

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
AMÉLIE BOUCHARD**

**ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE *IN VITRO* DU FACTEUR DE RESTRICTION
TRIM5 α**

OCTOBRE 2009

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie mon directeur de laboratoire, le Dr. Lionel Berthoux, de m'avoir permis de travailler sur ce projet de recherche très intéressant.

Je remercie également tous les gens avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler dans le laboratoire du Dr. Berthoux : Julie Bérubé, Marie-Édith Nepveu-Traversy, Mélodie B. Plourde, Quang Toan Pham, Marine Malbec, Aïda Morchid, Yixin Yang, Nadia Chandonnet, Lolita Iranezereza, Maxime Agbeci, Josée Pellerin, Vincent Guen, Delphine Guyot et Alexandre Deshières.

Je remercie aussi l'équipe des laboratoires suivants pour leur prêt d'équipement et pour leur expertise : le laboratoire du Dr. Éric Asselin, le laboratoire du Dr. Carlos Reyes-Moreno, le laboratoire du Dr. Hélène-Marie Thérien, le laboratoire du Dr. Michel Cyr, le laboratoire du Dr. Hélène Glemet, le laboratoire du Dr. Guy Massicotte et le laboratoire du Dr. Marc Sirois.

Merci beaucoup à vous tous !

RÉSUMÉ

La protéine TRIM5alpha est un facteur de restriction présent dans le cytoplasme des cellules hôtes. Elle inhibe les rétrovirus après leur entrée dans la cellule lors d'une interaction physique avec la capsid rétrovirale. La restriction par TRIM5 α est saturable et dépend de l'allèle exprimé ainsi que de la souche rétrovirale. Plusieurs orthologues simiens de *TRIM5 α* inhibent le VIH-1 à différents degrés, ce qui semble en faire un bon gène candidat pour des applications de thérapie génique. Cependant, lorsque *TRIM5 α* simien est exprimé dans des macrophages humains, l'infection par le VIH-1 n'est pas empêchée mais retardée. Pour sa part, *TRIM5 α* humain (*TRIM5 α_{hu}*) ne possède pas d'activité de restriction contre le VIH-1. Les applications de thérapie génique sont alors limitées. Une publication a démontré qu'une seule mutation était suffisante pour conférer à *TRIM5 α_{hu}* une activité de restriction dix fois supérieure contre le VIH-1. Aucune évidence ne démontre qu'une version de TRIM5 α possédant une activité de restriction plus forte ne pourrait être générée. Par conséquent, l'hypothèse de ce projet était que *TRIM5 α_{hu}* pourrait être modifiée génétiquement afin de générer une protéine ayant des effets antiviraux contre le VIH-1. Les objectifs à court terme étaient les suivants : (a) générer des mutations aléatoires par mutagenèse dirigée dans la protéine *TRIM5 α_{hu}* et (b) isoler par un criblage fonctionnel les différents mutants présentant une activité de restriction accrue contre le VIH-1. À long terme, ce projet pourrait permettre : (a) d'identifier de nouveaux déterminants sensibles à la restriction par *TRIM5 α_{hu}* et (b) d'exprimer un gène *TRIM5 α_{hu}* muté le plus similaire possible au type sauvage pour des applications de thérapie génique. Afin de réaliser le projet, la méthodologie suivante a été utilisée : (a) construire une banque de gènes *TRIM5 α_{hu}* mutés, (b) introduire la banque construite dans des cellules, (c) infecter les cellules exprimant les différents *TRIM5 α_{hu}* mutés par du virus VIH-1, (d) isoler les cellules résistantes au VIH-1 et (e) vérifier si la résistance accrue au VIH-1 des clones isolés était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté. Une banque de 24 600 clones contenant en moyenne une à

TRIM5 α_{hu} muté. Une banque de 24 600 clones contenant en moyenne une à deux mutations dans *TRIM5 α_{hu}* a été générée et un nouveau mutant de *TRIM5 α* ayant une résistance six fois plus élevée que celle du type sauvage a été isolé.

Mots clés : VIH, mutagenèse, interactions hôte/virus, inhibition, réPLICATION virale.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine.....	1
1.1.1 La structure du VIH	3
1.1.2 Le cycle d'infection virale	6
1.1.2.1 La phase précoce de l'infection virale.....	7
1.1.2.2 La phase tardive de l'infection	9
1.2 Les mécanismes de défense contre le VIH-1	13
1.2.1 Le facteur de restriction Fv1	13
1.2.1.1 Les différents allèles de Fv1	13
1.2.1.2 Le mécanisme d'action de Fv1	14
1.2.2 La protéine APOBEC3G	14
1.2.2.1 La structure des protéines APOBEC	15
1.2.2.2 Le mécanisme d'action d'APOBEC3G	15
1.2.3 La protéine tetherin	17
1.2.3.1 La structure de la tetherin.....	17
1.2.3.2 Le mécanisme d'action de la tetherin	18
1.2.4 La famille des protéines « TRImpartite Motif » (TRIM)	20
1.2.4.1 La structure des protéines TRIM	20
1.2.4.2 Le rôle des protéines TRIM	21
1.2.4.3 La protéine TRIM5α.....	22
1.2.4.3.1 Les caractéristiques de TRIM5α	22
1.2.4.3.1.1 Les différents isoformes de TRIM5.....	23

1.2.4.3.1.2 Le rôle des différents domaines de TRIM5α	24
1.2.4.3.1.3 Le polymorphisme de longueur entre les orthologues de TRIM5α.....	25
1.2.4.3.1.4 Les rétrovirus inhibés par les différents orthologues de TRIM5α.....	27
1.2.4.3.2 La multimérisation de TRIM5α	29
1.2.4.3.3 La localisation de TRIM5α dans les corps cytoplasmiques	29
1.2.4.3.4 Le mécanisme d'action de TRIM5α.....	30
1.2.4.3.4.1 Les interactions TRIM5α-capside rétrovirale	30
1.2.4.3.4.2 L'ubiquitination et la dégradation de TRIM5α par le protéasome	31
1.2.4.3.5 L'évolution de TRIM5	33
1.2.4.3.6 L'effet dominant négatif de mutants de TRIM5α	36
1.2.4.3.7 Les facteurs agissant sur la régulation par TRIM5α.....	37
1.2.4.3.7.1 La régulation de TRIM5α par l'interféron	37
1.2.4.3.7.2 L'effet du choc toxique sur TRIM5α	38
1.2.4.3.7.3 L'effet de la cyclophiline A sur TRIM5α	39
1.2.4.3.8 Les mutations dans le domaine B30.2	40
1.2.4.4 La protéine TRIMCyp	41
1.2.4.4.1 La structure de la protéine TRIMCyp	41
1.2.4.4.2 Le mécanisme d'action de TRIMCyp	42
1.2.4.4.3 Les nouveaux isoformes de TRIMCyp	43
1.3 La problématique, l'hypothèse et les objectifs du projet	44
 CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
2.1 Le matériel utilisé	46
2.1.1 La culture cellulaire.....	46
2.1.2 La culture bactérienne	46
2.1.3 La transformation bactérienne	47
2.1.4 Les extractions et les purifications d'ADN.....	47

2.1.5	Les enzymes de restriction	48
2.1.6	Les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) à fidélité élevée et les ligations.....	48
2.1.7	Les migrations sur gel d'agarose	49
2.1.8	Les plasmides utilisés	49
2.1.8.1	Le plasmide pMIP-TRIM5 α_{hu}	49
2.1.8.2	Le plasmide pBluescript II KS+.....	51
2.2	Description générale de la méthode.....	52
2.2.1	Construire la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	52
2.2.1.1	La technique de mutagenèse utilisée	52
2.2.1.2	La mutagenèse du domaine B30.2 de <i>TRIM5α_{hu}</i>	53
2.2.1.3	La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i>	54
2.2.1.4	La deuxième technique utilisée pour amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i>	57
2.2.2	Introduire la banque construite dans des cellules	61
2.2.2.1	Production des vecteurs rétroviraux	61
2.2.2.2	Transduction des cellules	62
2.2.3	Infecter les différentes cellules exprimant la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté par du virus VIH-1	63
2.2.3.1	L'infection avec le virus VIH-TK.....	63
2.2.3.2	L'infection avec le virus VIH-GFP	63
2.2.4	Isoler les cellules résistantes à l'infection par le VIH-1	64
2.2.4.1	Méthode utilisée suite à l'infection par le virus VIH-TK des cellules exprimant la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté.....	64
2.2.4.2	Méthode utilisée suite à l'infection par le virus VIH-GFP des cellules exprimant la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté.....	65
2.2.4.2.1	Analyse des cellules triées de façon individuelle	66
2.2.4.2.1.1	Analyse du tri des cellules MDTF	66
2.2.4.2.1.2	Analyse du tri des cellules HeLa.....	67
2.2.4.2.1.3	Analyse du tri des cellules TE671.....	71

2.2.4.2.2 Analyse des cellules triées de façon collective	71
CHAPITRE 3 LA CONSTRUCTION DE LA BANQUE DE <i>TRIM5α_{hu}</i> MUTÉ.....	73
3.1 Les contrôles positifs effectués afin de s'assurer du fonctionnement adéquat de la mutagenèse aléatoire par PCR	73
3.2 La mutagenèse du domaine B30.2 de <i>TRIM5α_{hu}</i>	76
3.2.1 La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i>	77
3.2.2 La deuxième technique utilisée pour amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i>	81
CHAPITRE 4 LA RECHERCHE DE MUTATIONS PROVOQUANT UNE RESTRICTION ACCRUE DU VIH-1 CHEZ <i>TRIM5α_{hu}</i>	86
4.1 Introduire la banque construite dans des cellules.....	86
4.2 Infecter les différentes cellules exprimant la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté par du virus VIH-1	86
4.3 Isoler les cellules résistantes au VIH-1.....	86
4.3.1 Isoler les cellules résistantes au VIH-1 suite à l'infection avec le VIH-TK	86
4.3.2 Isoler les cellules résistantes au VIH-1 suite à l'infection avec le VIH-GFP	89
4.3.2.1 L'analyse des cellules MDTF triées de façon individuelle.....	89
4.3.2.2 L'analyse des cellules HeLa triées de façon individuelle	89
4.3.2.3 L'analyse des cellules HeLa triées de façon collective	94
4.3.2.4 L'analyse des cellules TE671 triées de façon individuelle	99
CHAPITRE 5 DISCUSSION DES RÉSULTATS	106
5.1 La mutagenèse du domaine B30.2 de <i>TRIM5α_{hu}</i>	106
5.2 La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i>	109

5.3	La production de la banque initiale de mutants	111
5.4	Le tri cellulaire effectué avec les cellules MDTF.....	112
5.5	Le tri cellulaire individuel effectué avec les cellules HeLa	112
5.6	Le tri cellulaire collectif effectué avec les cellules HeLa	113
5.7	La première sélection des cellules résistantes au VIH-1 effectuée avec les cellules TE671	113
5.8	La deuxième sélection des cellules résistantes au VIH-1 effectuée avec les cellules TE671	114
CHAPITRE 6 CONCLUSION		115
6.1	Conclusion du projet.....	115
6.2	Directions futures du projet	115
BIBLIOGRAPHIE		119

LISTE DES TABLEAUX

1.1 : Données actuelles faisant le point sur l'épidémie mondiale du SIDA en 2007	1
1.2 : La répartition des différents groupes et sous-groupes du VIH-1 à travers le monde	3
1.3 : Les différentes fonctions des protéines du VIH-1	6
1.4 : Les différents rétrovirus inhibés par les différents orthologues de TRIM5 α	28
2.1 : La composition des différents tampons et le taux de mutations attendu par 1 000 paires de bases	53
2.2 : Les conditions de la PCR réalisée afin de muter le domaine B30.2	54
2.3 : Les conditions de la PCR réalisée afin d'amplifier le reste du gène <i>TRIM5α_{hu}</i> avec le domaine B30.2 comme méga-amorce	56
2.4 : Les conditions de PCR utilisées afin d'amplifier le reste de <i>TRIM5α_{hu}</i>	59
2.5 : La PCR réalisée afin d'amplifier le gène complet de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	60
2.6 : Les différentes quantités de plasmides utilisées pour produire les vecteurs rétroviraux MIP-TRIM5 α_{hu} , VIH-TK et VIH-GFP	61
2.7 : Les conditions de la PCR réalisée afin d'amplifier <i>TRIM5α_{hu}</i> muté de l'ADN extrait des cellules triées	66
4.1 : Les valeurs brutes de la densité optique obtenue pour les cellules MDTF non infectées et pour les cellules MDTF infectées avec du VIH-TK suite au test XTT	87
5.1 : Les limites de la technique de mutagenèse aléatoire par PCR.....	107
5.2 : Analyse de la nature des mutations retrouvées chez les différents clones séquencés	108

LISTE DES FIGURES

1.1 : La carte génomique du VIH-1 et du VIH-2	4
1.2 : La structure du virus VIH-1	5
1.3 : Schéma illustrant l'entrée du virus dans la cellule	8
1.4 : Les ARNm du VIH-1	10
1.5 : Cycle viral de l'infection par le VIH-1	12
1.6 : Le mécanisme d'action d'APOBEC3G.....	16
1.7 : Le mécanisme d'action de la tetherin	19
1.8 : La structure de la protéine TRIM5 α	23
1.9 : La position des gènes <i>TRIM</i> sur le chromosome 11.....	34
1.10 : La sélection positive de la région variable v ₁ de <i>TRIM5α</i>	36
1.11 : La structure de TRIMCyp.....	42
2.1 : La carte de pMIP-TRIM5 α_{hu}	50
2.2 : La carte de pBluescript II KS+	51
2.3 : Schéma illustrant la première stratégie utilisée pour produire la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	55
2.4 : Schéma illustrant la deuxième stratégie utilisée pour produire la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	58
2.5 : Schéma illustrant la méthode employée afin d'analyser le tri cellulaire des cellules HeLa	68
2.6 : Schéma illustrant la méthode utilisée pour confirmer que la résistance accrue au VIH-1 était bien due à la présence de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	70
3.1 : Migration des contrôles positifs de la PCR	73
3.2 : Migration des contrôles positifs digérés par Taq I.....	75
3.3 : Migration de l'amplification du domaine B30.2 muté.....	76

3.4 : Migration de la construction de pBluescript-TRIM5 α_{hu} digérée par Xhol et EcoRI.....	78
3.5 : Migration de la midiprep de pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol.....	79
3.6 : Migration de la midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol.....	80
3.7 : Migration des produits de la PCR réalisée pour amplifier le reste de <i>TRIM5α_{hu}</i>	82
3.8 : Migration des produits de la PCR réalisée pour amplifier le gène complet de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	83
3.9 : Graphique du nombre de mutations obtenues par clone pour la banque initiale de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	84
3.10 : Migration de la midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol.....	85
4.1 : Graphique des résultats du test XTT suite au traitement à la TFT.....	88
4.2 : Les résultats de la cytométrie de flux suite au tri cellulaire des cellules HeLa	91
4.3 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de vérifier la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules HeLa.....	92
4.4 : Les résultats de la cytométrie de flux réalisée afin de confirmer que la résistance accrue des clones est due à la présence de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté	94
4.5 : Graphique du nombre de mutations obtenues par clones pour la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté après le premier cycle d'infection	95
4.6 : Graphique du nornbre de mutations obtenues par clones pour la banque de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté après le deuxième cycle d'infection	96
4.7 : Répartitions des différentes mutations des clones séquencés lors des cycles d'infection.....	97
4.8 : Graphique du test effectué afin de vérifier si la résistance accrue au VIH-1 des mutants possédant une mutation similaire était due à la présence de <i>TRIM5α_{hu}</i> muté.....	98

4.9 : Les résultats de la cytométrie de flux suite au tri cellulaire des cellules TE671	100
4.10 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de confirmer la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules TE671	101
4.11 : Les résultats de la cytométrie de flux obtenus suite au tri cellulaire des cellules TE671 pour certains clones dont la résistance au VIH-1 était presque nulle	103
4.12 : Les résultats de la cytométrie de flux obtenus suite au tri cellulaire des cellules TE671 pour certains clones dont la résistance au VIH-1 était élevée	104
4.13 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de confirmer la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules TE671	105
5.1 : Migration des produits de PCR et de pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt	110

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
MLV	Virus de la leucémie murine
MLV-N	Virus de la leucémie murine de tropisme N
MLV-B	Virus de la leucémie murine de tropisme B
MoMLV	Virus de la leucémie murine de souche Moloney
EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine
MMTV	Virus murin de tumeur mammaire
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
SIV _{mac}	Virus de l'immunodéficience simienne de macaque
SIV _{mac239}	Virus de l'immunodéficience simienne de macaque 239
SIV _{agm}	Virus de l'immunodéficience simienne du singe vert africain
SIV _{cpz}	Virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé
FIV	Virus de l'immunodéficience féline
APOBEC	« apolipoprotein BmRNA-editing catalytic polypeptide »
agm _{pyg}	singe vert africain à queue de cochon
agm _{tan}	singe vert africain tantalus
TRIM	« TRIpartite Motif »
TRIM5a _{agm}	TRIM5alpha de singe vert africain
TRIM5a _{rh}	TRIM5alpha de singe rhésus ou TRIM5alpha de macaque
TRIM5a _{hu}	TRIM5alpha humain
TRIMCyp _{pgt}	TRIMCyp de macaque à queue de cochon
TRIMCyp _{lgt}	TRIMCyp de macaque à longue queue
IFN	Interféron
CypA	Cyclophiline A

CsA	Cyclosporine A
MDTF	« <i>Mus Dunnii</i> Tail Fibroblasts »
PEI	Polyéthylenimine
LB	Luria Bertoni
TK	Thymidine kinase
TFT	Trifluorothymidine
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), est un virus qui infecte chaque année des millions de personnes (tableau 1.1) en provoquant une destruction lente et progressive de leur système immunitaire.

**TABLEAU 1.1
Données actuelles faisant le point sur l'épidémie mondiale du SIDA en 2007 (UNAIDS 2008)**

	Nombre de personnes vivant avec le VIH en 2007	Nouvelles infections par le VIH en 2007	Décès dus au SIDA en 2007
Enfants de moins de 15 ans	2,5 millions [2,2 - 2,6 millions]	420 000 [350 000 - 540 000]	330 000 [310 000 - 380 000]
Adultes	30,8 millions [28,2 - 33,6 millions]	2,1 millions [1,4 - 3,6 millions]	1,7 million [1,6 - 2,1 millions]
Total	33,2 millions [30,6 - 36,1 millions]	2,5 millions [1,8 - 4,1 millions]	2,1 millions [1,9 - 2,4 millions]

Il existe deux souches de virus VIH, soit : (a) le VIH-1 et (b) le VIH-2. Le VIH-1 est la souche la plus virulente et cause la plupart des infections à travers le monde alors que, pour sa part, le VIH-2 est largement confiné à l'Afrique de l'Ouest, puisqu'il est moins infectieux que le VIH-1 (Levy 2007). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ceci : comparé au VIH-1, a) la charge virale du VIH-2 est plus faible dans le sang et les fluides génitaux, b) le VIH-2 se réplique à des titres plus faibles dans les cellules infectées, c) l'activation immunitaire est

réduite chez les individus atteints du VIH-2 et d) le taux d'apoptose est réduit chez les gens atteints du VIH-2. Ce ne sont que quelques-uns des facteurs pouvant expliquer pourquoi le VIH-2 est moins pathogène que le VIH-1. Le phénomène n'est pas encore totalement élucidé (Levy 2007). Le VIH est apparu chez l'Homme suite à une transmission inter-espèce, zoonose, du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) à l'humain. Les deux souches proviennent de deux origines différentes : le VIH-1 est dérivé d'un SIV de chimpanzé *Pan troglodyte troglodyte* (Gao et al. 1999) alors que le VIH-2 est dérivé d'un SIV de singe sooty mangabey (Reeves et Doms 2002).

Le VIH-1 comprend trois groupes répartis à travers le monde appelés : (a) groupe M (« main »), (b) groupe O (« outlier ») et (c) groupe N (non M et non O). Le groupe O et le groupe M diffèrent au niveau de leur séquence génétique et le groupe N possède une plus grande similarité de séquence avec les virus de type SIV qu'avec le groupe M ou le groupe O. Le groupe M comprend neuf sous-groupes ayant une séquence en acides aminés différent d'au moins 20% au niveau de la région de l'enveloppe virale et différant d'au moins 15% au niveau de la région du gène viral *gag* (tableau 1.2) (Levy 2007).

TABLEAU 1.2
La répartition des différents groupes et sous-groupes
du VIH-1 à travers le monde (Levy 2007)

Groupe du VIH-1	Sous-groupe du VIH-1	Pays où est retrouvé le sous-groupe du VIH-1
Groupe M	A	Afrique centrale
	B	Amérique du Nord, Europe
	C	Afrique du Sud, Inde
	D	Afrique centrale
	F	Brésil, Roumanie, Finlande, Cameroun, République démocratique du Congo
	G	Russie
	H	Afrique, Taïwan
	J	Zaïre
	K	Cameroun
	O	Cameroun et autres pays d'Afrique
Groupe N	-	Cameroun

1.1.1 La structure du VIH

Le VIH est un virus faisant partie de la famille des *Retroviridae* et du genre des lentivirus (figure 1.1). Il infecte principalement les lymphocytes T de type CD4⁺ et les monocytes/macrophages. Il possède un diamètre de 100 nm à 120 nm et un génome diploïde à polarité positive d'une taille de 9,8 kb (Levy 2007).

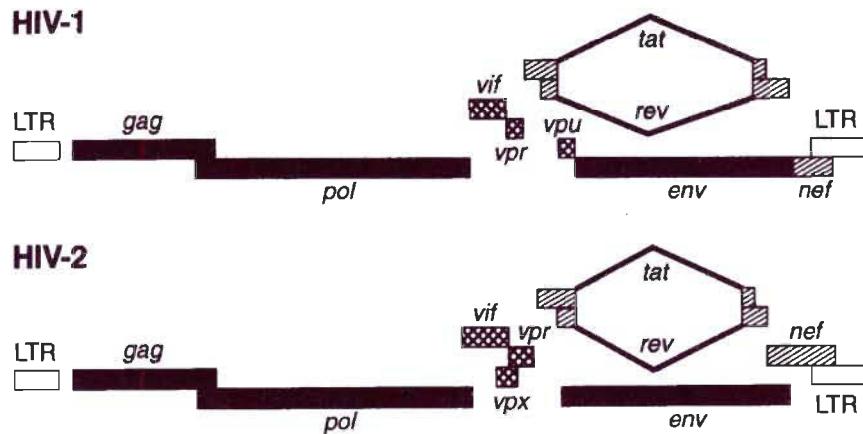


FIGURE 1.1 : La carte génomique du VIH-1 et du VIH-2 (Levy 2007)

Le génome du VIH-1 est très similaire au génome du VIH-2 sauf pour la présence de vpu et l'absence de vpx.

Le virus VIH est constitué d'une capsid enveloppée dans laquelle se retrouvent les deux brins d'ARN viraux, les nucléoprotéines associées à l'ARN, les enzymes virales et des protéines régulatrices et accessoires telles que Vpr et Vpx (figure 1.2) (Levy 2007).

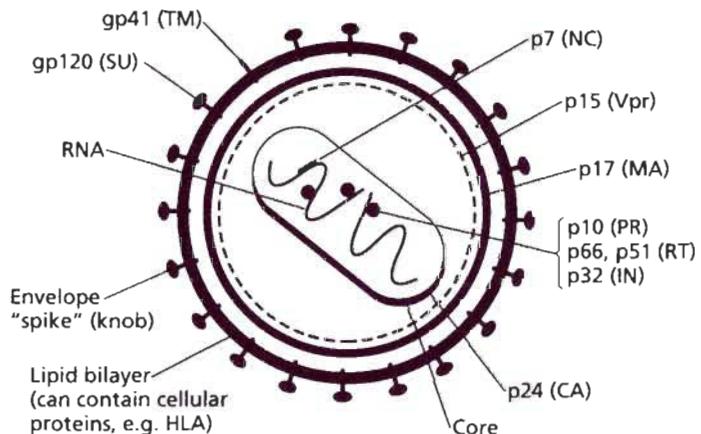


FIGURE 1.2 : La structure du virus VIH-1 (Levy 2007)

Le virus possède une enveloppe composée de la bicouche lipidique de la cellule infectée. Elle est recouverte de deux types de protéines : la gp41 et la gp120. À l'intérieur de l'enveloppe se retrouvent les protéines de matrice p17 et la capsid composée des protéines p24. À l'intérieur de la capsid, on retrouve les deux brins d'ARN viraux, les nucléoprotéines associées à l'ARN, les enzymes virales ainsi que les protéines régulatrices et accessoires.

Les trois principaux gènes faisant partie du génome du VIH sont (a) les polyprotéines *gag* (codant pour les protéines de structure), (b) *pol* (codant pour les enzymes virales) et (c) *env* (codant pour les protéines de l'enveloppe virale). Les autres gènes codent pour les protéines régulatrices et accessoires (tableau 1.3) (Levy 2007).

TABLEAU 1.3
Les différentes fonctions des protéines du VIH (Levy 2007)

Nom de la protéine	Appellation et taille (kDa) ^a	Fonction
Gag	p24	Capside (CA), protéine de structure
	p17	Protéine de matrice (MA), myristoylée
	p7	Protéine de nucléocapside (NC), aide à la transcription inverse
Polymérase (Pol)	p6	Rôle dans le bourgeonnement (domaine L)
	p66, p51	Transcriptase inverse (RT) : Rnase H- intérieur du noyau viral
Protéase (PR)	p10	Clivage post-transcriptionnel des protéines virales
Intégrase (IN)	p32	Intégration virale de l'ADNc
Enveloppe (Env)	gp120	Protéine de surface de l'enveloppe (SU)
	gp41	Protéine d'enveloppe transmembranaire (TM) ^d
Tat ^b	p14	Transactivation
Rev ^b	p19	Régulation de l'expression de l'ARNm viral
Nef	p27	Pléiotropique, peut augmenter ou diminuer la réPLICATION virale
Vif	p23	Augmente l'infectivité du virus et la transmission cellule-cellule; aide la synthèse de l'ADN proviral et/ou aide dans le processus d'assemblée des virions; inhibe l'activité antivirale d'APOBEC3G
Vpr Vpu ^{b,c}	p15	Aide à la réPLICATION virale; transactivation
	p16	Aide le relargage viral; interrompt les complexes gp160-CD4; inhibe l'activité antivirale de la tetherin
Vpx ^d	p15	Aide à l'entrée et à l'infectivité
Tev ^b	p26	Activités Tat/Rev

^a Les nombres dans l'appellation désignent la taille en kilodaltons.

^b N'est pas retrouvé dans la structure du virion.

^c Est seulement présent avec le VIH-1.

^d Est seulement présent avec le VIH-2. Peut être une duplication de Vpr.

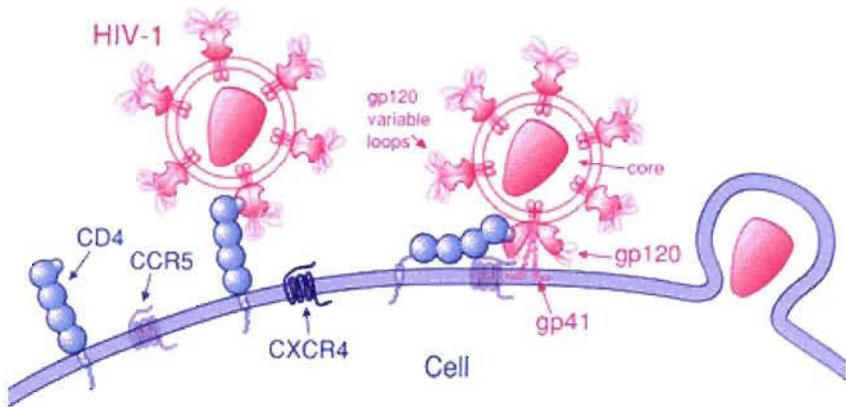
1.1.2 Le cycle d'infection virale

Le cycle de l'infection virale pour les cellules exprimant CD4+, soit les cellules T et les cellules dérivées des monocytes (macrophages et cellules dendritiques), est constitué de deux phases : (a) la phase précoce et (b) la phase tardive. La première comporte : (a) l'entrée du virus à l'intérieur de la

cellule, (b) la transcription virale et (c) l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique de la cellule cible. Pour sa part, la deuxième phase comporte : (a) l'expression des gènes viraux, (b) l'assemblage des virions et (c) le relargage des virions à l'extérieur de la cellule infectée (Levy 2007).

1.1.2.1 La phase précoce de l'infection virale

Afin d'entrer dans la cellule cible, les particules virales doivent s'attacher sur la membrane plasmique de la cellule cible. Cette adsorption se produit via la reconnaissance de récepteurs viraux par la protéine gp120. Le virus établit tout d'abord une interaction entre sa protéine gp120 et le récepteur CD4 se trouvant sur la cellule cible (Simon et al. 2006). Cette interaction provoque un changement de conformation au niveau du récepteur gp120 résultant en l'exposition d'une région en forme de boucle appelée boucle V₃. Dépendamment de la souche virale du VIH, cette boucle se lie ensuite au récepteur CCR5 ou CXCR4 situé sur la cellule cible. En plus de l'exposition de la boucle V₃, le changement conformationnel de la gp120 expose également une partie de la protéine gp41 contenant un peptide de fusion (Levy 2007). Ce dernier provoque la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique de la cellule cible entraînant l'introduction de la capsidie virale dans le cytoplasme de la cellule cible (Simon et al. 2006) (figure 1.3).



**FIGURE 1.3 : Schéma illustrant l'entrée du virus dans la cellule
(The Body 2009)**

Tout d'abord, le virus s'attache au récepteur CD4 de la cellule grâce à la protéine gp120. Ensuite, un changement conformationnel se produit au niveau de gp120 et la boucle variable V₃ de la gp120 s'attache au récepteur CXCR4 ou CCR5. Puis, la protéine gp41 s'attache à la membrane de la cellule et la capsid virale pénètre à l'intérieur de celle-ci.

Lorsque la capsid virale se retrouve à l'intérieur de la cellule cible, elle est déshabillée exposant ainsi l'ARN viral et les enzymes virales au cytoplasme de la cellule cible (Simon et al. 2006). La transcriptase inverse débute alors la synthèse de l'ADNc simple brin négatif à partir de l'ARN simple brin positif. Au cours de cette synthèse, l'ARN simple brin positif est dégradé par l'activité RNase H de l'enzyme et la transcriptase inverse synthétise le brin complémentaire d'ADN (Levy 2007). Lors de cette synthèse, des mutations sont généralement introduites dans le génome du VIH, car la transcriptase inverse n'est pas une enzyme qui possède une fidélité élevée de réPLICATION. Ce sont les mutations introduites à cette étape qui causent la plupart des résistances aux médicaments (Simon et al. 2006). Par la suite, l'ADN viral double brin est dirigé

vers le noyau où il est introduit dans l'ADN génomique de la cellule hôte à l'aide de la protéase virale. À ce moment, l'ADN est associé avec l'intégrase virale et avec d'autres complexes protéiques viraux ce qui constitue le complexe de pré-intégration. Celui-ci interagit avec des éléments de la membrane nucléaire afin de la traverser et d'accéder à la chromatine cellulaire. Ce processus n'est pas encore tout à fait élucidé, mais il semblerait que l'importine 7 et les composants du système Ran soient impliqués (Fassati et al. 2003). Lorsqu'il a atteint l'intérieur du noyau de la cellule infectée, l'ADN viral s'intègre ensuite de façon aléatoire dans l'ADN de la cellule cible. Puis, lorsque la cellule est activée, la synthèse des ARN viraux débute (Levy 2007).

1.1.2.2 La phase tardive de l'infection

La phase tardive de l'infection est tout d'abord amorcée par la synthèse de l'ARN viral. Certaines copies ne sont pas épissées et forment alors le génome viral et les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pro-Pol qui seront encapsidés dans les virions. D'autres copies subissent un épissage résultant en plusieurs protéines virales telles que : (a) Env, (b) Nef, (c) Vif, (d) Vpr (Vpx), (e) Vpu, (f) Tat, et (g) Rev (figure 1.4) (Levy 2007).

