



HAL
open science

Protéines à motif tripartite (TRIM) chez le porc (*Sus scrofa*) et réplication du rétrovirus endogène porcine

Antonin Demange

► **To cite this version:**

Antonin Demange. Protéines à motif tripartite (TRIM) chez le porc (*Sus scrofa*) et réplication du rétrovirus endogène porcine. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1S159 . tel-00992386

HAL Id: tel-00992386

<https://theses.hal.science/tel-00992386>

Submitted on 17 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2013



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Antonin DEMANGE

Préparée à l'unité de recherche UGVB
(Unité Génétique Virale et Biosécurité)
(Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de
l'environnement et du travail, Anses)

**Protéines à motif
tripartite (TRIM) chez
le porc (*Sus scrofa*)
et réplication du
rétrovirus endogène
porcin**

Thèse soutenue à Ploufragan

le 19 décembre 2013

devant le jury composé de :

Pr Uriel HAZAN

Directeur du département de biologie – ENS
Cachan / *rapporteur*

Dr Corinne RONFORT

Responsable d'équipe - INRA / *rapporteur*

Dr André JESTIN

Direction Scientifique des Laboratoires - Anses /
directeur de thèse

Dr Yannick BLANCHARD

chef de l'unité GVB - Anses / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) à Ploufragan, dans l'unité de Génétique Virale et Biosécurité. Initialement dirigée par le Dr André JESTIN puis par le Dr Yannick BLANCHARD. Ces travaux de thèse ont été en partie financés par le Conseil Régional de Bretagne et le Conseil Général des Côtes d'Armor au cours des trois premières années puis par le projet NADIR pendant cinq mois supplémentaires.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury, le Dr Corinne RONFORT et le Pr Uriel HAZAN, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également les membres du comité de pilotage, le Dr Isabelle Le HUEROU-LURON, le Pr Jean Luc DARLIX et le Dr Claire ROGEL-GAILLARD pour leurs regards critiques sur le déroulement de ces travaux.

Je tiens aussi à remercier Gilles SALVA, Directeur du laboratoire de l'Anses de Ploufragan pour son accueil pendant ces quatre années.

Je remercie surtout Yannick, mon encadrant et co-directeur de thèse, pour sa confiance à mon égard concernant ce projet mais aussi, et surtout, pour ses critiques, ses conseils et l'expérience qu'il a pu me transmettre tout au long de ces quatre années.

Je remercie beaucoup André, directeur de cette thèse, pour la chaleur de son accueil, ses encouragements, sa confiance mais aussi pour la complémentarité qu'il a apportée dans la direction de ma thèse.

Je tiens également à remercier Marie Frédérique LEPOTIER et les membres de l'unité de Virologie et Immunologie Porcines (VIP) pour leur accueil, leur aide et leur gentillesse.

Merci à tous les collègues de l'unité GVB pour leur accueil, leur soutien et la bonne ambiance qu'ils savent faire régner dans ce laboratoire au travers des nombreuses et succulentes pâtisseries maison. Merci à Daniel DORY, à Béatrice GRASLAND et à Guillaume BLOT pour leurs nombreux conseils, et merci à MacGyver, alias Lionel, pour ses bons conseils pratiques. Je remercie également Fabrice TOUZAIN, ami et voisin de bureau, pour m'avoir supporté tout ce temps. Mais aussi Armel, Cécilia, Véronique, Anne-Cécile, Claire et Séverine pour leur gentillesse et leur disponibilité. Tout

particulièrement, je tiens à remercier Hélène QUENAULT pour toute son aide apportée, ses nombreuses, très nombreuses réponses et ses grandes qualités autant techniques que culinaires.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire de Ploufragan, Elisabeth, Annie, Katel, Christel et les membres des diverses unités VIPAC, HQPAP, MB, et le SMEPT. Mais surtout Olivier pour son aide et ses conseils et que l'on regrette tous.

Merci à tous mes amis de Paris, de Niort et d'ailleurs, mais aussi à mes amis bretons que j'ai pu rencontrer, qui ont su me faire profiter de cette magnifique région qu'est la Bretagne. Je pense notamment à Marc, Patricia, Jérôme, Ségolène, Cédric, FX, Adèle, Aurore, Nico, Vanessa et Pepette, tous, chers compagnons de détente.

Je remercie aussi mes voisins et amis des 3 frères Le Goff, Haïk et Soussanna pour leur accueil et leur grand sens du partage.

Je tiens aussi à remercier Daniel PATAT pour la fine relecture qu'il a pu faire de ce manuscrit, ainsi que mon ami Jonhatan LOMBARD pour son appui anglophone.

Je remercie également mes parents, pour m'avoir soutenu tout ce temps et m'avoir aidé à cultiver mon jardin. Mon frère et sa famille pour avoir apporté du renouveau.

Je remercie plus particulièrement ma chère Cécile pour m'avoir supporté et attendu pendant ces quatre longues années. Pour toute son aide apportée dans la rédaction de ce manuscrit, d'avoir toujours été là pour m'encourager et surtout m'avoir apporté un peu de soleil sous les nuages bretons.

Enfin je dédicace cette thèse à mes grands parents.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	5
Sommaire des Figures et des Tableaux	9
Liste des abréviations	12
Introduction.....	13
1. Généralités sur les virus	13
1.1. Définition des virus.....	13
1.2. Les différentes classifications de virus	13
2. Les rétrovirus exogènes.....	15
2.1. La famille des Retroviridae	15
Betarétroviruses.....	16
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	16
Betarétroviruses Mason-Pfizer monkey virus (MPMV).....	16
Mouse mammary tumor virus (MMTV), Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV).....	17
Walleye dermal sarcoma virus (WDSV), Snakehead retrovirus (SnRV).....	17
Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Simian immunodeficiency virus (SIV)	17
Simian foamy virus (SFV),	17
Bovine foamy virus (BFV)	17
2.2. Structure des rétrovirus	17
2.3. Le génome des rétrovirus.....	19
2.4. Le cycle répliatif des rétrovirus.....	22
2.5. Les pathologies associées.....	35
3. Les rétrovirus endogènes	37
3.1. Endogénisation.....	38
3.2. Classification.....	39
3.3. Domestication et devenir des ERV	41
4. Les Rétrovirus Endogènes Porcins.....	55
4.1. Généralités	55
4.2. Les PERV répliatifs,.....	56

4.3.	Les PERV répliatifs et leur interaction avec leurs hôtes	61
5.	La restriction virale	62
5.1.	Le système immunitaire	63
5.2.	Les facteurs de restriction	66
6.	La famille des protéines TRIM	73
6.1.	Caractéristiques des TRIM	75
6.2.	Les rôles et évolution des TRIM	85
	Objectifs de la thèse	90
	Matériel et Méthodes :	92
	Partie I : Criblage des facteurs de restriction du porc	93
1.	Validation des outils de la stratégie de criblage : l'outil de mesure de l'infection par le PERV-A/C 93	
1.1.	Construction d'un PERV-A/C exprimant la GFP	93
1.2.	Production de particules PERV infectieuses	94
1.3.	Infection des cellules HEK293 par un surnageant infectieux PERV	94
1.4.	Construction des outils de criblage de la banque	94
2.	Construction d'une banque d'ADNc	95
2.1.	Extraction des ARN messager	96
2.2.	Transcription inverse des ARNm	97
2.3.	Ajout de l'adaptateur EcoRI et préparation des extrémités des ADNc	97
2.4.	Fractionnement par la taille de la population des ADNc par chromatographie d'exclusion	98
2.5.	Clonage des ADNc dans le vecteur d'expression pBabe-HAZ	98
	Partie II : Etude de la restriction virale par les TRIM	100
1.	Stratégie de mise en évidence d'une activité des protéines TRIM porcines sur le cycle répliatif des PERV	100
1.1.	Expression des Protéines TRIM.	100
1.2.	ARN Interférences.	107
1.3.	Infection des lignées cellulaires TRIM par l'outil de génétique inverse PERV-GFP	110
2.	Caractérisation des mécanismes d'action des TRIM sur les PERV	112
2.1.	La phase précoce	113
2.2.	La phase tardive	115
	Résultats	117
	Partie I : Criblage des facteurs de restriction du porc	118
1.	Stratégie de criblage des facteurs de restriction	118
1.1.	Identification des facteurs de restriction du PERV-A/C	118

