hRAD51 on both RNase H and DNA polymerase activities of recombinant purified RT. Reactions were performed under the standard conditions described in Materials and Methods, in the presence of increasing amounts of hRAD51. Results clearly showed that hRAD51 had no effect on *in vitro* RT activities within the IN inhibition concentration range (Fig. 1B). To better determine the specificity of this inhibition, we further tested the effect of hRAD51 on another retroviral integrase: the PFV integrase. A concerted integration reaction performed with the re-

combinant purified PFV integrase in the presence of hRAD51 showed that the DNA repair factor did not inhibit PFV *in vitro* integration compared to that of HIV-1 (Fig. 1C). Taken together these results suggested that inhibition by hRAD51 was due to the specific action of hRAD51 on the integrase protein in the HIV-1 active integration complex.

To determine whether IN inhibition by hRAD51 could be due to the nonspecific DNA binding property of the added cellular factor, we tested several eukaryotic and prokaryotic proteins also displaying unspecific interaction with DNA. We first assayed the bacterial RecA homolog of hRAD51, previously shown to interact *in vitro* with HIV-1 IN (33) and sharing close DNA binding properties with hRAD51 (39). As reported in Fig. 1D, RecA was able to inhibit IN but with a lower efficiency than its human counterpart. In contrast, when the human dsDNA binding protein HMG1A or

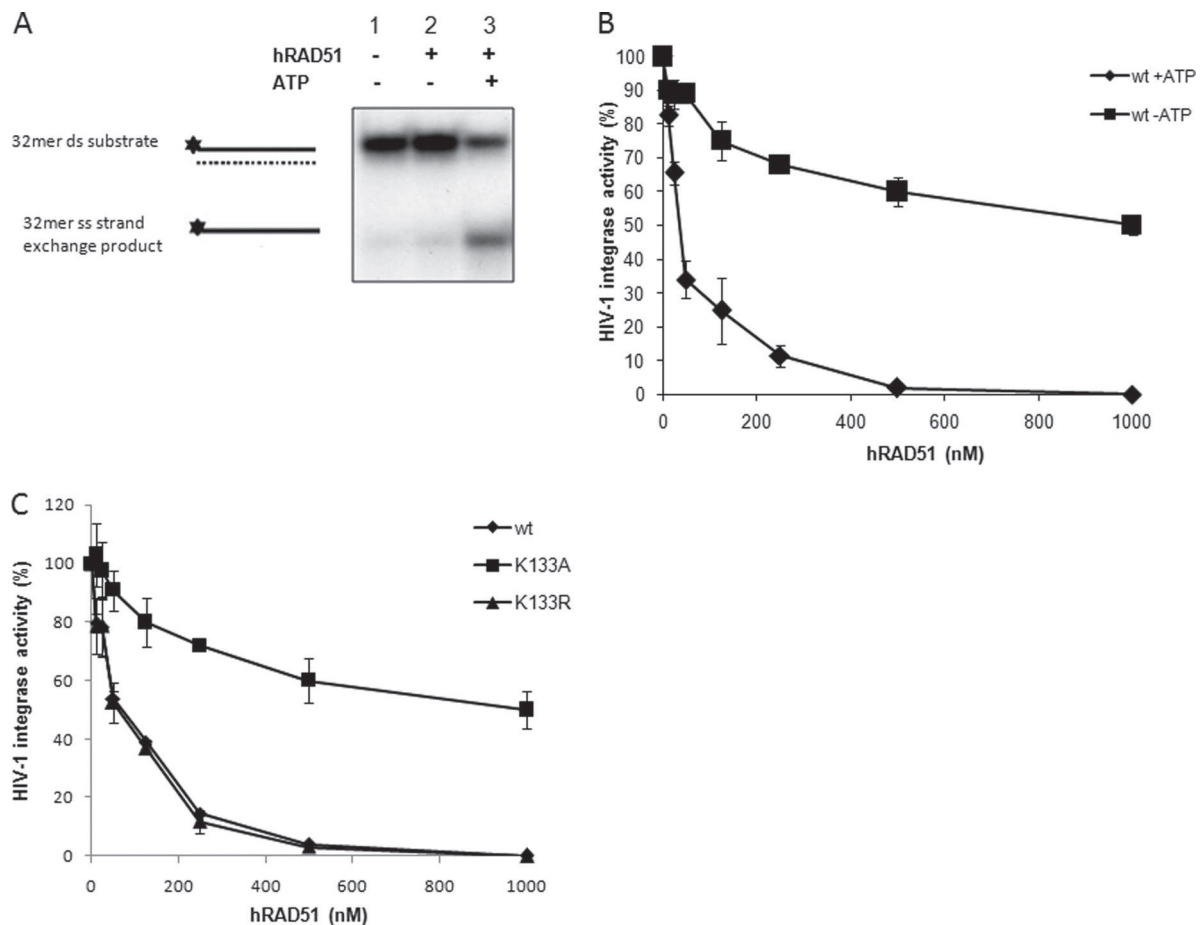


FIG 3 Involvement of hRAD51 nucleofilament in inhibition of integration *in vitro*. (A) ATP-dependent strand exchange activity. The hRAD51 strand transfer reaction (left panel) was performed in the presence of 500 nM hRAD51 and in the absence or presence of 100 μ M ATP. Products were loaded on non-denaturing 12% polyacrylamide gel. The single-stranded (ss) strand exchange product is shown, as well as the double-stranded (ds) 32-mer substrate. (B) ATP-dependent HIV-1 IN inhibition by hRAD51. Concerted integration reactions were performed under standard conditions with increasing concentrations of wild-type hRAD51 in the absence or presence of 100 μ M ATP. Integration products were quantified on agarose gel. Values are percentages of donor DNA integrated as circular HSI and FSI plus linear FSI forms. (C) Inhibitory effect of hRAD51 mutants defective for DNA binding and/or nucleofilament formation on HIV-1 IN inhibition. Concerted integration reactions were performed under standard conditions in the presence of increasing concentrations of wild-type protein or K133R and K133A RAD51 mutants and 100 μ M ATP. The reaction products were loaded on 1% agarose gel. Integration products were quantified on agarose gel. Values are percentages of donor DNA integrated as circular HSI and FSI plus linear FSI forms. The data reported are the means from at least three independent experiments \pm standard deviations (error bars).

the ssDNA binding protein RPA was tested, no inhibition was observed. This indicates that the IN inhibition observed with the RAD enzymes was specific to this type of DNA repair factor and not due to nonspecific DNA interactions.

The hRAD51 nucleofilament inhibits HIV-1 IN *in vitro*. A prerequisite step in hRAD51-mediated recombination involves the ATP-dependent polymerization of hRAD51 on its single-stranded DNA substrate, following its initial binding to nucleotides (nucleation), leading to the formation of an active presynaptic nucleofilament (for a recent review see reference 37). Thus, we further studied whether this active nucleoprotein complex could also be formed on the double-stranded DNA integration substrate used under our IN inhibition conditions. For this purpose we first sought to detect this complex by electron microscopy in the presence or absence of IN. As reported in Fig. 2A, a typical hRAD51 nucleofilament was found on the viral DNA integration substrate both in the absence and presence of HIV-1 IN, strongly suggesting that hRAD51 could form this crucial recombination intermediate

on the double-stranded integration substrate. Next, we investigated whether this nucleoprotein complex was active under our concerted integration reaction conditions. For this purpose we performed a standard hRAD51-mediated strand exchange reaction as previously described (40) but adapted to our conditions of concerted integration inhibition. As shown in Fig. 2B, hRAD51 was found to be active under these conditions, confirming that the protein could form a fully active nucleofilament in our concerted integration inhibition reactions.