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

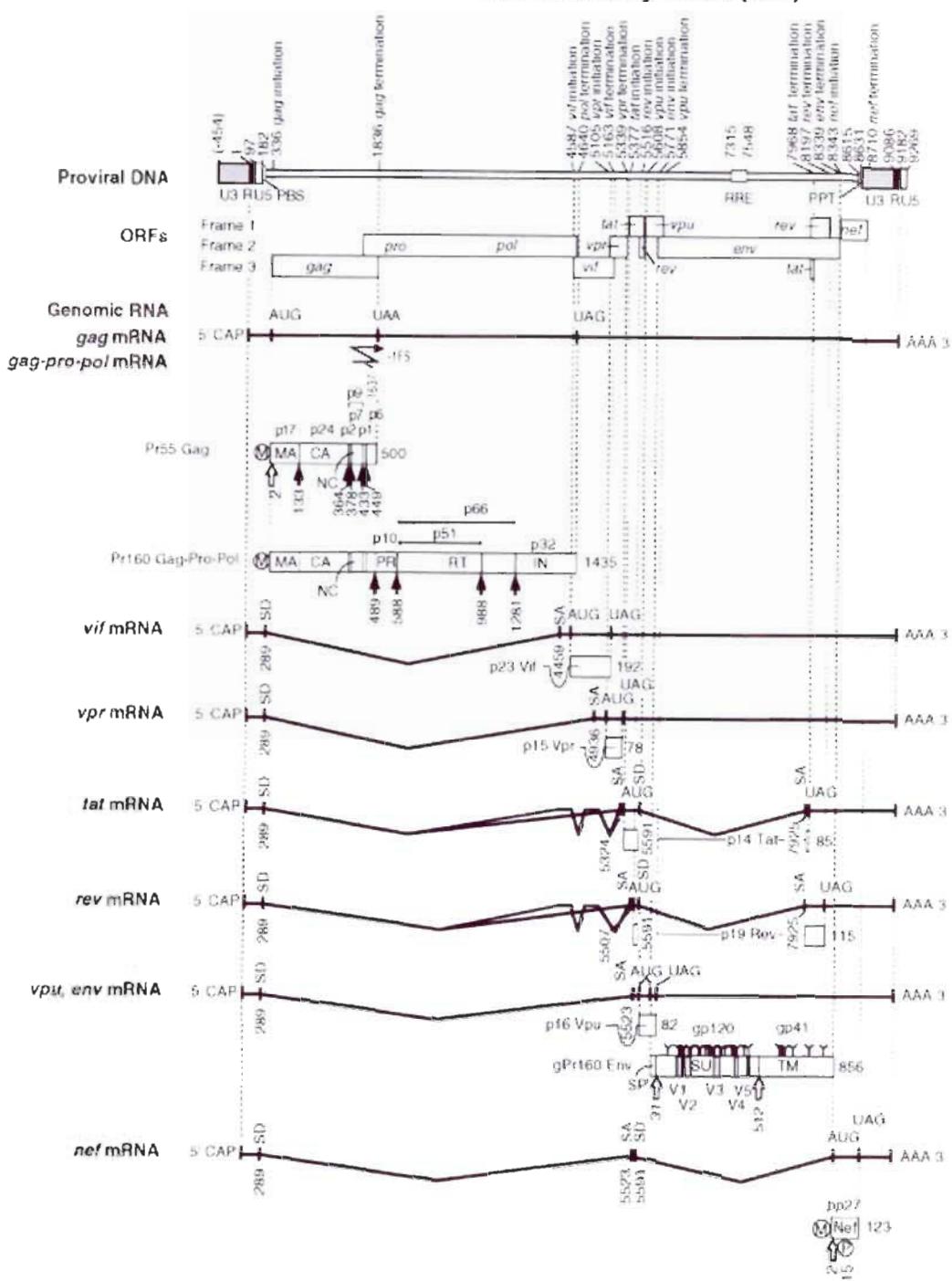


FIGURE 1.4 : Les ARNm du VIH-1 (Coffin et al. 1997)

Le génome viral possède trois cadres de lecture. Certains ARNm sont transcrits sous formes de polyprotéines qui sont ensuite épissées pour former les protéines virales.

Une fois les protéines virales et le génome viral produits, la polyprotéine Env (gp160) traverse le réticulum endoplasmique. Elle est ensuite dirigée vers l'appareil de Golgi où elle est clivée en gp120 et gp41 par la protéase virale. Ces deux glycoprotéines d'enveloppe sont alors dirigées vers la membrane plasmique de la cellule cible où la protéine transmembranaire gp41 ancre la gp120 à la membrane de la cellule infectée. Les polyprotéines Gag (p55) et Gag-Pol (p160) ainsi que l'ARN génomique s'associent à leur tour avec la surface interne de la membrane plasmique lorsque les virions commencent à bourgeonner. Au cours de cette étape de bourgeonnement, la maturation du virus a lieu. Les protéinases du VIH clivent les polyprotéines en protéines individuelles et fonctionnelles et les composants de la structure du VIH s'assemblent pour produire un virus mature (figure 1.5) (Levy 2007).

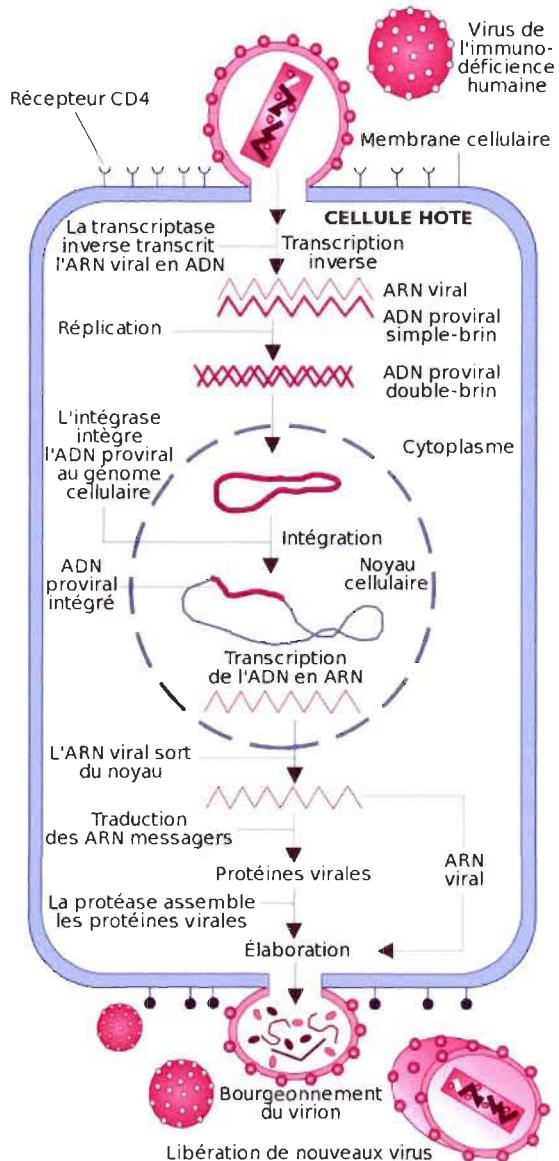


FIGURE 1.5 : Cycle viral de l'infection par le VIH-1 (adapté de Sano 2007)

Le virus s'attache à la cellule cible et la capsidé pénètre dans le cytoplasme. La capsidé est déshabillée et l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN viral. Ce dernier pénètre dans le noyau de la cellule où il est inséré dans l'ADN de la cellule. Lorsque la cellule est activée, la synthèse des ARNm viraux débute et est suivie par la traduction des ARNm viraux en protéines virales. Celles-ci s'assemblent pour former des virions qui bourgeonnent à la surface de la cellule. Une étape de maturation se produit au même moment de façon à former des virus infectieux.

1.2 Les mécanismes de défense contre le VIH-1

Afin de se défendre contre les différents pathogènes, les organismes ont développé une immunité dite innée et adaptative. L'immunité innée comprend : (a) les barrières naturelles telles la peau et les muqueuses, (b) les phagocytes, (c) les cellules présentatrices de l'antigène, (d) les cellules « natural killer » (NK), (e) les protéines de phase aigüe, (f) les lectines, (g) le système du complément et (h) les interférons. Pour sa part, l'immunité acquise est composée : (a) de lymphocytes T effecteurs ($CD4^+$ et $CD8^+$) et (b) d'anticorps (lymphocytes B) (Goldsby et al. 2003). En plus de ces différents types d'immunités, une immunité dite intrinsèque a été caractérisée comme faisant partie de l'immunité innée. Cette immunité comprend des gènes antiviraux exprimés chez la cellule hôte qui codent pour des protéines capables d'inhiber les rétrovirus. Ces protéines ont été appelées facteurs de restriction (Emerman 2006). Il existe quatre types de facteurs de restriction capables d'inhiber les différents rétrovirus. Il s'agit des protéines suivantes : (a) Fv1, (b) APOBEC3G, (c) tetherin et (d) TRIM (plus en particulier TRIM5α et TRIMCyp).

1.2.1 Le facteur de restriction Fv1

Fv1 est un facteur de restriction murin qui a été découvert dans les années 1970. Il inhibe l'infection par le virus de la leucémie murine (MLV).

1.2.1.1 Les différents allèles de Fv1

Il existe plusieurs allèles du gène *Fv1* : (a) l'allèle *Fv1ⁿ*, exprimé chez les souris suisses NIH, (b) l'allèle *Fv1^b*, exprimé chez les souris Balb/c, (c) l'allèle

Fv1^{nr}, un variant de *Fv1ⁿ* présent dans certaines souches, et (d) l'allèle nul *Fv1⁰*. Chaque allèle n'inhibe pas toutes les formes du virus MLV. En effet, il existe trois tropismes possibles du virus MLV : (a) tropisme N, (b) tropisme B, ou (c) tropisme NB. Le déterminant de ce tropisme se trouve au niveau du domaine CA de la protéine Gag; il est déterminé par la nature de l'acide aminé situé en position 110 qui contrôle la susceptibilité de la restriction. Le virus N-MLV possède une arginine à cette position alors que le virus B-MLV possède un acide glutamique. N-MLV est capable d'infecter les cellules qui expriment *Fv1^{n/n}* et certaines souches cellulaires exprimant *Fv1^{nr}*, B-MLV peut infecter les cellules exprimant *Fv1^{b/b}* et *Fv1^{nr}* et NB-MLV infecte les cellules exprimant n'importe quel génotype de *Fv1* (Bieniasz 2003).

1.2.1.2 Le mécanisme d'action de Fv1

Le mécanisme de la restriction par Fv1 n'est pas complètement élucidé. Il est connu que Fv1 bloque la réplication virale du virus dans la phase précoce du cycle de l'infection virale. Ce bloc se produit après la transcription inverse de l'ARN viral en ADN viral linéaire mais avant l'entrée de l'ADN viral dans le noyau et son intégration dans le génome de l'hôte. Fv1 possède une activité de restriction saturable par une grande quantité de virus et ce gène peut être transféré dans des lignées non murines afin de conférer aux cellules cibles une activité inhibitrice contre MLV (Passerini et al. 2006).

1.2.2 La protéine APOBEC3G

Les protéines humaines APOBEC (« apolipoprotein BmRNA-editing catalytic polypeptide ») forment un groupe de cytidines déaminases composé des protéines suivantes : (a) AID et APOBEC, dont les gènes respectifs sont

situées sur le chromosome 12, (b) APOBEC2, dont le gène est localisé sur le chromosome 6, (c) APOBEC4 dont le gène est trouvé sur le chromosome 1 et (d) sept protéines APOBEC3 dont les gènes sont organisés en tandem sur le chromosome 22. Cette série de protéines APOBEC3 contient : (a) APOBEC3A, (b) APOBEC3B, (c) APOBEC3C, (d) APOBEC3DE, (e) APOBEC3F, (f) APOBEC3G et (g) APOBEC3H. Il existe des orthologues d'APOBEC chez les mammifères, les poulets et les grenouilles (Goila-Gaur et Strebel 2008).

1.2.2.1 La structure des protéines APOBEC

Toutes les protéines APOBEC possèdent la même structure, c'est-à-dire : (a) un court domaine en structure d'hélice alpha, (b) un domaine catalytique (CD), (c) un petit peptide de liaison (« linker ») et (d) un domaine pseudo-catalytique (PCD). Les protéines APOBEC3B, APOBEC3F et APOBEC3G possèdent une duplication de cette structure, c'est-à-dire : hélice1- CD1- « linker1 »- PCD1- hélice 2- CD2- « linker 2 »- PCD2. Chez les protéines APOBEC possédant plus d'un domaine catalytique, le premier est actif de façon catalytique alors que le second est plutôt impliqué dans l'encapsidation virale et dans la liaison aux acides nucléiques (Goila-Gaur et Strebel 2008).

1.2.2.2 Le mécanisme d'action d'APOBEC3G

La protéine APOBEC3G est la protéine APOBEC qui possède l'activité de restriction la plus élevée. Elle inhibe le VIH-1, le virus MLV, le virus SIV, le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) et le virus murin de tumeur mammaire (MMTV). Son mécanisme d'action n'est pas encore complètement compris. Cependant, il est connu qu'APOBEC3G est encapsidée dans les virions du VIH-1. Elle n'agit que sur l'ADN viral simple brin négatif (Goila-Gaur et Strebel

2008). Pendant l'infection des cellules naïves, elle provoque la déamination des désoxycytidines en désoxyuridines. Il est estimé qu'environ 2% des désoxycytidines sont converties en désoxyuridines. Les produits de cette déamination suivent alors deux voies : (a) ils sont dégradés par les endonucléases ou (b) l'hypermutation de C en U sur le brin négatif provoque une hypermutation de G en A sur le brin positif de l'ADN viral et le double brin d'ADN viral hypermuté est inséré dans le génome viral de l'hôte menant à une production de protéines virales non fonctionnelles (figure 1.6) (Goff 2004).

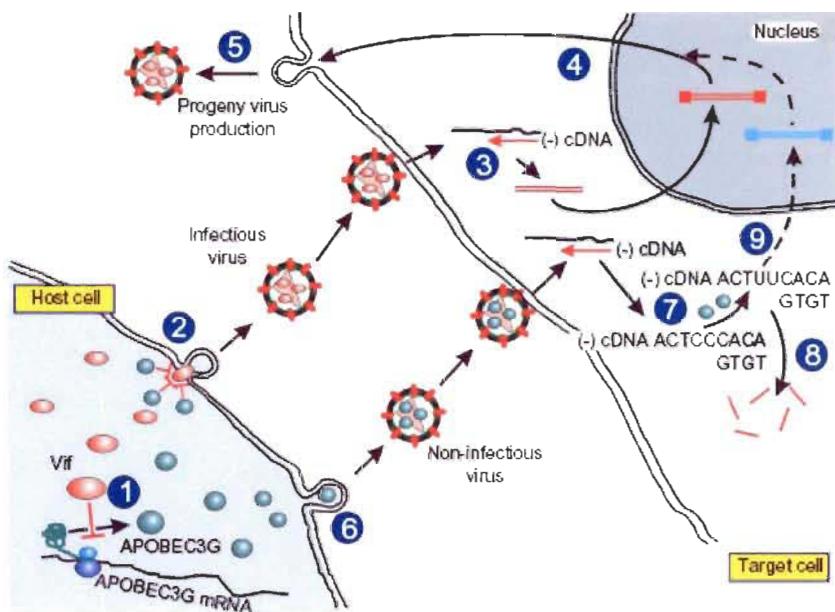


FIGURE 1.6 : Le mécanisme d'action d'APOBEC3G (Strebel 2003)

APOBEC3G est encapsidée dans les virions et provoque une conversion des désoxycytidine en désoxyuridines. Les produits sont alors : a) dégradés par les endonucléases ou b) l'hypermutation de C en U sur le brin négatif provoque une hypermutation de G en A sur le brin positif. Dans ce dernier cas, l'ADN viral double brin est inséré dans l'ADN viral de l'hôte où il entraîne une production de protéines virales non fonctionnelles.

Même si cette protéine possède une activité de restriction contre plusieurs rétrovirus, des rétrovirus tel le VIH-1 ont développé des moyens pour contrecarrer le pouvoir d'inhibition d'APOBEC3G. En effet, la protéine virale du VIH-1 appelée Vif inhibe fortement l'activité antivirale d'APOBEC3G par une interaction physique qui résulte en l'exclusion de la déaminase des virions. Effectivement, Vif recrute une ubiquitine ligase E3 qui provoque la polyubiquitination d'APOBEC3G et dirige ainsi cette dernière vers la voie de dégradation par le protéasome (Goila-Gaur et Strelbel 2008).

1.2.3 La protéine tetherin

La tetherin est un facteur de restriction actif contre le VIH-1 découvert récemment. Cette protéine a été découverte lors d'expériences effectuées sur la protéine Vpu du VIH-1 (Neil et al. 2008). En effet, des expériences ont démontré que certaines lignées cellulaires nécessitent la présence de Vpu afin d'effectuer un relargage efficace de virions dans le milieu environnant de la cellule infectée alors que dans d'autres lignées cellulaires, Vpu n'est pas essentiel à la production de virions (Neil et al. 2008). Des expériences impliquant des fusions de cellules ont permis de découvrir un inhibiteur du bourgeonnement des virions. Cet inhibiteur a alors été appelé tetherin et des études plus poussées à l'aide de puces à ADN ont permis de déterminer qu'il s'agissait en fait de la protéine CD317 dont la fonction était jusqu'à maintenant inconnue (Neil et al. 2008).

1.2.3.1 La structure de la tetherin

La tetherin serait une protéine exprimée dans plusieurs compartiments subcellulaires. Elle possède une queue cytoplasmique en position N-terminale,

une séquence de simple passage dans la membrane plasmique, un domaine coiled-coil extracellulaire ainsi qu'une protéine d'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) située en position C-terminale (Neil et al. 2008). La queue cytoplasmique est responsable de la distribution subcellulaire de la protéine alors que la GPI est essentielle à l'inhibition du bourgeonnement des virions (Neil et al. 2008).

1.2.3.2 Le mécanisme d'action de la tetherin

L'expression de la tetherin est induite ou augmentée par la présence de l'interféron alpha. En absence de Vpu, l'assemblage des virions est complet et ils atteignent leur maturité. Toutefois, au lieu d'être relargués dans le milieu environnant, ils s'accumulent plutôt à la surface de la cellule et une portion de ces virions est ensuite internalisée dans des endosomes (figure 1.7) (Neil et al. 2008).

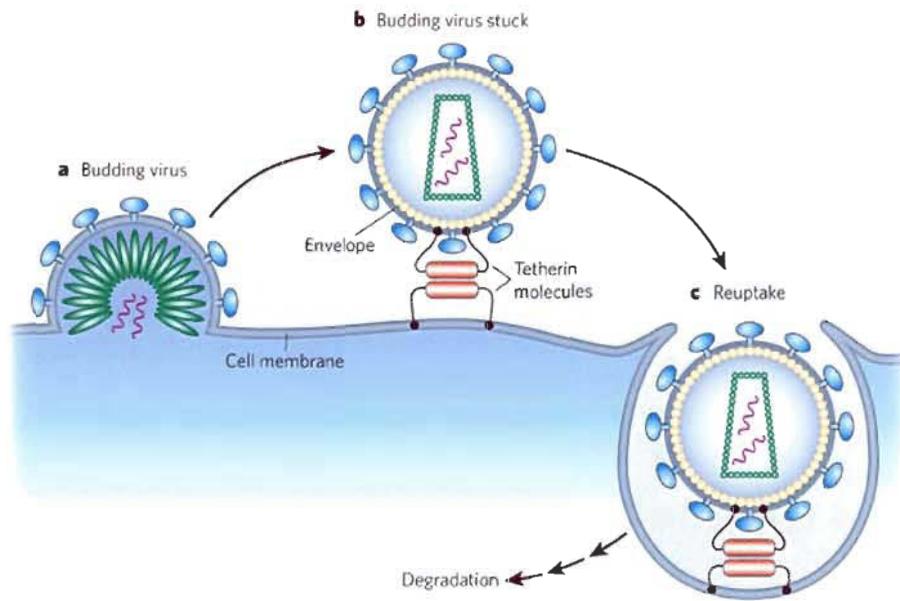


FIGURE 1.7 : Le mécanisme d'action de la tetherin (Gottlinger 2008)

En absence de la protéine virale vpu, les virions atteignent leur maturité, mais ils s'accumulent à la surface de la cellule au lieu d'être relargués dans le cytoplasme. Certains sont ensuite internalisés dans des endosomes.

Afin de contrecarrer l'effet de la tetherin, le VIH-1 a développé des moyens de défense. En effet, la protéine virale Vpu du VIH-1 inhibe l'effet provoqué par la présence de la tetherin. Lors de l'infection de cellules exprimant la tetherin par un virus VIH-1 non défectif au niveau de Vpu, les virions sont relargués normalement dans le milieu environnant. Le mécanisme exact de l'inhibition n'a pas encore été démontré, mais il a été prouvé que Vpu colocalise avec la tetherin (Neil et al. 2008).

1.2.4 La famille des protéines « TRIpartite Motif » (TRIM)

Les protéines TRIM sont retrouvées chez les mammifères. Plus de 70 protéines TRIM ont été identifiées à ce jour chez l'humain (Sawyer et al. 2007) ainsi qu'un pseudogène de TRIM (*TRIMψ*) (Reymond et al. 2001). Certaines protéines TRIM sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme alors que d'autres sont exprimées dans des organes précis. La localisation des différentes protéines TRIM peut varier en fonction du degré de maturité de l'organisme les exprimant. Elles sont retrouvées au niveau du cytoplasme ou du noyau sous forme de corps cytoplasmiques ou de corps nucléaires. Elles peuvent être également retrouvées sous forme diffuse dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule (Reymond et al. 2001).

1.2.4.1 La structure des protéines TRIM

Les protéines TRIM doivent leur appellation à leur structure composée de trois domaines (« TRIpartite Motif ») (Reymond et al. 2001). Le premier domaine situé à l'extrémité N-terminale est appelé RING. Le deuxième domaine se nomme B-box. Le dernier domaine, coiled-coil, se trouve à l'extrémité C-terminale. La région située entre le domaine RING et B-box s'appelle « linker 1 » (L1) alors que celle retrouvée entre le domaine B-box et coiled-coil se nomme « linker 2 » (L2) (Reymond et al. 2001). Les protéines TRIM sont aussi parfois retrouvées sous le nom RBCC (Reymond et al. 2001).

Bien que la plupart des protéines TRIM possèdent un domaine RING suivi d'un domaine B-box et d'un domaine coiled-coil, certaines protéines TRIM possèdent une séquence qui diffère quelque peu. En effet, certaines possèdent deux domaines B-box appelés B-box-1 et B-box 2. Ces deux domaines ont une

longueur différente et la B-box 1 précède toujours la B-box 2. Certaines protéines TRIM possèdent aussi un quatrième domaine situé en position C-terminale, appelé B30.2, dont la longueur varie entre les espèces (Reymond et al. 2001).

1.2.4.2 Le rôle des protéines TRIM

Bien que le rôle de la plupart des protéines TRIM ne soit pas connu, certaines sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que : (a) la régulation transcriptionnelle, (b) l'apoptose, (c) l'inflammation, (d) la détermination de la polarité de la cellule et (e) une activité antivirale (Li et al. 2007).

Les protéines TRIM peuvent être responsables de certaines maladies. En effet, un polymorphisme retrouvé au niveau de la protéine TRIM20 (protéine de la fièvre Méditerranéenne, MEFV) (NCBI 2009a) cause la fièvre familiale méditerranéenne, une maladie caractérisée par des attaques récurrentes de fièvre et d'inflammation (Towers 2007). Pour sa part, TRIM21 est un auto-antigène majeur retrouvé dans des maladies auto-immunes telles que (a) l'arthrite rhumatoïde, (b) le lupus érythémateux disséminé (maladie inflammatoire touchant plusieurs organes) et (c) le syndrome de Gougerot-Sjögren (maladie se caractérisant par une sécheresse oculaire et buccale) (Keeble et al. 2008). Alors que certaines protéines TRIM peuvent causer des maladies, d'autres possèdent un rôle antiviral. En effet, TRIM1 (MID2) (NCBI 2009b) inhibe le virus MLV. Différents TRIM5α possèdent une activité de restriction contre : (a) le VIH-1, (b) le SIV_{mac}, (c) le SIV_{agm}, (d) le EIAV, (e) le virus de l'immunodéficience féline (FIV) et (f) le MLV (Hatzioannou et al. 2004; Yap et al. 2004; Saenz et al. 2005; Song et al. 2005c; Ohkura et al. 2006). Pour sa part, TRIM19 (protéine de leucémie promyélocytique PML) (NCBI 2009c)

inhibe faiblement différents virus tels : (a) le virus de la stomatite vésiculaire, (b) le virus de l'influenza de type A, (c) le cytomégalovirus humain, (d) l'herpès simplex de type I, (e) le virus Ébola, (f) le virus de la fièvre de Lassa, (g) le virus de la chorioméningite lymphocytique et (h) le VIH (Uchil et al. 2008). TRIM 22 et TRIM32 inhibent le VIH en atténuant la transcription des LTR (Uchil et al. 2008). TRIM28 inhibe le MLV (Uchil et al. 2008). La protéine TRIM possédant l'activité antivirale la plus élevée est TRIM5 α (Uchil et al. 2008).

1.2.4.3 La protéine TRIM5 α

1.2.4.3.1 Les caractéristiques de TRIM5 α

La protéine TRIM5 α fut découverte chez le singe rhésus lors d'un crible génétique visant à cibler un gène conférant une résistance au VIH (Stremlau et al. 2004). TRIM5 α est retrouvée dans le cytoplasme des cellules. Elle possède les trois domaines caractéristiques des protéines TRIM, c'est-à-dire (a) RING, (b) B-box 2 et (c) coiled-coil (Stremlau et al. 2004). Ce dernier est composé de deux régions nommées CC-A et CC-B qui sont séparées par une région espace (Javanbakht et al. 2006). Également, TRIM5 α possède un quatrième domaine en position C-terminale appelé B30.2. Il est composé d'une combinaison d'un motif PRY fusionné avec un domaine SPRY et il contient quatre régions variables appelées v₁, v₂, v₃ et v₄ (figure 1.8) (Song et al. 2005b). La séquence en acides aminés de ces régions varie à l'intérieur des espèces et entre les différents orthologues alors que la longueur de la séquence d'acides aminés des régions v₁ à v₃ varie également.

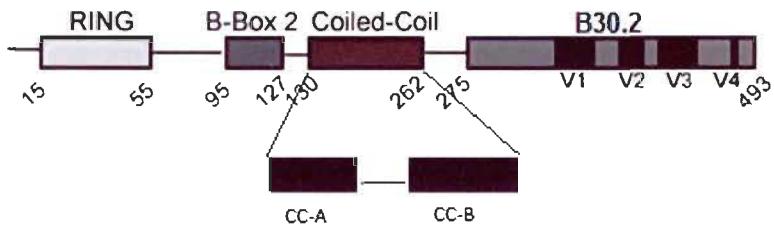


FIGURE 1.8 : La structure de la protéine TRIM5 α
(adapté de Maillard et al. 2007)

Elle est composée des domaines RING, B-box 2, coiled-coil et B30.2. Le domaine coiled-coil est formé par les régions CC-A et CC-B qui sont séparées par une région espace. Le domaine B30.2 contient quatre régions variables.

1.2.4.3.1.1 Les différents isoformes de TRIM5

Même si la protéine TRIM5 α est le plus long isoforme de la protéine TRIM5, il existe d'autres isoformes résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm : (1) TRIM5 δ , (2) TRIM5 γ , (3) TRIM5 θ et (4) TRIM5 η (Brennan et al. 2007). Les isoformes TRIM5 δ et TRIM5 γ contiennent un domaine B30.2 tronqué. Ils sont incapables d'inhiber les rétrovirus et ils sont le résultat d'un épissage alternatif de l'ARNm au niveau de l'exon huit. Ils sont retrouvés chez les mêmes organismes que ceux exprimant TRIM5 α (Stremlau et al. 2004). Pour leur part, les transcrits de TRIM5 θ et TRIM5 η sont uniquement retrouvés chez le singe à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) (Brennan et al. 2007). TRIM5 θ possède une délétion de deux acides aminés situés entre l'exon six et l'exon sept qui pourrait résulter d'une délétion dans l'ADN génomique ou d'un épissage alternatif de l'ARNm. Cette délétion de deux acides aminés provoque un décalage dans le cadre de lecture de *TRIM5*. Le transcrit prédit que la protéine TRIM5 θ posséderait une séquence de 300 acides aminés et encoderait seulement les domaines RING, B-box 2, coiled-coil et une queue de 100 acides aminés (Brennan et al. 2007). Quant à la protéine TRIM5 η , elle possède une

délétion de 27 acides aminés situés dans l'exon sept. Cette délétion restaure le cadre de lecture de la protéine TRIM5. Ce transcrit encoderait une protéine de 486 acides aminés exprimant les domaines de TRIM5 ainsi que la majorité du domaine B30.2 (Brennan et al. 2007). Les deux isoformes TRIM5 α et TRIM5 η sont exprimés au niveau du cytoplasme tout comme TRIM5 α (Brennan et al. 2007). Ils n'inhibent cependant pas les rétrovirus normalement inhibés par TRIM5 α , c'est-à-dire le VIH-1 et le virus de l'immunodéficience simienne 239 (SIV_{mac239}). La perte de la restriction est causée par la séquence codant les exons 2 à 7 de la protéine TRIM5 η et non par la présence de l'exon 8 codant pour un domaine incomplet de B30.2 (Brennan et al. 2007).

1.2.4.3.1.2 Le rôle des différents domaines de TRIM5 α

Le rôle des différents domaines de la protéine TRIM5 α n'est pas encore complètement défini. Le domaine RING contient des cystéines et des histidines critiques à la liaison de zinc et qui pourraient également contribuer au repliement approprié de la protéine TRIM5 α . Il possède une activité ubiquitine ligase E3 et il participe à l'activité inhibitrice de la protéine TRIM5 α sans être essentiel à son activité de restriction. En effet, lorsque des mutations sont insérées à l'intérieur de ce domaine ou lorsque la protéine TRIM5 α est dépourvue de celui-ci, une diminution de l'activité de restriction de la protéine est observée mais elle n'est pas abolie (Javanbakht et al. 2005; Li et al. 2006a). Pour sa part, le rôle du domaine B-box 2 reste inconnu. Par contre, il est connu que ce domaine est critique à l'activité inhibitrice des différents rétrovirus, puisque lorsque des mutations sont insérées à l'intérieur de ce domaine, la restriction des différents rétrovirus est complètement abolie (Javanbakht et al. 2005; Li et al. 2006a). Quant au domaine coiled-coil, il est responsable de la multimérisation de la protéine et de l'interaction de TRIM5 α avec le rétrovirus inhibé (Mische et al. 2005). Finalement, le domaine B30.2 est responsable de la

spécificité de la restriction conférée à TRIM5 α , puisqu'il est en majeure partie responsable de l'interaction physique entre TRIM5 α et la protéine de capsid virale. Sa séquence détermine donc les différents rétrovirus inhibés (Stremlau et al. 2006). Un modèle moléculaire a été proposé pour le domaine B30.2. Les régions variables formeraient des structures en boucle à la surface de la protéine créant une surface capable d'interagir avec les capsides rétrovirales (Ohkura et al. 2006). Ce modèle serait plausible, puisque des différences de polymorphisme au niveau des régions variables du domaine B30.2 confèrent une spécificité de restriction différente à TRIM5 α .