1.2.	Caractérisation des inserts ADNc des clones résistants.....	121
2.	Validation des outils de la stratégie de criblage : l’outil de mesure de l’infection par le PERV-A/C	123
2.1.	Production de particules PERV infectieuses.....	123
2.2.	Infection des cellules HEK293 par un surnageant infectieux PERV.....	124
3.	Construction d’une banque d’ADNc.....	125
3.1.	Extraction des ARN messager.....	126
3.2.	Synthèse des ADN complémentaires	127
4.	Bilan de la construction d’une banque d’ADNc du porc	128
	Partie II : Etude de la restriction virale par les TRIM.....	129
1.	Sélection des TRIM d’intérêt	129
1.1.	Identification et sélection de protéines TRIM porcines	130
1.2.	Récupération des séquences protéiques TRIM sur les bases de données.....	131
1.3.	Analyse et validation de l’intégrité des séquences protéiques des orthologues TRIM récupérées.....	132
1.4.	Conclusion sur la sélection des TRIM d’intérêts.....	135
2.	Validation des outils moléculaires nécessaires	135
2.1.	L’outil de surexpression des gènes des TRIM.....	136
2.2.	L’outil de l’interférence ARN des TRIM	143
3.	Mise en évidence et caractérisation d’une activité de restriction des TRIM sur le PERV	148
3.1.	Influence des poTRIM sur l’infection PERV	148
3.2.	Caractérisation des effets des TRIM sur le cycle infectieux du PERV.....	153
	Discussions et Conclusion.....	164
	Bibliographie.....	174
	Annexes	191
	Annexe I : Lettre d’acceptation d’utilisation d’OGM.....	192
	Annexe II : Plan Management Qualité.....	194
	«Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc »	194
	Introduction.....	196
	Le champ du plan qualité	196
	La politique de management qualité du laboratoire et de l’unité.....	197
	Les acteurs du projet	197
	La conduite du projet	199
	La gestion des ressources.....	202

La gestion des écarts	204
La communication	205
ANNEXE 1 : Organigramme de thèse.....	207
ANNEXE 2 : Fiche de projet de thèse rév. 01.....	208
Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc.....	208
1. Contexte socioéconomiques et scientifique	208
2. Le Sujet	208
Références.....	210
ANNEXE 3 : Listing de points critiques du projet de thèse de AD	212
ANNEXE 4 : Répartition des micropipettes et des manipulations dans les différentes salles de l'unité GVB	213
Résumé.....	215
Abstract	215

Sommaire des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Schéma de l'organisation de la classification de Baltimore (http://fr.wikipedia.org/wiki/Classification_Baltimore).	14
Figure 2 : Structure générale des virions des rétrovirus (Rodrigues et al., 2011).	19
Figure 4 : Représentation du cycle de réplication des rétrovirus (schéma modifié de l'article de Goff, S.P., 2004).	23
Figure 5 : fusion de la membrane grâce au changement conformationnel de la glycoprotéine TM (Kubo et al., 2012).	25
Figure 6 : les étapes de la transcription inverse = ARN ; = ADN.	27
Figure 7 : Migration vers le noyau des rétrovirus entrant (Anderson and Hope, 2005).	29
Figure 8 : processus d'intégration du provirus par l'intégrase virale dans le génome hôte (Cherepanov et al., 2011).	32
Figure 9 : la phase tardive du cycle de réplication des rétrovirus.	34
Figure 10 : répartition des séquences répétées dans le génome des mammifères.	37
Figure 11 : Schéma de l'endogénéisation des rétrovirus dans le génome d'un hôte (Ribet and Heidmann, 2010).	39
Figure 12 : Phylogénie des ERV et leur classification chez les animaux (Jern et al., 2005).	40
Figure 13 : Schéma des différents modèles d'évolution des ERV dans leur génome hôte (Ribet D. & Heidmann T., 2010).	52
Figure 14 : schéma du génome ADN du PERV-A/C.	61
Figure 15: Les étapes de l'immunité intrinsèque.	65
Figure 16 : Les étapes clé et les molécules du cycle répliatif des rétrovirus affectés par les facteurs de restriction (schéma inspiré de l'article de Goff, S.P., 2004 (Goff, 2004))	66
Figure 17 : Structure et activité antivirale de SAMHD1 (Sze et al., 2013).	67
Figure 18 : la famille APOBEC.	69
Figure 19 : Schéma de l'inhibition de la transcription des gènes rétroviraux par ZFP809 et TRIM28 (Wolf and Goff, 2009; Wolf et al., 2008).	70
Figure 20 : schéma de la configuration de la protéine Téthérine.	71
Figure 21 : schéma de l'activité des Téthérines contre l'infection du VIH-1 dans le cadre de l'immunité innée (Sauter et al., 2010).	71
Figure 22 : Schéma des domaines caractéristiques de la famille des protéines TRIM et leur consensus de séquence protéique (Meroni and Diez-Roux, 2005).	74
Figure 23 : Schéma des étapes de la réaction de l'ubiquitination (Wertz and Dixit, 2010).	76
Figure 24 : Schéma de l'implication des TRIM dans la voie de signalisation des IFN.	89
Figure 25 : Schéma du PERV-GFP correspondant au vecteur PERV-A/C IRES-GFP.	94
Figure 26 : vecteurs de sélection construits sur la base du PERV-GFP.	95
Figure 27 : Etapes de la synthèse des ADNc des ARNm du porc.	96
Figure 28 : Schéma de la stratégie de surexpression des TRIM dans les cellules HEK293.	101
Figure 29 : Profil de migration de l'amplification des séquences génétiques des TRIM d'intérêt.	102
Figure 30 : Schéma du vecteur d'expression eucaryote des TRIM.	103

