



Etude par fluorescence de l'importance des structures primaires et secondaires de la séquence cTAR et de la protéine NCp7 lors du premier saut de brin de la transcription inverse de VIH-1.

Hervé Beltz

UMR CNRS 7034

Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Moléculaires et Cellulaires

Directeur de thèse: Pr Yves Mély

I) Introduction

II) Impact des structures de la NCp7 et de cTAR sur le premier saut de brin

1) Déstabilisation de la partie basse de cTAR

2) Déstabilisation de la partie haute de cTAR

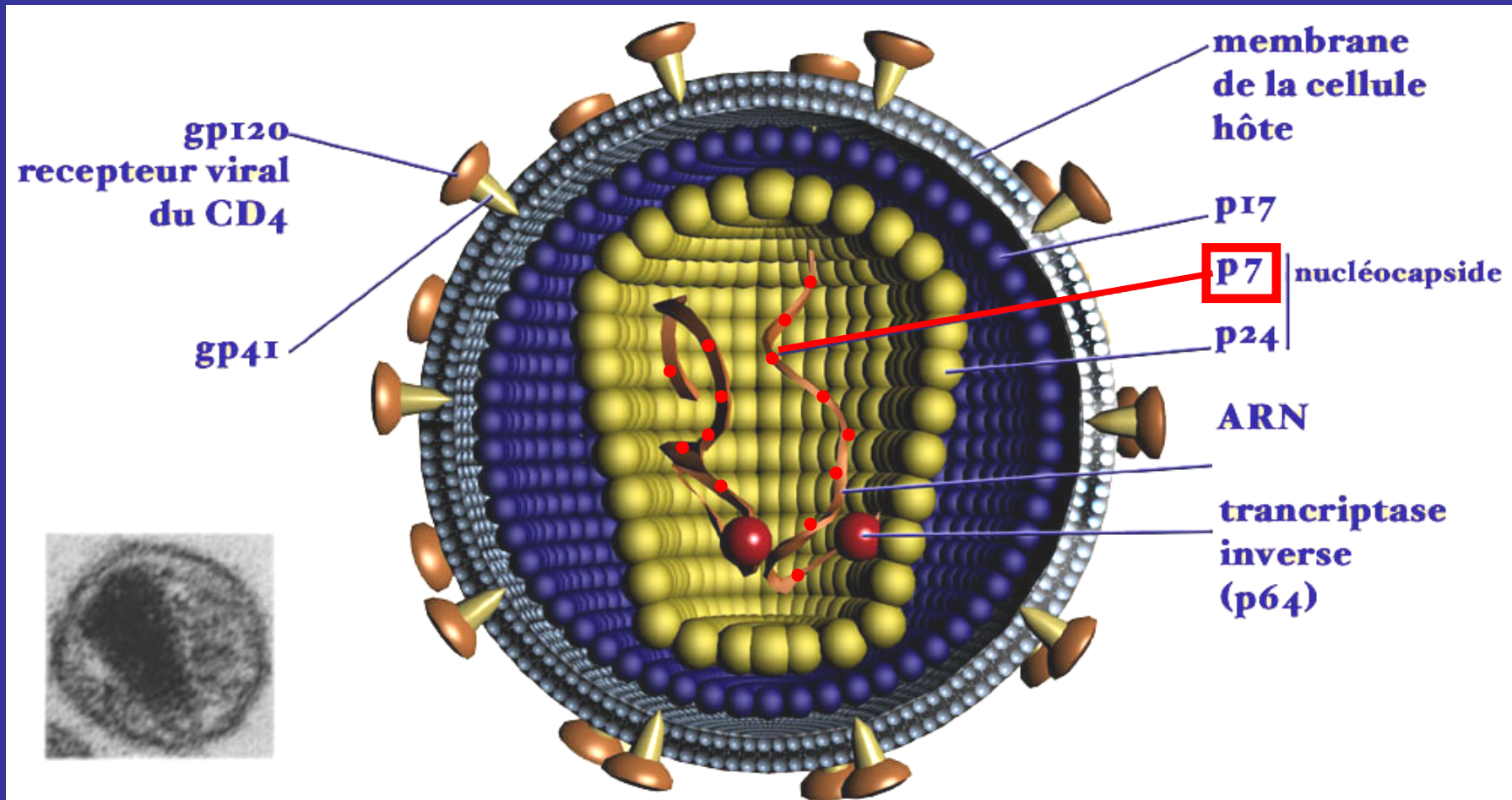
3) Formation de l'homodimère

4) Importance de la structure primaire de la NCp7

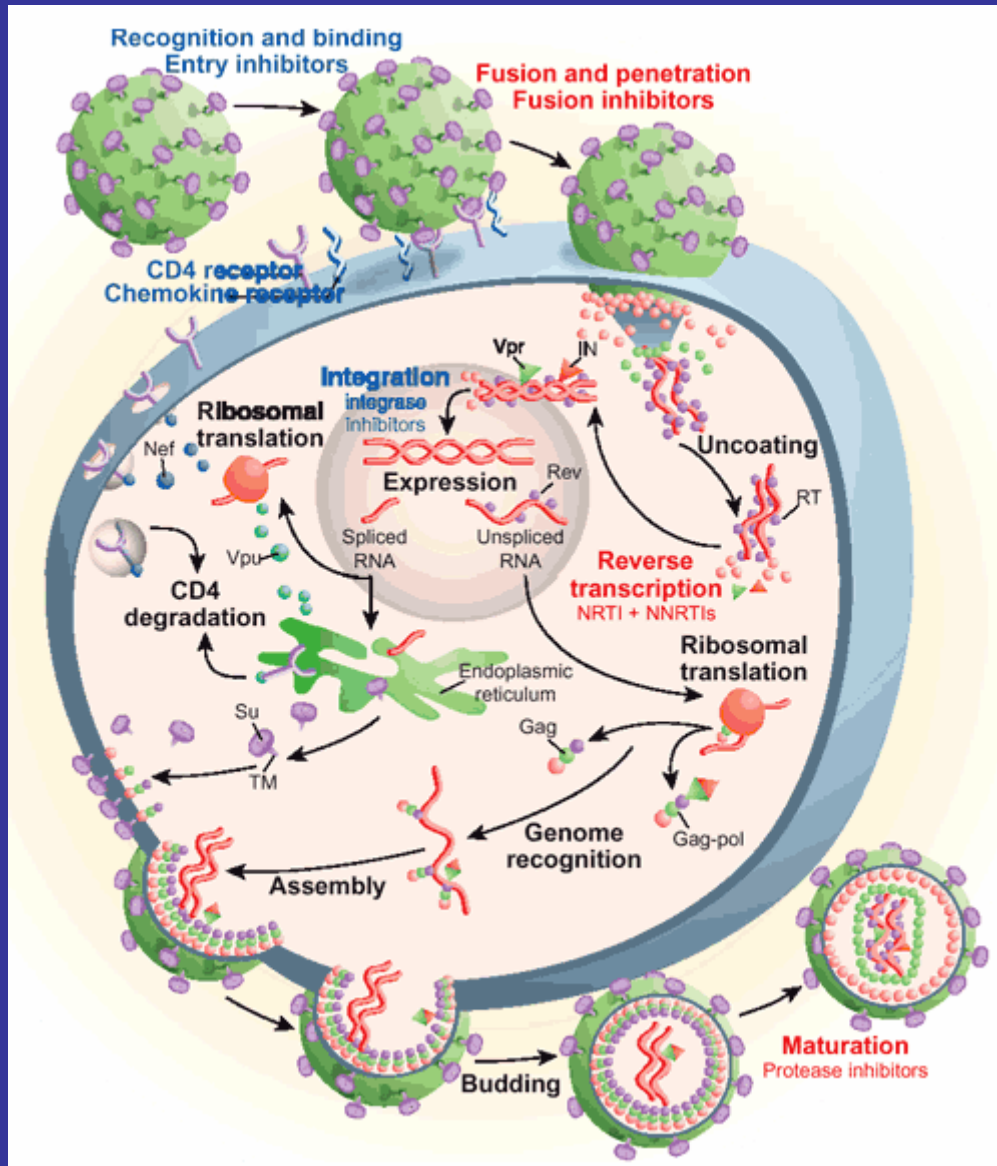
III) Description des propriétés spectroscopiques de la 8-vinyl-déoxyadénosine, un analogue fluorescent alternatif à la 2-aminopurine

I) Introduction

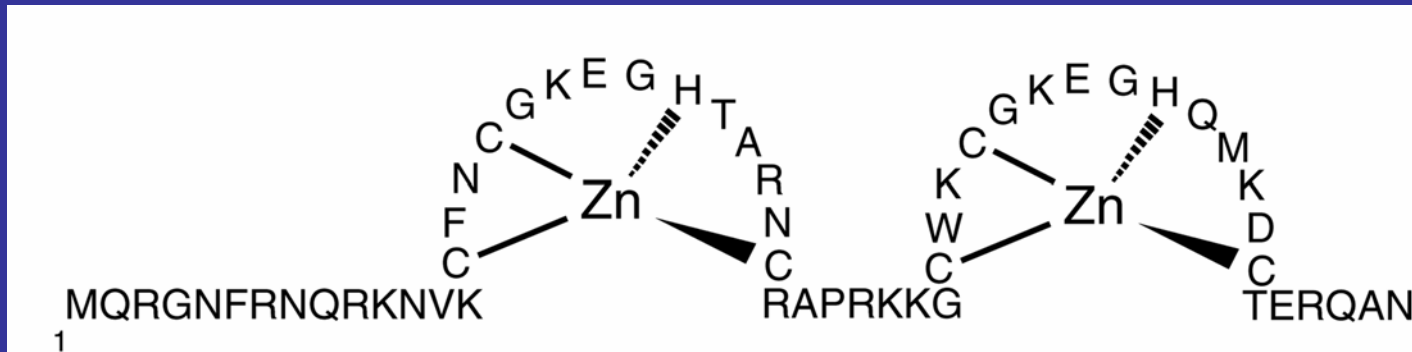
Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)