1.2.4.3.1.3 Le polymorphisme de longueur entre les orthologues de TRIM5 α

Il existe un polymorphisme de la protéine TRIM5 α simienne au niveau de la séquence en acides aminés et au niveau de la longueur entre les différents orthologues de cette protéine (Song et al. 2005c). En effet, elle contient une séquence assez bien conservée au niveau des domaines RING, B-box 2 et coiled-coil. Il y a cependant d'importantes variations au niveau du domaine B30.2. Elles sont concentrées à l'intérieur des quatre régions variables, allant d'un changement d'un seul acide aminé à un polymorphisme de longueur important pour toutes les régions variables excepté v₄ qui ne contient pas de polymorphisme de longueur (Song et al. 2005c). Les différents types de singes sont divisés en trois catégories : (a) les humanoïdes, (b) les singes de l'ancien monde et (c) les singes du nouveau monde. Les humanoïdes comprennent : (a) l'humain, (b) le chimpanzé, (c) l'orang-outang et (d) le gorille. Les singes de l'ancien monde comprennent : (a) le singe rhésus, (b) le singe vert africain à queue de cochon (agm_{pyg}), (c) le singe vert africain tantalus (agm_{tan}) et (d) le singe sooty mangabey. Les singes du nouveau monde comprennent : (a) le singe capucin brun, (b) le singe écureuil, (c) le singe tamarin cotton-top, (d) le

singe tamarin empereur, (e) le singe Goeldi marmoset, (f) le singe Silvery marmoset et (g) le singe araignée (Song et al. 2005c). D'une façon générale, la protéine TRIM5 α des singes de l'ancien monde possède une région v₁ relativement longue alors que celle des singes du nouveau monde possède une région v₃ relativement longue (Song et al. 2005c). D'une façon plus particulière, il existe des polymorphismes de longueur caractéristiques entre les espèces. Par exemple, la protéine TRIM5 α du singe vert africain (TRIM5 α_{agm}) contient une région v₁ anormalement longue résultant de duplication de séquences en tandem (Song et al. 2005c) alors que chez le singe araignée, TRIM5 α possède une région v₃ anormalement longue qui provient d'une triplication en tandem. Quant à TRIM5 α du singe rhésus (TRIM5 α_{rh}) et TRIM5 α du singe sooty mangabey, elles contiennent une insertion courte dans la région v₁ du domaine B30.2. Pour sa part, le singe tantalus possède une duplication de 20 acides aminés dans la région v₁ du domaine B30.2 (Song et al. 2005b). Pour ce qui est de la protéine TRIM5 de lapins, les domaines RING, B-box 2, coiled-coil et B30.2 de TRIM5 sont bien conservés bien qu'il existe quelques variations au niveau des domaines variables (Schaller et al. 2007). Pour leur part, les bovins possèdent une protéine semblable à TRIM5 α appelée Lv1. Celle-ci possède une séquence bien conservée au niveau des domaines RING, B-box 2 et au niveau de certaines parties du domaine B30.2. Elle possède cependant une insertion de 26 acides aminés située au niveau des acides aminés 349 à 375 (Ylinen et al. 2006). Donc, il existe plusieurs variations de la longueur ainsi que de la séquence en acides aminés de TRIM5 α entre les différents orthologues. Elles expliquent la variation de la spécificité de la restriction rétrovirale.

1.2.4.3.1.4 Les rétrovirus inhibés par les différents orthologues de TRIM5 α

La variation de TRIM5 α entre les différentes espèces provoque une diversité au niveau de la restriction par les différents orthologues de TRIM5 α (tableau 1.4).

TABLEAU 1.4
Les différents rétrovirus inhibés par les différents orthologues de TRIM5 α
(Yap et al. 2004; Song et al. 2005c; Ohkura et al. 2006)

Différents orthologues de TRIM5 α	Force avec laquelle les différents rétrovirus sont inhibés					
	VIH-1 ^a	MLV-N ^b	MLV-B ^c	MoMLV ^d	SIV _{agm} ^e	SIV _{mac} ^f
Humain	-	+++	-	-	-	-
Chimpanzé	-	+++	-	-	-	-
Orang-outang	++	+++	-	-	-	++
Gorille	+	+++	-	-	-	++
Rhésus	+++	++	-	-	+++	-
Agm _{pyg}	++	+++	-	-	-	-
Agm _{tan}	++	+++	-	-	-	+++
Sooty mangabey	++	+++	-	-	-	-
Capucin brun	-	+++	-	-	-	-
Écureuil	-	++	-	-	++	+++
Tamarin cotton-top	++	++	-	-	++	+++
Tamarin empereur	++	++	-	-	++	+++
Goeldi marmoset	-	-	-	-	-	-
Silvery marmoset	-	-	-	-	-	-
Araignée	+++	++	-	-	-	+++

^aVirus de l'immunodéficience humaine de type I

^bVirus de la leucémie murine de tropisme N

^cVirus de la leucémie murine de tropisme B

^dVirus de la leucémie murine de souche Moloney

^eVirus de l'immunodéficience simienne du singe vert africain

^fVirus de l'immunodéficience simienne de macaque

- Aucune inhibition

+ Inhibition faible

++ Inhibition modérée

+++ Inhibition forte

De plus, les protéines TRIM5 α humaine (TRIM5 α_{hu}) et TRIM5 α_{rh} inhibent aussi le virus FIV et le virus EIAV alors que pour sa part, TRIM5 α_{agm} inhibe seulement le virus EIAV (Hatziloannou et al. 2004; Saenz et al. 2005).

Pour ce qui est de TRIM5 de lapins, il possède la capacité d'inhiber plusieurs rétrovirus tels : (a) le VIH-1, (b) le VIH-2, (c) le virus EIAV et (d) le virus FIV. Il n'inhibe cependant pas les virus MLV et SIV_{mac} lorsqu'il est exprimé à des niveaux endogènes (Schaller et al. 2007). Quant à Lv1 de bovins, il inhibe les différents virus suivants : (a) le MLV-N, (b) le VIH-1, (c) le VIH-2, (d) le FIV et (e) le SIV_{mac}. Par contre, il est incapable d'inhiber le MLV-B, l'EIAV et le virus de l'immunodéficience simienne du singe vert africain (SIV_{agm}) lorsqu'il est exprimé à des niveaux endogènes (Ylinen et al. 2006).

1.2.4.3.2 La multimérisation de TRIM5α

Lors de restriction rétrovirale, plusieurs monomères de TRIM5α s'assemblent afin de permettre l'inhibition du rétrovirus. Le mécanisme d'action exact n'est pas encore connu, mais il a été démontré que cette multimérisation était importante dans l'activité de restriction de TRIM5α. En effet, lorsqu'il y a absence de multimérisation, il y a absence de restriction rétrovirale par TRIM5α (Mische et al. 2005). Selon différentes conditions expérimentales utilisées, TRIM5α est retrouvée sous forme de dimères (Diaz-Griffero et al. 2009), de trimères (Diaz-Griffero et al. 2009; Mische et al. 2005), d'hexamères (résultats non publiés observés dans notre laboratoire) ou de multimères de plus haut poids moléculaire (Li et Sodroski 2008; Diaz-Griffero et al. 2009). La multimérisation de TRIM5α n'est pas encore élucidée.

1.2.4.3.3 La localisation de TRIM5α dans les corps cytoplasmiques

Comme mentionné précédemment, TRIM5α est retrouvée dans le cytoplasme des cellules sous forme diffuse ou sous forme de corps cytoplasmiques. La taille et la forme de ces corps cytoplasmiques varient entre

les différents orthologues de TRIM5 α . Des expériences ont montré que la formation de corps cytoplasmiques ne dépend pas de la présence et de l'intégrité de domaines précis de TRIM5 α (Song et al. 2005a).

Des expériences par microscopie en temps réel ont permis d'observer les corps cytoplasmiques et de déterminer que ceux-ci étaient des structures hautement mobiles qui requéraient un réseau de microtubules intact. Deux types de mouvements ont été observés : (a) un court multidirectionnel et saltatoire et (b) un long rapide et unidirectionnel. Ensuite, la technique de « fluorescence recovery after photobleaching » (FRAP) a permis de démontrer que TRIM5 α était capable de faire la navette entre les corps cytoplasmiques et le cytoplasme de la cellule (Campbell et al. 2007). Une autre étude de microscopie en temps réel a permis de suggérer que le rôle des corps cytoplasmiques serait de séquestrer les rétrovirus. Ils constituaient l'endroit où se produirait la restriction virale par TRIM5 α (Campbell et al. 2008).

1.2.4.3.4 Le mécanisme d'action de TRIM5 α

TRIM5 α semble intervenir à deux étapes du cycle de réPLICATION du VIH-1. Premièrement, elle établit une interaction physique avec le rétrovirus dès son entrée dans la cellule. Ensuite, elle semble diriger les complexes de réPLICATION viraux vers la voie de dégradation par le protéasome (Levy 2007).

1.2.4.3.4.1 Les interactions TRIM5 α -capside rétrovirale

La première étape de l'inhibition par TRIM5 α se produit dès l'entrée du VIH-1 dans la cellule. TRIM5 α établit une interaction physique entre son

domaine B30.2 et la protéine de capsid du rétrovirus. Suite à cette interaction, une accélération de la décapsidation virale est alors provoquée, entraînant une baisse du niveau d'infection des cellules hôtes par le virus (Stremlau et al. 2006). La liaison de TRIM5 α_{hu} avec la capsid rétrovirale a aussi été démontrée pour le virus N-MLV (Sebastian et Luban 2005). Comme pour le virus VIH-1, cette liaison provoque une dégradation accélérée de la capsid rétrovirale du virus MLV (Perron et al. 2007). Également, à cette même étape, le complexe de pré-intégration est incapable d'être dirigé efficacement vers le noyau en présence de TRIM5 α .

1.2.4.3.4.2 L'ubiquitination et la dégradation de TRIM5 α par le protéasome

La protéine TRIM21, aussi appelée Ro52, fonctionne comme une ubiquitine ligase E3 et est capable d'auto-ubiquitination (Yamauchi et al. 2008). Comme il a déjà été démontré que TRIM5 δ pouvait avoir une activité ubiquitine ligase *in vitro* (Yamauchi et al. 2008), la capacité éventuelle d'ubiquitination de TRIM5 α a été étudiée. Les résultats ont montré que TRIM5 α était ubiquitinée *in vitro*. Comme les enzymes E1 et E2 (UbcH5B spécifiquement) étaient les enzymes minimum requises afin d'ubiquitinier TRIM5 α , TRIM5 α fonctionnerait comme une enzyme E3 et serait par conséquent capable de s'auto-ubiquitinier (Yamauchi et al. 2008). Cette ubiquitination *in vitro* était dépendante du domaine RING-finger et la déubiquitination de TRIM5 α était effectuée par YopJ, une protéine de désubiquitination retrouvée chez la levure (Yamauchi et al. 2008). Les résultats ont aussi démontré que TRIM5 α était capable de s'auto-ubiquitinier *in vivo* mais qu'elle était incapable d'ubiquitinier TRIM21. Donc, l'étape suivante a été de vérifier si l'ubiquitination de TRIM5 α conduisait à sa dégradation par le protéasome. Des expériences ont démontré que TRIM5 α se retrouvait que sous forme polyubiquitinée et que lorsqu'une synthèse protéique de TRIM5 α plus

importante que son taux de dégradation se produisait, TRIM5 α s'accumulait dans des corps cytoplasmiques (Diaz-Griffero et al. 2006). Elles ont aussi démontré que la polyubiquitination de TRIM5 α résultait en sa dégradation rapide par le protéasome (Diaz-Griffero et al. 2006). Cependant, des données récentes sont contradictoires. Des formes monoubiquitinées et polyubiquitinées de TRIM5 α ont été observées. Des expériences ont montré que la monoubiquitination semblait être un signal de translocation de TRIM5 α des corps cytoplasmiques vers le noyau. (Yamauchi et al. 2008). Quant au rôle de la polyubiquitination, les expériences ont démontré que l'auto-ubiquitination n'était pas une forme de régulation négative de la synthèse et de la dégradation de TRIM5 α . En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome n'avait pas augmenté les formes monoubiquitinées ou polyubiquitinées de TRIM5 α , suggérant que l'auto-ubiquitination de TRIM5 α ne causait pas sa dégradation (Yamauchi et al. 2008). Le rôle de la polyubiquitination demeure encore obscur.

Le taux de dégradation de TRIM5 α lors de la restriction a été étudié afin de vérifier s'il était médié par la dégradation via le protéasome (Rold et Aiken 2008). La dégradation de TRIM5 α était corrélée avec le niveau de saturation de ce facteur de restriction par des particules virales, puisque plus TRIM5 α était saturé, plus son taux de dégradation était élevé. De plus, la perte de stabilité de TRIM5 α serait reliée à la spécificité de la restriction. En effet, lorsque des cellules exprimant TRIM5 α_{hu} étaient infectées par du virus VIH-1 et par N-MLV, TRIM5 α était dégradée rapidement dans le cas de l'infection par le virus N-MLV, car elle était capable de l'inhiber. Le contraire se produisait dans le cas de l'infection par le VIH-1 (Rold et Aiken 2008). Une autre étude a été réalisée afin de déterminer l'effet de l'utilisation de MG132, un inhibiteur de protéasome, sur la restriction virale médiée par TRIM5 α . L'utilisation de MG132 n'a provoqué aucun effet sur le pouvoir d'infection du VIH-1. Par contre, l'utilisation du MG132 a secouru les produits de la transcription inverse à un niveau similaire à celui des cellules contrôles même si la restriction de l'infection par le VIH-1 est

demeurée présente (Wu et al. 2006). L'effet de l'inhibition du protéasome sur le transport de l'ADNc vers le noyau a ensuite été étudié. Les résultats ont démontré qu'un traitement au MG132 provoquait une transcription inverse complétée, mais que les produits de cette transcription ne pouvaient pas accéder au noyau (Wu et al. 2006). Donc, TRIM5α semble diriger les complexes de réPLICATION viraux vers la voie de dégradation par le protéasome.

1.2.4.3.5 L'évolution de TRIM5

Une observation de la localisation du gène *TRIM5* dans le génome permet de constater que ce gène se trouve sur le chromosome 11p15 dans un locus incluant aussi les gènes codant pour les protéines: (a) TRIM21, (b) TRIM68, (c) TRIM6, (d) TRIM34, (e) TRIM22 et (f) TRIM3 (Yamauchi et al. 2008). La distance évolutive entre les gènes codant pour les protéines (a) TRIM5, (b) TRIM21, (c) TRIM6 et (d) TRIM34 est très courte ce qui suggère que ces protéines pourraient avoir une fonction similaire (figure 1.9).

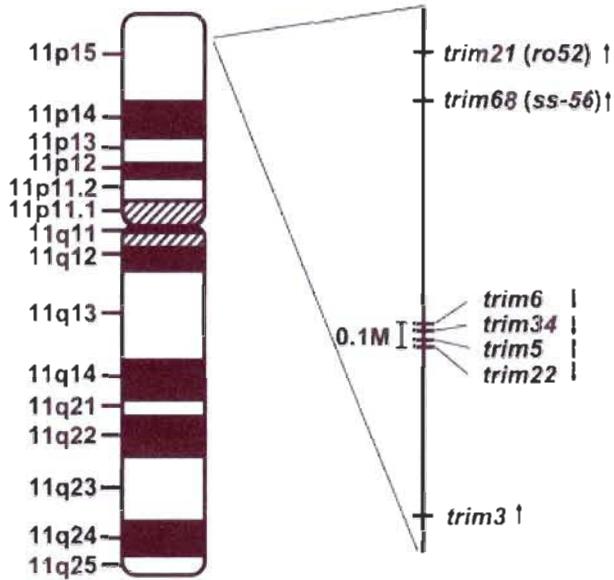


FIGURE 1.9 : La position des gènes *TRIM* sur le chromosome 11
(Yamauchi et al. 2008)

La distance évolutive entre les gènes TRIM6, TRIM34, TRIM5 et TRIM22 est très courte, ce qui suggère qu'elles pourraient avoir une fonction semblable.

La différenciation du groupe de gènes codant pour les protéines (a) TRIM6, (b) TRIM34, (c) TRIM5 et (d) TRIM22 date d'après la divergence des placentaires et des marsupiaux, il y a environ 180 millions d'années. Ce groupe de gènes peut aussi être daté d'avant la divergence des groupes majeurs de placentaires, tels le chien, la vache et l'humain qui s'est produite il y a environ 90 à 100 millions d'années. La séquence de TRIM5 a évolué par une sélection positive depuis plus de 30 millions d'années chez les primates, précédant même les origines évolutionnaires des lentivirus de primates (Sawyer et al. 2007). En effet, les lentivirus de primates comme le VIH-1 existeraient depuis au moins un million d'années (Sawyer et al. 2005). Les éléments de rétrovirus endogènes retrouvés dans les lignées germinales des mammifères ont aussi démontré que les mammifères ont été sujets à des répétitions d'infections par des rétrovirus au cours de leur évolution. En effet, plus de douze rétrovirus ont été retrouvés incluant le VIH-1 (Liu et al. 2005). En termes d'évolution, les gènes *TRIM34* et

TRIM6 sont demeurés assez stables alors que *TRIM5* et *TRIM22* ont subi des pressions sélectives au cours de l'évolution. En effet, le génome de la vache ne contient pas de gène *TRIM22*, mais il contient plusieurs gènes de *TRIM5* sur son chromosome 15 dont quatre encoderaient une protéine TRIM5 : (a) *TRIM5-1*, (b) *TRIM5-3*, (c) *TRIM5-4* et (d) *TRIM5-6*. Ils ont probablement évolué afin de diversifier la fonction de liaison à la capsid virale. Ce grand nombre de copies de *TRIM5* serait présent afin de permettre une sélection simultanée de plusieurs activités antivirales, suite à de multiples expositions à des pathogènes rétroviraux se trouvant sur différentes trajectoires évolutives (Sawyer et al. 2007). Pour sa part, le génome canin ne contient pas de gène complet de *TRIM5*, mais il contient un gène *TRIM22*. En effet, le gène *PNRC1*, un coactivateur de récepteurs nucléaires qui est riche en prolines ou « proline-rich nuclear receptor coactivator 1 » (The GeneCards Human Gene Database 2009), a été inséré dans la séquence de *TRIM5* au cours de l'évolution, empêchant la transcription d'une protéine TRIM5 fonctionnelle. Une analyse de type « BLAST », comprenant des séquences de banques de données génomiques et de transcrits, n'a prédict aucun gène *TRIM5* canin (Sawyer et al. 2007). Également, aucun gène de *TRIM5* fonctionnel n'est retrouvé chez le chat (Sawyer et al. 2007). Quant au lapin, il possède des séquences assez bien conservées pour tous les domaines de TRIM5, et ce, plus particulièrement au niveau des domaines RING et coiled-coil (Schaller et al. 2007). Pour le gène *TRIM5α* de primates, la sélection positive s'est effectuée au niveau du domaine B30.2 dans les régions variables v_1 , v_2 , v_3 et v_4 mais plus particulièrement dans une portion de la région variable v_1 formée par 11 à 13 acides aminés (figure 1.10). Chez *TRIM5α_{hu}*, il s'agit des acides aminés 330 à 340 (Sawyer et al. 2005).

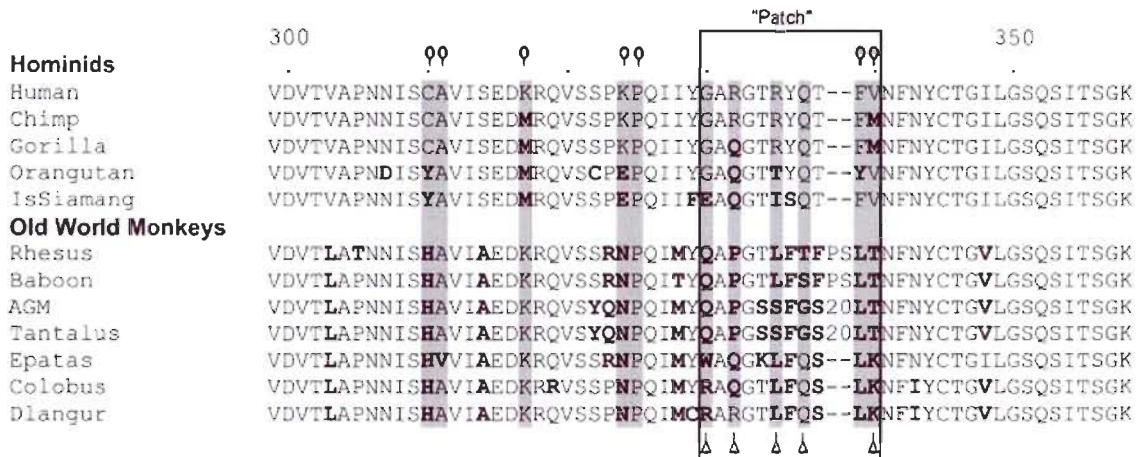


FIGURE 1.10 : La sélection positive de la région variable v_1 de *TRIM5 α* (Sawyer et al. 2005)

La figure représente une portion du domaine B30.2 de différents orthologues de *TRIM5 α* . Les acides aminés ayant subit une pression de sélection positive sont représentés en gris avec des cercles au-dessus des colonnes. Les triangles représentent les changements relatifs à *TRIM5 α_{hu}* . La sélection positive a donc été effectuée particulièrement dans une portion formée de 11 à 13 acides aminés. Cette portion est située dans la région variable v_1 du domaine B30.2 de *TRIM5 α_{hu}* qui est constituée des acides aminés 321 à 346.

1.2.4.3.6 L'effet dominant négatif de mutants de *TRIM5 α*

La protéine *TRIM5 γ* , incapable d'inhiber le VIH-1 à cause d'un domaine B30.2 incomplet, possède un effet dominant négatif sur *TRIM5 α_{rh}* , puisqu'elle secoure l'infection par le VIH-1 lorsqu'elle est exprimée dans des cellules de singe rhésus (Perez-Caballero et al. 2005). L'effet de dominance négative possible chez *TRIM5 α_{hu}* a alors été étudié (Perez-Caballero et al. 2005). Des différents mutants de *TRIM5 α_{hu}* ayant des délétions au niveau des différents domaines ont été construits. Tous les mutants possédant un domaine coiled-coil étaient capables d'agir comme inhibiteur dominant de l'activité de restriction de *TRIM5 α_{hu}* exprimé de façon endogène suite à une infection par N-MLV. Ce

domaine était donc nécessaire et suffisant à la multimérisation avec TRIM5 α_{hu} . Ainsi, il peut conférer un effet dominant négatif sur TRIM5 α_{hu} à un mutant incapable d'inhiber un rétrovirus normalement inhibé par TRIM5 α_{hu} (Perez-Caballero et al. 2005). L'effet de dominance négative sur TRIM5 α_{hu} a aussi été étudié chez le lapin. Les résultats ont démontré que TRIM5 α_{hu} et TRIM5 possèdent une activité dominante négative sur TRIM5 de lapins (Schaller et al. 2007).

1.2.4.3.7 Les facteurs agissant sur la régulation par TRIM5 α

Différents facteurs extérieurs sont capables d'agir sur la régulation de TRIM5 α tels l'interféron, le choc thermique et la cyclophiline A (Levy 2007).

1.2.4.3.7.1 La régulation de TRIM5 α par l'interféron

Les interférons sont des protéines extracellulaires faisant partie de la famille des cytokines. Il existe trois isomères appelés : (a) interféron-alpha (IFN- α), (b) interféron-bêta (IFN- β) et (c) interféron-gamma (IFN- γ) (Goldsby et al. 2003). Ils possèdent plusieurs fonctions biologiques telles une activité antivirale, une activité antiproliférative, une activité antitumorale et des activités immunomodulatrices (Goldsby et al. 2003). Les IFN se lient à leur récepteur provoquant une transduction du signal jusqu'au noyau où des facteurs de transcription sont activés. Ils sont divisés en deux types d'IFN comportant des voies de signalisations différentes. Le premier type est appelé IFN de type I et il comprend les IFN- α et IFN- β alors que le deuxième groupe se nomme les IFN de type II et comprend les IFN- γ (Goldsby et al. 2003). Plusieurs informations ont permis de poser l'hypothèse que l'expression de TRIM5 α_{hu} pourrait être augmentée par la présence d'interférons. Tout d'abord, les gènes (a) *TRIM21*,

(b) *TRIM22* et (c) *TRIM34* sont situés près du gène de *TRIM5 α_{hu}* sur le chromosome 11p15. L'expression des gènes *TRIM21*, *TRIM22* et *TRIM34* est augmentée par l'interféron alpha (Asaoka et al. 2005). De plus, *TRIM5 α_{hu}* partage une région amplificatrice « enhancer » avec *TRIM22* (Sakuma et al. 2007). Enfin, la séquence consensus de l'élément de réponse stimulé par l'interféron « IFN-stimulated response element » (ISRE) est située à l'intérieur de la région de 40 paires de bases en aval des sites d'initiation de la transcription des gènes *TRIM5 α_{hu}* et *TRIM5 α_{rh}* . Une étude effectuée a tout d'abord démontré que TRIM5 α est induit par les interférons de type I dans les cellules de carcinome utérin HeLa et dans les cellules humaines d'hépatome HepG2 (Asaoka et al. 2005). Par la suite, une autre étude a démontré que l'interféron- α possède une activité sur *TRIM5 α_{rh}* et *TRIM5 α_{hu}* . En effet, il augmente le niveau de la transcription du gène *TRIM5 α_{rh}* dans les cellules de singe rhésus FrhK4. De plus, il augmente les activités antivirales médiées par *TRIM5 α_{rh}* sur la réPLICATION du VIH-1, en diminuant notamment le nombre de virions produits dans le surnageant. Pour sa part, chez les cellules HeLa et les cellules TE671, l'IFN- α augmente la production d'ARNm de *TRIM5 α_{hu}* et amplifie la restriction du virus MLV-N dès son entrée dans la cellule (Sakuma et al. 2007). L'immunité innée conventionnelle peut donc réguler l'expression de *TRIM5 α* .

1.2.4.3.7.2 L'effet du choc toxique sur TRIM5 α

Lorsqu'un choc thermique survient, comme lorsque des cellules normalement incubées à 37°C sont incubées à des températures élevées telles que 42°C, les cellules produisent une réponse au choc thermique les aidant à se remettre des dommages causés par ce stress. Cette réponse peut se traduire de plusieurs façons : un changement dans le repliement de la protéine, une agrégation protéique ou la dégradation de la protéine via la voie de

dégradation par le protéasome de la cellule (Anderson et al. 2008). Une étude a permis de constater que lors d'un choc thermique, une baisse du niveau de la restriction du VIH-1 par TRIM5 α_{rh} se produisait et que cette diminution n'était pas causée par la perte de stabilité de l'expression de la protéine suite au choc thermique (Anderson et al. 2008). Il a aussi été observé que le choc thermique seul était suffisant pour secourir les produits de la transcription inverse et l'incorporation de l'ADN viral dans le noyau (Anderson et al. 2008). Finalement, il a été également constaté que le choc thermique réduisait la capacité de TRIM5 α à former des corps cytoplasmiques (Anderson et al. 2008).

1.2.4.3.7.3 L'effet de la cyclophiline A sur TRIM5 α

La cyclophiline A (CypA) est une protéine faisant partie de la famille des cyclophilines. Ces dernières sont hautement conservées entre les espèces et sont abondamment exprimées dans plusieurs tissus des organismes eucaryotes et procaryotes. La CypA est capable de se lier à la protéine de capsid rétrovirale du VIH-1. Elle catalyse la trans-isomérisation du lien G89-P90 de la protéine de capsid facilitant ainsi l'infection des cellules par le VIH-1. Le site de liaison à la CypA se trouve dans le gène *pr55gag*. Ce site est formé de la séquence en forme de boucle Pro85-Pro93 de la protéine de capsid rétrovirale du VIH-1 où la présence des acides aminés A88, G89 et P90 est cruciale à l'interaction entre CypA et la protéine de capsid (Bosco et al. 2002; Sokolskaja et al. 2004). Chez les cellules humaines, la CypA augmente l'infection par le VIH-1. TRIM5 α_{hu} et la CypA modulent le taux d'infection par le VIH-1 de façon indépendante. Chez les cellules humaines, l'interaction entre la protéine de capsid et la CypA est importante pour un taux d'infection maximal. Lorsque cette interaction est empêchée, l'infection par le VIH-1 est réduite de façon indépendante de l'expression de TRIM5 α_{hu} . De plus, cette régulation du taux

d'infection par le VIH-1 est indépendante de l'entrée du virus (Sokolskaja et al. 2006; Towers 2007).

La cyclosporine A (CsA) est une drogue immunosuppressive capable de se lier avec une haute affinité à la CypA (Sokolskaja et al. 2004). Elle empêche la CypA de se lier avec la protéine de capsid du VIH-1. En empêchant cette interaction, elle augmente donc l'infection par le VIH-1 dans les cellules de primates alors qu'elle réduit l'infection par le VIH-1 dans les cellules humaines. Elle agit donc comme inhibiteur compétitif (Noser et al. 2006). Elle est cependant incapable d'inhiber les rétrovirus qui ne possèdent pas de site de liaison à la CypA sur leur protéine de capsid, tel le SIV_{mac239} (Sokolskaja et al. 2004).

1.2.4.3.8 Les mutations dans le domaine B30.2

Il a été démontré par des constructions de protéines chimériques que le domaine B30.2 de TRIM5 α est le principal déterminant de la spécificité de la restriction rétrovirale puisqu'il détermine la cible virale. En effet, un déterminant majeur de la restriction de TRIM5 α se trouvait entre les acides aminés 286 à 371, dans un segment incluant la région variable v₁ du domaine B30.2. Il a été constaté que lorsque l'acide aminé R332 de TRIM5 α_{hu} était remplacé par P332, l'activité de restriction contre le VIH-1 augmentait d'un facteur de 10 (Stremlau et al. 2005). Ultérieurement, d'autres expériences ont permis de constater que le changement de l'acide aminé R332 (chargé positivement) par un acide aminé quelconque possédant une chaîne latérale non chargée augmentait la résistance au VIH-1 par un facteur de dix (Li et al. 2006b).

1.2.4.4 La protéine TRIMCyp

L'existence de TRIMCyp a été découverte lors d'études sur l'effet de la CypA sur le VIH-1 dans des cellules de singe hiboux (Nisole et al. 2004; Sayah et al. 2004). Cette protéine n'est retrouvée que chez les différentes espèces de singe hiboux bien que des isoformes ayant une activité de restriction différente aient été découverts récemment (Brennan et al. 2008; Virgen et al. 2008; Wilson et al. 2008).

1.2.4.4.1 La structure de la protéine TRIMCyp

TRIMCyp est une protéine de 54 kD formée d'une fusion entre les exons un à sept de *TRIM5α* et l'ADNc complet codant pour la protéine CypA. Elle possède les 299 acides aminés de la portion N-terminale de *TRIM5α* et les 165 acides aminés de la CypA reliés par 11 acides aminés encodés par la région non transcrrite 5'(UTR) (figure 1.11) (Sayah et al. 2004).

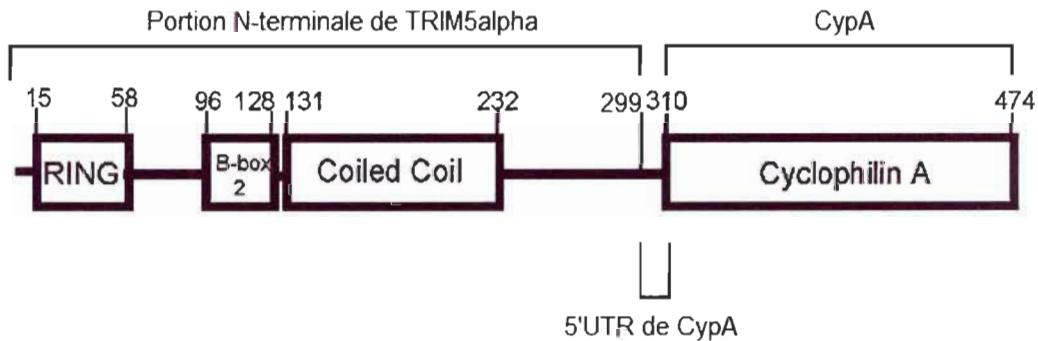


FIGURE 1.11 : La structure de TRIMCyp
 (adapté de Diaz-Griffero et al. 2007)

TRIMCyp est formée des 299 acides aminés de la portion N-terminale de TRIM5 α , de 11 acides aminés de la région non transcrrite 5'(UTR) de la CypA et des 165 acides aminés de la CypA.

1.2.4.4.2 Le mécanisme d'action de TRIMCyp

Le mécanisme d'action de la protéine TRIMCyp est très similaire à celui de TRIM5 α . Toutefois, l'interaction entre TRIMCyp et la protéine de capsid du rétrovirus se fait au niveau de la CypA et non au niveau du domaine B30.2 comme c'est le cas pour TRIM5 α . Les différents rétrovirus inhibés par TRIMCyp sont : (a) le FIV, (b) le VIH-1 et (c) le SIV_{agm} (Diaz-Griffero et al. 2007).

Bien que TRIMCyp possède une activité de restriction contre certains virus inhibés par TRIM5 α , il existe des différences au niveau du rôle de leurs domaines respectifs. En effet, contrairement à TRIM5 α , le domaine RING et B-box 2 ne sont pas indispensables à l'activité de restriction de TRIMCyp (Diaz-Griffero et al. 2007). Également, alors que la présence d'un domaine RING et B-box 2 intacts contribuent à un taux de dégradation rapide de la protéine TRIM5 α , seul le domaine RING contribue à la dégradation rapide de TRIMCyp.