Figure 31 : schéma de la stratégie par atténuation de l'expression des TRIM dans les cellules HEK293 exprimant les différentes TRIM d'intérêt.....	107
Figure 32 : schéma d'un shRNA avant maturation par le complexe Dicer-TRBP-PACT.....	108
Figure 33 : Schéma de la stratégie de mise en évidence de l'action des TRIM sur le cycle de réplication des PERV.....	111
Figure 34 : Schéma des étapes essentielles du cycle de réplication du PERV ciblées pour la caractérisation des mécanismes d'action des TRIM sur les PERV.....	112
Figure 35 : Stratégie de la quantification des marqueurs moléculaires de l'étape précoce.....	114
Figure 36 : Schéma de la stratégie de sélection du porc des facteurs de restriction à l'infection par le PERV-A/C dans la banque de cDNA.....	120
Figure 37 : vecteur d'expression de la banque pBabe-HAZ.....	121
Figure 38 : Schéma de la stratégie de criblage des candidats potentiels sélectionnés pour la restriction par le PERV-A/C.....	122
Figure 39 : Observation de l'évolution de la surinfection des cellules transfectées par le PERV-GFP.	124
Figure 40 : Histogramme de l'évolution du pourcentage de cellules infectées par le PERV-GFP et exprimant la GFP 48h pi.	125
Figure 41 : Exemple de résultat obtenu après l'extraction des ARN totaux des cellules de PK15.....	126
Figure 42 : Evaluation au Bioanalyser des étapes principale de la synthèse d'ADNc.	127
Figure 43 : Graphique récapitulatif des effets des TRIM humains (H) et murins (M) sur le MLV contre les phases précoces et tardive du cycle réplcatif du rétrovirus (Uchil P.D. et al., 2008).	131
Figure 44 : Arbre phylogénétique des protéines TRIM porcines sélectionnées et de leurs orthologues humain, murin et bovin.....	135
Figure 45 : Dosage de l'expression des ARNm TRIM par RTq-PCR.....	138
Figure 46: Analyse de l'expression des TRIM dans les cellules HEK293.....	139
Figure 47 : Caractéristiques de la protéine TRIM44.....	140
Figure 48 : Analyse de la séquence protéique de la poTRIM44.	141
Figure 49 : Test MTT réalisé sur les lignées cellulaire HEK293-TRIM comparé aux cellules non transfectées et transfectées par le vecteur lacZ.	142
Figure 50 : Evaluation du knockdown de la GFP par le shRNA anti GFP du kit psiRNA-h7SKhygro G1.	144
Figure 51 : Evaluation de l'efficacité des shRNA spécifique de la GFP 72h post transfection, sur une lignée PERV-GFP.	145
Figure 52 : Evaluation de l'efficacité des différents shRNA par dosage des transcrits par RTq-PCR des protéines poTRIM8 et 11 de l'étude.	146
Figure 53 : Analyse de l'efficacité de l'atténuation constitutive de l'expression des gènes poTRIM8 et 11.....	147
Figure 54 : Analyse, par cytométrie de flux, de l'infection des lignées HEK293 par le PERV- GFP suivie pendant 72h.	149
Figure 55 : Analyse par cytométrie de flux de la cinétique d'infection des lignées HEK293 par le PERV- IRES-GFP mesurée de 72h à 21 jours pi.....	150
Figure 56 : Analyse par cytométrie de flux de la phase tardive du cycle infectieux du PERV.....	153
Figure 57 : Analyse FACS 24hpi du pourcentage de cellules HEK293 infectées par le PERV (%GFP+) en présence d'une gamme de concentration d'AZT (en µM). T- = cellules HEK293 non infectées.	154
Figure 58 : Etude de l'efficacité du RAL sur le PERV-A/C.	155

Figure 59 : Evaluation de l'efficacité du dosage par q-PCR des rétro-transcrits tardifs.....	157
Figure 60 : Analyse q-PCR des étapes précoces de l'infection par le PERV.....	160
Figure 61 : Analyse de la transcription du gène <i>env</i> du PERV lors de la cinétique d'infection des différentes lignées poTRIM.	162
Tableau 1 : Classification des rétrovirus selon leur morphologie (Coffin et al., 1997)	16
Tableau 2 : Classification des rétrovirus selon l'ICTV (http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp).	17
Tableau 3 : Les différentes classes de TRIM selon la caractéristique des domaines C-terminaux	84
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets des protéines TRIM étudiées dans cette thèse.	91
Tableau 5 : récapitulatif des amorces utilisées pour le clonage des séquences TRIM d'intérêt.....	102
Tableau 6 : Conditions PCR utilisées pour chaque TRIM d'intérêt à extraire.	102
Tableau 7 : récapitulatif des amorces utilisées pour l'évaluation de la transcription des TRIM d'intérêt dans les différentes lignées cellulaires.....	105
Tableau 8 : Exemple des séquences ADN codant pour les shRNA ciblant les TRIM8 et 11	109
Tableau 9 : Exemple des séquences ADN codant pour les scramble des shRNA ciblant les TRIM8 et 11	109
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la détection des marqueurs moléculaire de la phase précoce.	115
Tableau 11 : Résultat d'une tentative de clonage des cDNA de la banque du porc dans le vecteur pBabe-HAZ dont l'efficacité de clonage a été améliorée.....	128
Tableau 12 : Pourcentages d'identités de l'alignement Blast et identifiants Genbank des séquences protéiques TRIM humaines et murines d'intérêt et de leurs équivalents bovines et porcines.....	134
Tableau 13 : tableau récapitulatifs des tissus où les différentes TRIM se trouvent exprimées.....	137

Liste des abréviations

%GFP+ :	pourcentage de cellules positives à la GFP	PA :	palindrome
AID/Apobec :	Activation-induced deaminase / Apolipoprotein B editing catalytique polypeptide	PBS :	Primer binding site
ALV :	Avian leukosis virus	PERV :	Porcine ERV
AZT :	Azidothymidine	pi :	Post infection
CA :	protéine de capside	PIAS3 :	protein inhibitor of activated STAT3
CC :	Coiled-coil	PML :	Promyelocytic leukemia nuclear bodies
CD4 :	cluster of differentiation 4	pol :	gène codant la polyprotéine polymérase
CpG :	Dinucléotides CG non méthylé	PRR :	Prolin-Rich Region
CPI :	Complexe de Pré-Intégration	PRY :	PTP-BL-related Y protein ???
CTI :	Complexe de Transcription Inverse	pt :	post transfection
enJSRV :	endogenous JSRV	R :	Redundant
Env :	gène codant la glycoprotéine d'enveloppe	RAL :	Raltégravir
ERV :	endogenous retrovirus	RBD :	Receptor Binding Domain
FeLV :	Feline leukemia virus	RING :	Really Interesting New Gene
Fv4/Fv1 :	Friend virus susceptibility protein 1 or 4	RSV :	Rous sarcoma virus
gag :	groupe spécifique antigène	RT :	Revers transcriptase
GaLV :	Gibbon ape leukemia virus	SPRY :	sp1A et Ryanodine
HTLV-1 :	Human T-lymphotropic virus 1	SUMO :	Small ubiquitin-like modifier
IAP :	Intracisternal type-A particules	TLR :	Toll-Like Receptors
ICTV :	the International Committee on Taxonomy of Viruses	TM :	Transmembranaire protein
IFN :	Interferon	TRIM :	Tripartite motif
IN :	protéine d'intégrase	U3 :	Element de séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARN viral
ISG :	Interferon stimulated gene	U5 :	Element de séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARN viral
KoRV :	Koala rétrovirus	ZAP :	Zinc-finger antivirale protein
LINE :	Long interspersed elements	ZFP :	Zinc Finger Protein
LTR :	Long terminal repeat		
MA :	protéine de matrice		
MIF :	moyenne d'intensité de fluorescence		
MIF GFP+ :	MIF des cellules positives à la GFP		
MLV :	Murine leukemia virus		
MMTV :	Mouse mammary tumor virus		
MOI :	Multiplicity of infection		
NC :	protéine de nucléocapside		

Introduction

1. Généralités sur les virus

1.1. Définition des virus

Les virus sont considérés comme des parasites intracellulaires obligatoires dans la mesure où la particule virale ne possède pas les éléments essentiels à sa réplication. Pour ce faire, elle doit obligatoirement infecter un hôte cellulaire vivant et détourner la machinerie de réplication à son avantage. De ce fait, les virus ne sont pas considérés comme faisant partie du vivant, bien que cette notion soit parfois controversée (Rybicki, 1990).