Les étapes principales du cycle viral de VIH-1



Les rôles de la NCp7 dans le cycle viral



Rôle histone

Rôle dans l'encapsidation du génome viral

Rôle dans la dimérisation du génome viral

Rôle dans l'intégration du génome viral

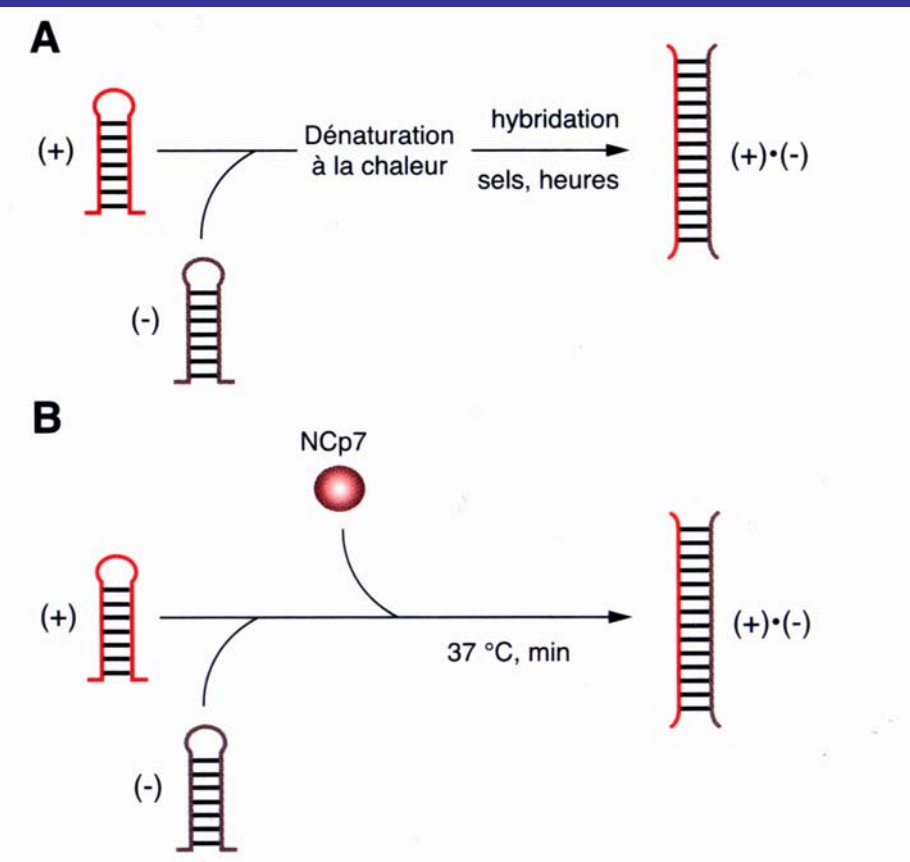
Rôle dans la transcription inverse de VIH-1

Activité chaperonne

Activité chaperonne

Définition :

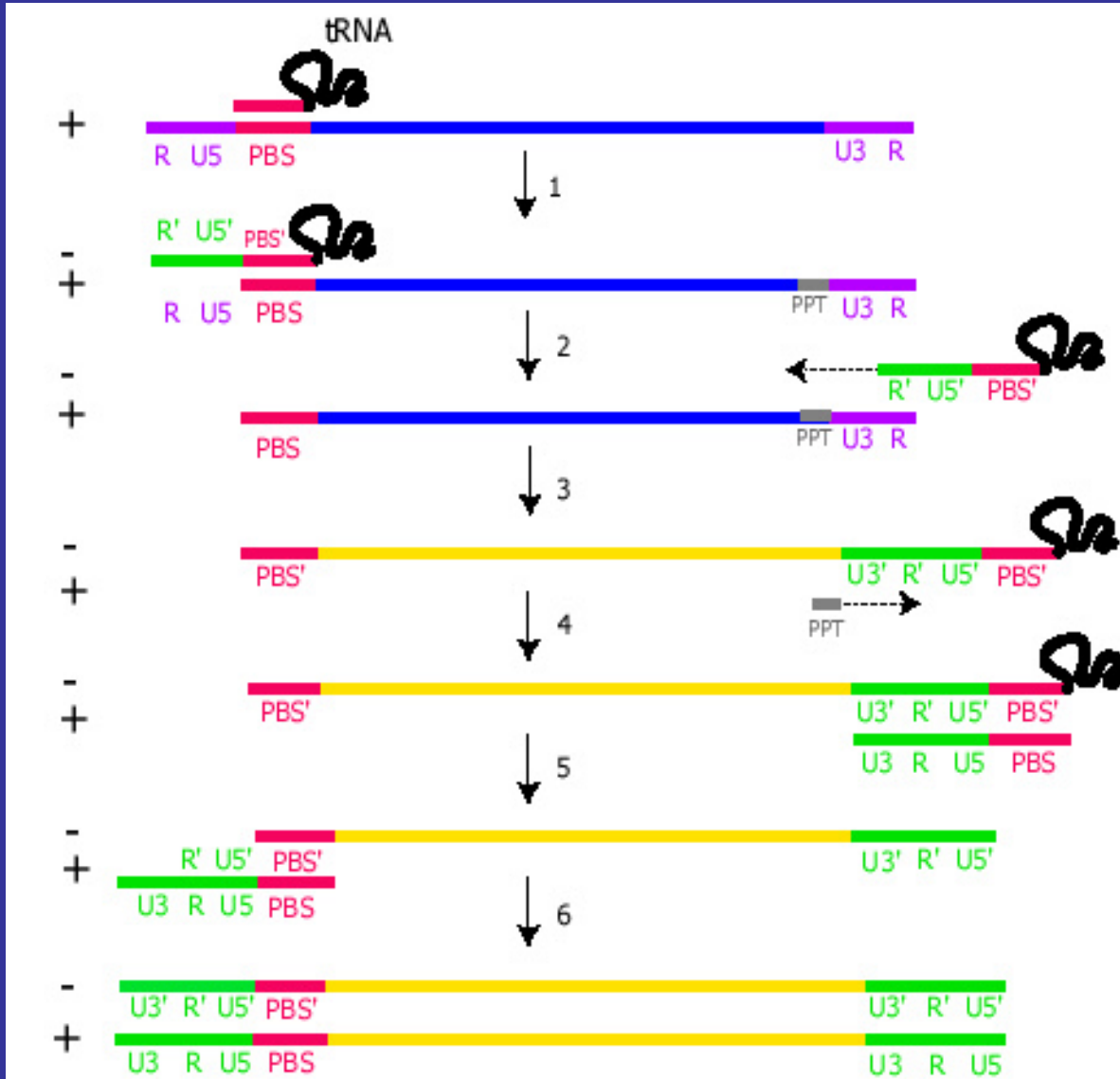
Cette activité permet à une molécule d'aider une autre molécule à atteindre sa conformation fonctionnelle et native



Baisse de la barrière énergétique durant l'ouverture des doubles brins

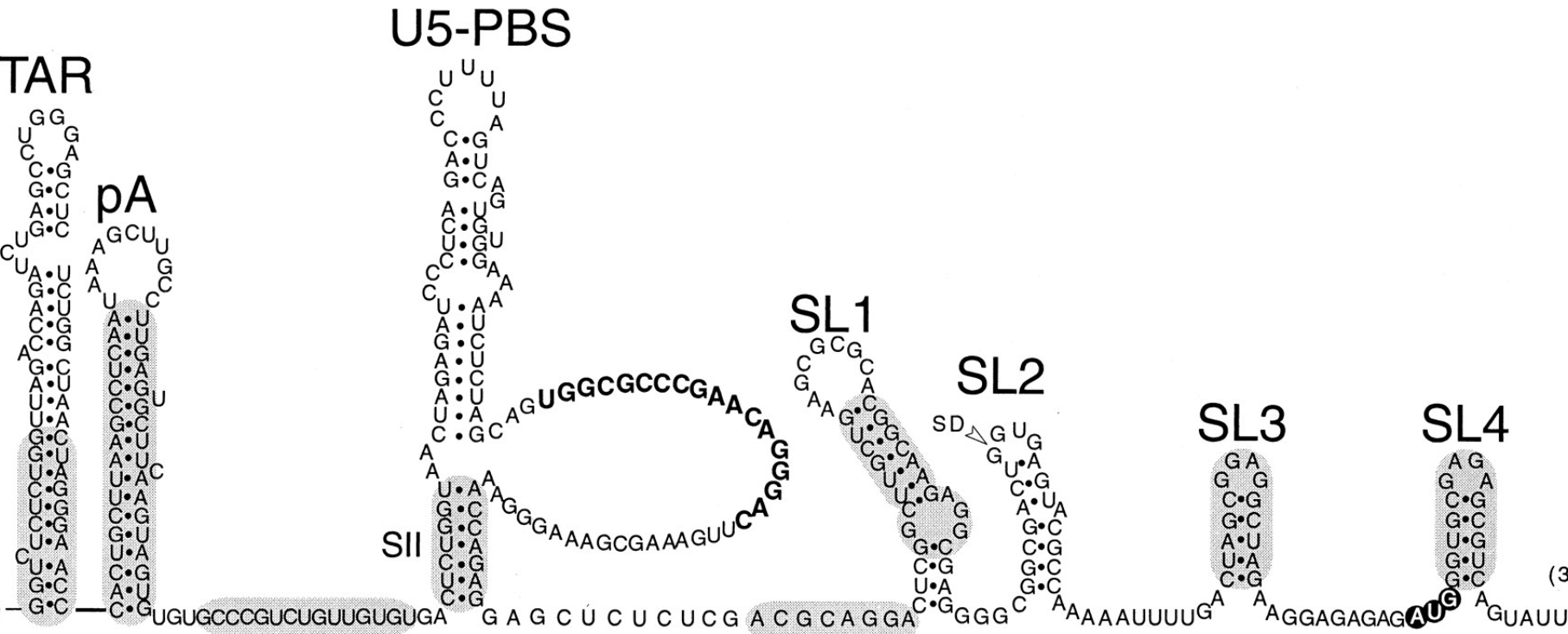
Réarrangement des acides nucléiques dans la conformation la plus stable