(Diaz-Griffero et al. 2006). De plus, chez TRIMCyp, le domaine coiled-coil participe à l'inhibition, mais n'est pas essentiel, puisque lorsqu'il est absent, la restriction contre le VIH-1 et le SIV_{mac} est diminuée considérablement, mais n'est pas abolie comme dans le cas de TRIM5α (Diaz-Griffero et al. 2007).

1.2.4.4.3 Les nouveaux isoformes de TRIMCyp

Jusqu'à récemment, TRIMCyp n'avait été retrouvé que chez les singes hiboux. Cependant, une nouvelle fusion entre TRIM5α et TRIMCyp a été retrouvée chez le singe rhésus (*Macaca mulatta*) lors d'une recherche des différents polymorphismes existants au niveau de l'exon huit de *TRIM5α* (Wilson et al. 2008). La protéine TRIMCyp des singes hiboux est encodée par les exons deux à sept de *TRIM5* et par le gène de la CypA qui a été inséré à environ 900 nucléotides en aval de l'exon huit de *TRIM5* lors d'un événement de rétrotransposition. Pour sa part, la nouvelle protéine appelée TRIMCyp_{rh} est plutôt encodée par les exons deux à six du gène *TRIM5* et par le gène de la CypA qui remplace les exons sept et huit de *TRIM5* (Wilson et al. 2008). Lorsque l'activité de restriction de TRIMCyp_{rh} a été étudiée, les résultats ont démontré que cette protéine n'inhibait pas le VIH-1, mais qu'elle était capable d'inhiber fortement le VIH-2 et le FIV alors que TRIMCyp des singes hiboux inhibait le VIH-1 et le FIV. Pour leur part, les virus SIV_{mac} et EIAV n'étaient pas inhibés par aucun des deux TRIMCyp (Wilson et al. 2008). Également, l'effet de la CsA et l'effet du protéasome étaient similaires pour TRIMCyp et TRIMCyp_{rh} (Wilson et al. 2008). Un deuxième isoforme de TRIMCyp a été trouvé chez le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*). Cette protéine TRIMCyp_{pgt} contient les exons deux à six de *TRIM5* liés à un ADNc complet de la CypA située dans la région non codante 3' de *TRIM5*. Ce TRIMCyp_{pgt} n'inhibe pas le VIH-1, mais inhibe le VIH-2 (Virgen et al. 2008). Finalement, un troisième isoforme de TRIMCyp a été trouvé chez les cellules de singe à longue queue

(*Macaca fascicularis*). Ce TRIMCyp_{gt} possède une séquence identique à 97% à celle trouvée pour le singe à queue de cochon et n'inhibe pas le VIH-1 et le SIV_{mac239} (Brennan et al. 2008).

1.3 La problématique, l'hypothèse et les objectifs du projet

Le niveau de restriction par TRIM5α dépend de l'orthologue du gène exprimé ainsi que de la souche rétrovirale utilisée. Plusieurs orthologues simiens de TRIM5α inhibent le VIH-1 à différents degrés, ce qui pourrait en faire un bon gène candidat pour des applications de thérapie génique. Cependant, l'inhibition dans des cellules de macaque n'est que partielle et lorsque TRIM5α simien est exprimé dans des macrophages humains, l'inhibition par le VIH-1 n'est pas empêchée mais est seulement retardée (Anderson et Akkina 2005).

Comme il a été mentionné précédemment, l'orthologue humain de TRIM5α n'inhibe pas le VIH-1. Il est probable que les TRIM5α chez nos ancêtres primates et chez l'humain aient évolué pour inhiber des rétrovirus dont certains sont maintenant éteints (Johnson et Sawyer 2009). Cependant, aucun orthologue de TRIM5α n'a émergé en réponse à l'épidémie par le VIH-1. Puisque ce rétrovirus n'infecte l'humain que depuis moins de 100 ans, TRIM5α n'aurait pas encore évolué suffisamment pour inhiber efficacement ce rétrovirus (Johnson et Sawyer 2009). Considérant les différences d'efficacité des orthologues de TRIM5α à inhiber le VIH-1 ainsi qu'une homologie de 87% entre les séquences nucléotidiques de *TRIM5α_{hu}* et de *TRIM5α_{rh}*, l'hypothèse de cette étude est donc que TRIM5α_{hu} pourrait être modifiée par des manipulations génétiques afin de produire une nouvelle protéine possédant des effets antiviraux contre le VIH-1.

Les objectifs à court terme du projet sont les suivants : (a) générer des mutations aléatoires par mutagenèse dirigée dans la protéine TRIM5 α_{hu} et (b) isoler par un criblage fonctionnel les différents mutants présentant une activité de restriction accrue contre le VIH-1. Pour leur part, les objectifs à long terme sont : (a) identifier de nouveaux déterminants sensibles à la restriction par TRIM5 α_{hu} et (b) réussir à exprimer un gène *TRIM5 α_{hu}* muté le plus similaire possible au type sauvage afin qu'il puisse être utilisé dans des stratégies de thérapie génique basées sur le transfert de gènes.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Le matériel utilisé

2.1.1 La culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires utilisées lors de ce projet sont les suivantes : (a) les fibroblastes de queue de souris « *Mus Dunnii* tail fibroblasts » (MDTF), (b) les cellules humaines embryonnaires de rein HEK293T, (c) les cellules humaines de carcinome de col utérin HeLa et (d) les cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671. Les différents types cellulaires ont été cultivés dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, de la pénicilline à une concentration finale de 100 unités/mL et de la streptomycine à une concentration finale de 100 µg/mL. Les différentes transfections ont été réalisées avec du polyéthylenimine (PEI), provenant de la compagnie Polysciences Inc., sur des cellules HEK293T à un pourcentage de confluence de 70%, et ce, selon le protocole du manufacturier. Les différentes mises en plaque de cellules ont été effectuées dans les conditions suivantes : pour les plaques 6 trous, 125 000 cellules ont été placées dans un volume de 2 mL de milieu de culture alors que pour les plaques 24 trous, 25 000 cellules ont été placées dans 400 µL de milieu de culture.

2.1.2 La culture bactérienne

Les bactéries ont été cultivées en milieu liquide et sur gélose dans du Luria Bertoni (LB) concentré à 1 X contenant de l'ampicilline à une concentration

finale de 0,1 mg/mL. Afin d'effectuer les différents clonages et transformations, les bactéries *E.coli* de souche DH5α ont été utilisées. Ces bactéries compétentes ont été produites selon un processus de lavages successifs à l'eau et au glycérol qui a eu pour effet de débarrasser les bactéries des sels contenus dans leur milieu de culture afin de faciliter la transformation subséquente.

2.1.3 La transformation bactérienne

Les différentes transformations bactériennes ont été effectuées par électroporation. Les bactéries compétentes ont été électroporées par aliquots de 50 µL dans des cuvettes de 0,2 cm avec 2,5 kV. Elles ont ensuite été placées dans du milieu SOC pendant 1 heure pour leur permettre de se remettre du choc causé par l'électroporation, puis elles ont été étalées sur géloses. Ces dernières ont ensuite été incubées à 37°C pendant 16 heures.

2.1.4 Les extractions et les purifications d'ADN

Toutes les trousseuses utilisées afin de réaliser les différentes extractions et purifications d'ADN provenaient de la compagnie QIAGEN. Les réactions ont été effectuées selon le protocole du manufacturier, et ce, à un détail près : le volume d'élution des minipreps, des extractions de gel et des purifications sur colonne était de 30 µL au lieu de 50 µL. Les différentes réactions effectuées afin d'extraire l'ADN plasmidique ont été réalisées avec les trousseuses « QIAprep Spin Miniprep Kit », pour les réactions de minipreps, et « HiSpeed Plasmid Midi Kit », pour les réactions de midipreps ». L'ADN plasmidique a été purifié sur colonne de silice et par extraction de gel avec les trousseuses « QIAquick Purification Kit » et « QIAquick Gel Extraction Kit » respectivement. L'ADN total a été extrait des cellules à l'aide de la trousse « DNeasy Blood & Tissue Kit ».

2.1.5 Les enzymes de restriction

Les enzymes et les tampons utilisés afin de réaliser les différentes digestions enzymatiques provenaient de la compagnie « New England Biolabs » (NEB). Les différentes digestions ont été effectuées à l'aide de 0,5 unité/ μ L des enzymes suivantes : (a) EcoRI, (b) Xhol, (c) DpnI, (d) BamHI, (e) SbfI, (f) BpI et (g) Avall. Les tampons utilisés afin de réaliser les différentes digestions étaient concentrés à 1 X et étaient les suivants : (a) le tampon EcoRI pour les digestions en présence de Xhol et EcoRI, (b) le tampon quatre pour les digestions avec DpnI, (c) le tampon BamHI pour les digestions avec BamHI et Xhol, (d) le tampon quatre pour les digestions en présence de Xhol, EcoRI, SbfI et BpI et (e) le tampon quatre pour les digestions avec Avall, EcoRI et Xhol. Les différentes digestions ont été effectuées à 37°C pendant 2 heures.

2.1.6 Les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) à fidélité élevée et les ligations

Les différentes PCR effectuées avec un taux élevé de fidélité de réPLICATION de l'enzyme ont été réalisées avec 20 unités/mL d'enzyme Phusion de la compagnie NEB dans du tampon « High Fidelity » (HF) concentré à 1 X. Pour leur part, les ligations ont été réalisées à l'aide de 0,5 unités/ μ L d'enzyme T₄ DNA ligase et du tampon T₄ DNA ligase à une concentration finale de 1 X, tous deux provenant de la compagnie NEB. Les réactions ont été effectuées à 16°C pendant 16 heures.

2.1.7 Les migrations sur gel d'agarose

Les différentes migrations sur gel d'agarose ont toutes été effectuées à 115 volts sur des gels de 0,7%, 1% ou 1,5% d'agarose. Le gel de 0,7% d'agarose a été utilisé pour les migrations des produits de digestion de pMIP-TRIM5 α_{hu} wt effectuées afin d'obtenir du vecteur pMIP linéarisé. Pour sa part, le gel de 1% d'agarose a été employé pour les migrations des produits de digestion de pBluescript et pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt. Le gel de 1,5% d'agarose a été utilisé pour les migrations des produits de digestion de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté et des différents produits de PCR purifiés.

2.1.8 Les plasmides utilisés

2.1.8.1 Le plasmide pMIP-TRIM5 α_{hu}

Le plasmide pMIP-TRIM5 α_{hu} (figure 2.1) est un vecteur rétroviral qui a été construit dans le laboratoire du Dr. Jeremy Luban (Berthoux et al. 2005). Ce plasmide possède une taille de 8 000 paires de bases et son insert *TRIM5 α_{hu}* possède une taille de 1482 paires de bases.

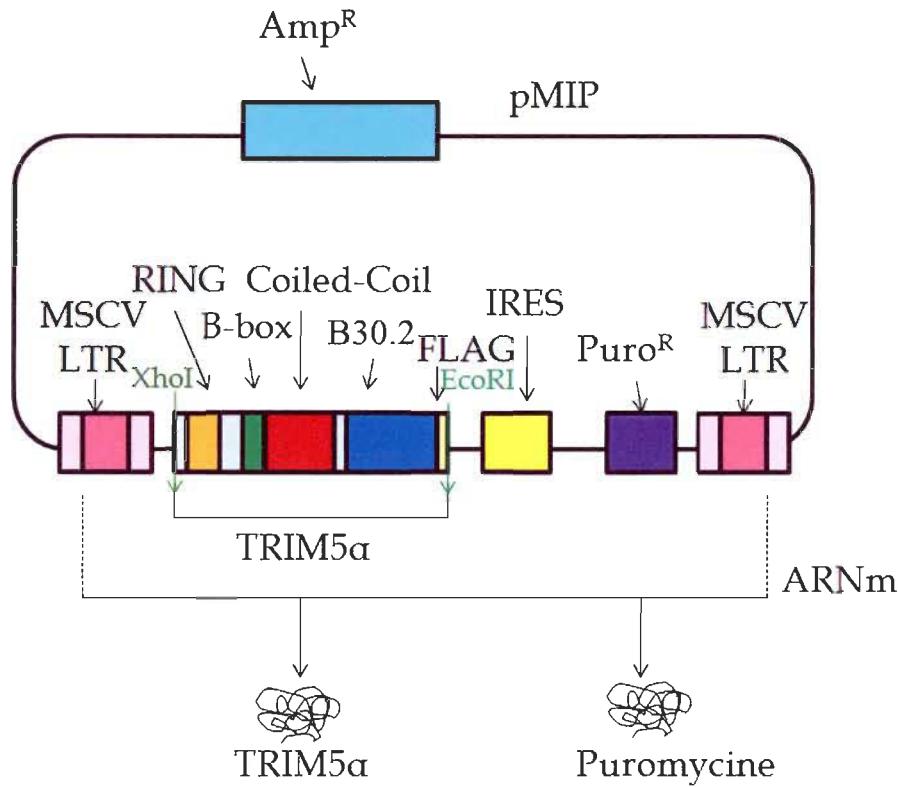


FIGURE 2.1 : La carte de pMIP-TRIM5 α _{hu}

Le plasmide contient le gène TRIM5 α suivi d'une étiquette FLAG, une séquence IRES, les LTR et les gènes de résistance à la puromycine et à l'ampicilline. Un site de restriction pour les enzymes Xhol et EcoRI se trouve respectivement aux extrémités 5' et 3' du gène TRIM5 α .

Les lettres MIP dans pMIP signifient **MSCV** (« Murine Stem Cell Virus retroviral vector »), **IRES** (« Internal Ribosomal Entry Site ») et **Puromycin** (gène de résistance à la puromycine). Le IRES permet d'exprimer deux gènes à partir d'un seul ARNm, soit dans ce cas, la protéine TRIM5 α _{hu} et le gène de résistance à la puromycine. En plus de la résistance à la puromycine, le plasmide pMIP contient également une cassette de résistance à l'ampicilline et deux séquences de longues répétitions terminales (LTR) nécessaires à

l'insertion du plasmide dans le génome de la cellule hôte. Lors de la construction de pMIP-TRIM5 α_{hu} , une étiquette FLAG servant de marqueur pour la détection de la protéine a été ajoutée à l'extrémité C-terminale de *TRIM5 α_{hu}* . Un site de restriction pour les enzymes Xhol et EcoRI a également été ajouté en amont de *TRIM5 α_{hu}* et en aval du FLAG, respectivement.

2.1.8.2 Le plasmide pBluescript II KS+

Le plasmide pBluescript II KS+ (Stratagene) possède une taille de 3 000 paires de bases et contient un gène de résistance à l'ampicilline. Il a été utilisé afin de faciliter les clonages (figure 2.2). Il n'est pas un plasmide d'expression.

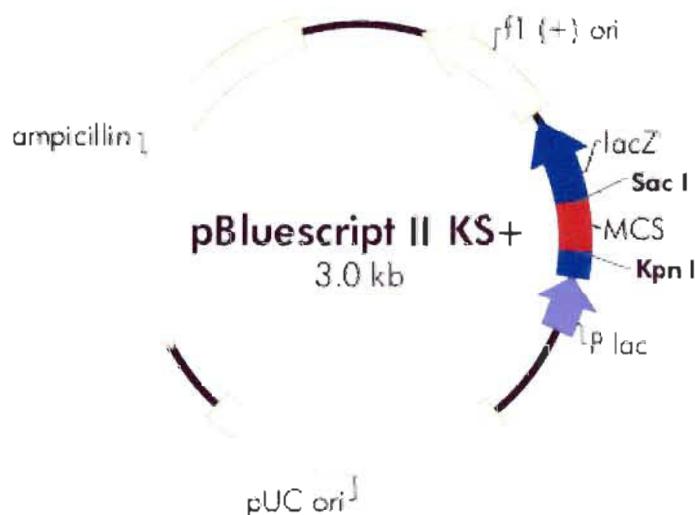


FIGURE 2.2 : La carte de pBluescript II KS+ (Stratagene 2008)

Ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline et un site de restriction pour EcoRI et Xhol faisant partie du site de clonage multiple ou « multiple cloning site » (MCS).

2.2 Description générale de la méthode

Afin de réaliser le projet, les différentes étapes suivantes ont été réalisées : (a) construire la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté, (b) introduire la banque construite dans des cellules, (c) infecter les différentes cellules exprimant la banque de *TRIM5 α_{hu}* mutés par du virus VIH-1, (d) isoler les cellules résistantes à l'infection par le VIH-1 et (e) vérifier si la résistance accrue au VIH-1 des clones sélectionnés est due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté.

2.2.1 Construire la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté

La technique de mutagenèse aléatoire par PCR a été utilisée afin de créer la banque de gènes *TRIM5 α_{hu}* muté. Cette mutagenèse a été appliquée au domaine B30.2 de la protéine TRIM5 α_{hu} dont la taille est de 600 paires de bases. Ce domaine a été choisi puisqu'il est le principal déterminant de la spécificité de restriction de TRIM5 α_{hu} .

2.2.1.1 La technique de mutagenèse utilisée

La mutagenèse a été effectuée à l'aide de la trousse « Diversify™ PCR Random Mutagenesis kit » de la compagnie Clontech (Clontech 2008). Cette trousse contenait une série de neuf tampons dont la composition variait au niveau de la quantité de manganèse et de dGTP. Ces variations ont eu pour effet de provoquer une perte de fidélité de réPLICATION au niveau de l'enzyme Taq TITANIUM qui a alors introduit des mutations aléatoires lors de la réaction de PCR (tableau 2.1).

TABLEAU 2.1
La composition des différents tampons et le taux de mutations attendu par
1 000 paires de bases (Clontech 2008)

	Condition de tampon									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Standard
Mutations par 1 000 pb	2,0	2,3	2,7	3,5	4,6	4,8	5,8	7,2	8,1	0,4
MnSO₄ (μM; final rx)	0	160	320	480	640	640	640	640	640	0
dGTP (μM; final rx)	40	40	40	40	40	80	120	160	200	200

Afin de s'assurer que cette technique d'introduction de mutations par PCR est fonctionnelle, un contrôle positif a été fourni avec la trousse de mutagenèse. Il consiste en un plasmide contrôle qui contient une série de sites contenant trois des quatre bases constituant le site de restriction de l'enzyme Taq I (5'-T↓CGA-3'). Lorsque la PCR du plasmide contrôle est réalisée à l'aide des amorces fournies avec la trousse de mutagenèse, il se produit des mutations qui génèrent des sites de restriction pour l'enzyme Taq I (Clontech 2008).

2.2.1.2 La mutagenèse du domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}*

Afin de vérifier le fonctionnement de la technique, trois réactions avec le plasmide contrôle ont été réalisées selon le protocole du manufacturier (Clontech 2008) : (a) en utilisant le tampon un, (b) en employant le tampon neuf et (c) avec le tampon standard. Suite à ces trois réactions, la mutagenèse du domaine B30.2 a été réalisée dans le tampon deux puisqu'il permettait d'obtenir une à deux mutations par 600 paires de bases (tableau 2.2). Pour ce faire, des amorces complémentaires aux séquences flanquant le domaine B30.2 ont été utilisées à une concentration finale de 0,2 μM. Leur séquence était la suivante :

sens, 5'-ACAGATGTCCGACGCTACTGGGTT-3' et anti-sens, 5'-TCCTGAATTCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC-3'. L'amorce anti-sens contenait le site de restriction EcoRI. Une quantité de 100 ng de pMIP-TRIM5 α_{hu} a été utilisée comme matrice et les dNTP ont été utilisés à une concentration finale de 0,2 mM. Suite à la PCR, les produits ont été purifiés sur gel.

TABLEAU 2.2
Les conditions de la PCR réalisée afin de muter le domaine B30.2

Étape	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	94	2 minutes
Dénaturation	94	15 secondes
Hybridation	60	15 secondes
Élongation	68	20 cycles 1 minute
Élongation finale	68	1 minute

2.2.1.3 La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène *TRIM5 α_{hu}*

La première technique a été utilisée afin d'amplifier le reste du gène *TRIM5 α_{hu}* et le reste du plasmide pMIP en utilisant la banque de domaines B30.2 mutés comme méga-amorce lors d'une réaction de PCR conventionnelle, c'est-à-dire dans des conditions de fidélité élevée de réPLICATION (figure 2.3). Puisque le plasmide pMIP-TRIM5 α_{hu} possède une grande taille et qu'il est par conséquent plus fastidieux à amplifier par PCR, le vecteur pBluescript-TRIM5 α_{hu} a été construit afin de servir de matrice pour amplifier le reste du plasmide. Afin d'éliminer la matrice résiduelle suite à la PCR, une digestion par DpnI, une

enzyme coupant un site méthylé, a été réalisée. Ensuite, la banque de gènes *TRIM5 α_{hu}* mutés a été reclonée dans le vecteur pMIP.

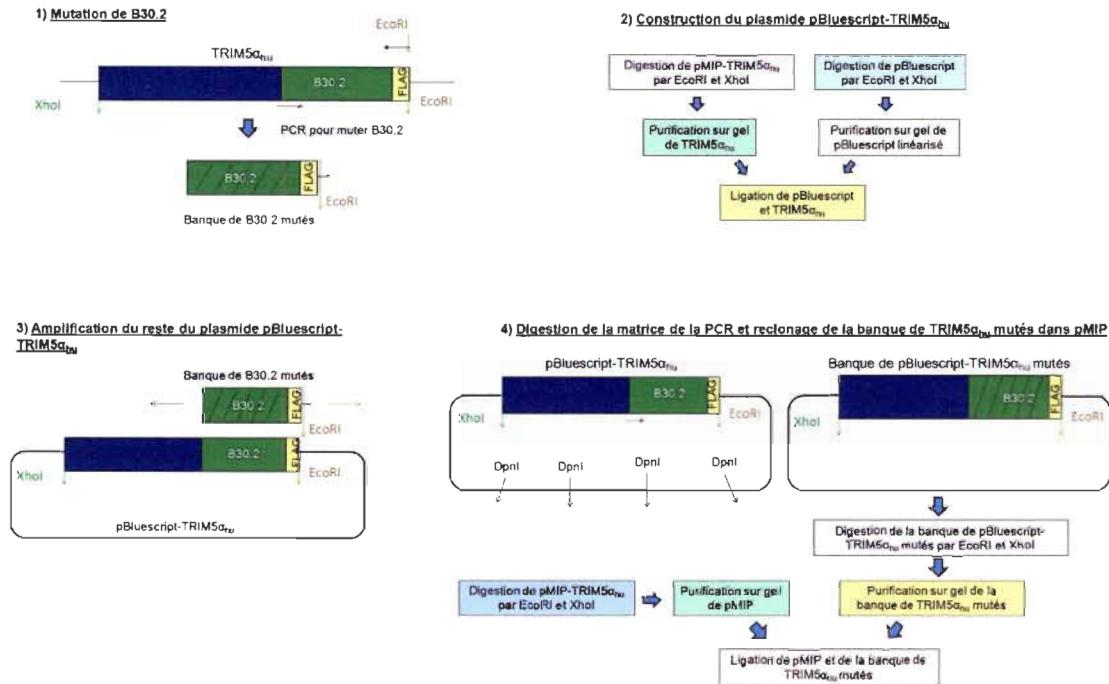


FIGURE 2.3 : Schéma illustrant la première stratégie utilisée pour produire la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté

- 1) Le domaine B30.2 de *TRIM5 α_{hu}* est muté à l'aide d'une mutagenèse aléatoire par PCR.
- 2) Le plasmide pBluescript-*TRIM5 α_{hu}* est construit à partir de pBluescript et de pMIP-*TRIM5 α_{hu}* wt.
- 3) Le reste du plasmide pBluescript-*TRIM5 α_{hu}* muté est amplifié par PCR conventionnelle en utilisant la banque des domaines B30.2 mutés comme méga-amorce.
- 4) Après la PCR, la matrice résiduelle est éliminée suite à une digestion par l'enzyme DpnI. La banque de *TRIM5 α_{hu}* mutés est ensuite reclonée dans le vecteur pMIP afin de former une banque de pMIP-*TRIM5 α_{hu}* mutés.

Pour effectuer la construction de la matrice pBluescript-TRIM5 α_{hu} , 500 ng du plasmide pBluescript II KS+ et 2 μ g de pMIP-TRIM5 α_{hu} wt ont été digérés par les enzymes de restriction EcoRI et Xhol dans un volume de 20 μ L. Ils ont été purifiés sur gel. Les bandes correspondant à pBluescript coupé et TRIM5 α_{hu} ont été extraites et liquées. La ligation a été effectuée avec 10 μ L de TRIM5 α_{hu} et 1 μ L de pBluescript dans un volume de 20 μ L. Un volume de 2 μ L des produits de la ligation a été transformé, les transformants ont été étalés sur une gélose, puis une midiprep a été réalisée à partir d'un clone obtenu afin d'obtenir le vecteur pBluescript-TRIM5 α_{hu} . Une fois la matrice construite, la PCR servant à amplifier le reste du plasmide a été réalisée (tableau 2.3). Pour ce faire, 400 ng de méga-amorce B30.2 muté, 20 ng de matrice pBluescript-TRIM5 α_{hu} et des dNTP à une concentration finale de 0,2 mM ont été utilisés.

TABLEAU 2.3
Les conditions de la PCR réalisée afin d'amplifier le reste du gène TRIM5 α_{hu} avec le domaine B30.2 comme méga-amorce

Étape	Température ($^{\circ}$ C)	Durée
Dénaturation initiale	99	1 minute
Dénaturation	99	15 secondes
Hybridation	65	15 secondes
Élongation	72	4 minutes
Élongation finale	72	4 minutes

Les produits de cette PCR ont ensuite été digérés dans un volume de 57 μ L par DpnI afin d'éliminer la matrice. Puis, ils ont été purifiés sur gel et des aliquots de 2 μ L ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes afin d'amplifier la banque de pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté. Les produits de chaque réaction de transformation ont été étalés sur trois géloses. Les colonies obtenues ont été mises en suspension dans un volume total de 75 mL de LB avec ampicilline. Un volume de 0,5 mL de ces bactéries a été placé dans

150 mL de LB avec ampicilline et les bactéries ont été cultivées pendant 16 heures. Ensuite, l'ADN plasmidique a été extrait par une midiprep et 10 µg de la banque de pBluescript-TRIM5 α_{hu} a été digérée par les enzymes de restriction EcoRI et Xhol dans un volume de 100 µL. Une quantité de 10 µg de pMIP-TRIM5 α_{hu} wt a été digérée dans un volume de 100 µL. Les produits des deux digestions précédentes ont été purifiés sur gel. Les bandes correspondant à pMIP coupé et à la banque de *TRIM5 α_{hu}* mutés ont été extraites et liguées. La ligation a été réalisée avec 15 µL de *TRIM5 α_{hu}* mutés et 5 µL de pMIP dans un volume de 30 µL. Par la suite, les produits de ligation ont été purifiés sur colonne et amplifiés lors de transformations. Les transformations ont été effectuées par aliquots de 4 µL et chacun des aliquots a été étalé sur trois géloses. Les colonies ont été mises en suspension dans un volume total de 75 mL de LB avec ampicilline. Puis, un volume de 0,5 mL de ces bactéries a été placé dans un volume de 150 mL de LB avec ampicilline. Les bactéries ont été cultivées pendant 16 heures et l'ADN plasmidique a été extrait par midiprep. La construction de la banque pMIP-TRIM5 α_{hu} muté était alors complétée.

2.2.1.4 La deuxième technique utilisée pour amplifier le reste du gène *TRIM5 α_{hu}*

La deuxième stratégie employée afin d'obtenir la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté consiste tout d'abord à amplifier le reste du gène *TRIM5 α_{hu}* et ensuite à amplifier tout le gène *TRIM5 α_{hu}* muté (figure 2.4).

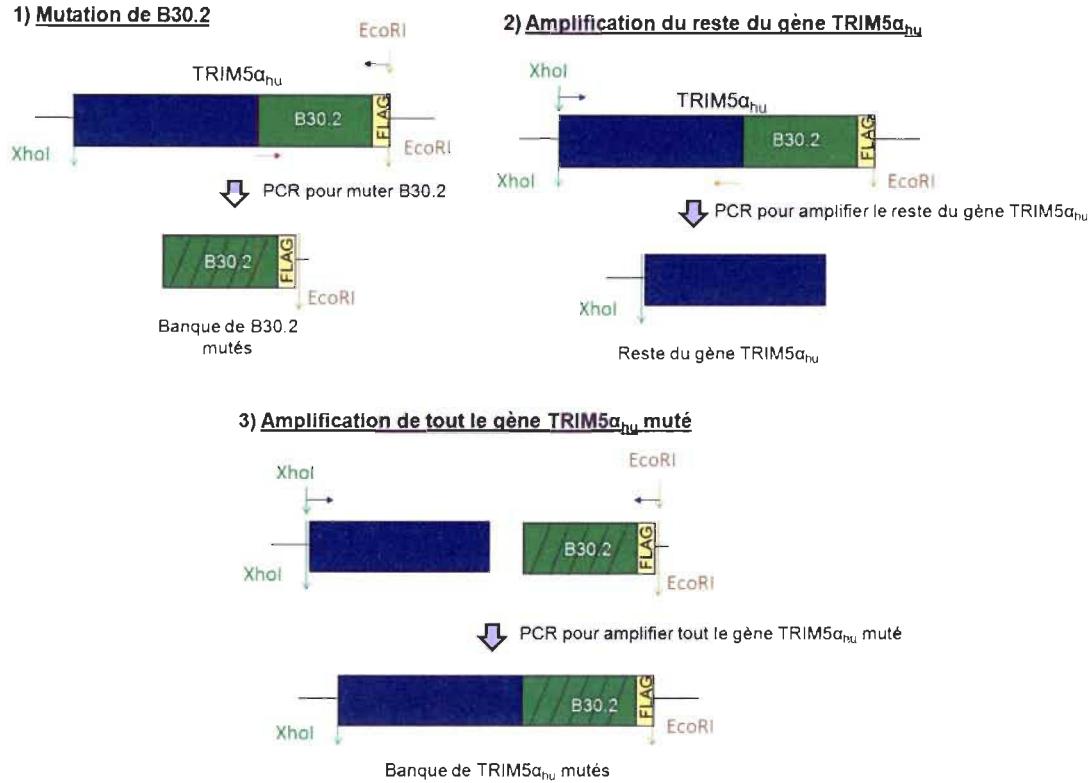


FIGURE 2.4 : Schéma illustrant la deuxième stratégie utilisée pour produire la banque de *TRIM5α_{hu}* muté

- 1) *Le domaine B30.2 est muté à l'aide d'une mutagenèse aléatoire par PCR.*
- 2) *Le reste du gène TRIM5α_{hu} est amplifié à l'aide d'une réaction de PCR conventionnelle.*
- 3) *Le reste du gène TRIM5α_{hu} muté est amplifié suite à une PCR conventionnelle en utilisant les produits des deux étapes précédentes comme matrice.*

Pour ce faire, deux réactions de PCR dans des conditions de fidélité élevée ont été effectuées. Une quantité de 2 ng de matrice pMIP-*TRIM5α_{hu}* de type sauvage, des amorces à une concentration finale de 0,2 µM ainsi que des dNTP à une concentration finale de 0,2 mM ont été utilisés pour la première réaction (tableau 2.4). Les amorces employées se retrouvaient respectivement en amont de la protéine *TRIM5α_{hu}*.

(sens : 5'-GTTCCCTCGAGATGGCTTCTGGAATCCTGGTTAAT-3') et en amont du domaine B30.2 (anti-sens : 5'-AACCCAGTAGCGTCGGACATCTGT-3'). Cette dernière amorce contenait un site de restriction pour l'enzyme Xhol.

TABLEAU 2.4
Les conditions de PCR utilisées afin d'amplifier le reste de *TRIM5α_{hu}*

Étape	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	98	2 minutes
Dénaturation	98	20 secondes
Hybridation	56	20 secondes
Élongation	72	25 cycles 1 minute
Élongation finale	72	5 minutes

Suite à cette PCR, 45 µL ont été purifiés sur gel d'agarose et la bande correspondant à *TRIM5α_{hu}* sans son domaine B30.2 a été extraite.

Afin d'effectuer la deuxième PCR (tableau 2.5), une quantité de 7 µL de la PCR précédente et une quantité de 7 µL des produits de la PCR réalisée afin de muter le domaine B30.2 ont été utilisés comme matrice. La concentration finale de dNTP était de 0,2 mM et les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 0,2 µM. Ces dernières étaient composées des séquences complémentaires des extrémités du gène de la protéine TRIM5α_{hu} (sens : 5'-TCCTGAATTCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC-3' et anti-sens : 5'-GTTCCCTCGAGATGGCTTCTGGAATCCTGGTTAAT-3'). L'amorce sens contenait un site de restriction pour l'enzyme Xhol tandis que l'anti-sens avait un site de restriction pour l'enzyme EcoRI.