Les effets cytopathiques des virus sur leur hôte cellulaire lors de leur cycle réplcatif sont variés. Certains virus peuvent entraîner la mort cellulaire : ils sont dit cytolitiques. D'autres modifient uniquement l'état cellulaire, comme dans le cas du virus Epstein-Barr qui entraîne une prolifération cellulaire sans causer de malignité. C'est également le cas de la plupart des papillomavirus responsables de certains cancers. A l'inverse, certains virus n'entraînent aucun changement apparent de la cellule hôte. C'est notamment le cas du rétrovirus endogène porcin (PERV), capable d'infecter les cellules porcines et qui se réplique activement chez son hôte sans lui provoquer de pathologie. C'est aussi le cas de virus tels que l'herpès simplex virus (HSV), qui entre dans une phase dite de latence pouvant durer plusieurs mois ou années avant de reprendre son cycle réplcatif.

Les particules virales ont une taille comprise entre 10 et près de 1000 nm. Elles ont toutes un génome sous forme de molécule ARN ou ADN contenant l'information génétique utile à la réplication du virus et à la formation de la capsid protéique protégeant le génome de la dégradation hors de la cellule lors du transit vers un nouvel hôte. Dans certains cas, une enveloppe lipidique englobe l'ensemble avant ou au moment de la sortie de la cellule hôte. La forme de ces virions est très variable selon les familles considérées, allant de simples formes en hélices ou icosaédriques à des structures beaucoup plus complexes. Ce qui permet, dans une certaine mesure, d'établir leur classification.

1.2. Les différentes classifications de virus

Les virus étant considérés comme des entités pseudo-vivantes, il est difficile de les classer à la manière des organismes cellulaires. Plusieurs classifications ont été proposées à ce jour. Ces systèmes de taxonomie se fondent sur les caractéristiques phénotypiques des virus, telles que la

morphologie, le type d'acide nucléique, le mode de répllication, les organismes hôtes, ou encore le type de pathologie qu'ils génèrent. Néanmoins les classifications les plus connues sont : la classification de Baltimore (créée en 1971) et celle de l'ICTV (the International Committee on Taxonomy of Viruses, créée en 1971). Les autres classifications sont fondées sur la structure des virions, le type d'hôte (la classification de Holmes créée en 1948) et les caractères chimiques et physiques (tels que le type d'acide nucléique, la symétrie, la présence d'enveloppe, le diamètre ou encore le nombre de capsomères) qui porte le nom de « LHT System of Virus Classification » (créée en 1962).

1.2.1. La classification selon l'ICTV

La classification selon l'ICTV propose un système structuré en taxons, proche de celui des organismes cellulaires (cf. <http://ictvonline.org>). Dans cette classification, les différentes familles virales sont réparties entre sept ordres organisés en fonction du type d'acide nucléique du génome viral et du type d'organisme cible. Chaque famille comprend les sous-familles, puis les genres et enfin les espèces de virus jusqu'alors identifiées. Cette classification est en perpétuelle évolution, toutefois de nombreuses familles virales (71 sur les 96 répertoriées en 2012) et notamment la famille des *Retroviridae*, n'ont pas encore été assignées à un ordre.

1.2.2. La classification de Baltimore

Dans la classification de Baltimore les différentes familles de virus sont réparties entre 7 groupes organisés en fonction du type d'acide nucléique (ARN ou ADN et simple brin ou double brin), du sens et de la stratégie de répllication (Figure 1).

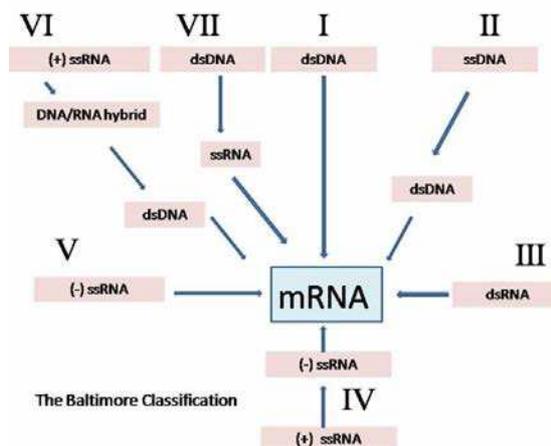


Figure 1 : Schéma de l'organisation de la classification de Baltimore (http://fr.wikipedia.org/wiki/Classification_Baltimore).

Les chiffres romains désignent les différents groupes. Pour chaque groupe est représentée l'évolution du génome viral menant à la synthèse des ARN messagers codant pour les protéines virales du cycle répllicatif du virus. mRNA = ARN messenger ; ss = simple brin ; ds = double brin ; (+) polarité positive ; (-) polarité négative.

2. Les rétrovirus exogènes

Les rétrovirus sont une classe particulière de virus, les connaissances actuelles sur ces pathogènes exogènes et endogènes proviennent en grande partie de l'étude des pathologies qui leurs sont associées. Ces études concernent, pour l'essentiel, l'homme et les organismes modèles tels que le poulet et la souris. Une revue bibliographique de ces connaissances est réalisée dans le présent chapitre. Elle permet en particulier d'introduire le cas des rétrovirus endogènes porcins, virus modèles de notre étude.

2.1. La famille des Retroviridae

Dans la classification de Baltimore, les rétrovirus font partie du groupe VI. Ce groupe est composé de virus dont le génome est à ARN simple brin et à polarité positive, capables de réaliser la transcription inverse de leur génome pour former un intermédiaire ADN double brin (Figure 1). Ce groupe est composé de la famille des *Metaviridae*, des *Pseudoviridae* et des *Retroviridae*.

2.1.1. L'histoire des rétrovirus

Ces virus sont dits « rétrovirus » en raison de la présence de la transcriptase inverse qui permet de rétro-transcrire leur génome ARN monocaténaire en un ADN complémentaire bi-caténaire (ADNc). Ils sont toutefois étudiés depuis le début du XXème siècle sous le nom de virus tumorigènes (Baltimore, 1975). De fait, l'hypothèse de la responsabilité d'un agent infectieux dans l'apparition de certains cancers a été soupçonnée à propos de l'anémie infectieuse équine dès 1904 par Vallé et Carré (Coffin et al., 1997) mais aussi, plus tard, à la faveur des travaux de Paul Ehrlich relatifs à l'émergence des cellules tumorales (Ehrlich, 1954), puis en 1908 au travers des leucémies du poulet (ALV) par Ellerman et Bang (Ellerman and Bang, 1908). Le premier isolat de l'un de ces agents infectieux a été réalisé en 1910 par Peyton Rous, qui donne son nom à ce virus responsable des tumeurs solides de poulet, le RSV (Rous sarcoma virus) (Rous, 1911).