To determine the importance of this hRAD51 nucleofilament in the IN inhibition mechanism, we tested the hRAD51 efficiency for inhibiting integration under several well-defined hRAD51 activity-promoting or -restricting conditions. ATP was previously shown to be required for the formation of an active nucleofilament (6). hRAD51 activity was also found to require ATP under our conditions since strand exchange was observed only in the presence of ATP (Fig. 3A). Interestingly, the omission of ATP in the hRAD51-mediated IN inhibition reaction strongly decreased the negative effect of the cellu-

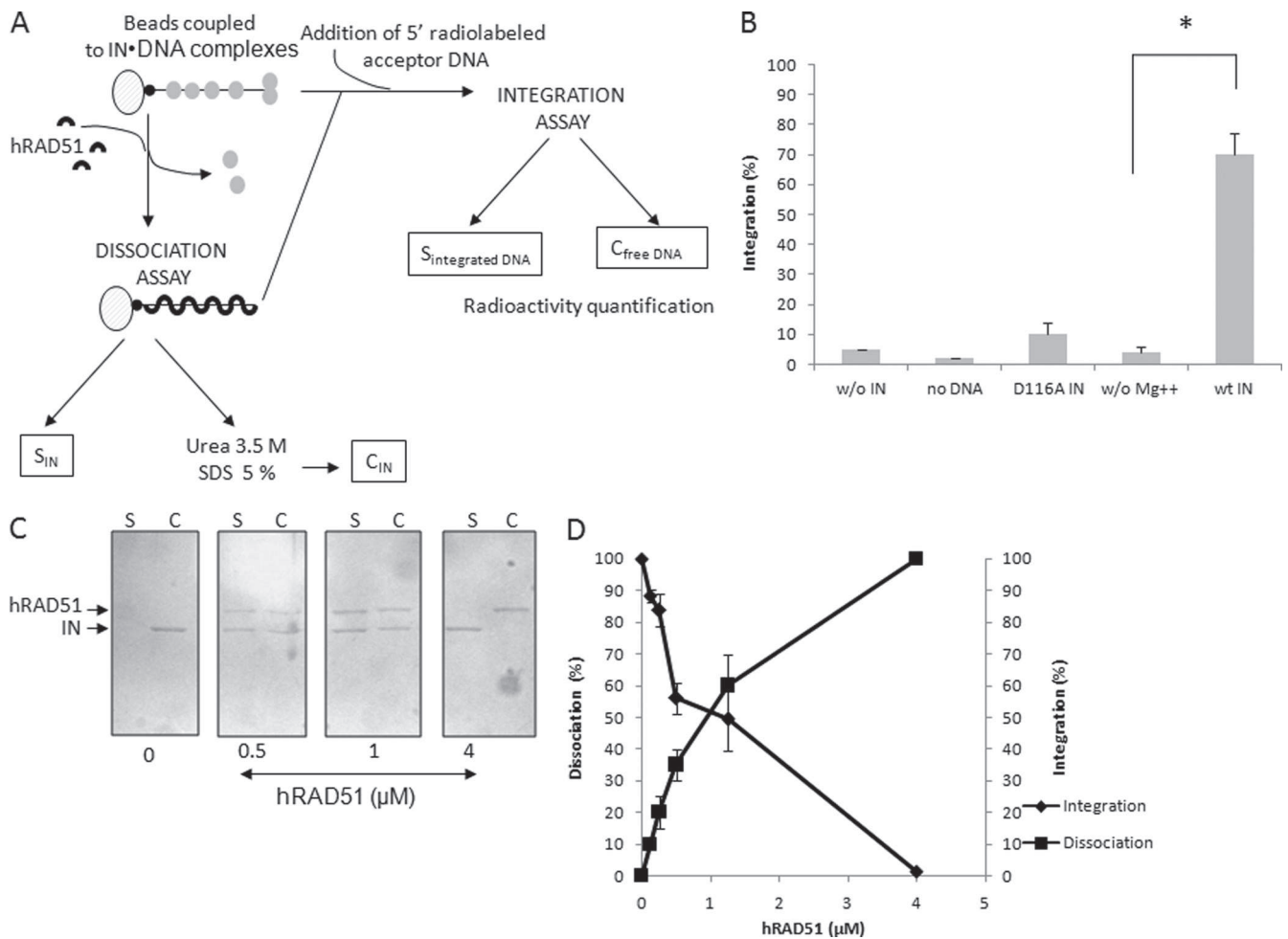


FIG 4 Dissociation effect of hRAD51 on active IN-DNA integration complex. The 296-bp viral DNA used in the concerted integration assay and fused to biotin was coupled with magnetic beads. HIV-1 IN was then bound to the DNA (checked by SDS-PAGE). hRAD51 treatment was performed under different conditions promoting the formation of the active nucleofilament or not. IN-DNA dissociation and hRAD51 binding were checked by SDS-PAGE of the supernatant (C, lanes S). The proteins remaining bound to the DNA were analyzed after SDS and urea treatment of the bead pellet and SDS-PAGE followed by Western blotting (C, lanes C). The presence of IN and hRAD51 in the bead pellet and the supernatant was checked after SDS-PAGE of the corresponding fractions and Western blotting using a mixture of antibodies against each protein (strategy is shown in panel A). Coupling of active complexes was checked by integration assays using different conditions promoting (wt IN) or not (w/o Mg⁺⁺; use of inactivated D116A enzyme) IN activity in the presence of a 5'-radiolabeled acceptor DNA. The activity of the coupled IN was measured by quantifying the radioactivity remaining covalently bound to the beads after repeated washings (B). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.005$. Treatment of the complexes with increasing concentrations of hRAD51 in the presence of 100 μM ATP led to the dissociation of IN from its substrate (C). (D) Quantification of the integration activity catalyzed by the IN coupled to the beads and IN dissociation after treatment with increasing concentrations of hRAD51.

lar factor, confirming that the IN inhibition property of hRAD51 also required ATP (Fig. 3B). To confirm that the fully active protein was required for optimal IN inhibition and to define more precisely the role of hRAD51 polymerization on DNA in the IN inhibitory effect, we analyzed well-characterized ATP hydrolysis mutants of hRAD51 that were still able to bind IN (data not shown) but that presented different activities on DNA (see the analysis of the mutant activities on DNA in reference 6). As reported in Fig. 3C, the K133A mutant, which remains able to bind DNA but is unable to form an active nucleofilament due to the poor binding of ATP (6), was defective for IN inhibition. We also tested the K133R protein, which also carries a punctual mutation on the same amino acid, is unable to hydrolyze ATP but still able to form stable RAD51 filaments, and presents a level of recombination activity similar to that of the wild-type enzyme (6). In this case we observed a level of inhibition similar to that detected

for the wild-type protein (Fig. 3C). The slight inhibition remaining due to the lack of ATP or the use of the K133A mutant indicates that a minor part of the inhibition process could involve the initial binding of hRAD51 on DNA and/or its interaction with IN. However, the observed difference in inhibition level between wt and K133A hRAD51 enzymes demonstrates that the active hRAD51-DNA complex is highly required for an optimal IN inhibition.