TABLEAU 2.5
La PCR réalisée afin d'amplifier le gène complet de *TRIM5α_{hu}* muté

Étape	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	98	2 minutes
Dénaturation	98	20 secondes
Hybridation	56	20 secondes
Élongation	72	50 secondes
Élongation finale	72	5 minutes

Une fois cette PCR réalisée, 45 µL ont été purifiés sur colonne. Ensuite, les produits purifiés ont été digérés par EcoRI et Xhol dans un volume de 40 µL. Une quantité de 10 µg de pMIP-*TRIM5α_{hu}* *wt* a aussi été digérée par ces mêmes enzymes dans un volume de 100 µL. Les produits des deux digestions ont été déposés sur gel et une migration a été réalisée. Les bandes correspondant à la banque de *TRIM5α_{hu}* muté et à pMIP coupé ont été extraites puis liguées. La ligation a été réalisée avec 15 µL de la banque de *TRIM5α_{hu}* muté et 5 µL de pMIP dans un volume de 30 µL. Les produits de la ligation ont ensuite été purifiés sur colonne et transformés par aliquots de 4 µL afin d'amplifier la banque. Chaque transformation a été étalée sur trois géloses. Dix clones ont été repiqués et placés en culture dans 2 mL de LB avec ampicilline. L'ADN plasmidique des dix clones a été extrait par miniprep afin de s'assurer de la présence de mutations. Ces ADN plasmidiques ont été séquencés à la plate-forme d'analyses biomoléculaires de l'Université Laval et les chromatogrammes résultants ont été analysés avec la version 9.0 du logiciel Mac Vector. Les colonies restantes suite à la transformation ont été mises en suspension dans un volume total de 30 mL de LB avec ampicilline. Ensuite, 0,5 mL de ces bactéries ont été placées dans 150 mL de LB avec ampicilline et elles ont été cultivées pendant 16 heures. Une midiprep a été réalisée afin d'extraire l'ADN plasmidique. La construction de la banque de pMIP-*TRIM5α_{hu}* muté était alors complétée.

2.2.2 Introduire la banque construite dans des cellules

Une fois la construction de la banque de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté réalisée, l'étape suivante était d'exprimer les différentes versions de TRIM5 α_{hu} muté dans des cellules. Pour ce faire, la banque de TRIM5 α_{hu} muté a été introduite dans les cellules au moyen de vecteurs rétroviraux.

2.2.2.1 Production des vecteurs rétroviraux

Les différents vecteurs rétroviraux ont été construits par co-transfection de trois plasmides dans des cellules HEK293T (tableau 2.6). Le milieu a été changé 16 heures après la transfection et les vecteurs rétroviraux ont été récupérés 36 heures post-transfection.

TABLEAU 2.6
Les différentes quantités de plasmides utilisées pour produire les vecteurs rétroviraux MIP-TRIM5 α_{hu} , VIH-TK et VIH-GFP

Vecteurs	1 ^{er} plasmide : gènes gag et pol	2 ^e plasmide : protéine d'enveloppe	3 ^e plasmide : plasmide exprimant le gène d'intérêt → gènes transduits
MIP-TRIM5 α_{hu} muté	10 µg de pCL-Eco (MLV ^a)	5 µg de pMDG (VSV-G)	10 µg de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté → TRIM5 α_{hu} et puromycine
VIH-TK	10 µg de pCMVΔR8.9 (VIH-1)	5 µg de pMDG (VSV-G)	10 µg de TRIP-TK → TK ^b
VIH-GFP	10 µg de pCMVΔR8.9 (VIH-1)	5 µg de pMDG (VSV-G)	10 µg de TRIPΔU3HIV-GFP → GFP

^a MLV : virus de la leucémie murine

^b TK : thymidine kinase du virus de l'herpès simplex

Le premier plasmide exprime les gènes *gag* et *pol* du rétrovirus. *Gag* code pour les protéines de structure principale soient : (a) la protéine de matrice (MA), (b) la protéine de capsid (CA) et (c) la protéine de nucléocapsid (NC) alors que *pol* code pour les enzymes virales. Le deuxième plasmide exprime la protéine d'enveloppe du rétrovirus. Pour sa part, le troisième plasmide exprime le gène d'intérêt. Le plasmide pCL-Eco exprime les gènes *gag* et *pol* du virus MLV. Pour sa part, le plasmide pCMVΔR8.9 exprime les gènes de *gag*, *pol*, *tat* et *rev* du virus VIH-1. Finalement, le plasmide pMDG exprime le gène de la protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) qui est retrouvée chez la plupart des cellules des vertébrés. Cette protéine permet au vecteur rétroviral de s'attacher aux récepteurs des cellules de la plupart des vertébrés, d'y pénétrer et de les infecter alors que les protéines d'enveloppe du VIH-1 ne lui permettent de s'attacher qu'aux cellules de primates et de quelques autres animaux. Les vecteurs pCL-Eco, pMDG et pCMVΔR8.9 ne possèdent pas de séquences LTR ce qui implique que ces plasmides ne seront pas insérés dans le génome de la cellule transfectée ou transduite. Par conséquent, les particules virales produites pourront effectuer un seul cycle viral de réPLICATION. De cette façon, l'effet d'un seul cycle d'infection par le VIH-1 pourra alors être étudié.

2.2.2.2 Transduction des cellules

Les cellules ont été transduites avec une quantité de virus infectant moins de 10% des cellules. De cette manière, un seul *TRIM5α_{hu}* muté est introduit par cellule. Cela est très important puisqu'en introduisant plus d'une version de *TRIM5α_{hu}* muté, il pourrait se produire de la compétition entre les deux *TRIM5α_{hu}* présents dans la cellule. Par exemple, un premier allèle *TRIM5α_{hu}* muté pourrait agir avec un effet dominant négatif sur le deuxième allèle *TRIM5α_{hu}* muté. Il pourrait alors en résulter une annulation de l'effet bénéfique

sur la restriction du VIH-1 alors conféré par les mutations se retrouvant sur le deuxième allèle. Afin de réaliser la transduction de MIP-TRIM5 α_{hu} muté, des cellules ont été placées dans des plaques 6 trous et ont été infectées par un procédé de « spinfection ». Celui-ci augmente le nombre de cellules transduites d'une façon encore non définie (O'Doherty et al. 2000). Pour ce faire, les étapes suivantes ont été réalisées : (a) une centrifugation à 1 800 rpm pendant 45 minutes, (b) une incubation d'une heure à 37°C et (c) une centrifugation à 1 800 rpm pendant 45 minutes. Une fois la « spinfection » effectuée, les cellules ont été incubées à 37°C pendant 16 heures puis le milieu de culture a été changé. Le lendemain, un traitement à la puromycine, à une concentration finale de 0,2 µg/mL, a été amorcé afin de conserver les cellules transduites. Trois jours plus tard, le milieu de culture a été changé.

2.2.3 Infecter les différentes cellules exprimant la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté par du virus VIH-1

2.2.3.1 L'infection avec le virus VIH-TK

Les cellules exprimant la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté ont été infectées par 5 mL de virus VIH-TK et le milieu a été changé 16 heures post-infection.

2.2.3.2 L'infection avec le virus VIH-GFP

Les cellules transduites avec la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté ont été infectées par trois doses successives de 5 mL de virus VIH-GFP et le milieu a été changé 16 heures post-infection. Ces trois doses ont permis d'atteindre le niveau d'infection le plus près possible de 100%. En effet, le but était d'éliminer

le plus de faux-positifs possibles et de conserver les clones les plus résistants à l'infection par le VIH-GFP.

2.2.4 Isoler les cellules résistantes à l'infection par le VIH-1

Deux méthodes ont été utilisées afin d'isoler ces cellules résistantes.

2.2.4.1 Méthode utilisée suite à l'infection par le virus VIH-TK des cellules exprimant la banque de *TRIM5α_{hu}* muté

Afin d'isoler les cellules exprimant *TRIM5α_{hu}* muté les plus résistantes suite à une infection par du virus VIH-TK, un traitement à la trifluorothymidine (TFT) a été réalisé. La TFT est un analogue toxique de la thymidine qui bloque la synthèse protéique de deux façons : (a) elle inhibe la thymidylate synthétase empêchant alors la production habituelle de thymidine et (b) elle est phosphorylée par la thymidine kinase et incorporée dans l'ADN lors de la synthèse d'ADN (Kaufman et Heidelberger 1964). Comme les cellules infectées par le virus VIH-TK expriment la thymidine kinase, elles sont tuées en présence de TFT et seules les cellules résistantes au virus survivent.

Afin de déterminer la quantité de TFT à utiliser lors du traitement, un test 3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxyde (XTT) a été réalisé (Weislow et al. 1989). Ce test permet de déterminer de façon qualitative la viabilité cellulaire suite à un traitement TFT réalisé à différentes concentrations. Pour déterminer la dose de TFT à utiliser, des cellules non infectées et des cellules infectées par le VIH-TK ont été placées dans des puits de plaque 24 puits et traitées à la TFT avec les

concentrations finales suivantes : (a) 0 µg/mL, (b) 0,25 µg/mL, (c) 0,5 µg/mL, (d) 1 µg/mL, (e) 1,5 µg/mL et (f) 2 µg/mL. Trois jours plus tard, une solution de XTT a été préparée : 1 mg/mL de XTT dans du « phosphate buffer saline » (PBS). Ensuite, une solution de PMS-XTT a été préparée : 1% de phénazine méthosulfate (PMS) dans la solution de XTT préparée précédemment. Puis, 500 µL de cette solution de PMS-XTT a été ajoutée à chacun des puits de la plaque 24 puits préparée trois jours auparavant. Suite à l'apparition d'une échelle de coloration orangée, la densité optique de chaque puits a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm et à 620 nm, et ce, à l'aide d'un lecteur de plaques FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). Les résultats ont été analysés avec le logiciel FLUOstar OPTIMA. Les données ont été traitées de la manière suivante : le blanc de lecture a été soustrait de chaque valeur et, ensuite, les valeurs obtenues à 620 nm (longueur d'onde de référence) ont été soustraite des valeurs obtenues à 450 nm.

2.2.4.2 Méthode utilisée suite à l'infection par le virus VIH-GFP des cellules exprimant la banque de *TRIM5α_{hu}* muté

Suite aux trois infections successives par du VIH-GFP, les cellules exprimant la banque de *TRIM5α_{hu}* muté ont été triées par cytométrie de flux à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (110 avenue des Pins Ouest, Montréal (Québec), H2W 1R7, affilié à l'Université de Montréal) sur la base de leur caractère GFP-négatif ou GFP-positif. En effet, le but était d'isoler les cellules résistantes au VIH-1, donc de conserver les cellules GFP-négatives. Celles-ci ont été triées de façon individuelle ou de façon collective.

2.2.4.2.1 Analyse des cellules triées de façon individuelle

2.2.4.2.1.1 Analyse du tri des cellules MDTF

Lors du tri cellulaire de la lignée MDTF, les cellules GFP-négatives ont été triées à raison d'une cellule par puits dans quatre plaques de 96 puits. Afin de connaître la nature des mutations introduites dans *TRIM5α_{hu}*, il a fallu séquencer l'ADN plasmidique. Pour ce faire, les cellules triées ont été cultivées et leur ADN total a été extrait. Une PCR a été réalisée pour amplifier *TRIM5α_{hu}* muté (tableau 2.7). Pour ce faire, une quantité de 5 µL de l'ADN total extrait des différents clones a été utilisé comme matrice. La concentration finale des dNTP était de 0,2 mM et la concentration finale des amorces était de 0,2 µM. Les amorces utilisées en 5' et en 3' respectivement étaient les suivantes : 5'-TCCTGAATTCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC-3' et 5'-GTTCCCTCGAGATGGCTTCTGGAATCCTGGTTAAT-3'. L'amorce 5' contenait un site de restriction pour l'enzyme Xhol alors que celle en 3' en contenait un pour l'enzyme EcoRI.

TABLEAU 2.7
Les conditions de la PCR réalisée afin d'amplifier *TRIM5α_{hu}* muté de l'ADN extrait des cellules triées

Étape	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	98	30 secondes
Dénaturation	98	10 secondes
Hybridation	52	30 secondes
Élongation	72	45 secondes
Élongation finale	72	10 minutes

Suite à la PCR, les produits ont été purifiés sur colonne et digérés par EcoRI et Xhol dans un volume total de 40 µL. Une digestion du vecteur pMIP-TRIM5 α_{hu} wt a aussi été réalisée avec les mêmes enzymes dans un volume total de 100 µL. Par la suite, les produits des deux digestions ont été purifiés sur gel et les bandes correspondant à TRIM5 α_{hu} muté et à pMIP coupé ont été extraites et liées. La ligation a été réalisée avec 15 µL de TRIM5 α_{hu} muté et 5 µL de pMIP coupé dans un volume total de 30 µL. Les produits de la ligation ont ensuite été purifiés sur colonne, un aliquot de 4 µL de chaque clone a été transformé puis 20 µL ont été étalés sur une gélose. Une colonie résultant de chaque transformation a été repiquée et remise en culture dans 2 mL de LB avec ampicilline. Puis, une miniprep a été réalisée afin d'extraire l'ADN plasmidique de chaque clone et cet ADN a été séquencé afin de connaître la nature des mutations des différents clones.

2.2.4.2.1.2 Analyse du tri des cellules HeLa

Lors du tri de la lignée cellulaire HeLa, les cellules GFP-négatives ont été triées à raison d'une cellule par puits dans quatre plaques de 96 puits. Ensuite, les cellules isolées ont été cultivées, placées dans des puits de plaque 24 puits et infectées le jour suivant avec 7 µL de virus VIH-GFP. Cette quantité de virus a été choisie puisqu'elle résulte en un taux de 30% d'infection des cellules contrôles. Il sera donc facile avec cette dose de quantifier le taux d'infection de cellules présentant une résistance allant jusqu'à 1 000 fois. Le milieu a été changé 16 heures après l'infection. Puis, 24 heures plus tard, les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde à une concentration finale de 1,5 % dans du PBS et analysées par cytométrie de flux avec un FC500 (Beckman). Les résultats de la cytométrie de flux ont été analysés avec le logiciel « CPX analysis ». Les clones présentant une résistance accrue au VIH-1 ont été conservés et une vérification de leur résistance au VIH-1 a été effectuée. Pour ce faire, les clones

conservés ont été placés dans des puits de plaques 24 puits et infectés avec des doses décroissantes de virus VIH-GFP. Puis, 16 heures post-infection, le milieu a été changé. Le jour suivant, les cellules ont été fixées au formaldéhyde comme décrit ci-haut et analysées par cytométrie de flux (figure 2.5).

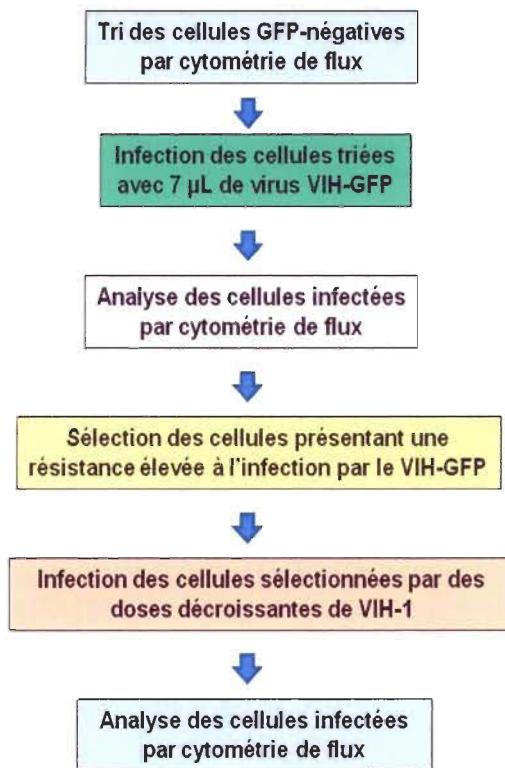


FIGURE 2.5 : Schéma illustrant la méthode employée afin d'analyser le tri cellulaire des cellules HeLa

Tout d'abord, les cellules GFP-négatives ont été triées par cytométrie de flux dans des plaques de 24 puits à raison d'une cellule par puits. Ensuite, les cellules ont été cultivées et infectées par une dose de 7 µL de virus VIH-GFP, fixées au formaldéhyde, puis le taux de cellules GFP-négatives a été déterminé par cytométrie de flux. Les cellules ayant une forte résistance au VIH-1 ont été conservées et infectées par des doses décroissantes de VIH-GFP. Par la suite, elles ont été fixées au formaldéhyde et analysées par cytométrie de flux afin de confirmer leur résistance élevée au VIH-1.

Une fois que les clones présentant une résistance élevée à l'infection par le VIH-GFP ont été sélectionnés, une confirmation que la résistance au VIH-1 des ces différents clones était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté a dû être obtenue. Pour ce faire, la manière de procéder était la suivante : (a) extraire l'ADN total des clones, (b) l'introduire dans des cellules non transduites et (c) quantifier le niveau de résistance au VIH-1 des cellules transduites. L'ADN total a alors été extrait et *TRIM5 α_{hu}* muté a été amplifié par PCR. Les conditions de PCR qui ont été utilisées sont les mêmes que celles du tri de cellules MDTF de la section précédente. Suite à cette amplification, les produits de PCR ont été purifiés sur colonne et digérés par les enzymes EcoRI et Xhol dans un volume total de 40 μ L. Une digestion de 10 μ g de vecteur pMIP-*TRIM5 α_{hu}* wt a été réalisée avec les mêmes enzymes dans un volume total de 100 μ L. Ensuite, les produits des deux digestions ont été purifiés sur gel. Les bandes correspondant à *TRIM5 α_{hu}* muté et à pMIP coupé ont été extraites et liguées. La ligation a été réalisée avec 15 μ L de *TRIM5 α_{hu}* muté et 5 μ L de pMIP coupé. Puis, les produits de ligation ont ensuite été purifiés sur colonne, transformés par aliquots de 4 μ L et chaque transformation a été étalée sur trois géloses. Une colonie de chaque transformation a été repiquée dans 5 mL de LB avec ampicilline, a été cultivée et une miniprep a été réalisée afin d'extraire l'ADN plasmidique de chaque clone. Ces derniers ont ensuite été séquencés et de nouveaux vecteurs rétroviraux ont été produits. Chacun des différents plasmides pMIP-*TRIM5 α_{hu}* muté a servi à produire un vecteur rétroviral MIP-*TRIM5 α_{hu}* muté selon la méthode décrite précédemment pour la production de la banque de virus MIP-*TRIM5 α_{hu}* muté. Suite à la production des différents virus, des cellules non infectées ont été transduites afin d'exprimer les différents *TRIM5 α_{hu}* muté et un traitement à la puromycine a été effectué comme précédemment. Les clones ont ensuite été placés dans des puits de plaque 24 puits et infectés par des doses décroissantes de virus VIH-GFP afin de confirmer que leur résistance au VIH-1 était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté (figure 2.6).

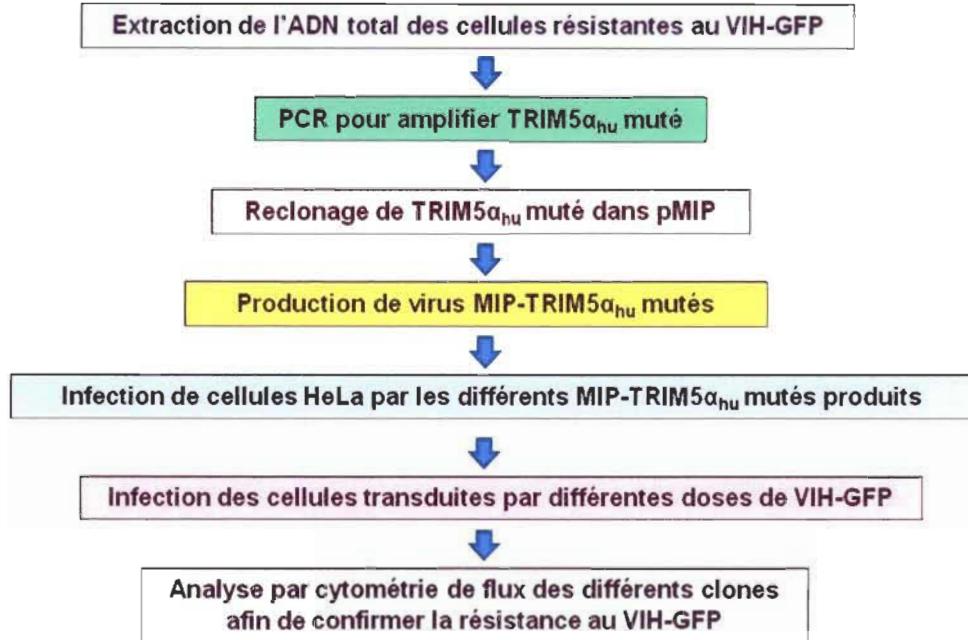


FIGURE 2.6 : Schéma illustrant la méthode utilisée pour confirmer que la résistance accrue au VIH-1 était bien due à la présence de *TRIM5α_{hu}* muté

Tout d'abord, l'ADN total a été extrait des cellules et une PCR a été réalisée pour amplifier *TRIM5α_{hu}* muté. Puis, les différents *TRIM5α_{hu}* mutés ont été reclonés dans pMIP. Un virus MIP-*TRIM5α_{hu}* muté a été produit pour chaque version de *TRIM5α_{hu}* muté suite à une transfection de cellules HEK293T et suite à une sélection des cellules transduites grâce à un traitement à la puromycine. Les différents virus MIP-*TRIM5α_{hu}* mutés ont été utilisés pour infecter des cellules HeLa et les cellules transduites ont par la suite été infectées par des doses décroissantes de virus VIH-GFP. Finalement, les cellules ont été fixées au formaldéhyde et le taux d'infection a été déterminé par cytométrie de flux.

2.2.4.2.1.3 Analyse du tri des cellules TE671

L'analyse du premier tri effectué avec les cellules TE671 s'est déroulée de la même façon que l'analyse du tri cellulaire des cellules HeLa. Un seul détail a été changé : la digestion des *TRIM5α_{hu}* muté amplifiés suite à la PCR a été réalisée avec les enzymes EcoRI, Xhol, Blpl et Sbfl afin d'éliminer l'ADN de *TRIMCyp* présent. En effet, Blpl et Sbfl sont des enzymes qui possèdent des sites de restriction dans l'ADN de *TRIMCyp* mais qui ne possèdent pas de site de restriction dans l'ADN de *TRIM5α_{hu}*.

Pour le deuxième tri cellulaire effectué avec les cellules TE671, les cellules n'ont pas été infectées par 7 µL de virus VIH-GFP comme précédemment, mais plutôt par des quantités décroissantes de virus VIH-GFP. De plus, les *TRIM5α_{hu}* mutés amplifiés par PCR ont été digérés par EcoRI, Xhol et Avall, car la digestion effectuée lors du premier tri de cellules TE671 avec EcoRI, Xhol, Blpl et Sbfl n'avait pas été efficace pour éliminer les *TRIMCyp*. Avall est aussi une enzyme qui possède un site de restriction dans *TRIMCyp* mais qui ne possède pas de site de restriction dans *TRIM5α_{hu}*.

2.2.4.2.2 Analyse des cellules triées de façon collective

Lors du tri collectif de cellules, la manière employée afin de sélectionner les mutations conférant une activité de restriction à *TRIM5α_{hu}* contre le VIH-1 est de conserver les clones ayant des mutations similaires. En effet, si la même mutation se retrouvait chez plus d'un clone résistant au VIH-1, ce serait un bon indicatif que cette mutation pourrait être importante dans l'activité de restriction du VIH-1 par *TRIM5α_{hu}*. Afin de cibler ces différentes mutations se retrouvant chez plus d'un clone, un grand nombre de cellules a été trié. Suite à ces tris, les

cellules ont été remises en culture et l'ADN total des cellules a été extrait. Ensuite, la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté a été amplifiée par PCR. Les conditions de PCR utilisées sont les mêmes que celles employées lors des tris de cellules individuelles. Suite à la PCR, les produits de PCR ont été purifiés sur colonne puis digérés dans un volume de 40 µL avec les enzymes EcoRI, Xhol et Avall. L'enzyme Avall a été ajoutée afin d'éliminer les *TRIMCyp* présents. Une digestion de 10 µg de vecteur pMIP-*TRIM5 α_{hu}* wt a été réalisée dans un volume total de 100 µL. Puis, les produits des deux digestions ont été purifiés sur gel. Les bandes correspondant à *TRIM5 α_{hu}* muté et pMIP coupé ont été extraites et liqués. La ligation a été réalisée avec 15 µL de *TRIM5 α_{hu}* muté et avec 5 µL de pMIP coupé. Par la suite, les produits de ligation ont été purifiés sur colonne, transformés par aliquots de 4 µL et chaque aliquot a été étalé sur trois géloses. Puis, 20 colonies ont été repiquées dans 2 mL de LB avec ampicilline et ont été cultivées. L'ADN plasmidique de ces 20 clones a été extrait par miniprep et séquencé afin de déterminer si des mutations se retrouvaient chez plus d'un clone résistant au VIH-1. Les bactéries transformées restantes ont ensuite été mises en suspension dans un volume total de 26 mL de milieu LB avec ampicilline. Puis, un volume de 0,5 mL de ces bactéries a été placé dans 150 mL de LB avec ampicilline. Les bactéries ont été cultivées pendant 16 heures et l'ADN plasmidique a été extrait par une midiprep. Une banque de virus MIP-*TRIM5 α_{hu}* muté a été produite comme précédemment et a été introduite dans des cellules non transduites. Ensuite, ces cellules ont été traitées à la puromycine et infectées par trois doses successives de virus VIH-GFP. Puis, les cellules GFP-négatives ont été triées et l'analyse des cellules triées de façon collective a été répétée. Deux cycles d'infection ont ainsi été réalisés.

CHAPITRE 3

LA CONSTRUCTION DE LA BANQUE DE *TRIM5α_{hu}* MUTÉ

3.1 Les contrôles positifs effectués afin de s'assurer du fonctionnement adéquat de la mutagenèse aléatoire par PCR

Avant d'effectuer la mutagenèse du domaine B30.2, il a fallu s'assurer du bon fonctionnement de la trousse de mutagenèse aléatoire par PCR. Pour ce faire, trois réactions contrôles ont été effectuées à l'aide du plasmide contrôle, des amorces contrôles et des différents réactifs fournis avec la trousse de mutagenèse. La première réaction a été effectuée dans le tampon standard, la deuxième dans le tampon un et la troisième dans le tampon neuf. La moitié des produits de PCR, soit 25 µL, a ensuite été déposée dans des puits d'un gel d'agarose et une migration a été effectuée (figure 3.1).

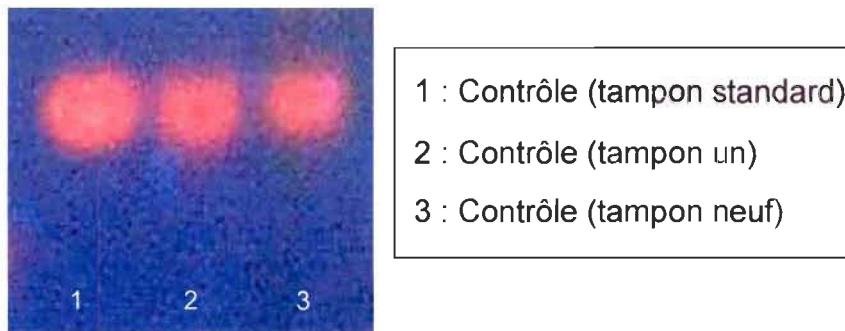


FIGURE 3.1 : Migration des contrôles positifs de la PCR

La trousse de mutagenèse fonctionnait donc au niveau de l'amplification de l'ADN. Il était cependant impossible à cette étape de déterminer si des mutations avaient été insérées dans l'ADN.

L'ADN contrôle a bien été amplifié ce qui signifiait que la trousse de mutagenèse fonctionnait au niveau de l'amplification d'ADN. Suite à cette étape, il était cependant impossible de déterminer si des mutations avaient été générées lors de la PCR. Cependant, comme mentionné dans la section précédente, le plasmide contrôle contient une série de sites contenant trois des quatre bases constituant le site de restriction de l'enzyme Taq I. Lorsqu'une PCR est réalisée, l'enzyme introduit des mutations qui génèrent des sites de restriction pour l'enzyme Taq I. Donc, afin de vérifier si la mutagenèse avait bien fonctionné, les 25 µL de produits de PCR restants ont été digérés par cette enzyme dans un volume total de 30 µL. Puis, une migration des produits de la digestion a été effectuée sur gel d'agarose (figure 3.2)

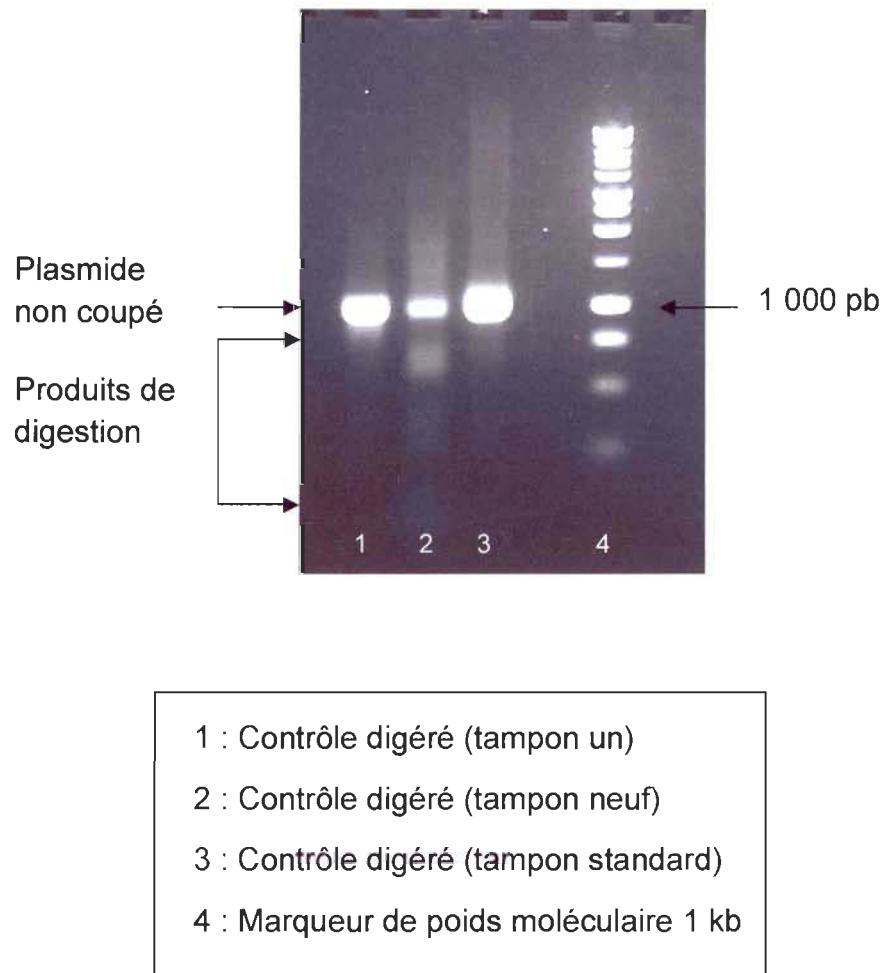


FIGURE 3.2 : Migration des contrôles positifs digérés par Taq I

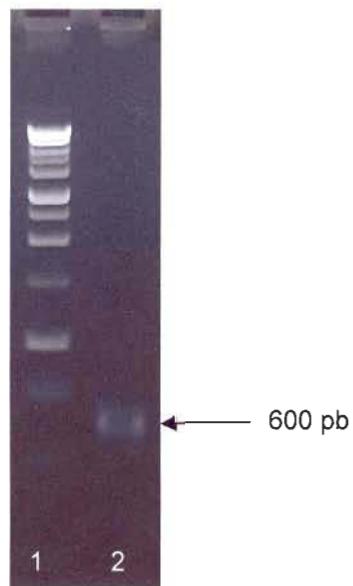
Les produits de digestion démontrent que la mutagenèse a bien fonctionné.