Il faut attendre les années 60 pour que le concept de transcription inverse apparaisse, proposé par Mirko Beljanski, chez *E. coli* (Beljanski, 1972; Temin, 1989) et, outre-Atlantique, par Howard Temin, concernant le RSV chez le poulet (Temin, 1963; Temin, 1964). Toutefois celui-ci n'est définitivement accepté qu'en 1970 après la découverte et l'isolement de la « reverse transcriptase » (RT) des rétrovirus, conjointement réalisé par ce dernier pour le RSV (Temin and Mizutani, 1970) ainsi que par David Baltimore pour le MLV et le RSV (Baltimore, 1970).

Les rétrovirus sont appelés ainsi à partir de 1974 (Baltimore, 1975). Jusque là ils sont principalement étudiés chez le poulet (*Gallus gallus*) et la souris (*Mus musculus*) au travers de l'ASLV, du MLV ou du MMTV. Ils prennent une toute autre importance dans le domaine de la recherche médicale à partir de 1980, avec la découverte du HTLV-1 (Poiesz et al., 1980), puis du HTLV-2 (Gallo, 2005; Kalyanaraman

et al., 1982) et des VIH-1 et 2 découverts respectivement en 1983 et 1984 (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984).

2.1.2. La classification des rétrovirus

2.1.2.1. La classification selon la morphologie

Deux classifications possibles sont retenues pour la famille des rétrovirus. La première classification, ancienne, est fondée sur la morphologie et le mode de bourgeonnement des rétrovirus, observés en microscopie électronique. Cette classification a permis de diviser la famille en 4 types de particules :

Tableau 1 : Classification des rétrovirus selon leur morphologie (Coffin et al., 1997)

Type	Description	Exemple
A	Particules internes (intracisternale) non enveloppées : on ignore si ces particules sont infectieuses. Elles sont immatures et ne peuvent être observées qu'à l'intérieur des cellules. Elles proviendraient de rétrovirus ou de séquences rétrovirales partielles endogènes.	Intracisternal type-A particules(IAP)
B	Particules enveloppées extracellulaires contenant un noyau excentré et des spicules très proéminentes. Ces particules s'assemblent dans le cytoplasme.	Betarétroviruses Mouse mammary tumor virus (MMTV)
C	Particules enveloppées extracellulaires contenant un noyau central : les spicules sont très petites ou invisibles. Ces particules de 80-100nm de diamètre s'assemblent à la membrane plasmique.	Alpharétroviruses Gammarétroviruses Lentiviruses
D	Particules enveloppées extracellulaires, contenant un noyau cylindrique : elles sont légèrement plus grandes que les C (≈ 120 nm) mais ont des spicules de plus petite taille. Ces particules s'assemblent dans le cytoplasme.	Betarétroviruses Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)

2.1.2.2. La classification selon l'ICTV

La seconde classification est celle de l'ICTV, qui classe la famille des Retroviridae en deux sous-familles, en fonction du type de pathogénicité, et sept genres en fonction du niveau de conservation des gènes de la transcriptase inverse (Tableau 2). Ces genres se dissocient en deux catégories, en fonction de leur complexité : tandis que certains présentent des génomes simples qui codent pour des protéines structurales essentielles au cycle répliatif du rétrovirus, grâce aux gènes *gag* (groupe spécifique antigène), *pro* (protéase), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), d'autres présentent des génomes complexes qui codent, en plus des protéines structurales, pour des protéines accessoires et régulatrices (Coffin et al., 1997).

Tableau 2 : Classification des rétrovirus selon l'ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Les rétrovirus sont classés dans deux sous-familles et sept genres en fonction du niveau de conservation des gènes de la transcriptase inverse. Les genres regroupent des rétrovirus soit à génome simple soit à génome complexe présentant des types de pathogénicité différents.

Famille des <i>Retroviridae</i>				
Sous familles	Genres	Exemples d'espèces	Oncogène	Génome
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	Avian Leukosis virus (ALV), Rous sarcoma virus (RSV)	+	Simple
	<i>Betaretrovirus</i>	Mouse mammary tumor virus (MMTV), Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	+	Simple
	<i>Gammaretrovirus</i>	Murine leukemia virus (MLV), Feline leukemia virus (FeLV)	+	Simple
	<i>Deltaretrovirus</i>	Bovine leukemia virus (BLV), Human T-lymphotropic virus (HTLV)	+	Complexe
	<i>Epsilonretrovirus</i>	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV), Snakehead retrovirus (SnRV)	+	Simple
	<i>Lentivirus</i>	Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Simian immunodeficiency virus (SIV)	-	Complexe
<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Spumavirus</i>	Simian foamy virus (SFV), Bovine foamy virus (BFV)	-	Complexe

2.2. Structure des rétrovirus

Les rétrovirus, sous leur forme extracellulaire, sont enveloppés et présentent une forme sphérique d'un diamètre moyen d'environ 80-120nm. Les particules virales sont généralement purifiées par leur taille et leur densité sur gradient de sucrose et présentent une densité approximative de 1,16g/ml (Coffin et al., 1997).

2.2.1. Les protéines Env

La surface de l'enveloppe lipidique est recouverte de spicules correspondant à un complexe glycoprotéique. Celui-ci est codé par le gène *env* et composé de deux polypeptides. La partie externe

ou l'unité de surface (SU) est un polypeptide glycosylé et hydrophile lié à la partie transmembranaire (TM), qui traverse la bicouche de phospholipides de l'enveloppe et se fixe à la matrice (MA) sous-jacente à l'enveloppe (Figure 2) (Coffin et al., 1997).

Ce complexe de glycoprotéines est essentiel pour l'entrée du virus dans la cellule : SU se lie à des récepteurs spécifiques présents à la surface de la cellule cible, tel que les récepteurs CD4 des lymphocytes T en ce qui concerne le VIH, entraînant alors un changement conformationnel des glycoprotéines en contact et l'activation de la TM. La TM permet la fusion des deux membranes de phospholipides et ainsi la capsidie protéique contenant le génome rétroviral est propulsée à l'intérieur de la cellule cible.

2.2.2. Les protéines Gag

Sous la membrane se trouve la matrice (MA), codée par le gène *gag* avec les éléments de la capsidie (CA). Ces protéines de CA s'associent entre elles pour générer une coque de forme conique qui, lors du bourgeonnement, se lie à la MA (Figure 2). Cette coque ou capsidie contient le complexe formé par la nucléocapsidie (NC), également codée par *gag*, et les génomes ARN viraux diploïdes reliés l'un à l'autre par leur séquence Ψ (Figure 2) (Coffin et al., 1997).

2.2.3. Les protéines Pro-Pol

La capsidie contient elle aussi les éléments nécessaires au démarrage du cycle de réplication du rétrovirus une fois celui-ci entré dans la cellule. Ces éléments sont codés par les gènes *Pro* et *Pol*. Une fois matures ils se trouvent sous forme dimérique et sont souvent en contact avec le complexe NC/ARN (Coffin et al., 1997). La transcriptase inverse (RT) permet de transcrire le génome simple brin ARN en une molécule ADN complémentaire double brin. L'intégrase (IN) permet de réaliser l'intégration du provirus, sous forme d'ADNc, dans le génome de l'hôte. Enfin les protéases (PR) sont essentielles pour la maturation de l'ensemble des éléments protéiques codés lors du cycle répliatif du rétrovirus. (Figure 2) (Coffin et al., 1997).