The mechanism of IN inhibition by hRAD51 involves dissociation of the retroviral enzyme from its complex with the viral DNA substrate by formation of an active nucleofilament. A powerful *in vitro* property of protein-DNA displacement was reported for hRAD51, as demonstrated recently on nucleosomal templates (13). We thus wondered whether this mechanism could also occur on the IN-DNA complexes and be responsible for the IN inhibition. Electron microscopy analyses of the hRAD51 po-

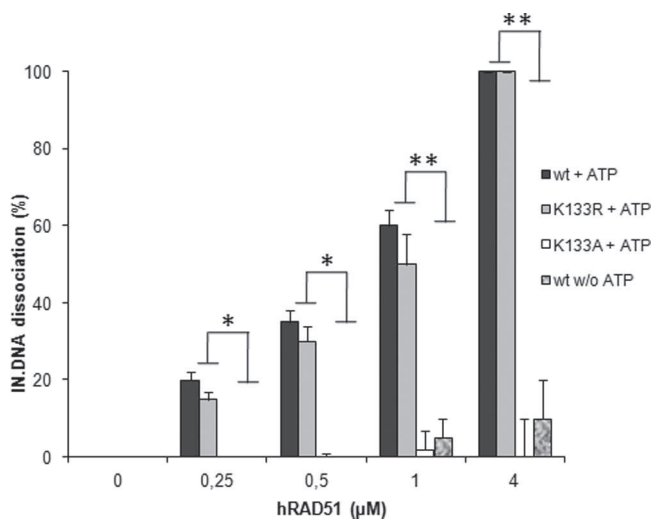


FIG 5 The active hRAD51 nucleofilament dissociates IN-DNA complexes. Quantification of the released IN after treatment of the beads with wt hRAD51 and K133R and K133A mutants in the presence or absence of 100 μM ATP was performed by scanning the IN corresponding bands in the Western blot analyses reported in Fig. 4. The data shown are the means from three independent experiments \pm standard deviations (error bars). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

lymerization on DNA in the presence of IN (Fig. 2A) showed that preformation of IN-DNA complexes prior to hRAD51 incubation did not affect either the formation or the structure of the nucleofilament. This result supported the hypothesis of an IN displacement by hRAD51 polymerization on DNA. However, the method did not allow us to clearly show a direct dissociation of the IN-DNA complexes. Thus, in order to demonstrate this displacement, we set up the dissociation experiment described in Materials and Methods and Fig. 4A, derived from the hRAD51-DNA dissociation system reported by Chi et al. (6). Briefly, IN was bound to biotinylated DNA coupled to streptavidin magnetic beads prior to hRAD51 treatment. Coupling of functional IN-DNA complexes was checked by performing an integration reaction on the activated beads. This control showed that the 296-bp viral ends containing DNA bound to the beads and associated with wt IN could be integrated efficiently into a short acceptor DNA (Fig. 4B). The structure of the integrated product was further checked by polyacrylamide gel analysis (data not shown), confirming that integration was catalyzed by active complexes coupled to the beads.

Experiments performed under conditions allowing the formation of the hRAD51 nucleoprotein filament (i.e., using wild-type hRAD51 and 100 μM ATP) showed that the addition of hRAD51 to the IN-DNA complex linked to the beads led to its dissociation and the release of the retroviral enzyme into supernatant fractions (Fig. 4C). An integration assay performed on the activated beads after hRAD51 dissociation showed that the reaction was also strongly inhibited, following a pattern inversely correlated with the IN-DNA dissociation efficiency (Fig. 4D). The involvement of the active hRAD51 nucleofilament in the dissociation process was further studied by using the two previously described K133R and K133A mutants and by omitting ATP in the reaction conditions. As reported in Fig. 5, a weak dissociation effect was observed in the absence of ATP or by using the hRAD51-defective K133A mutants, in contrast to the active wt and K133R proteins.

The observed close correlation between IN dissociation efficiency and the integration restriction property of hRAD51 strongly suggests that the cellular factor dissociates functionally relevant IN-DNA complexes and that this mechanism is probably responsible for the integration inhibition by the recombinase.

Stimulation of hRAD51 activity inhibits HIV-1 integration both *in vitro* and in infected cells. The above-mentioned results showing that hRAD51 was able to inhibit HIV-1 integration by dissociation of the IN-DNA complex may lead to a new therapeutic approach. Thus, it seemed interesting to investigate whether this observation was also true in infected cells and whether the stimulation of hRAD51 could intensify the restriction effect. Enhancement of hRAD51-DNA nucleofilament formation has been shown to be promoted by chemical compounds, such as the previously published hRAD51-stimulatory compound 1 RS-1 (18), whose structure is reported in Fig. 6A. This compound was shown to act presumably as an allosteric effector promoting the formation of the active nucleofilament and specifically stimulates hRAD51 activity both *in vitro* and in fibroblast cells (18). This hRAD51 stimulation was also observed under our *in vitro* conditions (Fig. 6B). In contrast, RS-1 did not affect either the HIV-1 IN or RT *in vitro* activity (Fig. 6B), allowing us to use this molecule as a molecular tool for dissecting hRAD51-mediated IN inhibition.

Addition of RS-1 to hRAD51 in an *in vitro* integration assay increased its IN inhibition efficiency (Fig. 6C) ($P < 0.05$). This indicated that the inhibition property of hRAD51 can be promoted, at least *in vitro*, by RS-1. Dissociation experiments performed as reported in Fig. 5 but in the presence of RS-1 showed that the molecule also stimulated the hRAD51-mediated IN-DNA dissociation process (Fig. 6D), confirming that the molecule enhances IN inhibition by hRAD51 via the stimulation of IN releasing from its substrate.

Since RS-1 was previously shown to be efficient for stimulating hRAD51 activity in human cells (18), we wondered whether it could also promote the hRAD51-mediated inhibition of IN in HIV-1-infected cells and hence retroviral replication. RS-1 treatment was first used to specifically stimulate the activity of the endogenous hRAD51 in the broadly used HeLa P4 cell model. To determine the effect of this RS-1 treatment on the cellular DNA repair processes mediated by HR catalyzed by hRAD51, we performed a standard cisplatin resistance assay as reported before using the sulforhodamine B method (18). Figure 7A indicates that a 24-h treatment with increasing concentrations of RS-1 ranging from 7.5 to 15 μM promoted an increased resistance to the cross-linking agent. No effect was observed at a concentration below 7.5 μM , and concentrations above 15 μM did not increase cisplatin resistance. These data indicate that RS-1 is capable of gaining intracellular access and increasing DNA repair efficiency in our model system, as previously reported in fibroblasts (18). Importantly, within the range of concentrations analyzed, RS-1 did not show any cytotoxicity, as measured by the standard MTT method (data not shown). We thus analyzed the effect of RS-1 treatment on HIV-1 replication. Increasing concentrations (0 to 30 μM) of RS-1 were added 24 h prior to infection under the same conditions as those inducing cisplatin resistance. As reported in Fig. 7B, RS-1 induced a dose-dependent inhibition of HIV-1 replication and 30 μM RS-1 treatments induced 80% inhibition of HIV-1 replication in this cell type.