Les résultats ont démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre le contrôle effectué dans le tampon un et dans le tampon standard. Quelques bandes devraient se retrouver au niveau du plasmide coupé pour la PCR réalisée dans le tampon un, puisque ce tampon devrait générer en moyenne deux mutations par 1 000 paires de bases. L'absence de ces bandes peut s'expliquer par le faible taux de mutations généré et par la petite quantité de plasmide coupé qui est peut-être insuffisante pour être visible sur gel. Pour sa part, la PCR effectuée dans le tampon neuf a produit de nombreuses

mutations qui ont généré des sites de restriction pour l'enzyme Taq I. Elles se traduisent par la petite bande observée au niveau du plasmide non coupé et par la série de bandes possédant une taille inférieure au plasmide non coupé. Les résultats étaient donc en accord avec ceux qui étaient escomptés, donc la réaction de mutagenèse fonctionnait.

3.2 La mutagenèse du domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}*

La mutagenèse aléatoire du domaine B30.2 a été effectuée. Ensuite, une migration de 5 µL des produits de la PCR a été effectuée sur gel d'agarose afin de s'assurer que l'ADN amplifié possédait la taille attendue, c'est-à-dire 600 paires de bases (figure 3.3).



1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb
2 : PCR du domaine B30.2

FIGURE 3.3 : Migration de l'amplification du domaine B30.2 muté

La bande amplifiée était de la taille attendue. Les 45 µL restants de la PCR ont alors été déposés dans les puits d'un gel d'agarose et une migration a été réalisée. Ensuite, la bande correspondant à B30.2 a été extraite du gel.

3.2.1 La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène *TRIM5α_{hu}*

La première stratégie d'amplification du reste du gène *TRIM5α_{hu}* a été réalisée en utilisant le domaine B30.2, généré à l'étape précédente, comme méga-amorce pour amplifier tout le reste du plasmide pMIP-*TRIM5α_{hu}*. La tentative a été un échec. Certains paramètres de la PCR ont alors été modifiés : (a) il y a eu plusieurs changements au niveau de la température et de la durée de la PCR en supposant que le plasmide contenait des régions riches en liens G-C qui requéraient plus d'énergie afin d'être brisés, (b) un changement du tampon HF pour le tampon GC a été effectué car celui-ci était plus approprié pour les plasmides contenant des régions riches en liens G-C bien qu'il provoquait une moins bonne fidélité de réPLICATION de l'enzyme et (c) un ajout de diméthyl sulfoxyde (DMSO) a été réalisé afin de linéariser le plasmide car celui-ci était superenroulé. Toutes ces modifications n'ont pas mené à une amplification efficace du plasmide. Puisque le plasmide pMIP possède une structure superenroulée, une grande taille et probablement des régions riches en liens G-C, tous ces paramètres le rendent difficile à amplifier par cette stratégie de PCR. Le plasmide pMIP a donc été changé pour le plasmide pBluescript II KS+. Ce dernier possède une plus petite taille et il ne possède pas de régions riches en liens G-C. La même stratégie a été conservée pour la PCR. Il a donc fallu construire la matrice, c'est-à-dire le plasmide pBluescript-*TRIM5α_{hu}*. Puis, afin de s'assurer que la construction avait bien été effectuée, une quantité de 400 ng de pBluescript-*TRIM5α_{hu}* a ensuite été digérée dans un volume de 20 µL par les enzymes EcoRI et Xhol. Les produits de la digestion ainsi que 400 ng d'ADN

non digérés ont été déposés dans des puits d'un gel d'agarose. Une migration a été effectuée (figure 3.4).

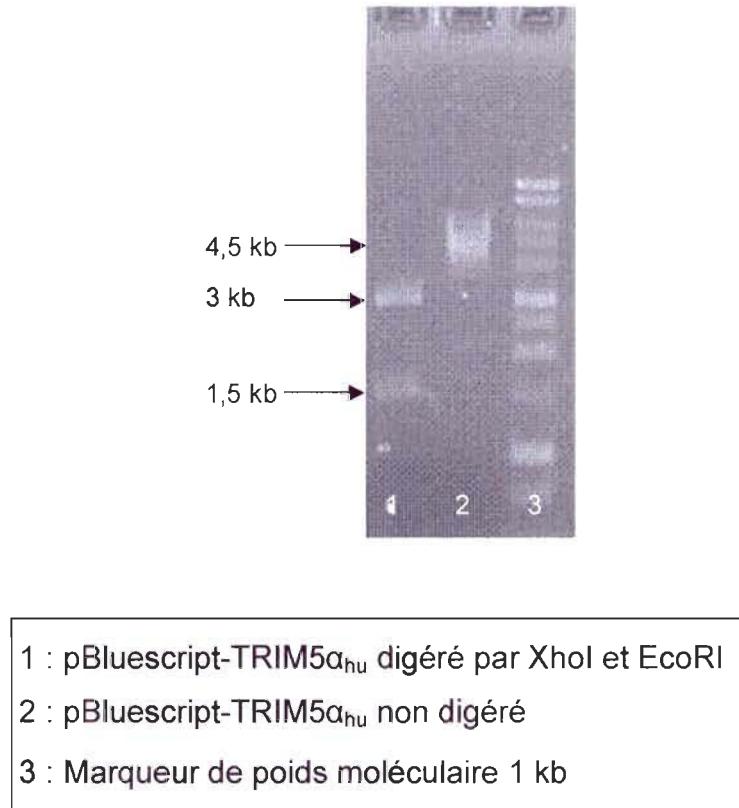


FIGURE 3.4 : Migration de la construction de pBluescript-TRIM5 α_{hu} digérée par Xhol et EcoRI.

Les bandes obtenues suite à la digestion et à la migration étaient de la taille attendue donc la construction s'était avérée efficace. Une fois la matrice construite, la PCR afin d'amplifier le reste de *TRIM5 α_{hu}* ainsi que le reste du plasmide a été réalisée en utilisant le domaine B30.2 comme méga-amorce. Afin d'éliminer la matrice résiduelle, les produits de la PCR ont ensuite été digérés par DpnI. Puis, les produits de la digestion ont été purifiés sur colonne et transformés dans des bactéries compétentes. Les produits de ligation ont été

étalés sur géloses. Les colonies obtenues ont alors été mises en suspension et remises en culture. Ensuite, l'ADN plasmidique a été extrait par midiprep et une quantité de 400 ng a été digérée par les enzymes EcoRI et Xhol dans un volume total de 20 µL afin de vérifier la qualité de cette midiprep. Les produits de migration ont été déposés dans des puits d'un gel d'agarose et la migration a été effectuée (figure 3.5).

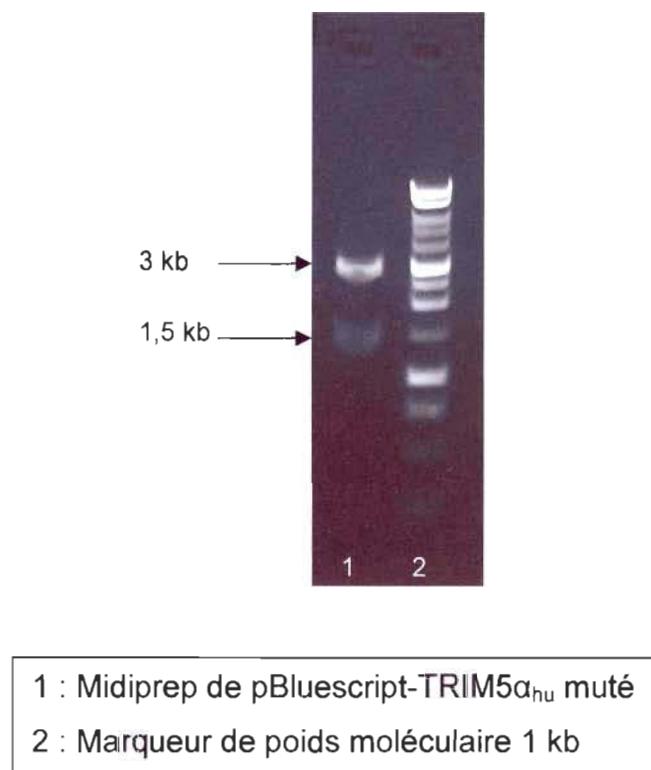
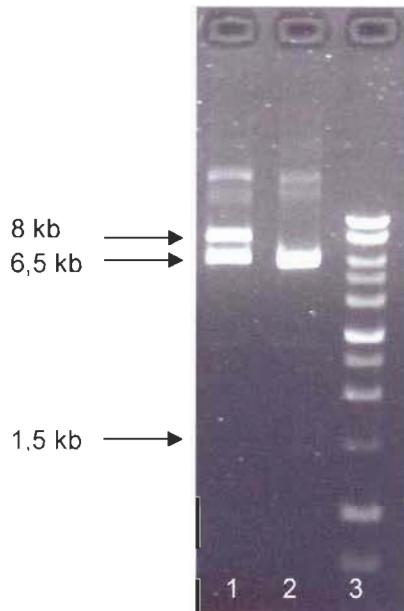


FIGURE 3.5 : Migration de la midiprep de pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol

Les bandes obtenues étaient de la taille attendue alors la banque de pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté était bien construite. Il a ensuite fallu la recloner dans le plasmide pMIP, car le plasmide pBluescript n'est pas un plasmide d'expression. Les produits de ligation ont ensuite été purifiés, transformés et étalés sur géloses. Les colonies obtenues ont été mises en suspension, remises

en culture et l'ADN a été extrait par midiprep. Afin de vérifier la qualité de la midiprep, 400 ng ont été digérés par EcoRI et Xhol et les produits de digestion ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose. Une migration a été effectuée (figure 3.6).



- 1 : Midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol
- 2 : Midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté non digérée
- 3 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb

FIGURE 3.6 : Migration de la midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol

Les bandes obtenues étaient de la taille attendue sauf qu'une bande à 1,5 kb correspondant à la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté aurait dû être présente. Son absence peut s'expliquer par la large bande de 8 kb qui correspond aux produits non digérés. L'insert de 1,5 kb n'était peut-être pas en quantité

suffisante pour être visible sur le gel. Néanmoins, une bande de 6,5 kb correspondant à pMIP sans l'insert a été obtenue, donc il est permis de supposer que la bande à 1,5 kb était bien présente mais en quantité insuffisante pour être visible. La construction de la banque de pMIP-*TRIM5α_{hu}* mutée était alors terminée.

3.2.2 La deuxième technique utilisée pour amplifier le reste du gène *TRIM5α_{hu}*

La deuxième stratégie d'amplification du reste du gène *TRIM5α_{hu}* a été réalisée par deux réactions de PCR. Tout d'abord, le reste du gène de *TRIM5α_{hu}* a été amplifié par PCR. Afin de vérifier si la PCR avait bien fonctionné, une quantité de 5 µL des produits résultants a été déposée dans un puits d'un gel d'agarose et une migration a été réalisée (figure 3.7).

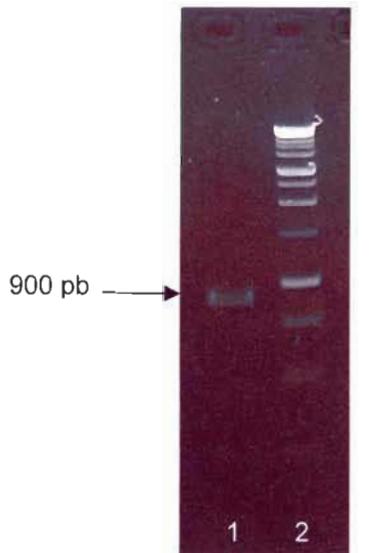


FIGURE 3.7 : Migration des produits de la PCR réalisée pour amplifier le reste de *TRIM5 α_{hu}*

La bande obtenue était de la taille attendue donc l'amplification avait bien été effectuée. Suite à cette migration, les 45 µL de produits de PCR restants ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose et une migration a été effectuée. La bande correspondant à *TRIM5 α_{hu}* sans son domaine B30.2 a été extraite. Par la suite, une PCR a été réalisée afin d'amplifier tout le gène de *TRIM5 α_{hu}* avec des mutations. Pour vérifier si cette PCR avait été bien effectuée, une quantité de 5 µL a été déposée dans un puits d'un gel d'agarose et une migration a été réalisée (figure 3.8).

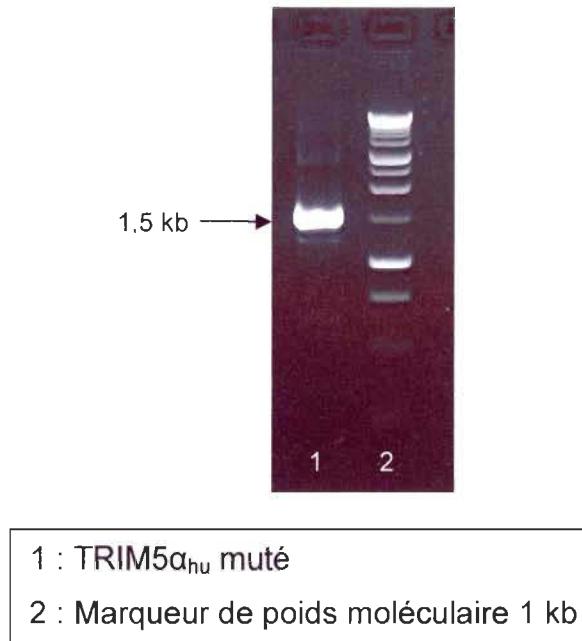


FIGURE 3.8 : Migration des produits de la PCR réalisée pour amplifier le gène complet de *TRIM5 α_{hu}* muté

La bande obtenue était de la taille attendue, donc la PCR avait bien fonctionné. Suite à cette migration, les 45 μ L de produits de PCR restants ont été purifiés sur colonne. Par la suite, ils ont été digérés, déposés sur gel d'agarose et une migration a été réalisée. Les bandes correspondant à la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté et à pMIP ont été extraites des gels et liguées. Suite à cette ligation, les produits ont été purifiés sur colonne, transformés et étalés sur géloses. Un nombre d'environ 24 600 colonies obtenues a été estimé. Pour ce faire, le nombre de colonies obtenues a été compté pour un aliquot de produits de ligation transformé et ce nombre a ensuite été multiplié par le nombre de transformations effectuées. L'ADN plasmidique de dix clones a ensuite été extrait par miniprep et séquencé. Les analyses de séquençage ont démontré que les dix clones contenaient un total de 11 mutations (figure 3.9).

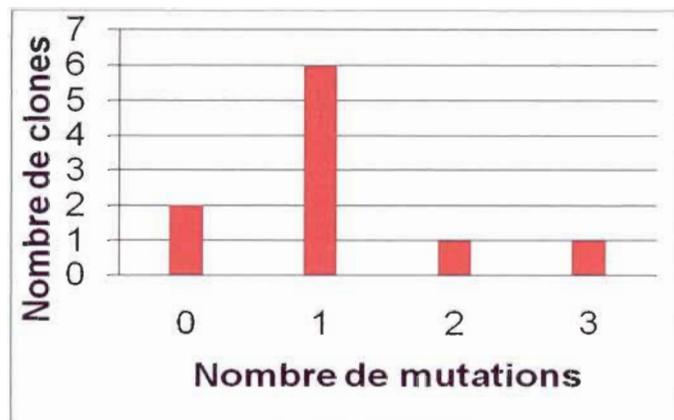
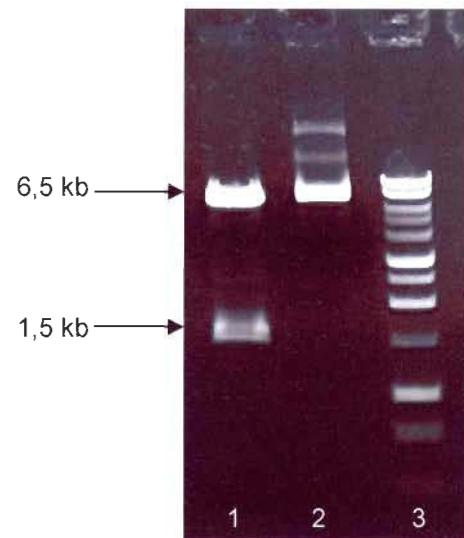


FIGURE 3.9 : Graphique du nombre de mutations obtenues par clone pour la banque initiale de *TRIM5α_{hu}* muté

Les clones contenaient donc de zéro à trois mutations.

Les colonies restantes suite à la transformation des produits de la ligation ont ensuite été mises en suspension et remises en culture. Puis, l'ADN plasmidique a été extrait par midiprep. Afin de vérifier la qualité de cette midiprep, 400 ng ont été digérés par les enzymes EcoRI et Xhol dans un volume de 20 µL. Les produits de la digestion ont été déposés dans des puits de gel d'agarose une migration a été effectuée (figure 3.10).



- 1 : Midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol
- 2 : Midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté non digérée
- 3 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb

FIGURE 3.10 : Migration de la midiprep de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté digérée par EcoRI et Xhol

Les bandes obtenues étaient de la taille attendue. La construction de la banque de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté était donc terminée.

CHAPITRE 4

LA RECHERCHE DE MUTATIONS PROVOQUANT UNE RESTRICTION ACCRUE DU VIH-1 CHEZ *TRIM5 α_{hu}*

4.1 Introduire la banque construite dans des cellules

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les banques produites afin de produire les vecteurs rétroviraux MIP-*TRIM5 α_{hu}* muté. Les cellules HEK293T ont été choisies puisqu'elles sont facilement transfectables. Différents types cellulaires ont ensuite été transduits avec ces vecteurs rétroviraux. Ils seront définis dans les sections suivantes.

4.2 Infecter les différentes cellules exprimant la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté par du virus VIH-1

Suite à la transduction, les cellules exprimant les banques de *TRIM5 α_{hu}* muté ont été infectées par du VIH-TK ou du VIH-GFP.

4.3 Isoler les cellules résistantes au VIH-1

4.3.1 Isoler les cellules résistantes au VIH-1 suite à l'infection avec le VIH-TK

Un test XTT a été réalisé sur des cellules MDTF contrôles non infectées et sur des cellules MDTF infectées par du VIH-TK, toutes deux traitées à

différentes concentrations de TFT. Ce test a permis d'établir si la drogue était toxique pour les cellules contrôles. Il a également permis de déterminer la concentration de TFT à utiliser sur les cellules infectées par le VIH-TK afin que cette drogue soit utilisée à une concentration non toxique (tableau 4.1).

TABLEAU 4.1

Les valeurs brutes de la densité optique obtenues pour les cellules MDTF non infectées et pour les cellules MDTF infectées avec du VIH-TK suite au test XTT

	MDTF non infectées		MDTF infectées par VIH-TK	
	Densité optique (à 450 nm)	Densité optique (à 620 nm)	Densité optique (à 450 nm)	Densité optique (à 620 nm)
Blanc de lecture	0,2234	0,1633	0,2671	0,1614
0 µg/mL de TFT	1,2013	0,2276	0,6032	0,1905
0,25 µg/mL de TFT	0,3445	0,1864	0,4363	0,183
0,5 µg/mL de TFT	0,3377	0,1829	0,3929	0,175
1 µg/mL de TFT	0,2983	0,1795	0,3578	0,1721
1,5 µg/mL de TFT	0,2867	0,1759	0,3572	0,1744
2 µg/mL de TFT	0,2863	0,1726	0,3364	0,17

Les valeurs ont ensuite été traitées (figure 4.1). Pour ce faire, le blanc de lecture a été soustrait de chaque valeur. Ensuite, les valeurs obtenues à une densité optique de 620 nm (longueur d'onde de référence) ont été soustraîtes de celles obtenues à 450 nm.

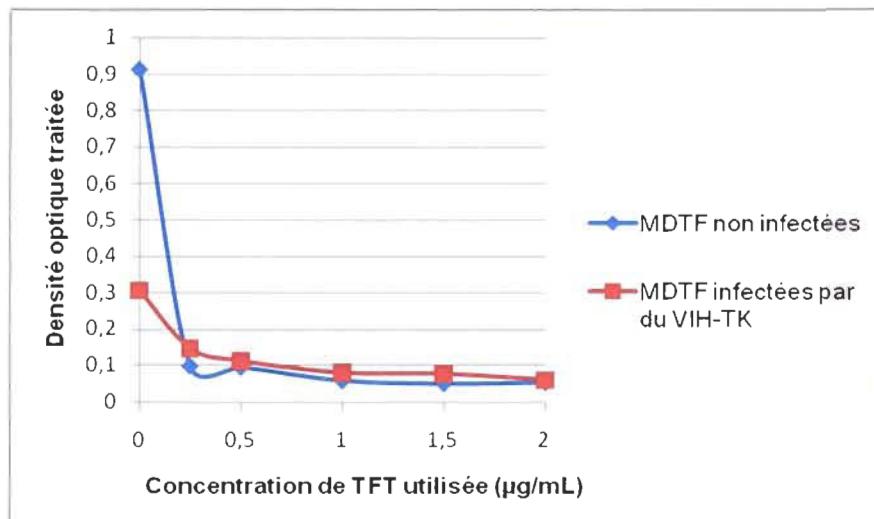


FIGURE 4.1 : Graphique des résultats du test XTT suite au traitement à la TFT

La TFT est donc毒ique pour les deux types de cellules.

Les résultats ont démontré que la TFT était toxique pour les cellules MDTF non infectées aussi bien que pour les cellules MDTF infectées par du VIH-TK, puisqu'il y a un écart important de densité optique entre les cellules traitées à la TFT et les cellules non traitées. Cette drogue n'a donc pas pu être utilisée pour sélectionner les cellules résistantes au VIH-1. Une autre stratégie a dû être employée, soit l'infection par du virus VIH-GFP et l'isolation des cellules résistantes GFP-négatives par cytométrie de flux.

4.3.2 Isoler les cellules résistantes au VIH-1 suite à l'infection avec le VIH-GFP

4.3.2.1 L'analyse des cellules MDTF triées de façon individuelle

La première lignée cellulaire utilisée afin d'isoler des cellules exprimant *TRIM5α_{hu}* muté résistantes au VIH-1 est la lignée de cellules MDTF. Ces cellules ont été choisies pour trois raisons : a) il a été démontré que *TRIM5α_{hu}* fonctionne bien dans ces cellules (Berube et al. 2007), b) il n'y aura pas d'interférence par *TRIM5α_{hu}* endogène, ce qui aurait pu se produire avec des cellules humaines et c) ce sont des cellules adhérentes, ce qui permet une sélection facile des cellules transduites suite à un traitement avec un antibiotique. Afin d'isoler les cellules exprimant *TRIM5α_{hu}* muté qui sont résistantes au VIH-1, la banque de *TRIM5α_{hu}* mutée produite à la section 3.2.1 a été introduite dans des cellules MDTF. Ces cellules ont ensuite été infectées par trois doses successives de VIH-GFP entraînant un taux de transduction de 98,42%. Puis, les cellules résistantes au VIH-1, c'est-à-dire les cellules GFP-négatives, ont été triées de façon individuelle. Suite à un tri de 384 clones, neuf clones ont survécu et leur ADN total a été extrait puis recloné dans pMIP. L'ADN a été amplifié dans des bactéries compétentes et des minipreps ont été réalisées. Les plasmides extraits ont été séquencés. Les résultats des analyses de séquençage ont montré que la technique de mutagenèse n'avait pas fonctionné puisque tous les clones ne contenaient aucune mutation.

4.3.2.2 L'analyse des cellules HeLa triées de façon individuelle

La deuxième lignée cellulaire utilisée afin d'isoler des cellules exprimant *TRIM5α_{hu}* muté résistantes au VIH-1 sont les cellules HeLa. Cette lignée

cellulaire a été choisie puisque : a) il a été démontré que *TRIM5 α_{hu}* muté transduit fonctionne bien dans les cellules HeLa (Berube et al. 2007), b) le but de ce projet est de générer un *TRIM5 α_{hu}* muté qui fonctionne bien dans des thérapies géniques chez l'humain, donc il fallait travailler en présence de *TRIM5 α_{hu}* endogène, c) ce sont des cellules adhérentes, ce qui facilite la sélection de cellules transduites suite à un traitement avec un antibiotique. Pour isoler les cellules exprimant *TRIM5 α_{hu}* muté résistantes au VIH-1, des cellules HeLa ont été transduites avec la banque de pMIP-*TRIM5 α_{hu}* muté produite à la section 3.2.2 et infectées par trois doses successives de VIH-GFP provoquant un taux de transduction de 94,47%. Les cellules GFP-négatives ont ensuite été triées de façon individuelle. Suite au tri, 183 clones ont survécu et la résistance au VIH-1 a été étudiée par cytométrie de flux chez 161 de ces clones (figure 4.2).

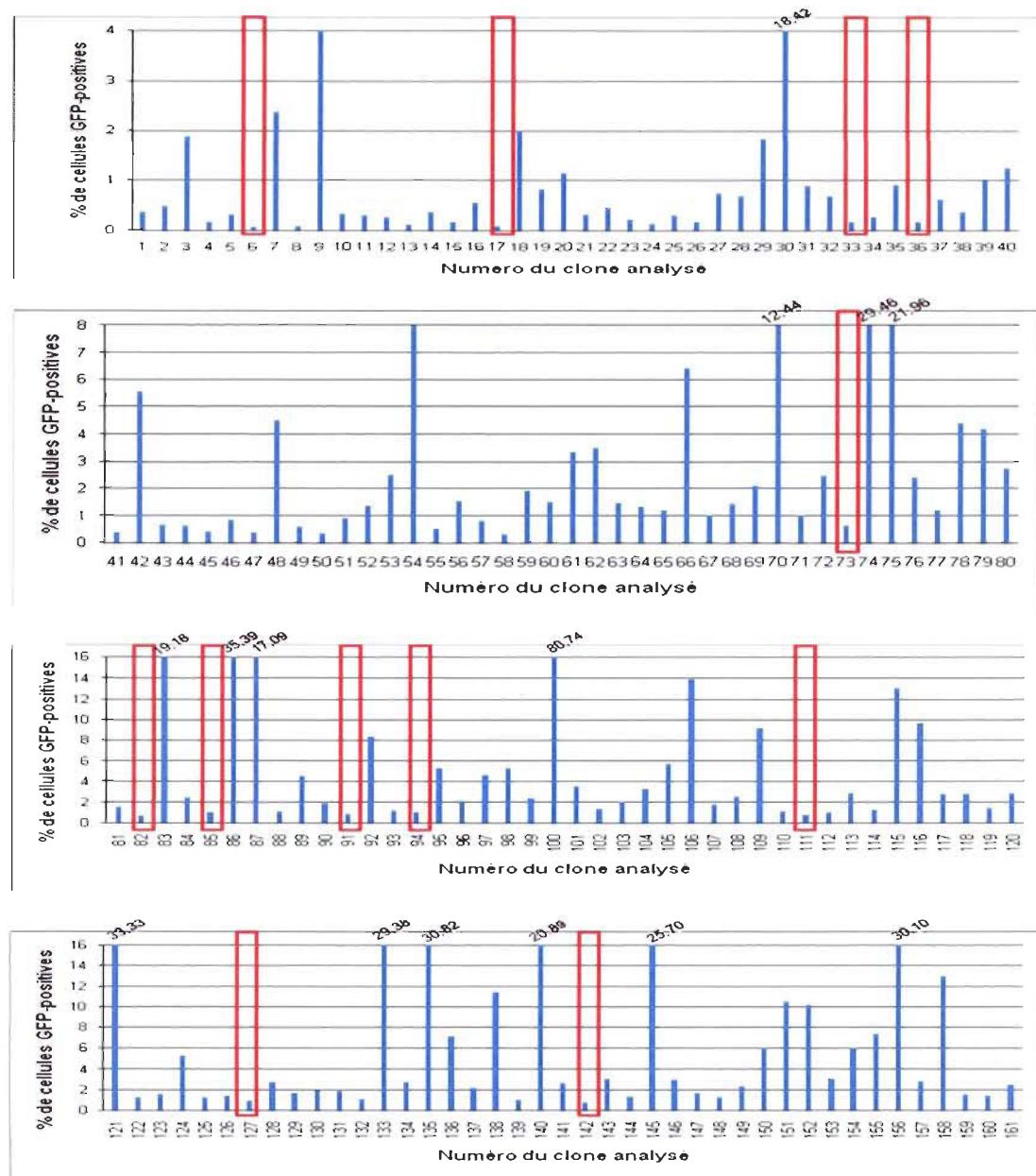


FIGURE 4.2 : Les résultats de la cytométrie de flux suite au tri cellulaire des cellules HeLa

Les clones encadrés en rouge représentent les clones ayant la résistance la plus élevée au VIH-1 et ils ont été conservés pour des analyses subséquentes. Les axes ont été coupés et les valeurs sur les colonnes représentent le pourcentage de cellules GFP-positives obtenu.

Les clones ayant la résistance la plus élevée au VIH-1 ont été conservés. Ils sont représentés par un encadré rouge dans la figure 4.2. Le critère de sélection des clones était le suivant : les clones devaient posséder une résistance au VIH-1 d'au moins dix fois supérieure aux cellules contrôles, c'est-à-dire des cellules HeLa transduites par un *TRIM5 α_{hu} wt*. Tous les résultats de cytométrie obtenus pour les différents clones ont été regroupés sur une seule et même figure (figure 4.2). Ensuite, une vérification du niveau de restriction accrue a été réalisée pour les clones conservés. Pour ce faire, les cellules ont été mises en plaque 24 puits, puis infectées avec les doses de virus VIH-GFP suivantes : (a) 200 μ L, (b) 50 μ L, (c) 10 μ L et (d) 2 μ L. Une analyse par cytométrie de flux a alors permis de quantifier leur niveau d'infection (figure 4.3).

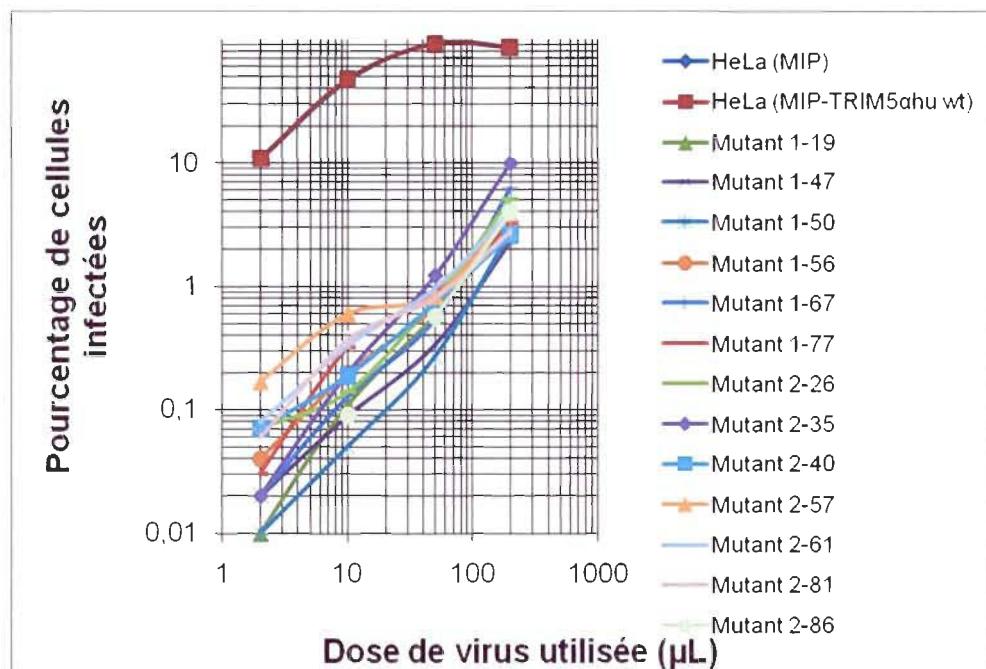


FIGURE 4.3 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de vérifier la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules HeLa

Tous les clones présentaient donc une résistance au VIH-1 de 100 à 1 000 fois supérieure aux cellules contrôles.

Tous les clones présentaient une résistance accrue au VIH-1 d'un facteur de 100 à 1 000 supérieur aux cellules contrôles, c'est-à-dire les HeLa (MIP) et HeLa (MIP-TRIM5 α_{hu} wt). Il fallait donc confirmer que cette restriction accrue au VIH-1 était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté. Pour ce faire, l'ADN total des clones a été extrait et une PCR a été réalisée afin d'amplifier *TRIM5 α_{hu}* muté. Ce dernier a ensuite été recloné dans pMIP. Par la suite, les différents ADN plasmidiques ont été amplifiés dans des bactéries compétentes, ont été extraits par minipreps et ont été séquencés. Ces ADN plasmidiques ont également servi à la construction de nouveaux vecteurs MIP-TRIM5 α_{hu} muté qui ont été transduits dans des cellules HeLa. Afin de confirmer la résistance au VIH-1 des différents *TRIM5 α_{hu}* muté isolés, les cellules transduites ont alors été infectées avec les doses de virus VIH-GFP suivantes : (a) 200 μ L, (b) 100 μ L, (c) 50 μ L, (d) 25 μ L, (e) 12 μ L et (f) 5 μ L. La résistance au VIH-1 a été analysée par cytométrie de flux (figure 4.4).