Transcription inverse de VIH-1



Premier saut de brin

Deuxième saut de brin



R

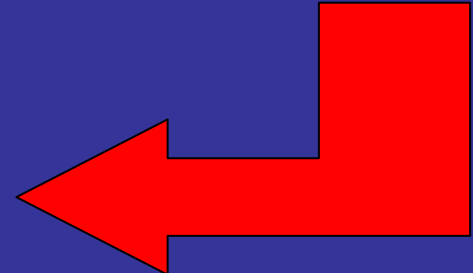
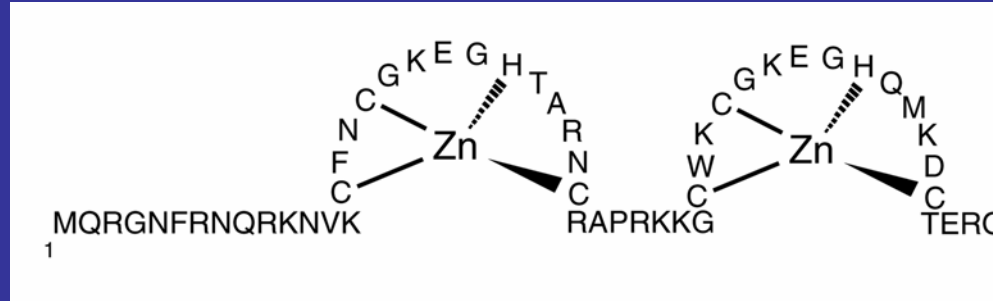
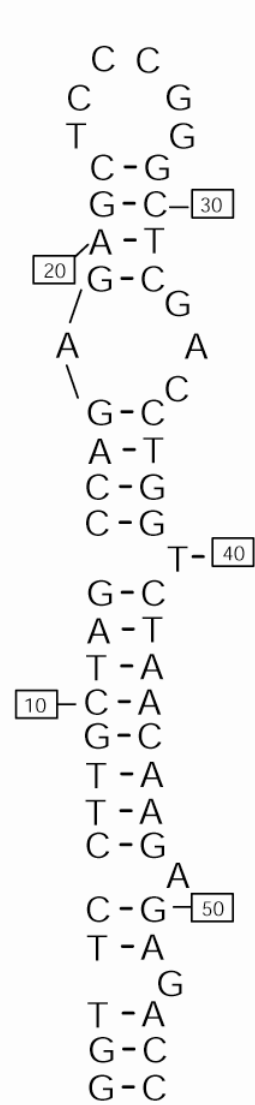
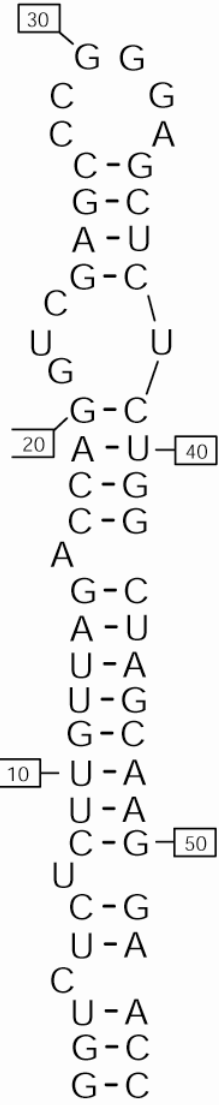
U5-PBS

Ψ

Premier saut de brin

TAR

cTAR



Ouverture et hybridation de la séquence TAR avec sa séquence complémentaire cTAR.

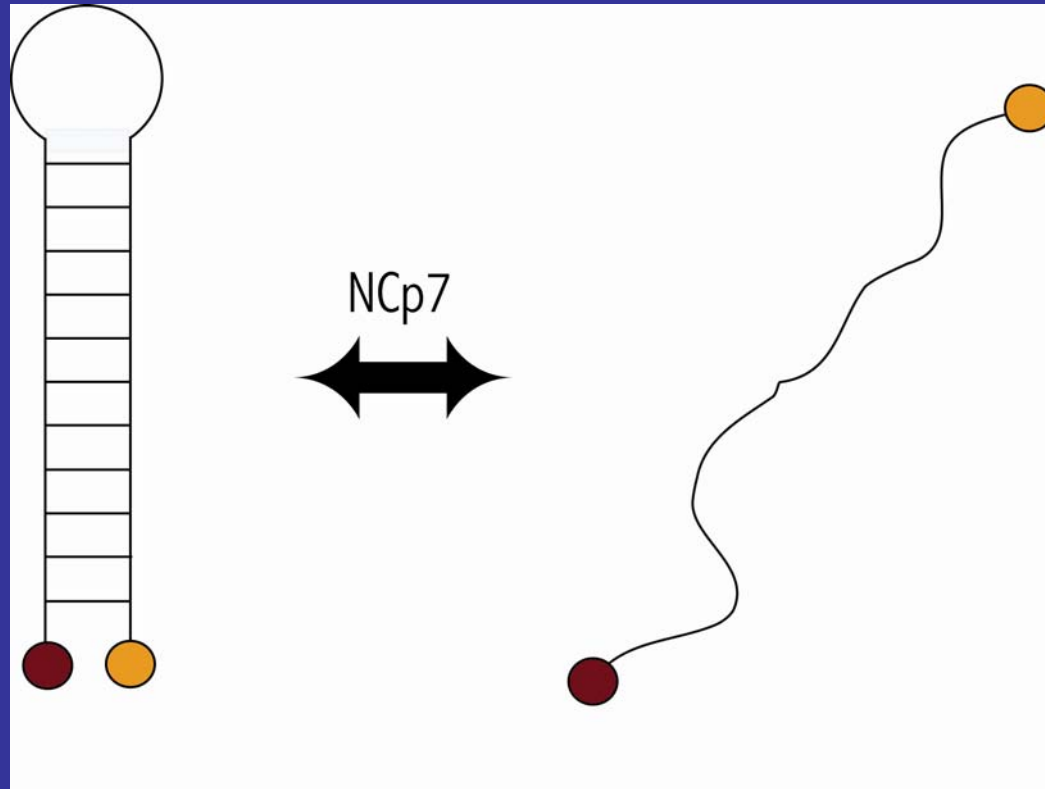
Méthodes

Spectroscopie d'absorbance

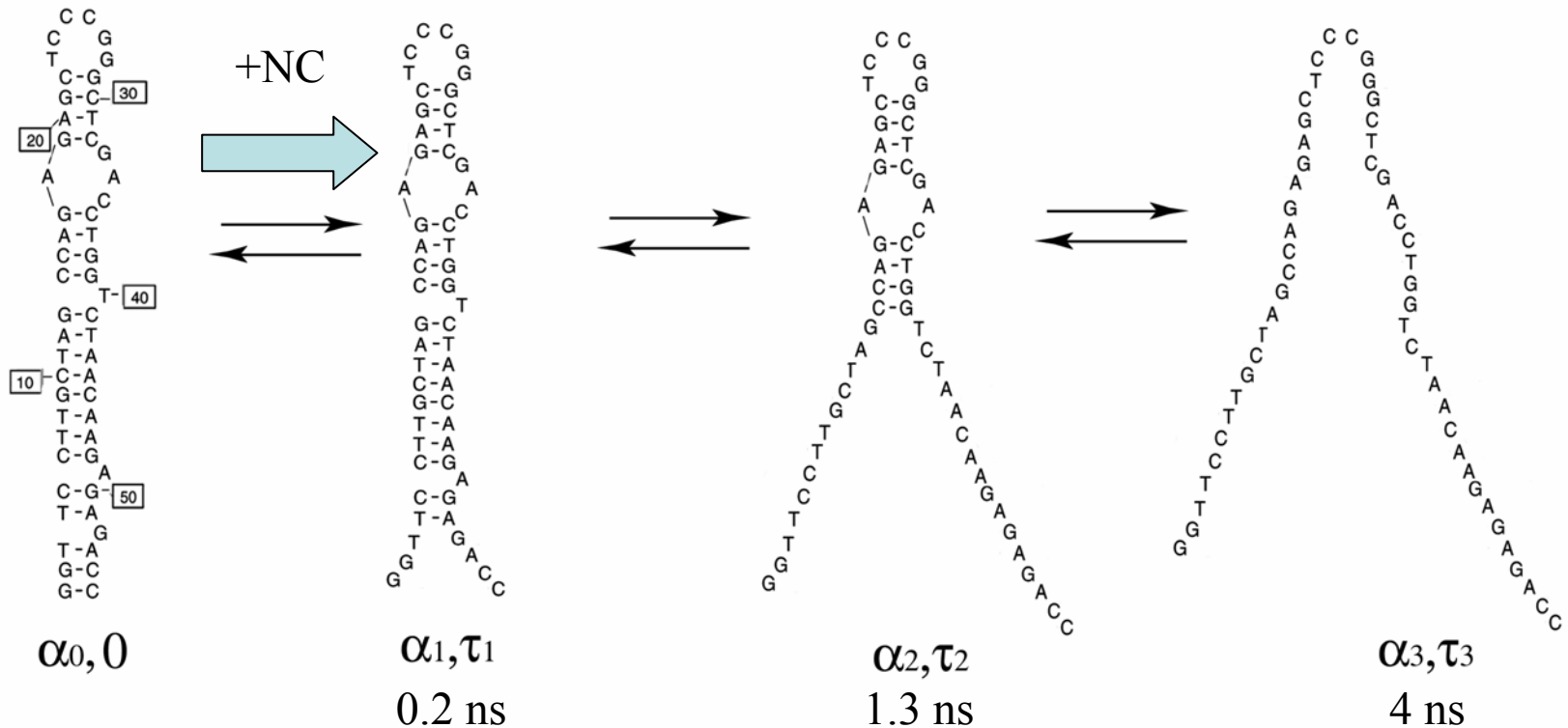
Spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire et résolue en temps

Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

Principe de la détection de l'ouverture par des sondes fluorescentes

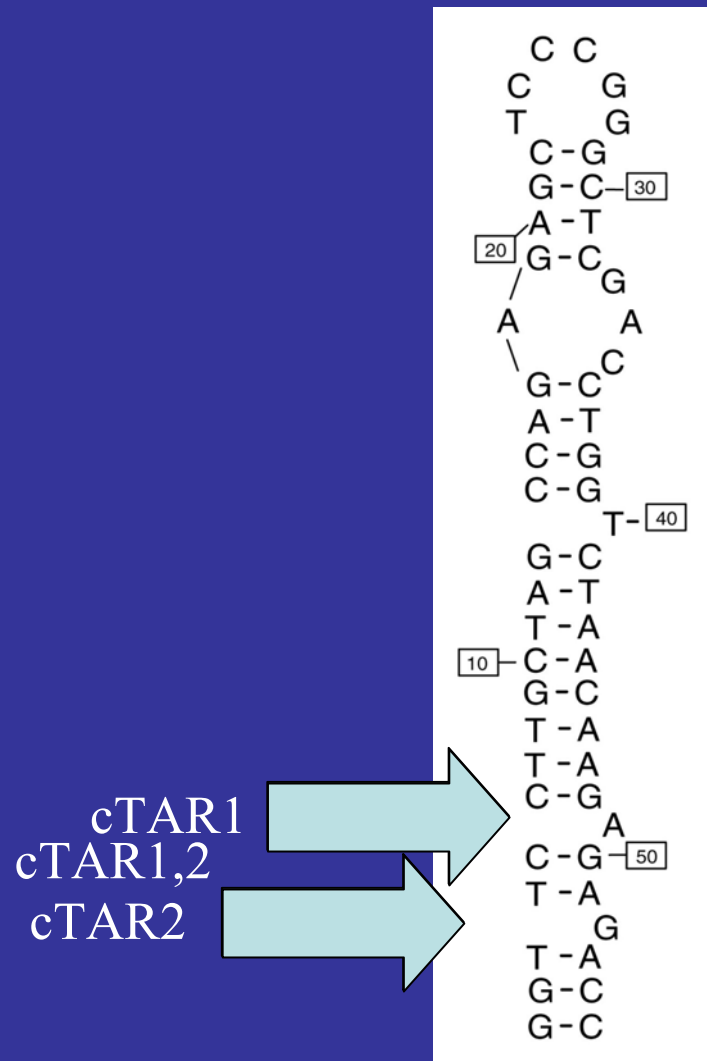


Effet déstabilisant de la NCp7



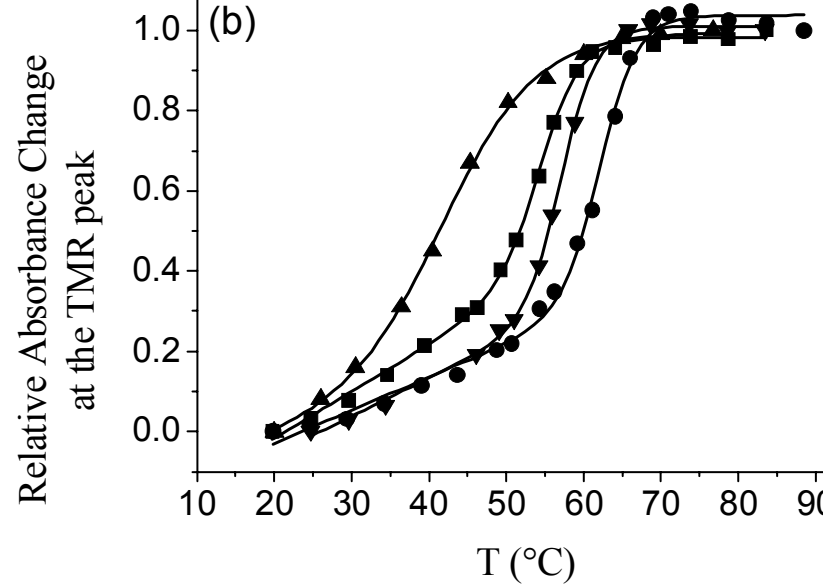
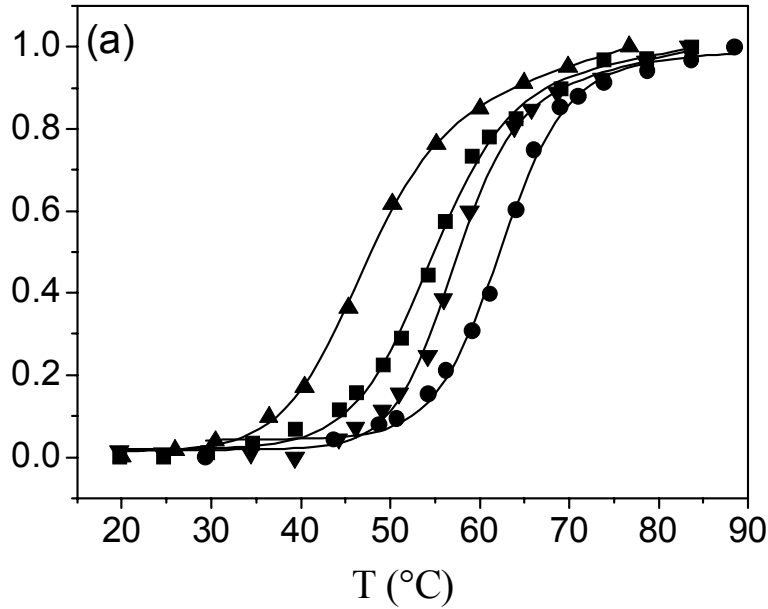
II) Impact des structures de la NCp7 et de cTAR sur le premier saut de brin

1) Déstabilisation de la partie basse de cTAR



Effet de la température et propriétés
thermodynamiques des mutants de la
partie basse de cTAR

Relative Absorbance Change
at 260nm



	T_m (°C)	$\Delta G^{37^\circ\text{C}}$ (kcal.mol ⁻¹)	T_m (°C)	$\Delta G^{37^\circ\text{C}}$ (kcal.mol ⁻¹)
cTAR	47±1	-1.7±0.2	43.5±1	-0.8±0.2
cTAR1	55±1	-4.6±0.5	55±1	-4.5±0.1
cTAR2	56±1	-4.6±0.5	56±1	-5.5±0.7
cTAR1,2	62.5±1	-6.5±0.2	62.5±1	-7.2±0.2

Effet de la protéine NC(12-55)

Effet suivi par spectroscopie de fluorescence résolue en temps

		α_0	α_2
cTAR	-	0.80	0.03
	+NC	0.46	0.24
cTAR1	-	0.78	0.02
	+NC	0.61	0.09
cTAR2	-	0.81	0.01
	+NC	0.71	0.06
cTAR1,2	-	0.78	0.02
	+NC	0.71	0.04

NC décale l'équilibre vers des formes partiellement ouvertes de cTAR.