The retroviral replication step targeted by the treatment was next determined by quantification of the different viral DNA pop-

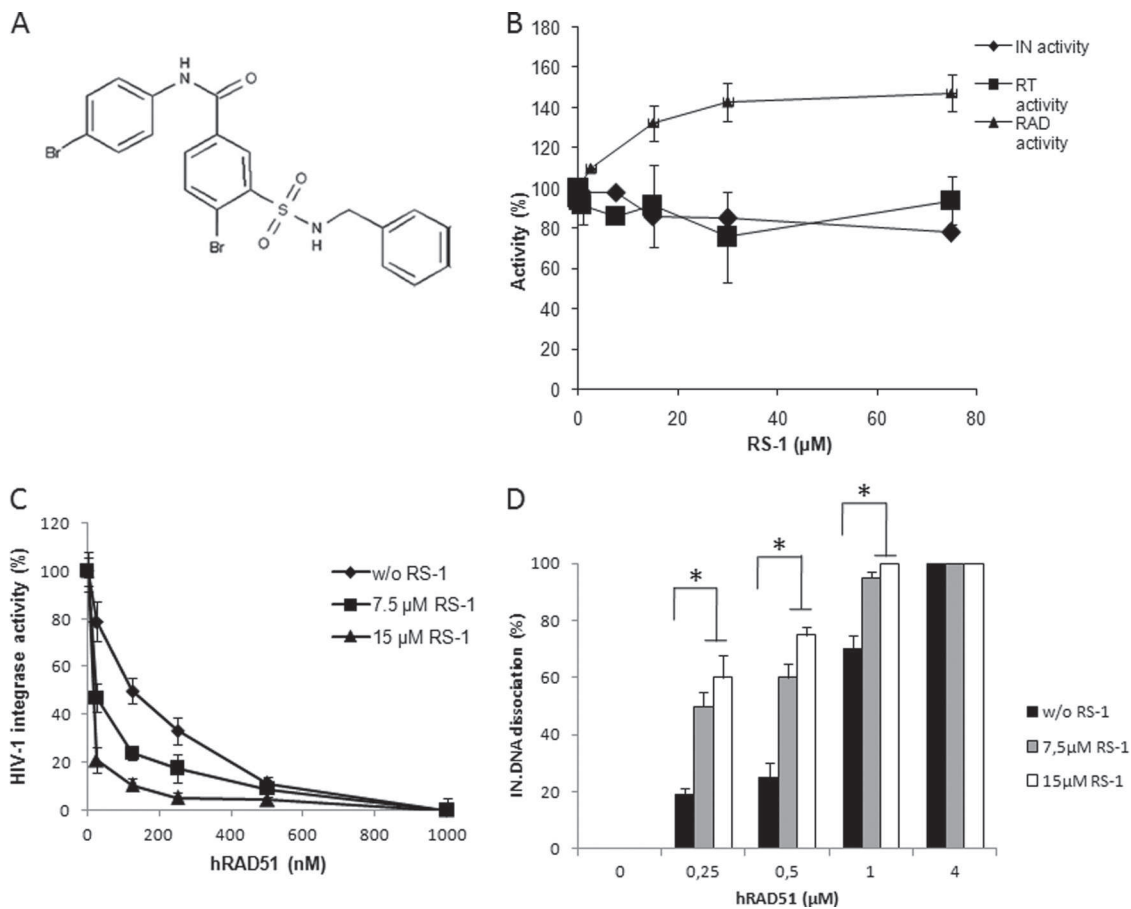


FIG 6 *In vitro* effect of hRAD51 activity stimulation by RS-1 on its integration inhibition property. (A) Chemical structure of RS-1 [3-[(benzylamino)sulfonyl]-4-bromo-N-(4-bromophenyl)benzamide] molecule. (B) *In vitro* effect of RS-1 on HIV-1 IN, reverse transcriptase, and hRAD51 enzymes. The effect of RS-1 on *in vitro* integration was analyzed by using the concerted integration system with 600 nM IN, 150 ng of acceptor plasmid, and 15 ng of donor DNA. The effect of RS-1 on the RT enzyme was analyzed in a typical RNase H assay. The RS-1 effect on hRAD51 was measured in the strand exchange reaction shown in Fig. 2B in the presence of 500 nM hRAD51. The data reported are the means from at least two representative independent experiments \pm standard deviations (error bars). One hundred percent corresponds to the activity observed in the absence of RS-1. (C) Effect of RS-1 on *in vitro* inhibition of HIV-1 IN activity by hRAD51. Increasing concentrations of wt hRAD51 were added in a standard concerted integration assay in the presence of 100 μ M ATP and in the absence or presence of 7.5 or 15 μ M RS-1. The data reported are the means from at least three independent experiments \pm standard deviations (error bars). Integration is shown as the percentage of donor DNA integrated as circular HSI and FSI plus linear FSI forms. (D) Effect of RS-1 on hRAD51-mediated dissociation of the IN-DNA complex. The dissociation experiment was performed as shown in Fig. 4 with increasing concentrations of hRAD51 in the presence of 100 μ M ATP and with or without 7.5 or 15 μ M RS-1. The data reported are the means from at least three independent experiments \pm standard deviations (error bars). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.05$.

ulations. As reported in Fig. 7C, the level of two-LTR DNA increased significantly at 15 μ M or 30 μ M RS-1 without affecting the amount of total viral DNA, strongly suggesting a specific inhibition of the HIV-1 integration step by RS-1 treatment. This is supported by the *in vitro* data reported in Fig. 6B showing that RS-1 did not induce any direct effect on reverse transcriptase. However, to demonstrate unambiguously that the integration step was specifically impaired by RS-1 treatment, the integrated DNA was amplified by nested PCR using primers specific to this form as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 7D, RS-1 treatment induced a strong decrease in the amount of amplified integrated DNA.