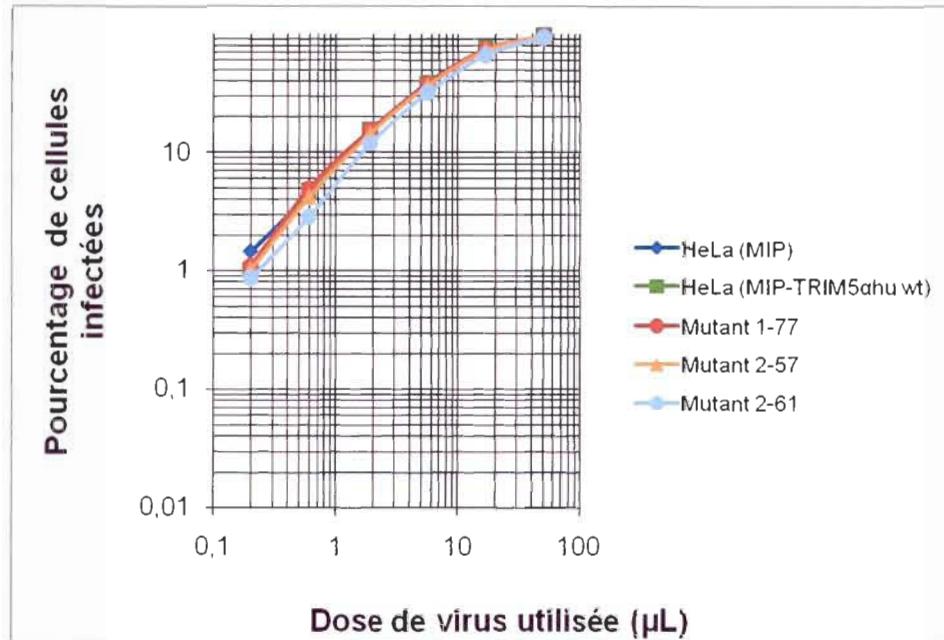


FIGURE 4.4 : Les résultats de la cytométrie de flux réalisée afin de confirmer que la résistance accrue des clones est due à la présence de $TRIM5\alpha_{hu}$ muté

Aucun clone ne présentait donc une résistance accrue au VIH-1 due à la présence d'un $TRIM5\alpha_{hu}$ muté.

Les résultats ont démontré que les clones analysés ne possédaient pas une résistance accrue au VIH-1 qui était due à la présence de $TRIM5\alpha_{hu}$ muté. Ils étaient donc des faux positifs (voir la discussion à la section 5.5 pour les explications).

4.3.2.3 L'analyse des cellules HeLa triées de façon collective

Afin d'effectuer le tri de façon collective, la lignée cellulaire HeLa a été utilisée. Lors du premier cycle d'infection, ces cellules ont été infectées par trois doses successives de VIH-GFP, ce qui a provoqué un taux de transduction de

98,35%. Lors du tri cellulaire, 35 000 cellules GFP-négatives ont été isolées. L'ADN total de ces cellules a ensuite été extrait et la banque de *TRIM5α_{hu}* muté a été amplifiée par PCR. Par la suite, cette banque a été reclonée dans pMIP. La banque obtenue a été estimée à 13 650 clones. Pour ce faire, le nombre de colonies obtenues a été compté pour un aliquot de produits de ligation transformé et ce nombre a ensuite été multiplié par le nombre de transformations effectuées. L'ADN plasmidique de 25 clones a été séquencé et les résultats ont démontré que 27 mutations avaient été introduites au total dans ces clones (figure 4.5).

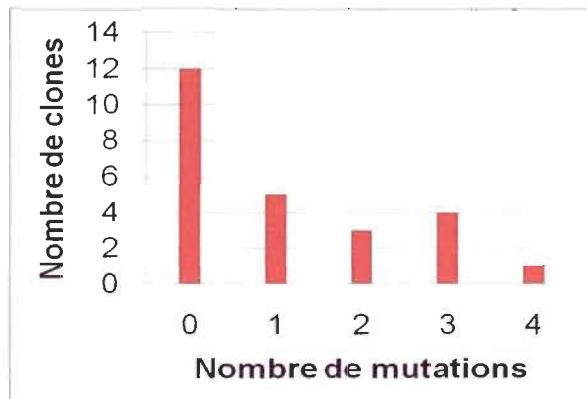


FIGURE 4.5 : Graphique du nombre de mutations obtenues par clones pour la banque de *TRIM5α_{hu}* muté après le premier cycle d'infection

Les clones contenaient donc de zéro à quatre mutations au niveau de leur domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}*.

Lors du second cycle d'infection, les trois infections successives au VIH-GFP ont provoqué un taux de cellules transduites de 83,47%. Au cours du tri cellulaire, 133 000 cellules GFP-négatives ont été isolées. L'ADN a ensuite été extrait et recloné dans pMIP comme lors du premier cycle d'infection. La banque obtenue a été estimée à 920 clones par décompte manuel. L'ADN plasmidique

de 16 clones a été extrait par miniprep et séquencé. Les résultats d'analyse de séquençage ont démontré que 32 mutations avaient été introduites au total dans ces cellules (figure 4.6).

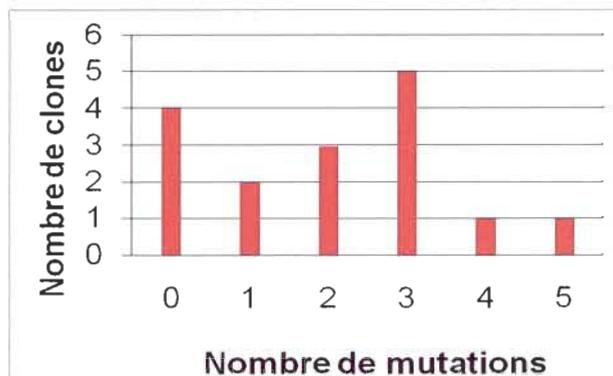


FIGURE 4.6 : Graphique du nombre de mutations obtenues par clones pour la banque de *TRIM5α_{hu}* muté après le deuxième cycle d'infection

Les clones contenaient donc de zéro à cinq mutations au niveau de leur domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}*.

Après cette analyse, la répartition des différentes mutations à l'intérieur du domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}* a été étudiée afin de déterminer si les mutations provoquant une restriction accrue de *TRIM5α_{hu}* au VIH se retrouvaient dans une région plutôt qu'une autre à l'intérieur du domaine B30.2 (figure 4.7).

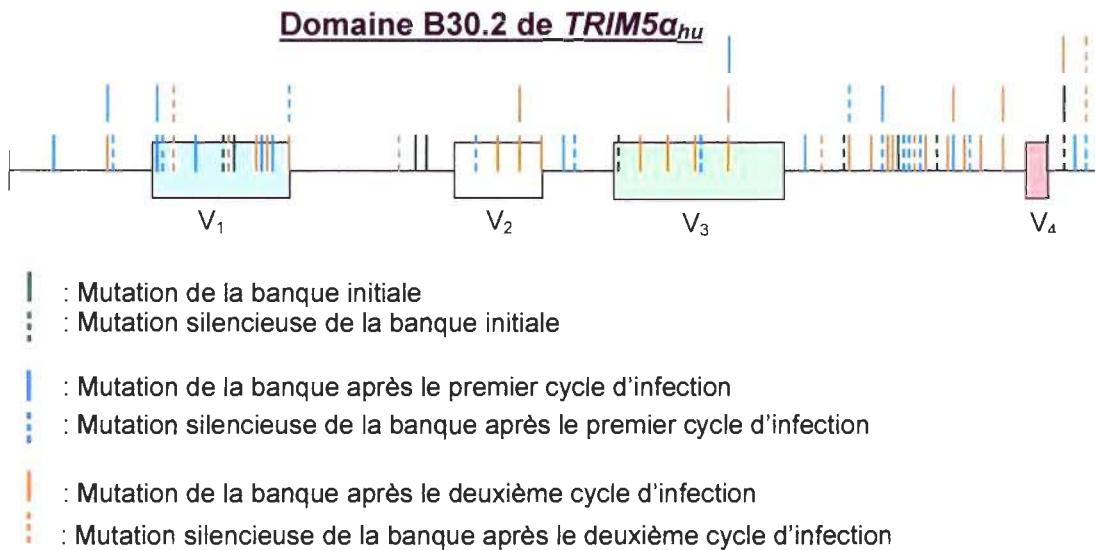


FIGURE 4.7 : Répartitions des différentes mutations des clones séquencés lors des cycles d'infection

Les mutations sont donc bien réparties à l'intérieur du domaine B30.2 de *TRIM5 α_{hu}* et certains clones contiennent des mutations au niveau d'un même acide aminé. Ces résultats sont ceux qui étaient escomptés avec la technique de mutagenèse aléatoire.

Les résultats ont démontré que les mutations étaient réparties à l'intérieur du domaine B30.2 et que ces mutations n'étaient pas concentrées au niveau d'un point chaud mutationnel (« hot spot »). Ces résultats étaient ceux escomptés, puisque la technique de mutagenèse utilisée avait pour but de générer le plus grand nombre de mutations différentes possibles dispersées dans tout le domaine B30.2, tout en obtenant idéalement en moyenne une seule mutation par *TRIM5 α* muté. Les résultats ont aussi démontré que certaines mutations se retrouvaient à la même position dans *TRIM5 α_{hu}* . Certains clones étaient identiques au niveau de toutes leurs mutations alors que d'autres l'étaient au niveau de certaines de leurs mutations. Par exemple, un clone

donné pouvait posséder les mutations A et B alors qu'un deuxième clone pouvait posséder les mutations A et C. Les mutants contenant une mutation non silencieuse et commune à un autre mutant ont été conservés. Leur *TRIM5 α_{hu}* muté a alors été recloné dans pMIP et réintroduit dans des cellules HeLa. Ensuite, il a fallu vérifier si la résistance accrue au VIH-1 de ces mutants était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté. Pour ce faire, les cellules ont été infectées avec les doses de VIH-GFP suivantes : (a) 50 μ L, (b) 16,7 μ L, (c) 5,6 μ L, (d) 1,9 μ L, (e) 0,6 μ L et (f) 0,2 μ L (figure 4.8).

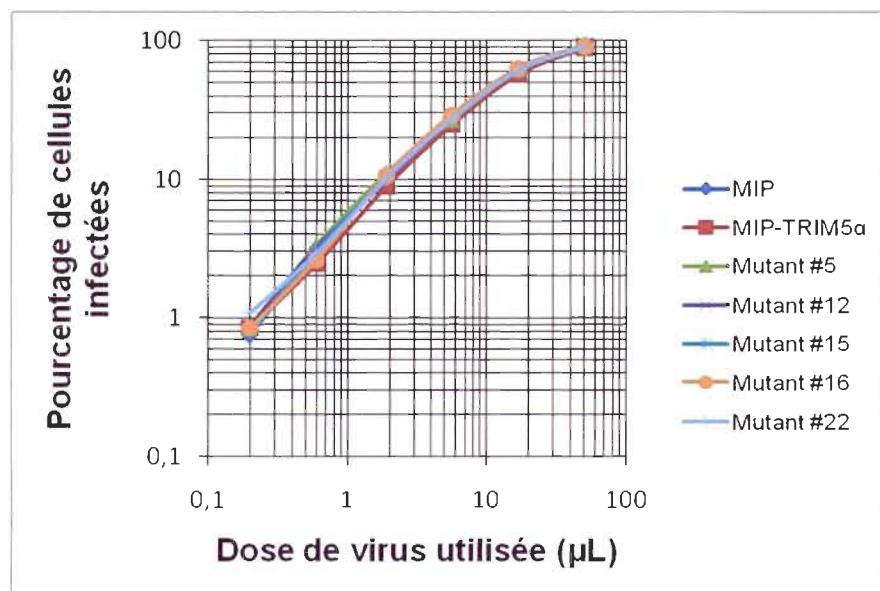


FIGURE 4.8 : Graphique du test effectué afin de vérifier si la résistance accrue au VIH-1 des mutants possédant une mutation similaire était due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté

Aucun clone ne présente donc de résistance accrue au VIH-1 due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté.

Aucun mutant ne possédait une résistance accrue au VIH-1 due à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté. Ils étaient tous des faux-positifs (voir la discussion à la section 5.6 pour les explications).

4.3.2.4 L'analyse des cellules TE671 triées de façon individuelle

Le troisième type cellulaire employé afin d'isoler les cellules exprimant un *TRIM5 α_{hu}* muté qui entraîne une restriction accrue au VIH-1 étaient les cellules TE671. Ces cellules ont été choisies pour les mêmes raisons que les cellules HeLa. Afin d'isoler les cellules exprimant un *TRIM5 α_{hu}* muté résistantes au VIH-1, des cellules TE671 ont été transduites avec la banque de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté produite à la section 3.2.2 et infectées par trois doses successives de VIH-GFP provoquant un taux de transduction de 91,73%. Ensuite, les cellules GFP-négatives ont été triées de façon individuelle et après le tri, un total de 177 clones a survécu. La résistance au VIH-1 de 77 de ces clones a été évaluée par cytométrie de flux (figure 4.9).

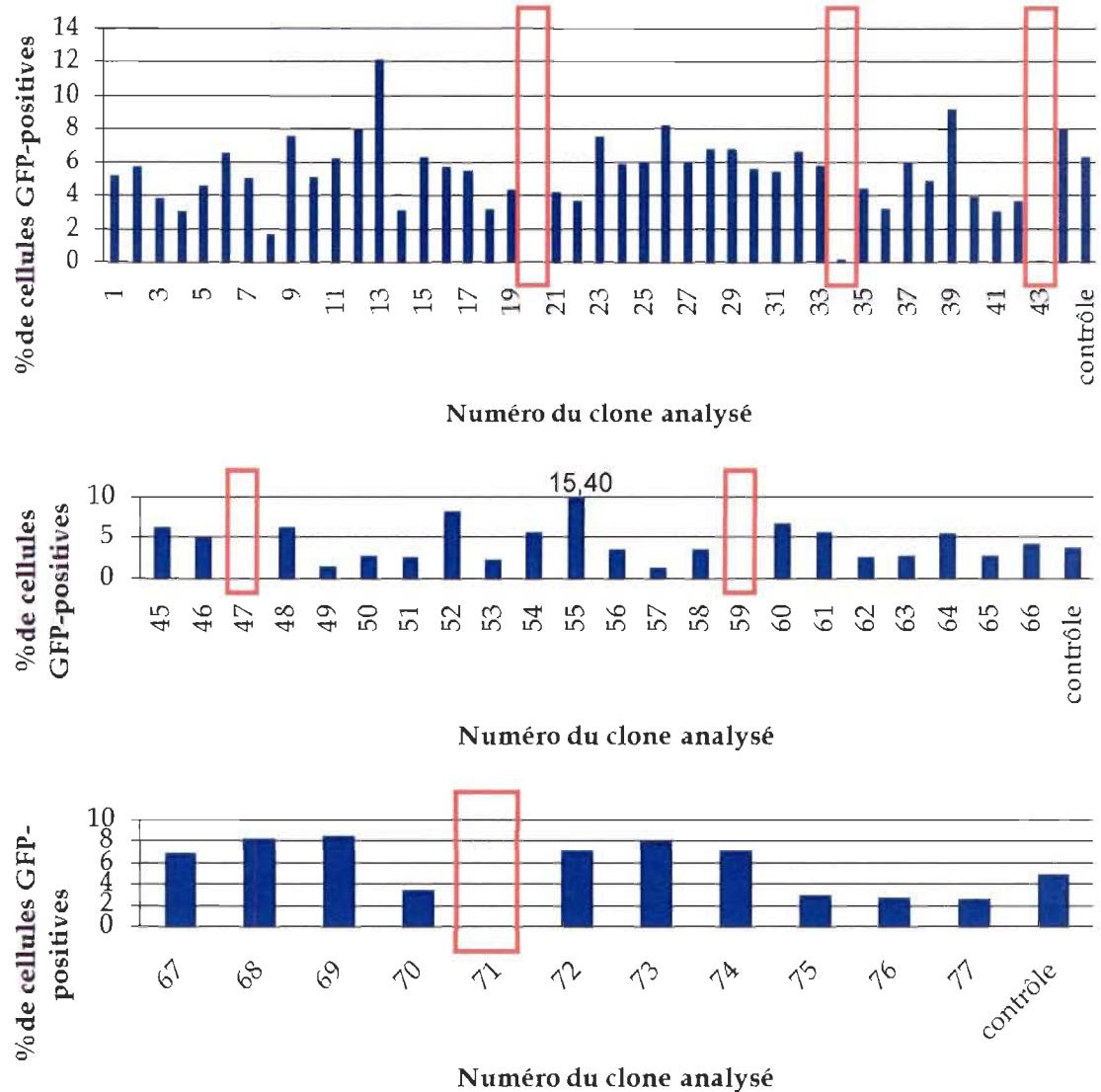


FIGURE 4.9 : Les résultats de la cytométrie de flux suite au tri cellulaire des cellules TE671

Les clones encadrés en rouge représentent les clones ayant la résistance la plus élevée au VIH-1 et ils ont été conservés pour des analyses subséquentes. Les axes ont été coupés et la valeur sur la colonne représente le pourcentage de cellules GFP-positives obtenu.

Les six clones encadrés en rouge dans la figure 4.9 présentaient la résistance la plus accrue au VIH-1. Ils ont alors été conservés pour une confirmation de leur restriction accrue au VIH-1 comme il a été effectué à la section 4.3.2.2. Les quantités de virus VIH-GFP suivantes ont été utilisées : (a) 200 µL, (b) 100 µL, (c) 50 µL, (d) 25 µL, (e) 12 µL, (f) 3 µL, (g) 1,5 µL, (h) 0,75 µL et (i) 0,38 µL (figure 4.10).

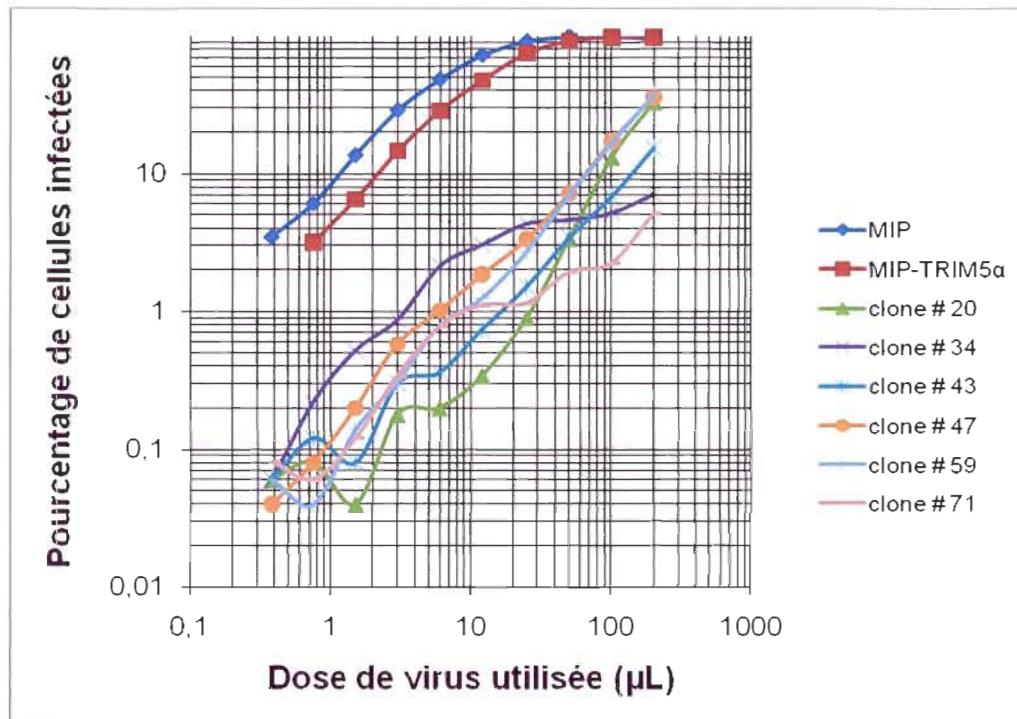


FIGURE 4.10 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de confirmer la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules TE671

Tous les clones présentaient une résistance accrue au VIH-1 de dix à 100 fois supérieure aux cellules contrôles.

Les clones présentaient tous une résistance accrue contre le VIH-1 qui était supérieure d'un facteur de dix à 100 fois comparé aux cellules contrôles, c'est-à-dire les cellules TE671 (*TRIM5α_{hu wt}*). L'ADN total de

ces clones a alors été extrait et les *TRIM5 α_{hu}* muté ont été amplifiés par PCR. Ils ont ensuite été reclonés dans pMIP. Ensuite, l'ADN plasmidique a été séquencé et les résultats du séquençage ont démontré que tous les clones analysés exprimaient *TRIMCyp* et non *TRIM5 α_{hu}* muté. Il a alors fallu recommencer le tri cellulaire en conservant un plus grand nombre de clones ayant une restriction moins forte au VIH-1 que ceux sélectionnés précédemment.

Le tri cellulaire de la banque de cellules TE671 transduites à 91,73% par du VIH-1 a été recommandé de façon individuelle. Suite à ce tri, 159 clones ont survécu et la résistance au VIH-1 a été analysée par cytométrie de flux pour 108 de ces clones. Pour ce faire, ces derniers ont été infectés respectivement par quatre doses de virus VIH-GFP : (a) 200 μ L, (b) 50 μ L, (c) 12 μ L et (d) 3 μ L. Un total de 68 clones ont présenté une résistance au VIH-GFP semblable aux cellules contrôles, c'est-à-dire une résistance quasi-nulle. La figure suivante représente les résultats de cytométrie de flux obtenus pour certains de ces clones (figure 4.11).

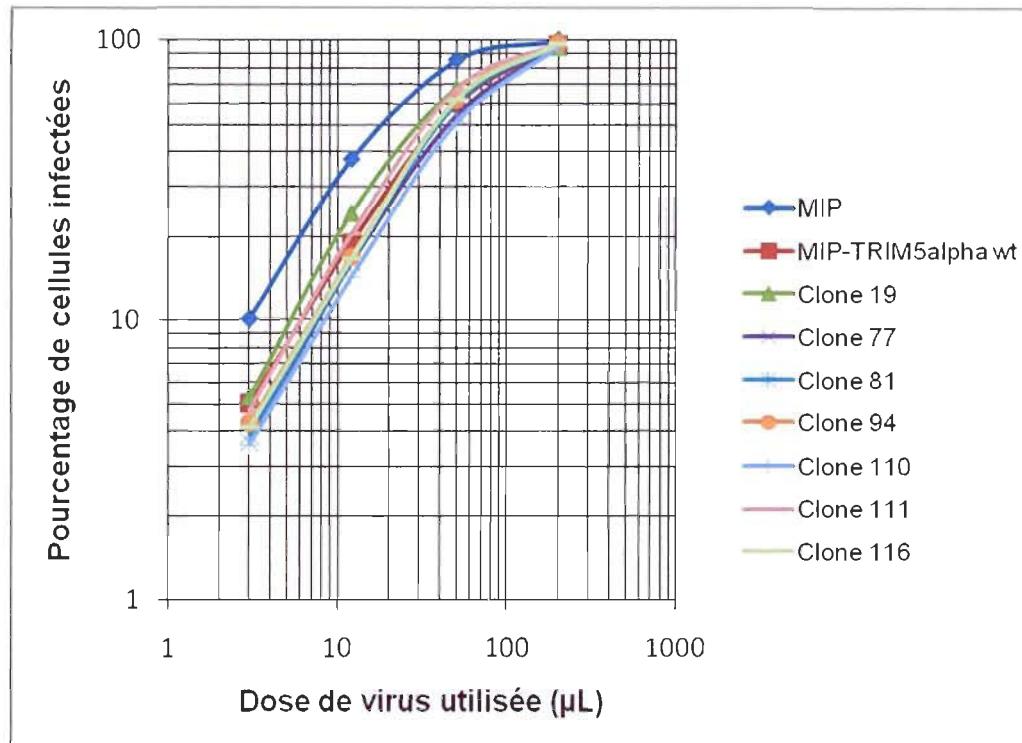


FIGURE 4.11 : Les résultats de la cytométrie de flux obtenus suite au tri cellulaire des cellules TE671 pour certains clones dont la résistance au VIH-1 était presque nulle

Sur un total de 108 clones, 68 clones ont présenté une résistance au VIH-1 presque nulle tout comme les cellules contrôles. Certains sont représentés dans cette figure.

Pour leur part, les 40 clones analysés restants ont présenté une résistance au VIH-1 d'environ deux à dix fois plus élevée que celle observée pour les cellules contrôles. Ceux-ci ont alors été conservés pour des analyses subséquentes. La figure suivante représente l'analyse des résultats de cytométrie de flux obtenue pour certains de ces clones (figure 4.12).

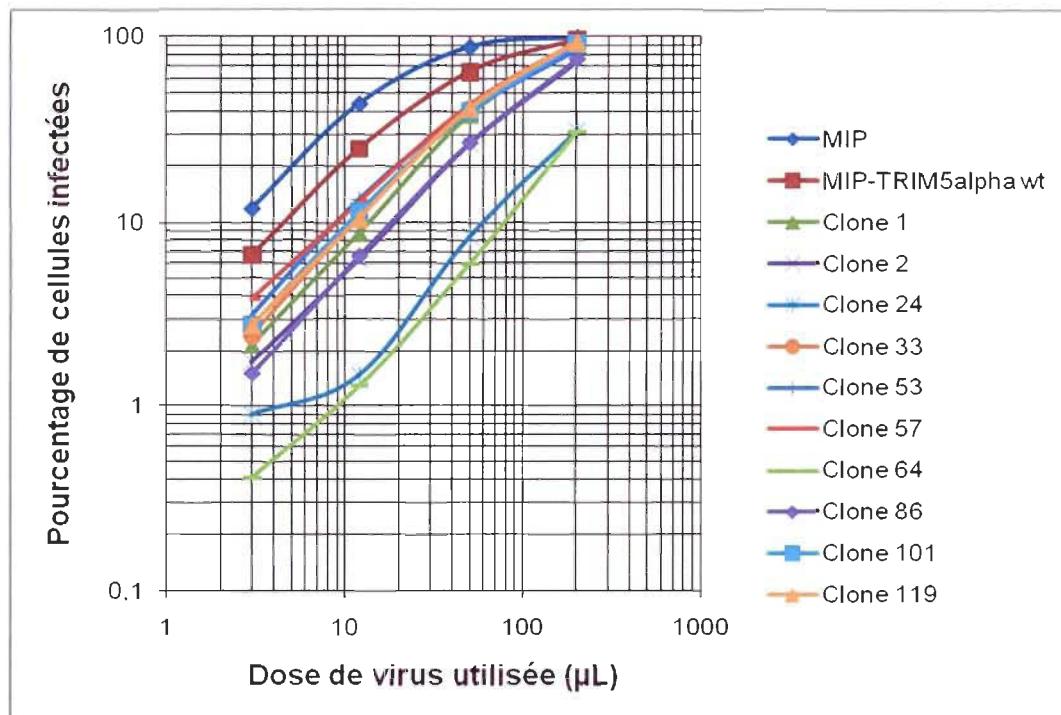


FIGURE 4.12 : Les résultats de la cytométrie de flux obtenus suite au tri cellulaire des cellules TE671 pour certains clones dont la résistance au VIH-1 était élevée

Sur un total de 108 clones, 40 ont présenté une résistance au VIH-1 de deux à dix fois supérieure aux cellules contrôles. Certains sont représentés dans cette figure.

L'ADN total des 40 clones conservés a alors été extrait et les *TRIM5α_{hu}* muté ont été amplifiés par PCR. Un de ces clones contenait du *TRIMCyp* alors il n'a pas été conservé pour les étapes suivantes et la PCR a échoué pour six clones. Les 33 autres *TRIM5α_{hu}* mutés pour lesquels la PCR a fonctionné ont ensuite été reclonés dans pMIP. Par la suite, l'ADN plasmidique de ces clones conservés a été séquencé. Un total de 12 clones présentaient des mutations non silencieuses. Il fallait donc confirmer que leur restriction accrue au VIH-1 était due à la présence de *TRIM5α_{hu}* muté. La technique qui a été utilisée est la même que celle employée pour les cellules HeLa triées individuellement. Les

quantités de virus VIH-GFP suivantes ont été utilisées : (a) 200 µL, (b) 50 µL, (c) 12 µL et (d) 3 µL (figure 4.13)

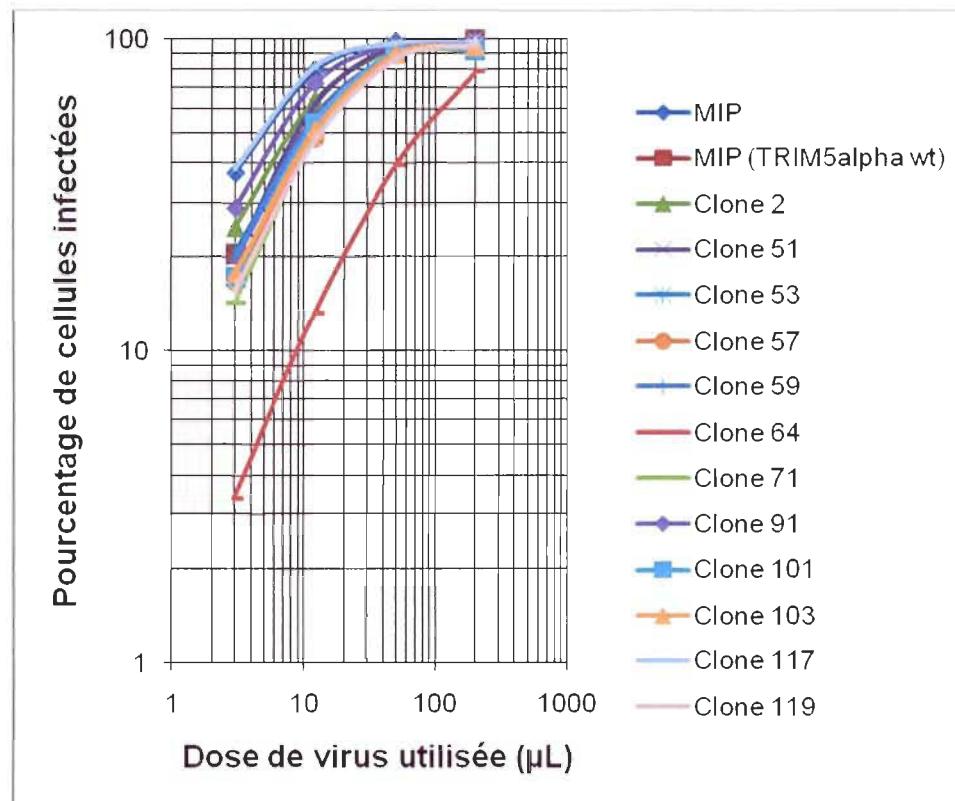


FIGURE 4.13 : Résultats de la cytométrie réalisée afin de confirmer la résistance accrue au VIH-1 des clones conservés chez les cellules TE671

Seul le clone 64 a présenté une résistance accrue au VIH-1 due à la présence d'un *TRIM5α_{hu}* muté. Cette résistance était six fois supérieure aux cellules contrôles.

Les résultats ont démontré que le clone 64 possédait une résistance accrue au VIH-1 qui était due à la présence de *TRIM5α_{hu}* muté et que les autres clones étaient des faux positifs.

CHAPITRE 5

DISCUSSION DES RÉSULTATS

5.1 La mutagenèse du domaine B30.2 de *TRIM5α_{hu}*

La technique de mutagenèse aléatoire par PCR a été appliquée sur le domaine B30.2, car ce domaine est nécessaire à l'activité de restriction de *TRIM5α_{hu}* et responsable de la spécificité de cette restriction. Comme le mécanisme d'action par lequel *TRIM5α* inhibe les rétrovirus n'est pas encore totalement connu, la région du domaine B30.2 qui est spécifique à l'activité de la restriction n'est pas encore définie. C'est pourquoi la mutagenèse aléatoire a été réalisée sur tout le domaine B30.2 plutôt que sur une région variable en particulier.