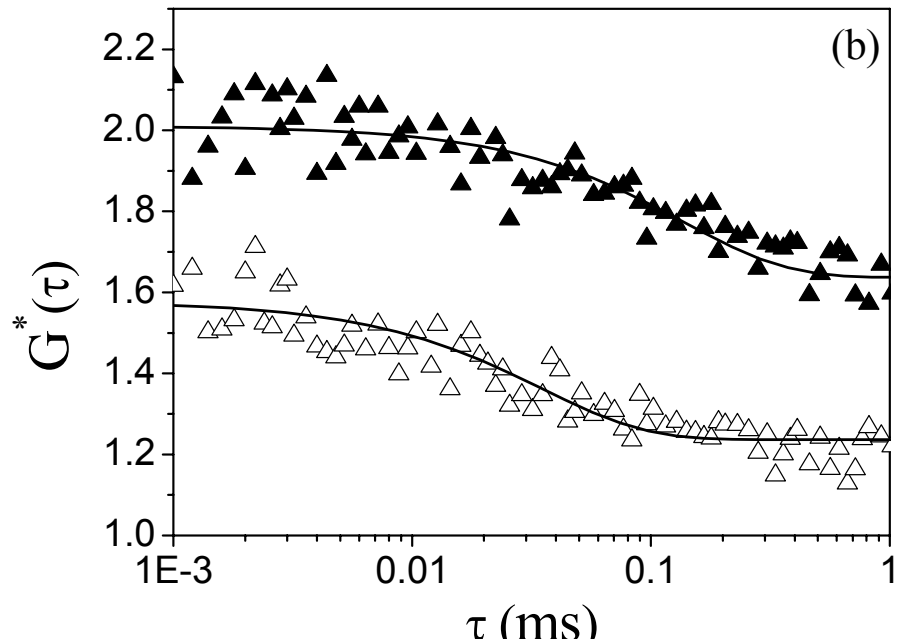
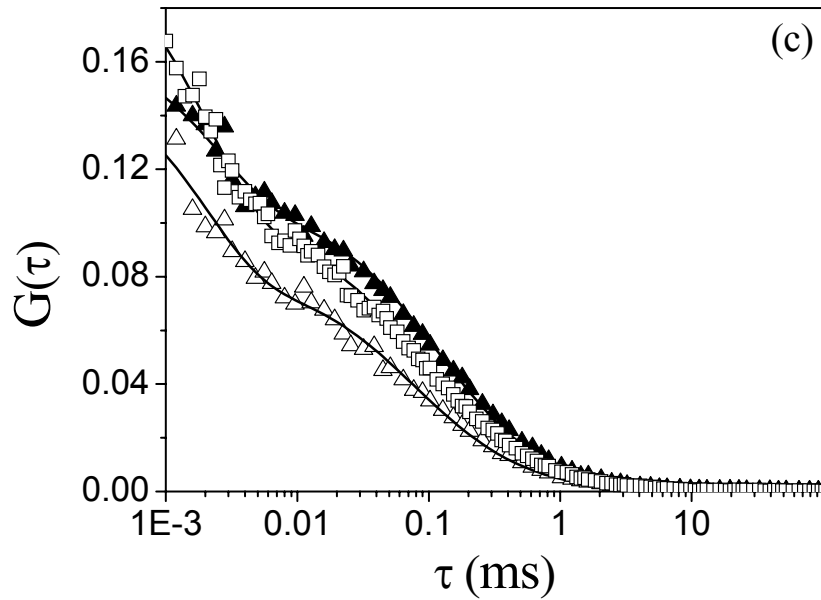
L'effet déstabilisant de la NC est:

$cTAR \gg cTAR1 > cTAR2 > cTAR1,2$

L'activité déstabilisante de la NCp7 dépend non seulement du nombre mais aussi de la position du bulge.

Les mesures de fluorescence résolue en temps nous ont permis également d'attribuer les différentes conformations aux différentes durées de vie mesurées.

Effet suivi par FCS



	<i>NC</i>	$k_{op} (s^{-1})$	$k_{cl} (s^{-1})$
cTAR	-	1250±150	5000±600
	+	>18000	>15400
cTAR1	-	2600±900	9200±3000
	+	>13000	>20300
cTAR2	-	3000±1000	12400±4000
	+	>10000	>24000
cTAR1,2	-	5500±1000	19500±5000

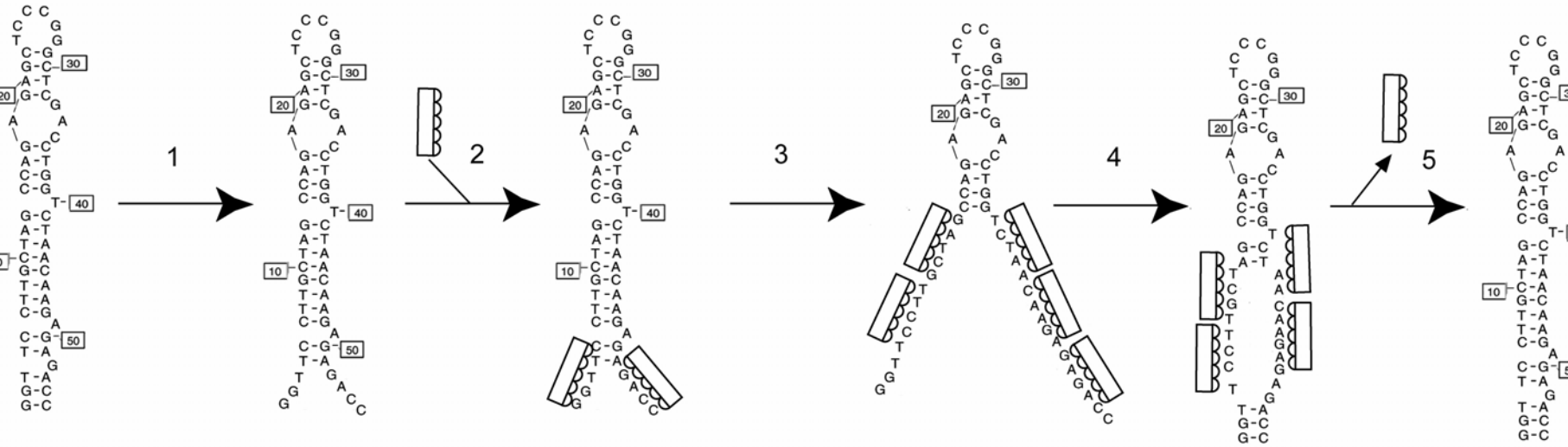
-A 20°C

- k_{op} augmente car les segments mis en jeu dans le fraying pour les mutants sont plus courts.

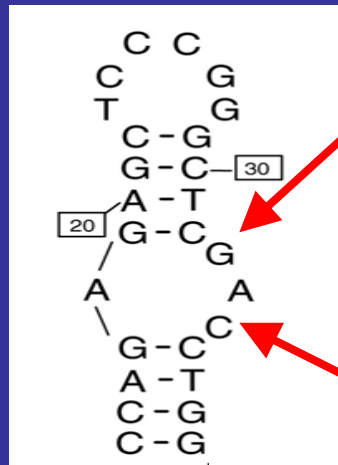
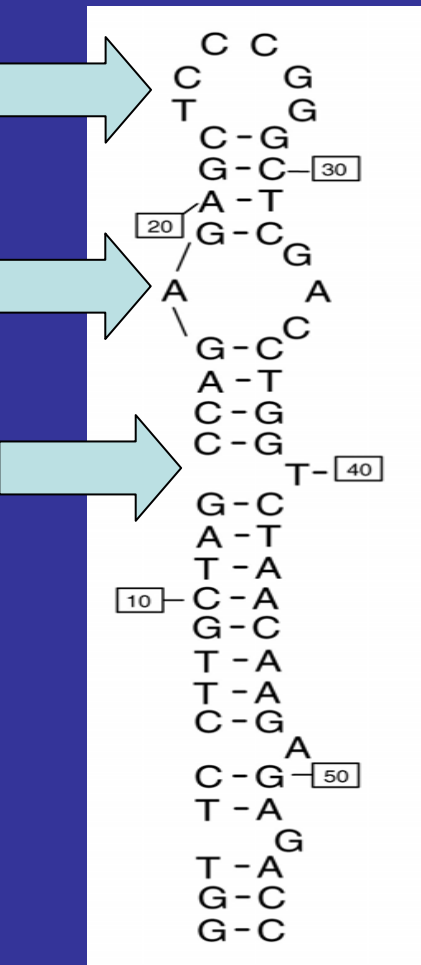
- k_{cl} est proportionnelle à la probabilité de collision entre les extrémités.

-Après ajout de NC, le mouvement de fraying est accéléré ce qui augmente à la fois k_{cl} et k_{op} .

Conclusion (1)

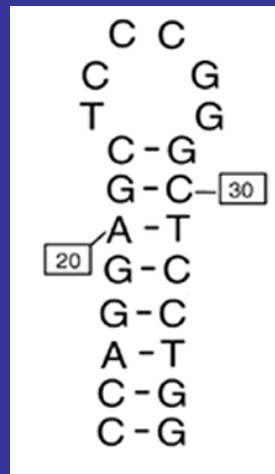


2) Déstabilisation de la partie haute de cTAR



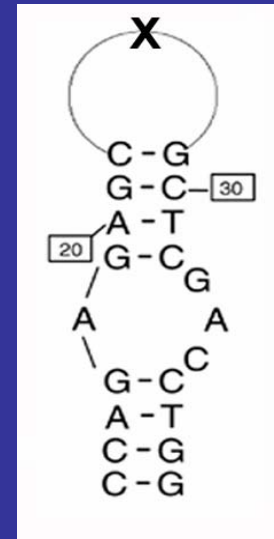
A³³(14-39) cTAR

(14-39)cTAR



ΔB(14-39)cTAR

A³⁵(14-39) cTAR



ΔL(14-39) cTAR

Effet de la température et propriétés
thermodynamiques des mutants de la
partie haute de cTAR

	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta G^{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal.mol^{-1})
cTAR	47	-1.7
(14-39)cTAR	59	-2.8
$\Delta\text{B}(14-39)\text{cTAR}$	73	-6.5
$\Delta\text{L}(14-39)$ cTAR	66	-2.8
$\text{A}^{35}(14-39)$ cTAR	55	-2.4
$\text{A}^{33}(14-39)$ cTAR	52	-1.6

Effet de la protéine NC(12-55)

	NC	α_0	α_2	I_{+NC}/I_{-NC}
cTAR	-	0.87	0.01	6.9
	+	0.55	0.15	
(14-39)cTAR	-	0.88	0.01	3.1
	+	0.78	0.04	
$\Delta B(14-39)cTAR$	-	0.91	0.005	1.9
	+	0.89	0.01	
$A^{35}(14-39) cTAR$	-	0.91	0.011	5.8
	+	0.71	0.08	
$A^{33}(14-39) cTAR$	-	0.93	0.01	9.4
	+	0.63	0.111	
$\Delta L(14-39) cTAR$	-	0.89	0.011	2.7
	+	0.79	0.04	