The cellular model used here is a transformed cell line where the endogenous hRAD51 activity could be different from that in naturally HIV-1-infected cells (17; reviewed in reference 20). In order to determine whether hRAD51-dependent restriction of viral replication could be promoted in natural HIV-1 infection con-

ditions, we tested the RS-1 effect in primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Fig. 8). Analysis of the cisplatin resistance of cells treated with RS-1 showed that hRAD51 activity could also be stimulated in this cellular type but with a lower efficiency than in transformed HeLa P4 cells (compare Fig. 8A and 7A). This could be due to the difference in endogenous hRAD51 recombination levels existing in these cells (which appear more sensitive to cisplatin). As in HeLa P4 cells, no significant effect of RS-1 treatment on cell survival was detected (data not shown). The effect of RS-1 on HIV-1 replication in these cells was evaluated by addition of the molecule 24 h before infection and quantification of the release of genomic RNA using standard procedures described in Materials and Methods. As reported in Fig. 8B, inhibition of replication by RS-1 was also observed in these cells. The level of inhibition was lower than in HeLa P4 cells, since a 30 μ M RS-1 treatment induced a 60% inhibition of HIV-1 replication. This is in agreement with the lower effect of the molecule on

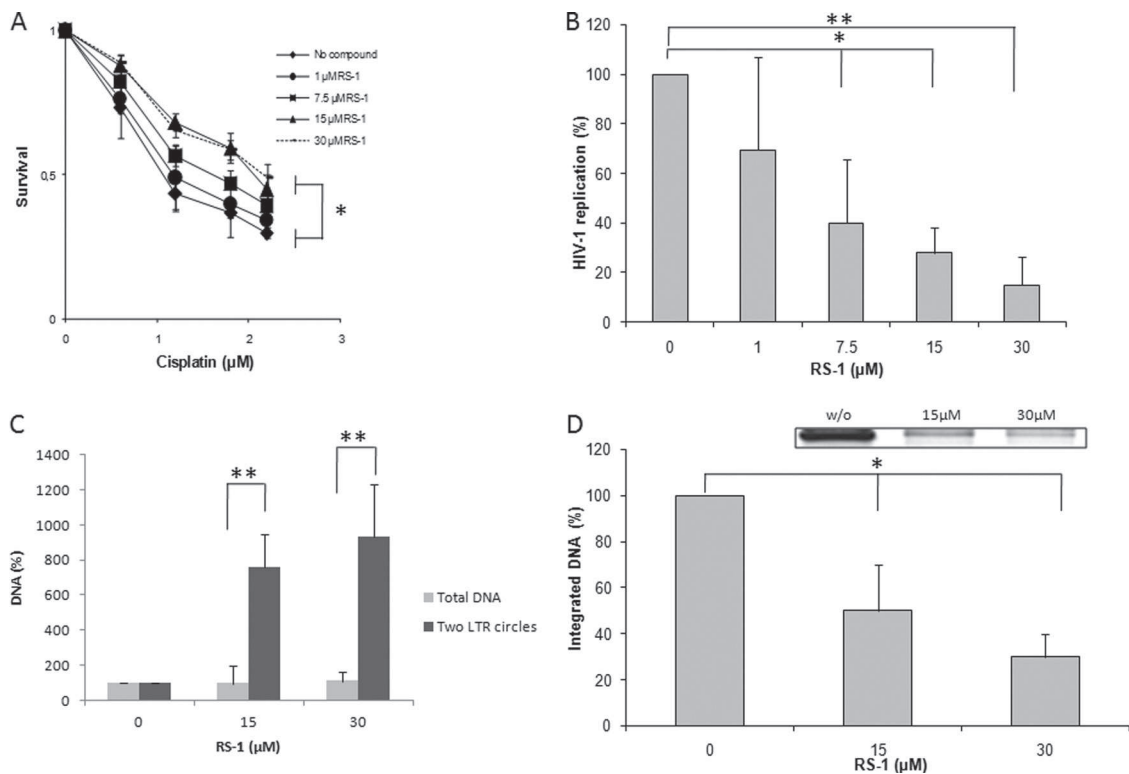


FIG 7 Effect of RS-1 on HIV-1 replication and integration in HeLa P4 cells. (A) Effect of RS-1 treatment on hRAD51 DNA repair endogenous activity. The ability of RS-1 to promote cisplatin resistance was checked in a standard survival analysis after 24 h of treatment with increasing concentrations of the compound. (B) Effect of RS-1 treatment on HIV-1 replication in HeLa P4 cells. The effect of RS-1 on early steps of HIV-1 replication was measured by 4-MUG quantification of the β -galactosidase activity 48 h postinfection (MOI = 0.4) after 24 h of pretreatment with increasing RS-1 concentrations. (C) Effect of RS-1 on amount of two-LTR circles. The total and two-LTR circle viral DNA populations were quantified by quantitative PCR as described in Materials and Methods for two effective concentrations of RS-1. Data are reported as the ratios between the percentages of two-LTR circles and total DNA. (D) Effect of RS-1 on integrated viral DNA amount. The integrated DNA was amplified by specific PCR as reported in Materials and Methods and quantified on agarose gel (an example of amplification results obtained in the absence [w/o] or presence of 15 or 30 μ M RS-1 treatment is shown). One hundred percent corresponds to the integrated DNA quantification obtained without RS-1 treatment. All results are the means from at least three representative independent experiments \pm standard deviations (error bars). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

HR activity, as shown by the lower effect of RS-1 on cisplatin resistance in these cells (Fig. 8A). Accumulation of the two-LTR circles confirmed that the integration step was also impaired by the compound in these cells (Fig. 8C). To unambiguously determine the viral replication step impaired by the treatment, we quantified the integrated DNA by specific quantitative PCR. Results shown in Fig. 8D indicate that treatment with the RS-1 compound led to a decrease of the integrated DNA amount. These data, in addition to the 2-LTR accumulation, demonstrate that the integration step was also inhibited in PBMC by the molecule.

Finally, in order to determine the specificity of the effect of RS-1 treatment on HIV-1 replication, we tested the effect of the molecule on infection by PFV, whose IN was previously shown to be resistant *in vitro* to the restriction property of this cellular factor (cf. Fig. 1C). The infection assay was performed in HeLa cells; RS-1 treatment was also found to stimulate hRAD51-mediated DNA repair (Fig. 9A). As reported in Fig. 9B, no significant inhibition of PFV was observed with RS-1 compared to HIV-1 inhibition, confirming the specificity of integration inhibition by hRAD51 for HIV-1.

DISCUSSION

Our previous research using the yeast model system suggested a downregulation of HIV-1 IN by the DNA repair factor RAD51

(12). In the present work we used biochemical procedures to elucidate the molecular mechanism involved in this process. The effect of hRAD51 on IN was analyzed *in vitro* by using the concerted integration assay in the presence of purified recombinant hRAD51 protein. The *in vitro* IN inhibition assays performed under conditions promoting the formation of the hRAD51 nucleoprotein filament, required for efficient recombination activity, i.e., presence of ATP and hRAD51-stimulatory compound RS-1 addition, showed stimulated hRAD51 inhibition efficiency. In contrast, the reaction conditions that did not allow the formation of the active nucleoprotein filaments, i.e., lack of ATP or use of a K133A hRAD51 mutant defective for active polymerization on DNA, strongly impaired hRAD51 inhibition efficiency. Interestingly, the hRAD51 K133A mutant, which is still able to bind DNA and IN but is unable to form an active nucleoprotein filament, lost a significant fraction of inhibitory activity (Fig. 3C). These observations suggest that the IN binding property of hRAD51 is not sufficient for fully efficient inhibition and that, even if the initial nucleation of hRAD51 on DNA can induce a weak inhibition of IN activity, as observed with the K133A mutant, the formation of the active hRAD51 nucleoprotein filament is very necessary for fully efficient integration inhibition. This result was confirmed by the strong decrease of hRAD51 IN inhibition in the absence of ATP, a