La technique de mutagenèse aléatoire par PCR employée comporte des limites (tableau 5.1). En effet, lors de la mutagenèse, il se produit plus de mutations AT → GC que de mutations GC → AT. Également, plus le numéro de condition du tampon choisi est élevé, plus le ratio transition/transversion est élevé (Clontech 2008).

TABLEAU 5.1
Les limites de la technique de mutagenèse aléatoire par PCR (Clontech 2008)

Condition de tampon	Mutations par 1 000 pb	Ts ^a /Tv ^b	AT→GC / GC→AT
1	2	0,9	7,3
5	4,6	1,3	2,9
9	8,1	3,9	13,7

^a Transition (une mutation purine↔purine ou pyrimidine↔pyrimidine)

^b Tranversion (une mutation purine↔pyrimidine)

Lors de la construction des différentes banques, la plupart des mutations se sont produites sur les bases A ou T, créant un biais puisque les mutations étaient plus nombreuses dans les régions riches en A/T que dans les régions riches en G/C. En effet, le ratio AT→GC/GC→AT calculé à partir des mutations obtenues lors des analyses de séquençage des clones de chaque banque construite était de 3,5 (tableau 5.2). Les résultats obtenus sont donc acceptables et moins biaisés que ceux attendus, c'est-à-dire l'obtention d'un ratio AT→GC/GC→AT d'environ 6 (tableau 5.1).

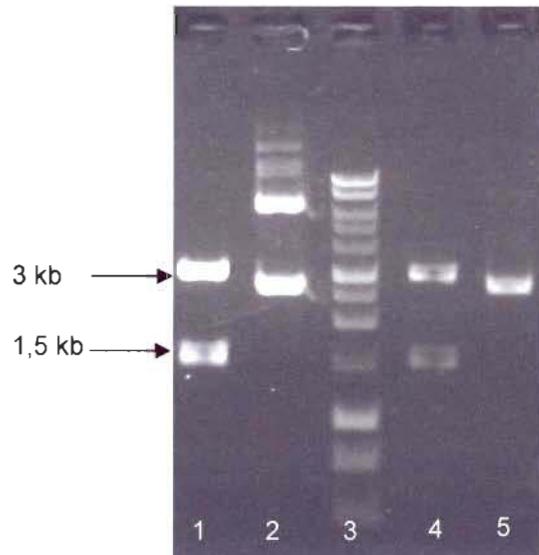
TABLEAU 5.2
Analyse de la nature des mutations retrouvées chez les différents clones séquencés

Type de mutation	Nombre de mutations	Pourcentage de substitutions
G → A, C → T	8	11,3
G → C, C → G	0	0
G → T, C → A	4	5,6
A → T, T → A	16	22,5
A → G, T → C	30	42,3
A → C, T → G	13	18,3
Insertion	3	-
Délétion	0	-
Total	74	100

Les résultats ont également démontré que l'utilisation de cette technique de mutagenèse n'a pas généré de nombreuses insertions/délétions ce qui est une caractéristique intéressante. En effet, une mutation résultant en l'insertion ou la délétion d'un nucléotide provoquerait un décalage dans le cadre de lecture de la protéine ce qui résulterait probablement en une protéine non fonctionnelle. Suite à l'ensemble de ces résultats, l'utilisation de la condition de tampon deux paraît avoir été un choix judicieux puisqu'elle a généré un faible ratio de mutations AT→GC/GC→AT, un nombre acceptable de mutations par 1 000 paires de bases et un faible taux d'insertions et de délétions. Malgré les limites que la technique de mutagenèse aléatoire comportait, elle demeurait une des techniques existantes la moins biaisée. Comme elle pouvait être ciblée sur un domaine particulier, elle était un choix indiqué.

5.2 La première technique employée afin d'amplifier le reste du gène *TRIM5α_{hu}*

La première technique utilisée pour créer la banque de pMIP-TRIM5α_{hu} muté s'est avérée inefficace car elle n'a généré aucune mutation chez les clones analysés. Le problème s'est produit au niveau de l'amplification du reste du plasmide puisque : (a) la technique de mutagenèse du domaine B30.2 utilisée lors de la première et de la deuxième technique employée pour amplifier le reste du gène *TRIM5α_{hu}* était la même et (b) la deuxième technique d'amplification du reste de *TRIM5α_{hu}* a fonctionné. Une explication possible de l'absence de mutations est la suivante : la réaction de PCR pourrait avoir amplifié le reste du plasmide comme prévu mais elle pourrait aussi avoir poursuivi l'amplification du plasmide sauvage complet et ensuite avoir expulsé *TRIM5α_{hu}* muté pour une raison inconnue. Ceci expliquerait l'absence de mutations chez les clones analysés. Cette hypothèse a été posée suite à l'analyse de l'ADN plasmidique de certains clones obtenus après la transformation des produits de PCR purifiés (figure 5.1).



- 1 : Produit de PCR purifié digéré par EcoRI et Xhol
- 2 : Produit de PCR purifié non digéré
- 3 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb
- 4 : pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt digéré par EcoRI et Xhol
- 5 : pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt non digéré

FIGURE 5.1 : Migration des produits de PCR et de pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt

Suite à la migration, des bandes d'une taille supérieure à pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté ont été obtenues pour l'ADN de pBluescript-TRIM5 α_{hu} muté non digéré. Ces bandes ne représentaient pas une forme habituelle de pBluescript-TRIM5 α_{hu} puisqu'elles étaient absentes lors de la migration de l'ADN de pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt non digéré. Comme le plasmide non digéré était superenroulé, il a été impossible de déterminer leur taille. Néanmoins, elles pourraient représenter des ADN contenant plus d'une copie de pBluescript-TRIM5 α_{hu} wt.

5.3 La production de la banque initiale de mutants

Lors de la construction de la banque initiale, un nombre de 24 600 clones a été obtenu. Ce nombre semblait convenable puisque le domaine muté était d'une taille de 600 paires de bases. Suite à l'obtention d'un nombre aussi élevé de mutants, il était donc permis de s'attendre à ce que chaque nucléotide du domaine B30.2 soit muté pour une des quatre bases azotées. Par conséquent, la banque initiale de *TRIM5 α_{hu}* muté semblait bien construite. Cependant, lors de la production de cette banque, une contamination de source inconnue est survenue. En effet, la banque a été contaminée par du vecteur pMIP-TRIMCyp ce qui a résulté en la transduction de pMIP-TRIMCyp dans un certain nombre de cellules. Lors de la sélection des clones ayant une résistance élevée au VIH-1, les différents clones exprimant TRIMCyp ont été isolés en plus des clones exprimant *TRIM5 α_{hu}* muté, car TRIMCyp inhibait très fortement le VIH-1. Néanmoins, parce que le projet visait à isoler un mutant de *TRIM5 α_{hu}* qui présentait une résistance accrue au VIH-1, les clones exprimant TRIMCyp étaient simplement mis à l'écart et les analyses se poursuivaient avec les clones qui exprimaient *TRIM5 α_{hu}* muté. Puisque cette contamination n'était pas nuisible au déroulement du projet, il n'a pas paru essentiel de recommencer la construction de la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté.

Même si la construction de la banque n'a pas été reprise, des moyens afin d'éliminer la plus grande quantité possible de TRIMCyp ont été utilisés. Comme *TRIM5 α_{hu}* et TRIMCyp possèdent des tailles très similaires, soient 1 482 pb et 1 426 pb respectivement, ils sont difficilement séparables sur gel. La digestion de la banque par des enzymes ayant un site de restriction dans pMIP-TRIMCyp mais pas dans pMIP-TRIM5 α_{hu} a alors paru être un bon moyen afin de se débarrasser de la plus grande quantité possible de pMIP-TRIMCyp. Pour ce faire, après le premier tri cellulaire effectué de façon collective, l'enzyme Avall a

été ajoutée à la digestion de la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté par EcoRI et Xhol à l'étape du reclonage de la banque dans pMIP. Ceci n'a pas suffit à enrayer la présence de *TRIMCyp*. Par conséquent, un faible taux de cellules a été transduit par pMIP-TRIMCyp après le premier cycle d'infection et ces cellules ont été isolées lors du deuxième tri cellulaire effectué de façon collective. Afin de pallier à ce problème, la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté a alors été digérée par deux enzymes ayant un site de restriction dans pMIP-TRIMCyp, soit BlpI et SbfI. Ceci n'a pas encore suffit à éliminer complètement la présence de pMIP-TRIMCyp. Néanmoins, le nombre de clones isolés exprimant pMIP-TRIMCyp était beaucoup moins élevé suite à la digestion des banques de pMIP-TRIM5 α_{hu} muté par des enzymes ayant un site de restriction dans pMIP-TRIMCyp.

5.4 Le tri cellulaire effectué avec les cellules MDTF

Suite au tri cellulaire effectué à l'aide des cellules MDTF, seuls neuf clones ont survécu sur un total de 384 clones. Cette lignée cellulaire n'était donc pas appropriée puisque son taux de survie au tri cellulaire était beaucoup trop faible. Le projet a donc été poursuivi avec les cellules HeLa.

5.5 Le tri cellulaire individuel effectué avec les cellules HeLa

Suite du tri cellulaire individuel réalisé avec les cellules HeLa, des clones faiblement permisifs au VIH-1 et n'ayant aucune activité de restriction médiée par *TRIM5 α_{hu}* muté ont été sélectionnés parmi les cellules triées. Ces mutants étaient tous des faux-positifs. Afin de pallier à ce problème, un plus grand nombre de cycles de sélection a donc dû être effectué afin d'éliminer la majeure partie des faux-positifs à chaque cycle d'infection. C'est pourquoi un tri cellulaire effectué de façon collective a été réalisé avec les cellules HeLa.

5.6 Le tri cellulaire collectif effectué avec les cellules HeLa

Les clones isolés suite à deux cycles de sélections étaient une fois de plus des faux-positifs. Les résultats du projet ont été présentés au 33^e congrès annuel sur les rétrovirus qui s'est déroulé du 18 mai au 24 mai à Cold Spring Harbor (33rd annual Cold Spring Harbor Laboratory meeting on retroviruses, 1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, New York). Lors de ce congrès, une conférence par Taichiro Takemura a démontré l'existence d'une sous-population de cellules HeLa naturellement résistantes au VIH-1 (Takemura et al. 2008). La cause de cette résistance est pour le moment encore inexpliquée. Ces données expliquaient donc les résultats obtenus lors des deux types de tri effectués avec les cellules HeLa. Par conséquent, les cellules isolées lors de ces tris faisaient probablement partie de cette sous-population de cellules HeLa résistante au VIH-1. La lignée cellulaire HeLa n'était donc pas appropriée pour réaliser ce projet. Celui-ci a alors été poursuivi avec les cellules TE671.

5.7 La première sélection des cellules résistantes au VIH-1 effectuée avec les cellules TE671

Suite à cette première sélection effectuée avec les cellules TE671, les clones isolés exprimaient tous pMIP-TRIMCyp et non pMIP-TRIM5 α_{hu} . Les paramètres de la sélection avaient donc été choisis de façon trop rigoureuse. Une autre sélection a dû être réalisée en conservant des clones ayant une restriction au VIH-1 moins élevée que lors de la sélection précédente.

5.8 La deuxième sélection des cellules résistantes au VIH-1 effectuée avec les cellules TE671

Après cette deuxième sélection, la plupart des clones isolés étaient des faux positifs. Cependant, un clone possédant une résistance accrue au VIH-1, causée par la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté, a été isolé. Ce clone contient une seule mutation et celle-ci est de nature non silencieuse. Elle confère une restriction de *TRIM5 α_{hu}* au VIH-1 de six fois supérieure à celle du type sauvage. En d'autres termes, à une dose donnée de VIH-1, six fois moins de cellules TE671 contenant cette version de *TRIM5 α_{hu}* muté ont été infectées comparé aux cellules TE671 transduites par *TRIM5 α_{hu} wt*. Mon collègue Quang Toan Pham a reproduit les résultats par mutagenèse dirigée et il a observé une résistance au VIH-1 de huit à dix fois pour ce mutant. Cette mutation est nouvelle et est située dans la région variable v₁ du domaine B30.2 de *TRIM5 α_{hu}* comme la mutation R332G qui augmentait la restriction de *TRIM5 α_{hu}* au VIH-1 de dix fois. Cette mutation est gardée secrète pour l'instant, car elle fait l'objet d'une demande de brevet.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

6.1 Conclusion du projet

Les deux objectifs à court terme du projet ont été atteints, soient : (a) de générer des mutations aléatoires par mutagenèse dirigée dans la protéine *TRIM5 α_{hu}* et (b) d'isoler par un criblage fonctionnel les différents mutants présentant une activité de restriction accrue contre le VIH-1. En effet, une banque de 24 600 mutants de *TRIM5 α_{hu}* contenant de une à deux mutations par gène a été produite. Puis, suite à plusieurs tri cellulaires, un clone de *TRIM5 α_{hu}* contenant une mutation ponctuelle non silencieuse qui augmente la restriction de *TRIM5 α_{hu}* au VIH-1 par six fois a été isolé. Ce mutant précis n'a pas encore été répertorié dans la littérature alors il est permis de conclure qu'un nouveau déterminant sensible à la restriction de *TRIM5 α_{hu}* au VIH-1 a été découvert. Les objectifs fixés au départ ont donc été atteints. La mutation découverte est un résultat prometteur, puisque la mutation générant le plus de résistance au VIH-1 qui avait été répertoriée jusqu'à ce jour était la mutation R332G qui conférait aux cellules une résistance au VIH-1 d'environ dix fois. Ce résultat est donc réellement significatif.

6.2 Directions futures du projet

La prochaine étape du projet serait de définir si l'acide aminé muté obtenu lors du criblage génétique est celui qui confère à *TRIM5 α_{hu}* la plus grande restriction au VIH-1. Pour ce faire, l'acide aminé muté serait remplacé, à la même position de *TRIM5 α_{hu}* , par différents acides aminés contenant des

différences au niveau de la charge latérale, de la solubilité dans l'eau et du pH. Ensuite, la mutation qui confère à TRIM5 α_{hu} la meilleure restriction contre le VIH-1 serait combinée à la mutation R332G, déjà répertoriée comme augmentant par un facteur de dix la restriction de TRIM5 α_{hu} contre le VIH-1. De cette façon, il serait possible de déterminer s'il se produit un effet additif au niveau de la restriction du VIH-1 par *TRIM5 α_{hu}* muté.

Une fois la protéine TRIM5 α_{hu} ayant la meilleure restriction au VIH-1 produite, l'étape suivante serait de caractériser la protéine mutée : (a) en vérifiant son expression par immunobuvardage de type western, (b) en observant sa localisation dans le cytoplasme de la cellule et (c) en étudiant sa stabilité. Ensuite, il serait possible de caractériser l'effet de la protéine TRIM5 α_{hu} mutée sur le VIH-1 en étudiant son effet sur la décapsidation du VIH-1 et en observant son effet sur la dégradation par le protéasome. Par la suite, il serait également possible de caractériser l'effet de *TRIM5 α_{hu}* muté sur diverses souches cellulaires et virales : (a) en observant l'effet de *TRIM5 α_{hu}* muté dans diverses lignées cellulaires, (b) en étudiant l'activité de restriction de *TRIM5 α_{hu}* muté contre d'autres rétrovirus et (c) en observant l'effet de *TRIM5 α_{hu}* muté sur d'autres souches de VIH-1. Finalement, à long terme, il serait intéressant de caractériser l'effet de *TRIM5 α_{hu}* muté sur le VIH-1 en observant s'il se produit des mutations au niveau du VIH-1 en réponse à la présence de *TRIM5 α_{hu}* muté.

Des traitements antirétroviraux hautement actifs ou « Highly Active Antiretroviral therapy » (HAART) ont été développés au cours des années pour contrer le VIH. Ils sont composés de plusieurs médicaments. Généralement, la thérapie comprend : a) un analogue de nucléosides, b) un inhibiteur de protéase et c) un deuxième analogue de nucléoside ou un inhibiteur de transcriptase inverse non-nucléoside (Alberta Reappraising AIDS Society 2009). Cette thérapie est administrée aux personnes atteintes du VIH tout au long du reste

de leur vie et la toxicité des différents médicaments du mélange administré peut être cumulative. C'est pourquoi, il est important de développer de nouvelles approches afin de contrer l'infection et la progression de la maladie. Une des approches intéressante est la thérapie génique. Elle consiste à faire pénétrer un gène dans les cellules ou les tissus d'un patient afin de traiter une maladie. Le but de cette thérapie est de remplacer ou de complémenter un allèle portant une mutation défective par un allèle de type sauvage ou encore de surexprimer une protéine ayant un effet thérapeutique (Griffiths et al. 2002). La thérapie génétique est administrée aux personnes atteintes du VIH, et ce, de façon seule ou encore en combinaison avec des traitements pharmacologiques. Généralement, les traitements sont initiés lorsque le taux de lymphocytes CD4⁺ des personnes atteintes se trouve entre 300×10^6 et 350×10^6 par litre de sang (Rossi et al. 2007).

Il serait possible de concevoir une thérapie génique à partir des résultats découverts lors de ce projet. En effet, deux méthodes de thérapie génique impliquant la protéine TRIM5 α_{hu} mutée possédant la meilleure restriction au VIH-1 pourraient être administrées aux patients atteints du VIH-1. La première impliquerait directement les lymphocytes T CD4⁺ (Rossi et al. 2007). En effet, la thérapie consisterait à prélever du sang du patient, à isoler les lymphocytes T CD4⁺, à infecter en laboratoire ces cellules avec un vecteur contenant la meilleure protéine TRIM5 α_{hu} mutée trouvée, à nettoyer les cellules et à les réinjecter au patient. La deuxième technique de thérapie génique qui pourrait être employée impliquerait des cellules souches hématopoïétiques (Rossi et al. 2007). Ce sont des cellules non différenciées qui sont à l'origine des leucocytes, des globules rouges et des plaquettes. Elles sont situées au niveau de la moelle osseuse. Tout d'abord, une mobilisation de la moelle osseuse serait effectuée par l'administration d'un facteur stimulateur des granulocytes pendant trois à cinq jours. Ensuite, un prélèvement de la moelle osseuse serait effectué et les cellules souches hématopoïétiques seraient isolées et enrichies grâce à

l'expression de leur protéine CD34⁺, protéine spécifique de ces cellules. Puis, les cellules seraient cultivées pendant deux à quatre jours en présence d'un mélange de cytokines recombinantes afin de stimuler les cellules à proliférer. Pendant ce temps, les cellules seraient aussi en présence du vecteur contenant la protéine TRIM5 α_{hu} mutée possédant la meilleure résistance au VIH-1 trouvée. Ensuite, un nettoyage des cellules serait réalisé et ces dernières seraient reinjectées au patient.

Une façon utilisée afin de vérifier le bon fonctionnement d'une thérapie génique est d'effectuer de brèves interruptions de traitement (Rossi et al. 2007). La charge virale ou le taux de CD4⁺ est alors mesuré au cours de l'interruption. Cette technique est sécuritaire et permet de déterminer l'habileté de l'hôte ainsi que les réponses engendrées afin de contrôler la réPLICATION virale et afin de protéger les cellules CD4⁺. Si la protéine TRIM5 α_{hu} mutée ayant la meilleure résistance au VIH-1 trouvée ne fonctionne pas lors de thérapies géniques, il existerait plusieurs méthodes qui pourraient être utilisées afin de trouver d'autres clones peut-être encore plus efficaces que celui trouvé lors de ce projet. Tout d'abord, le tri cellulaire et la sélection des cellules résistantes au VIH-1 due à la présence d'un gène *TRIM5 α_{hu}* muté pourraient être recommandées à partir de la banque de *TRIM5 α_{hu}* muté produite lors de ce projet en conservant un plus grand nombre de cellules triées. Ensuite, il serait possible de recommencer la mutagenèse aléatoire par PCR en l'appliquant cette fois-ci à la région variable v₁ de *TRIM5 α_{hu}* seulement, puisque la plupart des mutations dans *TRIM5 α_{hu}* augmentant la résistance au VIH-1 qui ont été recensées se trouvent dans cette région (Li et al. 2006b). Finalement, une autre technique de mutagenèse, telle la mutagenèse chimique, pourrait être utilisée afin de générer des mutations aléatoires dans *TRIM5 α_{hu}* . Cette technique générerait des biais de mutations différents, ce qui permettrait d'obtenir des banques de *TRIM5 α* muté différentes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alberta Reappraising AIDS Society. (2009) "Concerns about HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy)" Uniform Resource Locator <http://www.aras.ab.ca/haar.html>.
2. Anderson, J. et R. Akkina. (2005). "TRIM5alpharh expression restricts HIV-1 infection in lentiviral vector-transduced CD34+-cell-derived macrophages." *Mol Ther* 12(4): 687-96.
3. Anderson, J. L., E. M. Campbell, et al. (2008). "Heat shock perturbs TRIM5alpha restriction of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* 82(5): 2575-9.
4. Asaoka, K., K. Ikeda, et al. (2005). "A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons." *Biochem Biophys Res Commun* 338(4): 1950-6.
5. Berthoux, L., S. Sebastian, et al. (2005). "Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41): 14849-53.
6. Berube, J., A. Bouchard, et al. (2007). "Both TRIM5alpha and TRIMCyp have only weak antiviral activity in canine D17 cells." *Retrovirology* 4: 68.
7. Bieniasz, P. D. (2003). "Restriction factors: a defense against retroviral infection." *Trends Microbiol* 11(6): 286-91.
8. Bosco, D. A., E. Z. Eisenmesser, et al. (2002). "Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5247-52.
9. Brennan, G., Y. Kozyrev, et al. (2008). "TRIMCyp expression in Old World primates Macaca nemestrina and Macaca fascicularis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9): 3569-74.
10. Brennan, G., Y. Kozyrev, et al. (2007). "Novel TRIM5 isoforms expressed by Macaca nemestrina." *J Virol* 81(22): 12210-7.
11. Campbell, E. M., O. Perez, et al. (2008). "Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha." *J Cell Biol* 180(3): 549-61.
12. Campbell, E. M., M. P. Dodding, et al. (2007). "TRIM5 alpha cytoplasmic bodies are highly dynamic structures." *Mol Biol Cell* 18(6): 2102-11.

13. Clontech. (2008). "Diversify PCR Random Mutagenesis Kit User Manual", Uniform Resource Locator <http://www.clontech.com/images/pt/PT3393-1.pdf>.
14. Coffin, J. M., S. H. Hughes, et al. (1997) "Retroviruses", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U. S. A., 843 p.
15. Diaz-Griffero, F., X. Qin, et al. (2009) "A B-Box 2 surface patch important for TRIM5alpha self-association, capsid binding avidity, and retrovirus restriction." *J Virol* 83(20): 10737-51.
16. Diaz-Griffero, F., A. Kar, et al. (2007). "Comparative requirements for the restriction of retrovirus infection by TRIM5alpha and TRIMCyp." *Virology* 369(2): 400-10.
17. Diaz-Griffero, F., X. Li, et al. (2006). "Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5." *Virology* 349(2): 300-15.
18. Emerman, M. (2006). "How TRIM5alpha defends against retroviral invasions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5249-50.
19. Fassati, A., D. Gorlich, et al. (2003). "Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7." *EMBO J* 22(14): 3675-85.
20. Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*." *Nature* 397(6718): 436-41.
21. Goff, S. P. (2004). "Genetic control of retrovirus susceptibility in mammalian cells." *Annu Rev Genet* 38: 61-85.
22. Goila-Gaur, R. et K. Strelbel (2008). "HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity." *Retrovirology* 5: 51.
23. Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2003) "Immunologie : le cours de Janis Kuby", Dunod, Paris, France, 660 p.
24. Gottlinger, H. G. (2008). "HIV/AIDS: virus kept on a leash." *Nature* 451(7177): 406-8.
25. Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, et al. (2002) "Introduction à l'analyse génétique", 3^e éd., De Boeck, Paris, France, 860 p.

- 26.Hatzioannou, T., D. Perez-Caballero, et al. (2004). "Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10774-9.
- 27.Javanbakht, H., W. Yuan, et al. (2006). "Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding." *Virology* 353(1): 234-46.
- 28.Javanbakht, H., F. Diaz-Griffero, et al. (2005). "The contribution of RING and B-box 2 domains to retroviral restriction mediated by monkey TRIM5alpha." *J Biol Chem* 280(29): 26933-40.
- 29.Johnson, W. E. et S. L. Sawyer (2009). "Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene." *Immunogenetics* 61(3): 163-76.
- 30.Kaufman, H. E. et C. Heidelberger (1964). "Therapeutic Antiviral Action of 5-Trifluoromethyl-2'-Deoxyuridine in Herpes Simplex Keratitis." *Science* 145: 585-6.
- 31.Keeble, A. H., Z. Khan, et al. (2008). "TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16): 6045-50.
- 32.Levy, J. A. (2007) "HIV and the pathogenesis of AIDS", ASM Press, Washington D.C., U. S. A., 644 p.
- 33.Li, X. et J. Sodroski (2008). "The TRIM5alpha B-box 2 domain promotes cooperative binding to the retroviral capsid by mediating higher-order self-association." *J Virol* 82(23): 11495-502.
- 34.Li, X., B. Gold, et al. (2007). "Unique features of TRIM5alpha among closely related human TRIM family members." *Virology* 360(2): 419-33.
- 35.Li, X., Y. Li, et al. (2006a). "Functional replacement of the RING, B-box 2, and coiled-coil domains of tripartite motif 5alpha (TRIM5alpha) by heterologous TRIM domains." *J Virol* 80(13): 6198-206.
- 36.Li, Y., X. Li, et al. (2006b). "Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection." *J Virol* 80(14): 6738-44.
- 37.Liu, H. L., Y. Q. Wang, et al. (2005). "Adaptive evolution of primate TRIM5alpha, a gene restricting HIV-1 infection." *Gene* 362: 109-16.

38. Maillard, P. V., S. Reynard, et al. (2007). "Interfering residues narrow the spectrum of MLV restriction by human TRIM5alpha." *PLoS Pathog* 3(12): e200.
39. Mische, C. C., H. Javanbakht, et al. (2005). "Retroviral restriction factor TRIM5alpha is a trimer." *J Virol* 79(22): 14446-50.
40. NCBI. (2009a) "MEFV Mediterranean fever" Uniform Resource Locator [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=4210&log\\$=databasead&logdbfrom=protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=4210&log$=databasead&logdbfrom=protein).
41. NCBI. (2009b) "MID2 midline 2" Uniform Resource Locator http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=11043&ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.
42. NCBI. (2009c) "PML promyelocytic leukemia" Uniform Resource Locator http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=5371&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.
43. Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." *Nature* 451(7177): 425-30.
44. Nisole, S., C. Lynch, et al. (2004). "A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13324-8.
45. Noser, J. A., G. J. Towers, et al. (2006). "Cyclosporine increases human immunodeficiency virus type 1 vector transduction of primary mouse cells." *J Virol* 80(15): 7769-74.
46. O'Doherty, U., W. J. Swiggard, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding." *J Virol* 74(21): 10074-80.
47. Ohkura, S., M. W. Yap, et al. (2006). "All three variable regions of the TRIM5alpha B30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction." *J Virol* 80(17): 8554-65.
48. Passerini, L. D., Z. Keckesova, et al. (2006). "Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5alpha act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription." *J Virol* 80(5): 2100-5.

- 49.Perez-Caballero, D., T. Hatzioannou, et al. (2005). "Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity." *J Virol* 79(14): 8969-78.
- 50.Perron, M. J., M. Stremlau, et al. (2007). "The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid." *J Virol* 81(5): 2138-48.
- 51.Reeves, J. D. et R. W. Doms (2002). "Human immunodeficiency virus type 2." *J Gen Virol* 83(Pt 6): 1253-65.
- 52.Reymond, A., G. Meroni, et al. (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." *EMBO J* 20(9): 2140-51.
- 53.Rold, C. J. et C. Aiken (2008). "Proteasomal degradation of TRIM5alpha during retrovirus restriction." *PLoS Pathog* 4(5): e1000074.
- 54.Rossi, J. J., C. H. June, et al. (2007). "Genetic therapies against HIV." *Nat Biotechnol* 25(12): 1444-54.
- 55.Saenz, D. T., W. Teo, et al. (2005). "Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins." *J Virol* 79(24): 15175-88.
- 56.Sakuma, R., A. A. Mael, et al. (2007). "Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells." *J Virol* 81(18): 10201-6.
- 57.Sano. (2007) "Cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine", Uniform Resource Locator http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:HIV_gross_colored_fr_sans_libel.png.
- 58.Sawyer, S. L., M. Emerman, et al. (2007). "Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals." *PLoS Pathog* 3(12): e197.
- 59.Sawyer, S. L., L. I. Wu, et al. (2005). "Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 2832-7.
- 60.Sayah, D. M., E. Sokolskaja, et al. (2004). "Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1." *Nature* 430(6999): 569-73.

61. Schaller, T., S. Hue, et al. (2007). "An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins." *J Virol* 81(21): 11713-21.
62. Sebastian, S. et J. Luban (2005). "TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid." *Retrovirology* 2: 40.
63. Simon, V., D. D. Ho, et al. (2006). "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment." *Lancet* 368(9534): 489-504.
64. Sokolskaja, E., L. Berthoux, et al. (2006). "Cyclophilin A and TRIM5alpha independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells." *J Virol* 80(6): 2855-62.
65. Sokolskaja, E., D. M. Sayah, et al. (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." *J Virol* 78(23): 12800-8.
66. Song, B., F. Diaz-Griffero, et al. (2005a). "TRIM5alpha association with cytoplasmic bodies is not required for antiretroviral activity." *Virology* 343(2): 201-11.
67. Song, B., B. Gold, et al. (2005b). "The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates." *J Virol* 79(10): 6111-21.
68. Song, B., H. Javanbakht, et al. (2005c). "Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates." *J Virol* 79(7): 3930-7.
69. Stratagene. (2008) "pBluescript II KS+ Vector Map" Uniform Resource Locator
<http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript%20II%20KS+%20webpg.pdf>.
70. Strelbel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." *AIDS* 17 Suppl 4: S25-34.
71. Stremlau, M., M. Perron, et al. (2006). "Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5514-9.
72. Stremlau, M., M. Perron, et al. (2005). "Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction." *J Virol* 79(5): 3139-45.

73. Stremlau, M., C. M. Owens, et al. (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys" *Nature* 427(6977): 848-53.
74. Takemura, T., K. Lee, et al. (2008). "Cyclophilin A-dependant restriction of HIV-1 in somatic HeLa cells clones", HIV Drug Resistance Program, National Cancer Institute, Frederick, Maryland et Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, New York.
75. The Body. (2009) "HIV Life Cycle : Viral Attachment" Uniform Resource Locator
http://images.google.ca/imgres?imgurl=http://img.thebody.com/legacyAssets/66/27/cellbin.gif&imgrefurl=http://www.thebody.com/content/art6627.html&usg=_I70-xnoVX8bqVuc2Db0oPJn_NE=&h=237&w=428&sz=14&hl=fr&start=15&tbnid=N8ladFgjE9knRM:&tbnh=70&tbnw=126&prev=/images?q%3DHIV%2Battachment%2Bfusion%26gbv%3D2%26hl%3Dfr.
76. The GeneCards Human Gene Database. (2009) "Proline-rich nuclear receptor coactivator 1" Uniform Resource Locator
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Pnrc1>.
77. Towers, G. J. (2007). "The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A." *Retrovirology* 4: 40.
78. Uchil, P. D., B. D. Quinlan, et al. (2008). "TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle." *PLoS Pathog* 4(2): e16.
79. UNAIDS. (2008) "Media kit : 2008 Report on the global AIDS epidemic" Uniform Resource Locator
http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511_GR08_ExecutiveSummary_en.pdf.
80. Virgen, C. A., Z. Kratovac, et al. (2008). "Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9): 3563-8.
81. Weislow, O. S., R. Kiser, et al. (1989). "New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity." *J Natl Cancer Inst* 81(8): 577-86.
82. Wilson, S. J., B. L. Webb, et al. (2008). "Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9): 3557-62.

- 83.Wu, X., J. L. Anderson, et al. (2006). "Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19): 7465-70.
- 84.Yamauchi, K., K. Wada, et al. (2008). "Ubiquitination of E3 ubiquitin ligase TRIM5 alpha and its potential role." *FEBS J* 275(7): 1540-55.
- 85.Yap, M. W., S. Nisole, et al. (2004). "Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10786-91.
- 86.Ylinen, L. M., Z. Keckesova, et al. (2006). "Isolation of an active Lv1 gene from cattle indicates that tripartite motif protein-mediated innate immunity to retroviral infection is widespread among mammals." *J Virol* 80(15): 7332-8.