Conclusion (2)

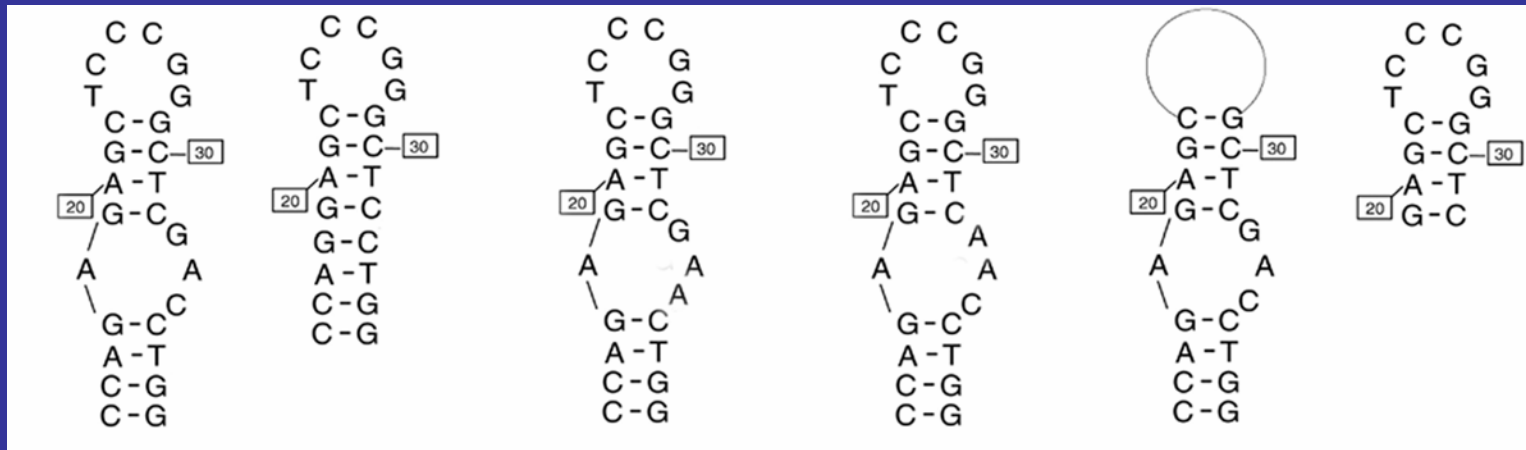
La partie haute de cTAR est plus résistante à la NC et la partie basse déstabilise l'ensemble de la séquence.

NC déstabilise par la partie basse de cTAR.

La boucle interne constitue un site d'initiation de la déstabilisation au contraire de la boucle apicale.

La séquence de la boucle interne module l'effet déstabilisant de NC

3) Formation de l'homodimère



$$N_{+NC}/N_{-NC}$$

1.2

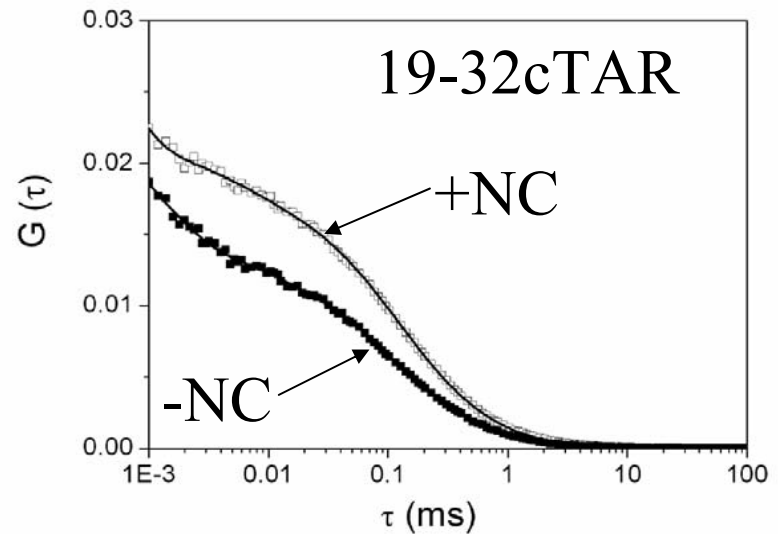
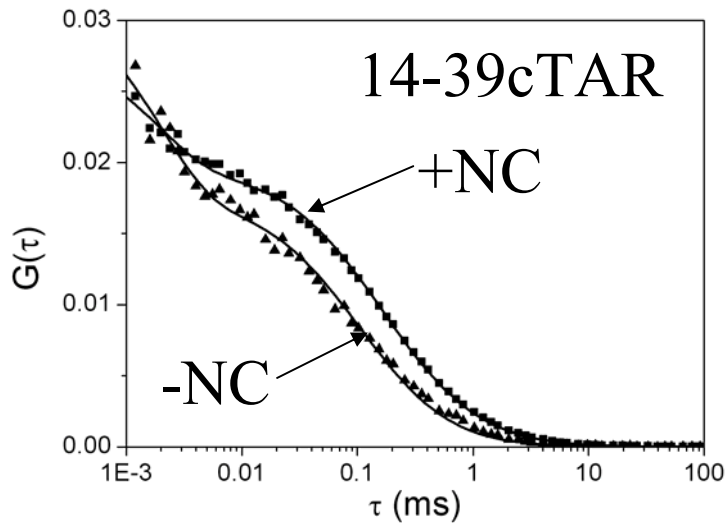
0.6

1.0

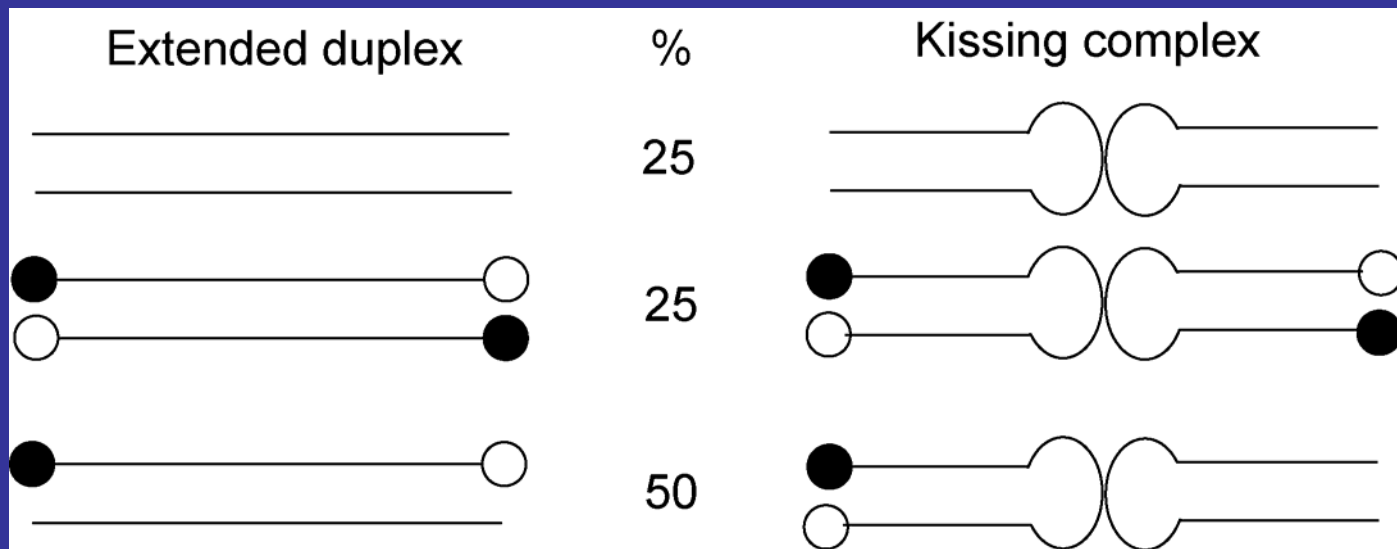
1.1

1.0

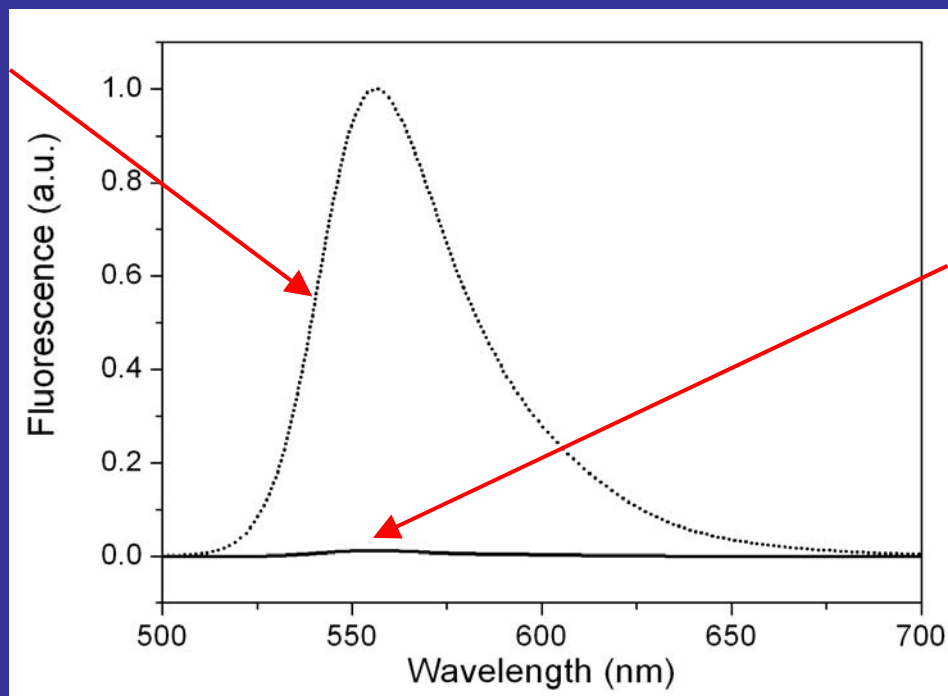
0.5



Duplex étendu ou Complexe boucle-boucle ?