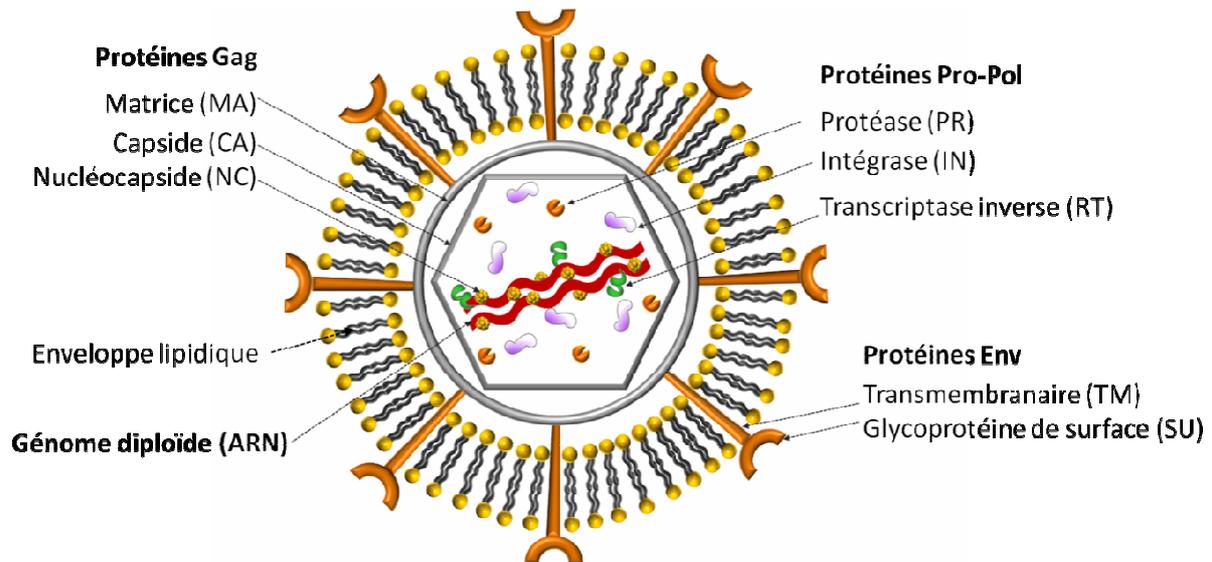


Figure 2 : Structure générale des virions des rétrovirus (Rodrigues et al., 2011).

Les glycoprotéines d'enveloppes (SU et TM) encrées dans la bicouche de phospholipides sont liées aux protéines de la matrice (MA). Ces protéines sont un intermédiaire reliées à la capsidie protéique (CA). La CA contient les enzymes essentielles au démarrage du cycle répliatif (PR, IN et RT) et le génome du rétrovirus (en rouge) sous forme ARN simple brin à polarité positive et diploïde. Celui-ci est condensé et protégé par les protéines de nucléocapside (NC).

2.3. Le génome des rétrovirus

Les génomes des rétrovirus présentent quatre caractéristiques principales qui les définissent :

- ils sont diploïdes ;
- le génome entrant est un ARN à polarité positive qui n'est pas directement codant et n'agit pas comme un ARNm ;
- la reverse transcription du génome est initiée par un ARNt cellulaire ;
- ils ont besoins de s'intégrer dans le génome hôte pour se répliquer par la machinerie cellulaire de transcription ;

Ils présentent une taille de 7 à 12 kb et sont constitués des éléments essentiels à leur répliation, tels que les LTR, des séquences de régulation et les gènes codants pour les protéines virales (Figure 3A). Deux groupes se distinguent (Tableau 2 et figure 3B et C) : les rétrovirus à génome simple, composés des gènes essentiels et principalement représentés par les gamma-rétrovirus, dont le plus connu est le MLV, et les rétrovirus à génome complexes représentés essentiellement par les lentivirus, dont le plus connu est le VIH. Ces génomes présentent, en plus des gènes essentiels, des gènes codant pour des protéines accessoires.

2.3.1. Les longues répétitions terminales

Sous sa forme ADN proviral, le génome des rétrovirus est encadré par deux séquences identiques, les LTR (long terminal repeat) 5' et 3', qui jouent essentiellement un rôle dans la régulation de la

transcription des gènes. Ces séquences sont composées des parties U3, R et U5, respectivement de l'extrémité 5' à 3' du LTR (Figure 3A).

U3 est dérivé d'une séquence unique présente à l'extrémité 3' du génome sous forme ARN (Figure 3A), cette séquence est de taille variable mais généralement de plusieurs centaines de paires de bases (pb) et comporte essentiellement des séquences amplificatrices, promotrices et d'initiation de la transcription (boîte TATA, promoteur NF-Y etc...).

La séquence R est beaucoup plus petite, allant d'une douzaine à une centaine de pb. Elle est retrouvée à chaque extrémité de la forme ARN du génome (Figure 3A) et de ce fait impliquée dans plusieurs fonctions essentielles à la réplication du rétrovirus. D'une part, sa présence aux 2 extrémités du génome ARN permet la réalisation d'un des transferts de brin dans les premières étapes de la transcription inverse. D'autre part, étant située juste en aval de la boîte TATA de la séquence U3, elle est le site de l'initiation de la transcription. Toutefois on y trouve aussi pour de nombreux rétrovirus des séquences importantes pour l'activité de transcription, comme dans le cas de TAR chez le VIH (Yamamoto and Takase-Yoden, 2009). Enfin, elle présente le signal de polyadénylation à la jonction de la séquence U5. Celle-ci, contrairement à U3, est dérivée de l'extrémité 5' de l'ARN (Figure 3A), elle présente généralement une taille de 100 à 200 pb et contient essentiellement le signal de polyadénylation.

2.3.2. Les éléments de régulation

Les séquences R et U5 du 5'LTR, contiennent des éléments de régulation de la réplication des rétrovirus et font donc partie de la région dite « 5' leader » qui se poursuit en aval (Figure 3A) (Yamamoto and Takase-Yoden, 2009). Dans cette région, on trouve notamment la séquence PBS (Primer Binding Site) et la séquence Ψ (Figure 3A). La séquence PBS est longue d'une vingtaine de pb et se situe juste après U5 ; elle permet la fixation d'un ARNt cellulaire, différent selon les rétrovirus, qui est essentielle à l'initiation de la transcription inverse.

La séquence Ψ ou Psi (Packaging signal) présente généralement une taille de 500 pb et recouvre le gène *gag* sur environ 300 pb (Figure 3A). Lorsque le génome rétroviral est sous forme ARN, cette séquence prend une structure tridimensionnelle particulière dans laquelle se succèdent plusieurs palindromes et tiges-boucles (Gherghe et al., 2010). Ainsi permet-elle l'association des deux génomes ARN du rétrovirus par des liaisons non covalentes ce qui va participer au déclenchement du signal de leur encapsidation lors de l'assemblage des particules virales.

Dans cette région se situe également le site donneur (SD) de l'épissage alternatif des ARNm qui, avec le site accepteur (SA) situé au début du gène *env*, permet de générer l'ARNm Env (Figure 3A). Dans le

cas des génomes complexes, d'autres sites SD et SA peuvent exister permettant d'obtenir les ARNm codant pour les protéines accessoires.