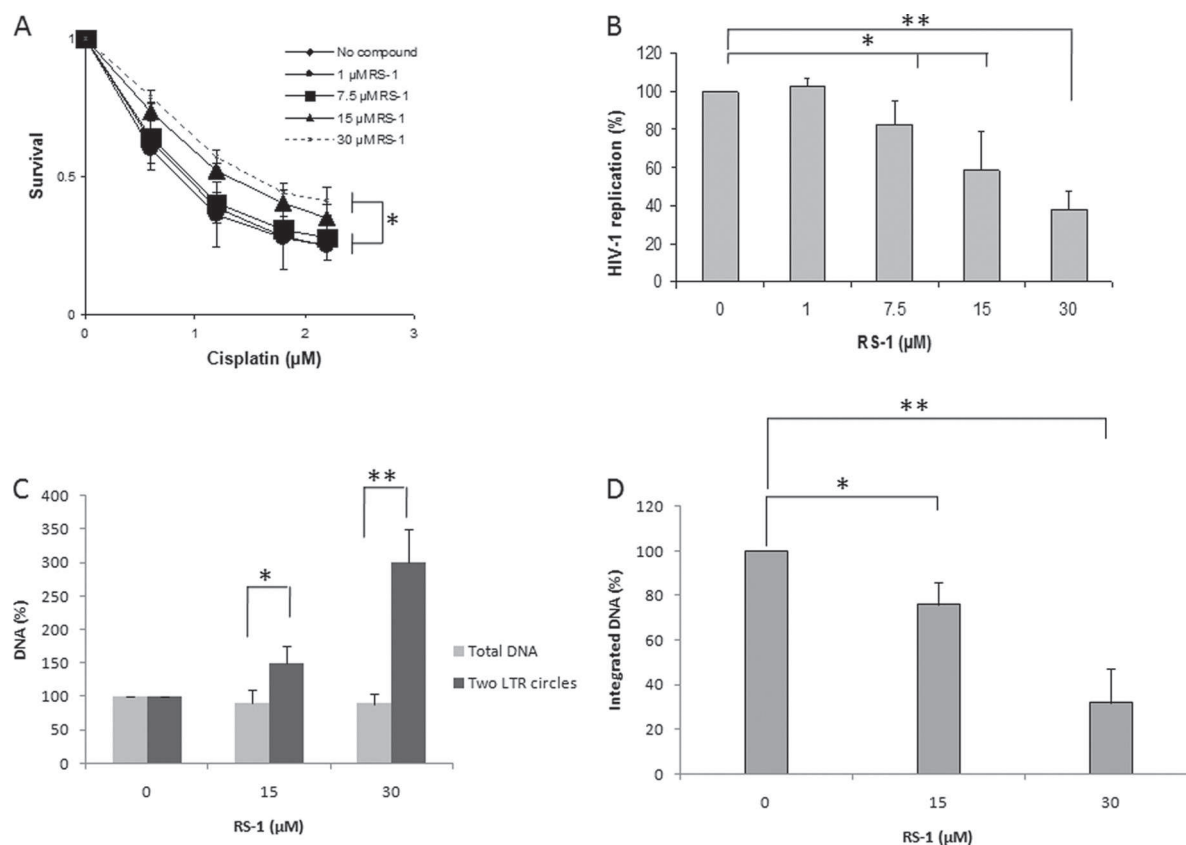


FIG 8 Effect of RS-1 on HIV-1 replication and integration in PBMC. (A) Effect of RS-1 treatment on hRAD51 DNA repair endogenous activity. Cells were incubated for 24 h with increasing concentrations of RS-1. The effect of RS-1 on hRAD51 activity was then checked by quantifying its ability to promote cisplatin resistance in a standard survival analysis, as reported above, with some adjustment due to the property of the primary cells. (B) Effect of RS-1 treatment on HIV-1 replication in PBMC. PBMC were incubated for 24 h in media containing various concentrations of cisplatin in the presence of RS-1. Drugs were then removed, and cell survival was evaluated by an MTT assay as described in Materials and Methods. The effect on HIV-1 replication of a 24-hour treatment of the infected cells with RS-1 prior to infection (MOI = 0.1) was measured by quantifying the genomic RNA released in the medium 48 h postinfection by quantitative PCR. (C) Effect of RS-1 on the amount of two-LTR circles. Total DNA and two-LTR circles were quantified by quantitative PCR as described in Materials and Methods for two effective concentrations of RS-1. (D) Effect of RS-1 on integrated viral DNA amount. Integrated DNA was measured by quantitative PCR as reported in Materials and Methods. One hundred percent corresponds to the integrated DNA quantification obtained without RS-1 treatment. All results are the means from at least three representative independent experiments \pm standard deviations (error bars). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

condition allowing the binding of the protein to DNA but impairing its polymerization (6). The remaining inhibition of IN by the K133A enzyme and in the absence of ATP suggests that this mechanism could also involve the initial nucleation of hRAD51 on DNA and/or its binding to IN. However, the poor inhibition efficiency found under these conditions indicates that the main component for optimal inhibition is the formation of the active nucleofilament. This requirement highlights the specificity of IN inhibition by hRAD51 and rules out a mechanism involving an unspecific coating of the dsDNA. This was confirmed by the fact that other DNA binding proteins tested in the integration assay did not show any inhibition of retroviral IN (Fig. 1D). Strikingly, hRAD51 was unable to inhibit the PFV retroviral integrase (Fig. 1C), again underlying the specificity of the action of this repair enzyme on the HIV-1 integration complex. Additionally, since no interaction between the PFV integrase and hRAD51 was detected (data not shown), and in view of the high structural and functional similarities between PFV and HIV-1 proteins (15, 21, 28), our data suggest that the physical interaction between HIV-1 IN and hRAD51 is important for inhibition. However, determination of

the interaction domains between both proteins by direct dissociation approaches using mutants or peptide derivatives from the association domains (under way in our laboratory) would be helpful for a better understanding of the role of this interaction.

Electron microscopy showed that the formation of the structured hRAD51 nucleoprotein filament was not affected by the presence of IN (Fig. 2A), suggesting that hRAD51 could polymerize on an IN-DNA complex. Treatment of magnetic beads coupled to the IN-DNA complex with hRAD51 under conditions promoting the formation of the active presynaptic filament led to a dose-dependent dissociation of IN from its complex with DNA (Fig. 4C). An integration reaction performed on the activated beads after hRAD51 treatment or without hRAD51 treatment indicated that active IN-DNA complexes were dissociated by the cellular enzyme (Fig. 4D). Owing to the constant correlation between the ability of hRAD51 to form an active nucleoprotein filament and its IN inhibition property, in addition to its capacity to dissociate the active IN-DNA complex, we conclude that hRAD51 can inhibit integration by remodeling the functional IN-DNA complex and releasing the retroviral enzyme from its substrate.