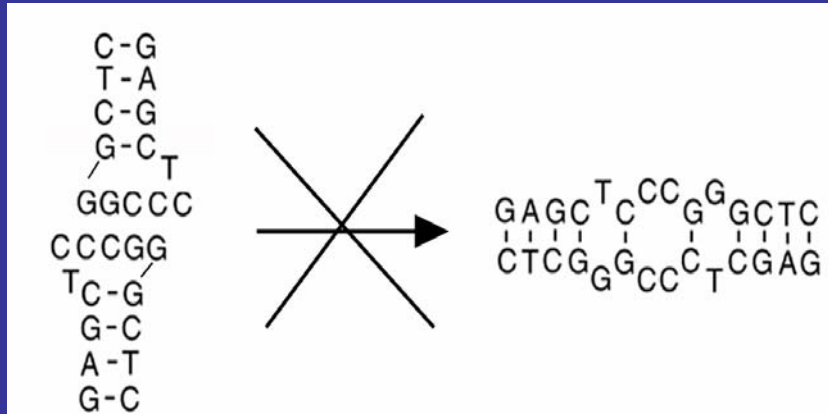


(19-32)cTAR
implément marqué +
(19-32)cTAR (+ ou -
NC)



(19-32)cTAR
doublement marqué -
(19-32)cTAR (+ ou -
NC)

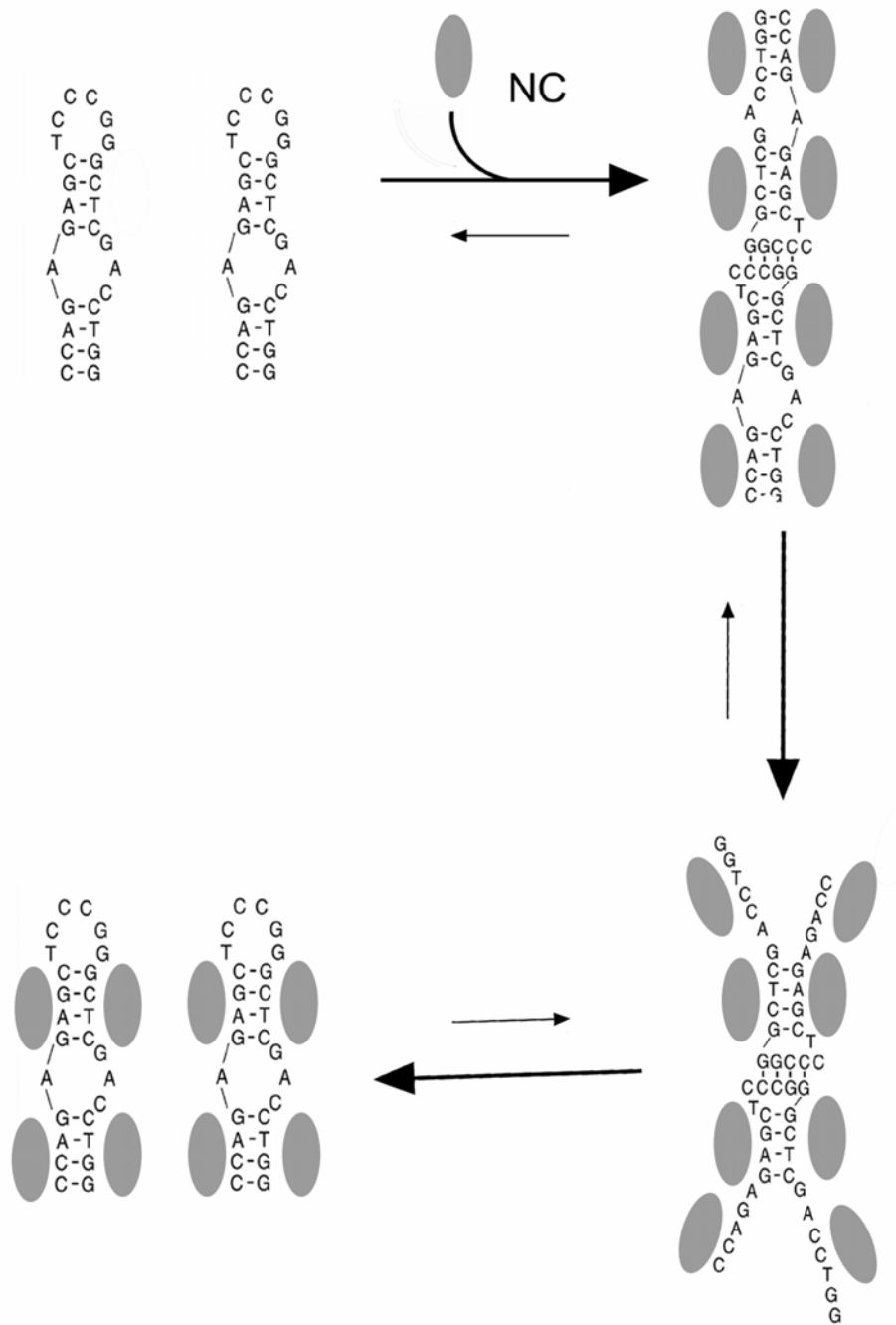
Duplex étendu ou Complexe boucle-boucle ?



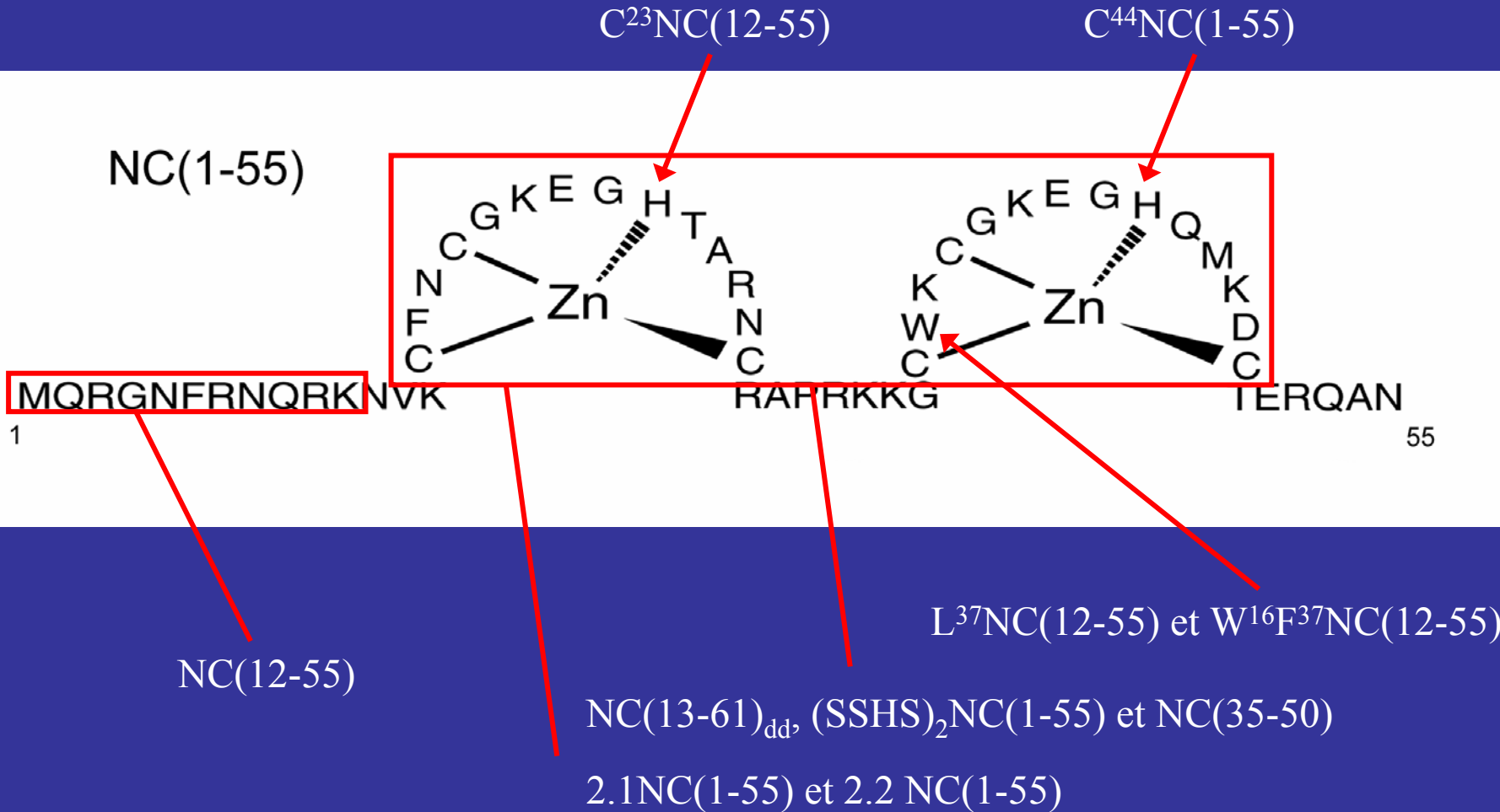
12 paires de bases

10 paires de bases

Conclusion (3)



4) Importance de la structure primaire de la NCp7



Importance de la chaîne N-terminale

	I_{+NC}/I_{-NC}	α_0 (0.74)	α_2 (0.04)	K_{app}
NC(12-55)	6.9	0.46	0.20	1.7×10^7
NC(1-55)	6.9	0.47	0.23	1×10^8

La chaîne N-terminale ne joue aucun rôle dans la déstabilisation de cTAR mais stabilise la liaison avec cTAR.