En aval des gènes rétroviraux et en amont de la séquence 3'LTR, se trouve la séquence PPT (Poly Purine Tract) (Figure 3A). Cette séquence riche en purine est difficile à dégrader et sert d'amorce à la RT pour son activité ADN polymérase ADN dépendante, lors des dernières étapes de la transcription inverse du génome rétroviral. Toutefois certains rétrovirus possèdent une 2^{ème} PPT. C'est le cas des lentivirus qui contiennent une PPT centrale (cPPT).

2.3.3. Les gènes du rétrovirus

Le cœur du génome des rétrovirus contient les différents gènes codant pour les protéines nécessaires au cycle répliatif et à la formation de nouvelles particules. Tous les rétrovirus comportent au minimum les gènes essentiels *gag*, *pro*, *pol* et *env*, respectivement dans cet ordre. Ces derniers peuvent toutefois se chevaucher chez certains rétrovirus (Figure 3B).

Ils sont à l'origine de deux ou trois ARNm distincts, Gag-Pro-Pol, et parfois Gag seul et Env. Les protéines qui en sont traduites sont clivées par les protéases rétrovirales, et cellulaires en ce qui concerne Env, avant de pouvoir être actives.

Les génomes complexes contiennent par ailleurs des gènes régulateurs et accessoires qui s'intercalent entre gènes essentiels ou les chevauchent (Figure 3C). Chez les lentivirus, l'exemple le plus connu est celui du VIH qui présente les gènes régulateurs *tat* et *rev*, et accessoires *vif*, *vpr*, *vpx*, *nef* et *vpu* qui codent pour des protéines participant à la régulation de la transcription de l'ADN viral, à la maturation des ARN mais aussi à d'autres fonctions telles que le développement du pouvoir infectieux dans le cas de *vpr*.

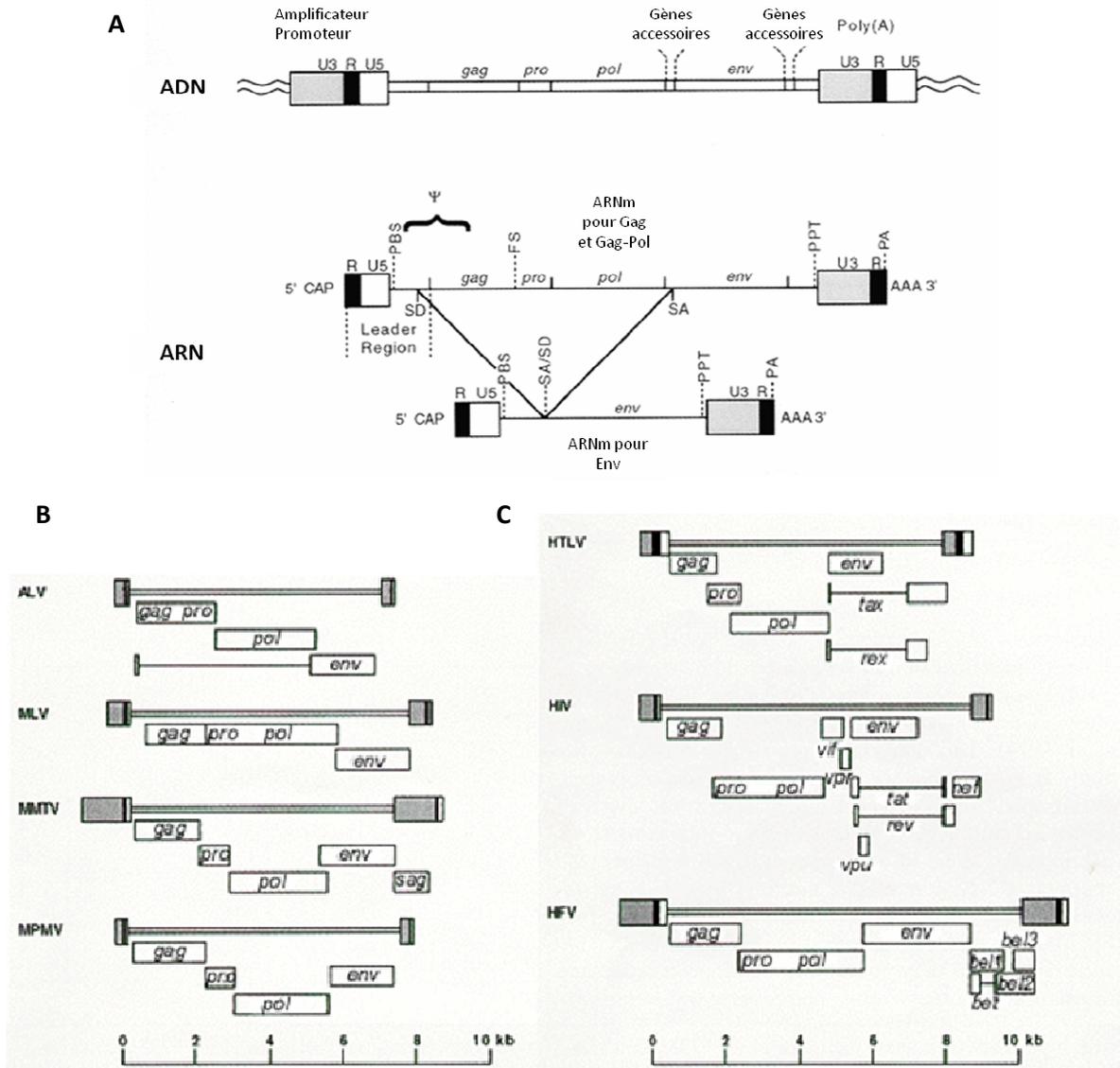


Figure 3 : Composition du génome des rétrovirus, sous leur forme ADN (provirus) et ARN (Coffin et al., 1997).

(A) Structure générale du génome des rétrovirus. Les gènes codant pour les protéines essentielles Gag, Pro, Pol et Env sont encadrés par les séquences LTR (long terminal repeat) contenant les régions U3, R et U5 identiques à chaque extrémité de la molécule d'ADN. La molécule d'ARN messager transcrite est épissée au niveau des sites SA et SD pour donner l'ARNm codant pour la protéine Env. (B) Organisation des gènes des rétrovirus à génome simple, contenant les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* codant pour les protéines essentielles. On représente les génomes d'un Alpharetrovirus (l'ALV), de Betaretrovirus (le MMTV et le MPMV) et d'un Gammaretrovirus (le MLV). (C) Organisation des gènes des rétrovirus à génome complexe contenant en plus des gènes essentiels les gènes accessoires qui s'intercalent dans le génome autour du gène *env*. Sont représentés les génomes d'un Deltaretrovirus (le HTLV) d'un Lentivirus (le HIV) et d'un Spumavirus (le HFV). La longueur des séquences nucléiques est indiquée avec l'échelle de taille en kilo base (kb).

2.4. Le cycle répliatif des rétrovirus

Le cycle répliatif des rétrovirus à génome simple ou complexe, peut être arbitrairement divisé en deux phases principales : la phase précoce et la phase tardive.

La phase précoce se réfère aux différentes étapes de l'entrée du rétrovirus jusqu'à l'intégration du génome viral. Elle débute par la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique, permettant la libération de la capside dans le cytoplasme de l'hôte où va se dérouler conjointement la transcription inverse du génome rétroviral en ADNc et la migration du complexe de transcription inverse (CTI) vers le noyau de la cellule infectée. Le complexe de pré-intégration (CPI) peut alors se former pour atteindre le génome de l'hôte afin de s'y intégrer sous la forme d'un provirus (Figure 4).