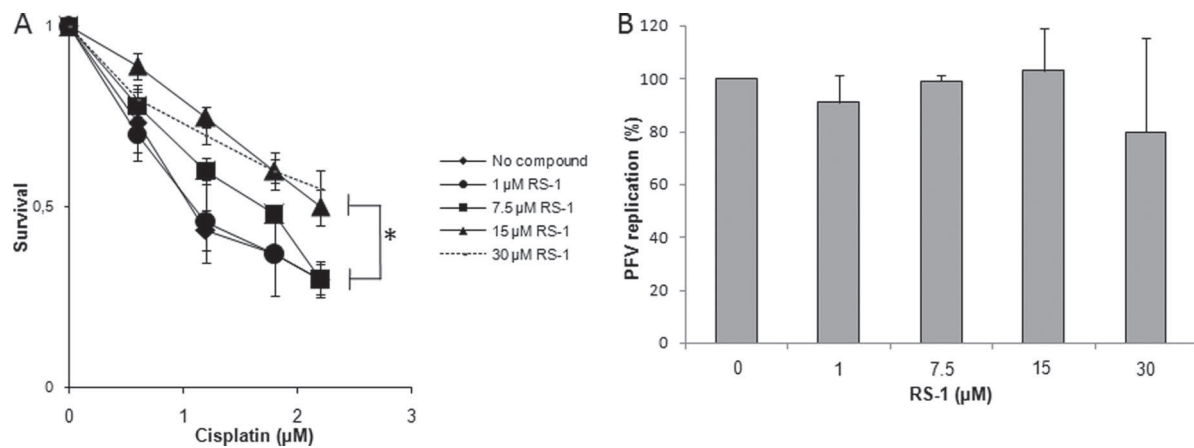


FIG 9 Effect of RS-1 on PFV replication in HeLa cells. (A) Effect of RS-1 treatment on hRAD51 DNA repair endogenous activity. The ability of RS-1 to promote cisplatin resistance was checked in a standard survival analysis after 24 h of treatment with increasing concentrations of the compound. (B) Effect of RS-1 treatment on PFV replication in HeLa cells. HeLa cells pretreated or not with increasing concentrations of RS-1 were infected with PFV at a MOI of 0.4. Replication was quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) 48 h postinfection. All results are the means from at least three representative independent experiments \pm standard deviations (error bars). A Student test was performed on serial values. *, $P < 0.05$.

Since the HIV-1 integration inhibition property of hRAD51 could constitute a new antiviral approach, we then studied the possibility of promoting this inhibition in infected cells. For this purpose we used the RS-1 compound specifically stimulating the formation and stability of the hRAD51 nucleofilament (18). Under our conditions, RS-1 was also found to induce a strong increase in the *in vitro* hRAD51-mediated inhibition of IN activity, without having any direct effect on IN alone (Fig. 6B). Treatment of HeLa P4 HIV-1-infected cells induced both stimulation of hRAD51-mediated HR and inhibition of viral replication (Fig. 7A and B). PCR quantification of the different DNA species after hRAD51 overexpression or RS-1 treatment of HIV-1-infected cells showed an accumulation of two-LTR circles without changes in the total viral DNA amount. These data indicated that the enhancement of homologous recombination mediated by hRAD51 induced the inhibition of integration efficiency without affecting the entry of virions, RNA reverse transcription, or DNA nuclear import. This hypothesis was supported by *in vitro* RT assays indicating that neither the RNase H activity nor the DNA polymerase activity catalyzed by the recombinant RT was affected by hRAD51 (Fig. 1B). The detection and quantification of the integrated viral DNA unambiguously showed a strong decrease in this population after RS-1 treatment (Fig. 7D). Therefore, we conclude that stimulation of the recombination activity catalyzed by hRAD51 in HIV-1-infected cells specifically inhibited the integration steps via the formation of an active nucleofilament. Furthermore, this HIV-1 replication inhibition was also observed after RS-1 treatment in other HIV-1-infected cells such as 293T and MT4 systems (data not shown). More importantly the similar results obtained in primary PBMC confirm that the inhibition effect can be reproduced in more-physiological models independently from their transformation state (Fig. 8). Quantification of the integrated DNA clearly demonstrated that the integration step was also inhibited in these primary cells and, thus, prior to Tat-dependent LTR transcription that was previously reported to be activated by hRAD51 (7, 35). These data indicate that the hRAD51-mediated inhibition of integration is not cell dependent. However, the difference in inhibition efficiency between all those cell models suggests that inhibition efficiency could depend on the cell line.

Previous experiments performed in other mammalian cell lines showed that the overexpression of hRAD51 increased resistance to ionizing radiation via an enhancement of the homologous recombination mediated by this factor (see above). Our data strongly suggest that the same mechanism could occur in HIV-1-infected cells if hRAD51 is stimulated, leading to resistance to retroviral integration. This was supported by hRAD51 overexpression experiments performed in HeLa P4 and 293T HIV-1-infected cells showing both stimulation of the endogenous DNA repair mechanism and HIV-1 replication inhibition, as observed with RS-1 treatment (data not shown). Whether the IN inhibition property of hRAD51 under stimulation conditions reported here signifies a possible regulatory function of this factor under normal infection conditions remains unclear. Even though this point is under study in our laboratory, several hypotheses can be proposed based on the molecular mechanism elucidated here and the cellular function known for hRAD51. Early interaction of hRAD51 with the free incoming intasome and with the host DNA-bound intasome before integration could lead to the displacement of IN from its substrate by hRAD51 polymerization, thereby limiting integration and replication. This could be promoted by simulating the activity of the factor. In contrast, a later interaction of hRAD51 with the integration complex, i.e., after the catalysis of the strand transfer by HIV-1 IN, could lead to the release of IN from the integration loci via the formation of the nucleofilament and the dissociation mechanism reported in Fig. 4. It has been shown that the postintegration repair processes (action of FEN1 and polymerases) cannot occur *in vitro* when IN is bound to its integration product and may require the active disassembly of the IN complex (3, 43), as has been previously reported for other transposases (25). Additionally, the postintegration mechanism also requires the disassembly of the IN complex and its address to the proteasome in infected cells (30). Finally, recent data from our laboratory highly suggest that integration into chromatin could require dynamic nucleosomes at the integration locus (23). The chromatin remodeling property of hRAD51 previously reported (13) could, thus, also play a role during the interaction of the incoming integration complex with suitable chromosomal loci.

Such late action of hRAD51 at the postintegration step could

thus improve the establishment of a stable insertion of the viral genome into the host DNA. Under physiological conditions, i.e., without hRAD51 stimulation, the function of hRAD51 could result from this equilibrium between its pro- and anti-integration properties. All these hypotheses remain to be studied under physiological *in vivo* conditions or with *in vitro* models reproducing more accurately the integration process. More especially, nucleosomal templates and LEDGF/p75 that could participate in or modulate hRAD51 activity on retroviral integration should be used. Indeed LEDGF/p75 may stabilize the intasome, modulating its dissociation by hRAD51 during native replication conditions.