Importance de la présence des doigts de zinc

	I_{+NC}/I_{-NC}	$K_{app} (M^{-1})$
NC(35-50)	1	1.5×10^4
NC(13-61) _{dd}	1	3.9×10^6
(SSHHS) ₂ NC(1-55)	1.2	$> 5 \times 10^8$

Les doigts de zinc sont indispensables à la fois à la liaison et à la déstabilisation de cTAR.

La flexibilité du mutant (SSHHS)₂NC(1-55) ainsi que la taille du mutant NC(13-61)_{dd} en créant des interactions électrostatiques supplémentaires augmente leur constante de liaison .

Importance de la structure des doigts de zinc

	I_{+NC}/I_{-NC}	α_0	α_2	ν
$C^{44}NC(1-55)$	6.5	-	-	98
$C^{23}NC(12-55)$	4.9	0.63	0.11	79
NC(1-55) NC(12-55)	6.9	0.46	0.23	

Importance de la structure du doigt N-terminal pour la liaison et la déstabilisation de cTAR au contraire du doigt C-terminal.

Importance de la position des doigts de zinc

	I_{+NC}/I_{-NC}	α_0	α_2	$K_{app} (M^{-1})$
2.1NC(1-55)	3.2	0.58	0.11	3×10^7
2.2NC(1-55)	4.3	0.48	0.21	2.9×10^7
NC(1-55)	6.9	0.46	0.23	1×10^8

La position des deux doigts de zinc est indispensable pour la déstabilisation mais pas pour la liaison avec cTAR.

Le doigt C-terminal peut compenser partiellement la fonction de déstabilisation de cTAR et entièrement la fonction de liaison à cTAR du doigt N-terminal.

Importance du Trp³⁷ dans le doigt de zinc

	I_{+NC}/I_{-NC}	α_0	α_2	ν
L ³⁷ NC(12-55)	3.6	0.57	0.08	76
W ¹⁶ F ³⁷ NC(12-55)	5.8	0.53	0.17	91
NC(1-55) NC(12-55)	6.9	0.46	0.23	

Le Trp³⁷ est indispensable à la fois à la liaison et à la déstabilisation.

Le cycle aromatique de la Phe³⁷ est capable de compenser partiellement ceux du Trp³⁷.

Conclusion générale

NC déstabilise partiellement la structure secondaire de cTAR en activant le mécanisme de fraying. La déstabilisation est probablement requise pour l'hybridation avec sa séquence complémentaire.

L'effet déstabilisant de NC dépend de motifs régulièrement distribués le long de cTAR

L'effet déstabilisant de NC dépend du Trp³⁷ ainsi que de la présence des deux doigts de zinc dans leur conformation native.

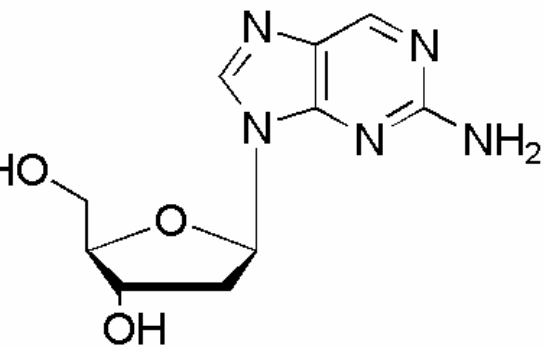
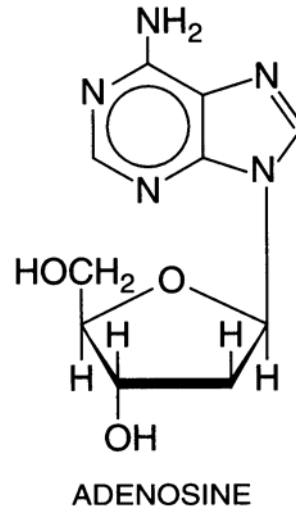
On peut observer une évolution concertée de TAR et NCp7

Perspectives

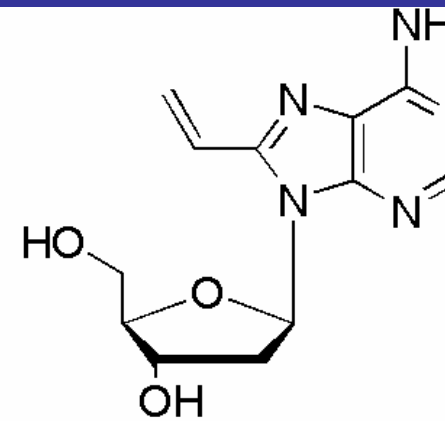
- Expliquer le mécanisme moléculaire de l'hybridation entre cTAR et TAR : Impact des structures de cTAR, TAR et NCp7.
- Déterminer la structure tridimensionnelle de cTAR complexée ou non avec la NCp7.
- Etude de la compétition entre Tat et NCp7.
- Recherche de molécules inhibitrices de l'interaction entre NCp7 et cTAR
- Etendre l'étude au deuxième saut de brin.
- Etendre l'étude sur d'autres rétrovirus: SIV, MuLV...

III) Description des propriétés spectroscopiques de la 8-vinyl-déoxyadénosine, un analogue fluorescent alternatif à la 2-aminopurine.

Un analogue fluorescence de l'adénosine



2AP



8vdA

Les propriétés de la sonde libre

	Abs λ_{\max} (nm)	Em λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	τ (ns)	Φ
2AP (eau)	303	370	7200	10.4	0.68
8vdA (Hepes)	290	382	12600	4.7	0.66
8vdA (méthanol)	294	375		2.9	0.32
8vdAdiP (Hepes)	292	382		4.9	0.64

La 8vdA est une sonde plus sensible que ne l'est la 2AP.

Le changement de polarité du solvant change considérablement les propriétés photophysiques.

L'ajout d'un groupement diphosphate ne change en rien les propriétés photophysiques.

Les propriétés de la sonde incorporée dans un oligonucléotide

5'- CGT TTT T8vdAT TTT TGC-3' (ODN 1)

5'- CGT TTT A8vdAA TTT TGC-3' (ODN 2)

5'- CGT TTT C8vdAC TTT TGC-3' (ODN 3)

On fait varier le voisin de la sonde et on observe l'effet sur les propriétés de la sonde et de l'oligonucléotide.

5'- CGT TTT T8vdAT TTT TGC-3' (ODN 1)

5'- CGT TTT A8vdAA TTT TGC-3' (ODN 2)

5'- CGT TTT C8vdAC TTT TGC-3' (ODN 3)

		Simple brin	Double brin		
		Φ	Φ	ΔT_m	$\Delta \Delta G_{37}^0$
8vdA	ODN1	0.024	0.028	0.4	0.3
	ODN2	0.014	0.016	1.5	0.6
	ODN3	0.037	0.005	4.1	1.4
2AP	ODN1	0.014	0.016	2.2	0.9
	ODN2	0.010	0.012	3.7	1.3
	ODN3	0.020	0.003	1.2	0.4

Les temps de vie de fluorescence

	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	τ_4 (ns)	α_4
ss8vdA-ODN1	0.071	0.52	0.22	0.34	1.23	0.13	3.42	0.012
ds8vdA-ODN1	0.053	0.42	0.19	0.38	1.33	0.19	3.05	0.003
ss2AP-ODN1	0.065	0.52	0.31	0.27	1.58	0.17	4.21	0.045
ds2AP-ODN1	0.079	0.28	0.45	0.69	1.56	0.023	4.87	0.0061
ss8vdA-ODN3	0.20	0.64	0.89	0.28	1.99	0.076	4.02	0.0089
ds8vdA-ODN3	0.055	0.94	0.29	0.032	1.40	0.016	2.62	0.0083

Conclusions (6)

La 2AP et la 8vdA ont une photophysique très proche.

Le proche voisin de la 8vdA conditionne les propriétés thermodynamiques et photophysiques de la sonde.

La 8vdA ne déstabilise que très peu ODN1 et ODN2. Les propriétés photophysiques ne sont pas affectées par l'appariement avec son complémentaire.

Pour ODN3, le complémentaire influence considérablement les propriétés thermodynamiques et photophysiques de la 8vdA.

Dans une séquence double brin, une des liaisons hydrogènes de la 2AP avec son complémentaire passe du grand sillon vers le petit sillon de l'ADN. Ceci n'est pas le cas pour la 8vdA.

La 8vdA (incorporée dans un oligonucléotide) par son rendement quantique est une sonde plus sensible que la 2AP.

Perspectives

- Cette sonde pourra être utilisée pour compléter l'étude effectuée sur l'impact de la structure secondaire de cTAR et PBS sur l'activité chaperonne de la NCp7.
- Elle pourra être également utilisée pour l'étude de l'hybridation de cTAR et PBS avec leurs complémentaires.
- Elle pourra être utilisé dans les mêmes applications que la 2AP .

Remerciements

Y Mély

G Duportail, H de Rocquigny, E Piémont

Emma, David, Jean-Pierre, Serena, Caroline, Elisa, Raja,
Nick, Vasyl, Andrey, Emmanuel, Nathalie, Denis, Christian.