Independently of the possible function of hRAD51 during HIV-1 replication, the promotion of its integration-inhibitory property reported and elucidated here could serve as a basis for a new antiviral therapy. The feasibility of this concept is strongly supported by our results obtained with the hRAD51-stimulatory agent RS-1 especially in PBMC including the physiological target of the HIV-1 infection. The mechanism of inhibition of HIV-1 replication illustrated in this work and the assay of new hRAD51 stimulation agents are under active study, which should lead to the improvement and optimization of such a therapeutic strategy in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

We are deeply grateful to R. Cooke (University Bordeaux 2) for proof-reading the manuscript.

No conflict of interest is declared.

This work was supported by the French Agence Nationale de Recherche contre le SIDA, the Centre National de la Recherche Scientifique, SIDACTION, and the University Bordeaux Segalen (to V.P. and M.A.). A. De Cian is a recipient of a grant from the Association pour la Recherche contre le Cancer. P. Sung's grant number is RO1ES015252. P. P. Connell's NIH grant number is CA142642-02.

V. Parissi designed and performed the experiments, analyzed the results, and wrote the manuscript. O. Cosnefroy, A. Tocco, P. Lesbats, S. Thierry, O. Delelis, C. Calmels, S. Reigadas, A. De Cian, S. Desfarges, T. Wiktorowicz, and P. Bonot performed the experiments. Y. Kwon, J. San Filippo, A. Rethwilm, P. P. Connell, and P. Sung provided the reagents and analyzed the results. M. L. Andréola, E. Le Cam, H. Fleury, and S. Litvak analyzed the results.

REFERENCES

- Andreola ML, et al. 2001. DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display *in vitro* antiviral activity. *Biochemistry* 40:10087–10094.
- Beloin C, et al. 2003. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J. Biol. Chem.* 278:5333–5342.
- Brin E, Yi J, Skalka AM, Leis J. 2000. Modeling the late steps in HIV-1 retroviral integrase-catalyzed DNA integration. *J. Biol. Chem.* 275:39287–39295.
- Brussel A, et al. 2003. Longitudinal monitoring of 2-long terminal repeat circles in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic HIV-1 infection. *AIDS* 17:645–652.
- Brussel A, Sonigo P. 2003. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J. Virol.* 77:10119–10124.
- Chi P, Van Komen S, Sehorn MG, Sigurdsson S, Sung P. 2006. Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst)* 5:381–391.
- Chipitsyna G, Sawaya BE, Khalili K, Amini S. 2006. Cooperativity between Rad51 and C/EBP family transcription factors modulates basal and Tat-induced activation of the HIV-1 LTR in astrocytes. *J. Cell. Physiol.* 207:605–613.
- Clavel F, Charneau P. 1994. Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles. *J. Virol.* 68:1179–1185.
- Daniel R, et al. 2001. Wortmannin potentiates integrase-mediated killing of lymphocytes and reduces the efficiency of stable transduction by retroviruses. *Mol. Cell. Biol.* 21:1164–1172.
- Daniel R, Katz RA, Skalka AM. 1999. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* 284:644–647.
- Daniel R, et al. 2004. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J. Biol. Chem.* 279:45810–45814.
- Desfarges S, et al. 2006. Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51. *Nucleic Acids Res.* 34:6215–6224.
- Dupaigne P, et al. 2008. Rad51 polymerization reveals a new chromatin remodeling mechanism. *PLoS One* 3:e3643.
- Espeseth AS, et al. 2011. siRNA screening of a targeted library of DNA repair factors in HIV infection reveals a role for base excision repair in HIV integration. *PLoS One* 6:e17612.
- Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P. 2010. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464:232–236.
- Heinkelein M, et al. 2002. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* 76:3774–3783.
- Hine CM, Seluanov A, Gorbunova V. 2008. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:20810–20815.
- Jayathilaka K, et al. 2008. A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:15848–15853.
- Kilzer JM, et al. 2003. Roles of host cell factors in circularization of retroviral DNA. *Virology* 314:460–467.
- Klein HL. 2008. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst)* 7:686–693.
- Krishnan L, et al. 2010. Structure-based modeling of the functional HIV-1 intasome and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:15910–15915.
- Lau A, Kanaar R, Jackson SP, O'Connor MJ. 2004. Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein. *EMBO J.* 23:3421–3429.
- Lesbats P, et al. 2011. Functional coupling between HIV-1 integrase and the SWI/SNF chromatin remodeling complex for efficient *in vitro* integration into stable nucleosomes. *PLoS Pathog.* 7:e1001280.
- Lesbats P, et al. 2008. *In vitro* initial attachment of HIV-1 integrase to viral ends: control of the DNA specific interaction by the oligomerization state. *Nucleic Acids Res.* 36:7043–7058.
- Levchenko I, Luo L, Baker TA. 1995. Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.* 9:2399–2408.
- Li L, et al. 2001. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J.* 20:3272–3281.
- Lloyd AG, et al. 2006. Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection. *PLoS Pathog.* 2:e40.
- Maertens GN, Hare S, Cherepanov P. 2010. The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature* 468:326–329.
- Metifiot M, et al. 2007. Cellular uptake of ODNs in HIV-1 human-infected cells: a role for viral particles in DNA delivery? *Oligonucleotides* 17:151–165.
- Mousnier A, et al. 2007. von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:13615–13620.
- Mulder LC, Chakrabarti LA, Muesing MA. 2002. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *J. Biol. Chem.* 277:27489–27493.
- Mullers E, Stirnagel K, Kaulfuss S, Lindemann D. 2011. Prototype foamy virus Gag nuclear localization: a novel pathway among retroviruses. *J. Virol.* 85:9276–9285.
- Parissi V, et al. 2003. The lethal phenotype observed after HIV-1 integrase expression in yeast cells is related to DNA repair and recombination events. *Gene* 322:157–168.
- Pauwels B, et al. 2003. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for *in vitro* chemoradiation studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51:221–226.
- Rom I, et al. 2010. Activation of HIV-1 LTR by Rad51 in microglial cells. *Cell Cycle* 9:3715–3722.
- Sallafranque-Andreola ML, et al. 1989. Human immunodeficiency virus

- reverse transcriptase expressed in transformed yeast cells. Biochemical properties and interactions with bovine tRNALys. *Eur. J. Biochem.* **184**: 367–374.
37. San Filippo J, Sung P, Klein H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**:229–257.
 38. Stirrnagel K, et al. 2010. Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology* **7**:45.
 39. Sung P, Klein H. 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:739–750.
 40. Takizawa Y, et al. 2004. Mutational analyses of the human Rad51-Tyr315 residue, a site for phosphorylation in leukaemia cells. *Genes Cells* **9**:781–790.
 41. Valkov E, et al. 2009. Functional and structural characterization of the integrase from the prototype foamy virus. *Nucleic Acids Res.* **37**:243–255.
 42. Yang W, Steitz TA. 1995. Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure* **3**:131–134.
 43. Yoder KE, Bushman FD. 2000. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J. Virol.* **74**:11191–11200.
 44. Yoder KE, et al. 2011. The base excision repair pathway is required for efficient lentivirus integration. *PLoS One* **6**:e17862.