La phase tardive débute par les étapes de l'expression des gènes du provirus et par la duplication de son génome. Les protéines ainsi générées vont permettre la formation de nouvelles particules rétrovirales qui vont encapsider les génomes rétroviraux. Ces particules seront par la suite captées par la matrice et les glycoprotéines d'enveloppes alors présentes à la surface de la membrane cellulaire et permettront ainsi le bourgeonnement des nouveaux virions et leur sortie de la cellule (Figure 4).

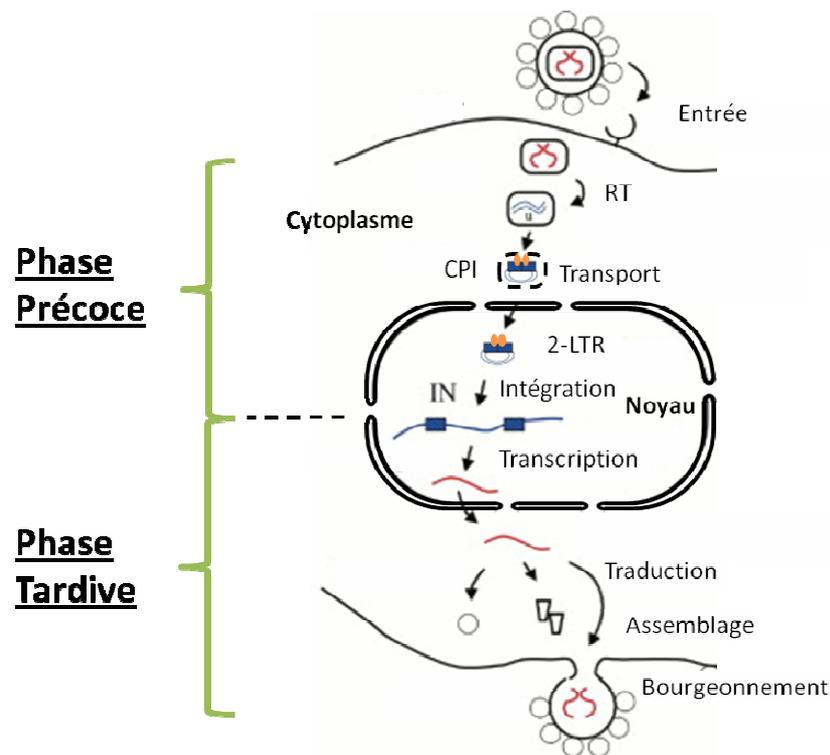


Figure 4 : Représentation du cycle de réplication des rétrovirus (schéma modifié de l'article de Goff, S.P., 2004).

Lors de la phase précoce la particule rétrovirale entre dans le cytoplasme par reconnaissance d'un récepteur membranaire puis le génome ARN subit la transcription inverse (RT) pour former le complexe de préintégration (CPI) qui migre vers le noyau. Dans le noyau le génome rétroviral sous forme ADN passe par une étape éphémère de cercle à 2-LTR avant d'être intégré dans le génome de l'hôte grâce à l'intégrase (IN) et aux protéines virales et cellulaires contenus dans le CPI. Lors de la phase tardive le provirus est transcrit par la machinerie cellulaire en ARNm codant pour les différentes protéines virales permettant la formation de nouvelles particules. Ces particules encapsident le génome ARN simple brin à polarité positive et diploïde avant le bourgeonnement et la maturation des particules virale.

2.4.1. La phase précoce

2.4.1.1. L'entrée dans la cellule

L'infection commence lorsque la glycoprotéine rétrovirale SU (Unité de Surface) reconnaît un récepteur membranaire de l'hôte. En fonction des rétrovirus et de leur SU, l'interaction peut être plus ou moins spécifique, ce qui déterminera le tropisme du rétrovirus et par conséquent l'ensemble des hôtes qu'ils peuvent infecter. Il existe quatre types de tropismes différents (Kubo et al., 2012) :

- **Ecotropique** : le virus n'infecte que les cellules de son espèce ou apparentées. Dans le cas d'un MLV cela concerne souris et rats. L'interaction avec les récepteurs de la surface cellulaire n'a pas besoin d'être spécifique pour permettre l'entrée du virus et passe par la reconnaissance d'un transporteur de type 1 des acides aminés cationiques (CAT1) (Kubo et al., 2012; Pizzato et al., 1999).
- **Amphotropique** : le virus peut infecter, en plus des cellules de son hôte, des cellules d'espèces différentes. Dans le cas du MLV le récepteur est Pit2, un transporteur de phosphate inorganique.
- **Polytropique** : présente les mêmes cibles que l'amphotropique à la différence qu'il est moins ou pas du tout sensible à l'interférence membranaire. Dans certains cas cette interférence est due à l'encombrement d'un récepteur cellulaire spécifique par une protéine d'enveloppe d'un autre rétrovirus, ce qui empêche sa reconnaissance et donc l'entrée d'un nouveau rétrovirus. Le caractère polytrope contourne ce problème par la capacité du rétrovirus à reconnaître d'autres récepteurs et ainsi d'infecter des cellules déjà infectées par un équivalent amphotrope. Dans le cas du MLV polytrope, celui-ci peut reconnaître le récepteur XPR1 (Xenotropic & Polytropic retrovirus Receptor 1) (Kozak, 2010).
- **Xénotropique** : le virus ne peut pas infecter les cellules de l'organisme dont il est originaire et n'infecte alors que des espèces différentes. Cela concerne essentiellement des rétrovirus amphotropes ou polytropes dont le (les) récepteur(s) membranaire(s) de l'hôte d'origine a (ont) muté(s) et n'est (sont) plus reconnu(s) par les glycoprotéines d'enveloppe du rétrovirus. Le rétrovirus n'infecte alors que les espèces voisines (Kozak, 2010; Weiss, 2013).

La reconnaissance des récepteurs membranaires

Ainsi, selon le tropisme du MLV, la présence de certains récepteurs est essentielle et parfois spécifique pour permettre l'entrée du virus. Ce qui peut être à l'origine d'une interférence membranaire dans le cas où le récepteur concerné est déjà lié à une protéine d'enveloppe (Kubo et al., 2012). Concernant le récepteur du VIH-1, la présence et l'intégrité des corécepteurs associés au

récepteur CD4 est requise. En effet, la SU-gp120 reconnaît le récepteur CD4 des lymphocytes T, ce qui entraîne un changement de conformation du complexe et permet la liaison de la protéine d'enveloppe aux corécepteurs CCR-5 ou CXCR4. Cependant, chez certaines personnes le corécepteur CCR-5 est non fonctionnel ce qui les rend résistantes à l'infection par le VIH-1 (Samson et al., 1996). Toutefois cela n'empêche pas le virus d'adhérer à la surface cellulaire car une variété d'autres molécules moins spécifiques interviennent pour favoriser cette adhésion (Nisole and Saib, 2004; Pizzato et al., 1999).

La fusion à la membrane cellulaire

L'interaction de l'unité de surface (SU) avec son récepteur entraîne un changement de conformation de la partie transmembranaire (TM) : celle-ci se détache de SU, ce qui permet d'exposer la partie N-terminale hydrophobe de TM, le peptide de fusion, et favorise son insertion dans la membrane cytoplasmique de l'hôte (Figure 5). La sous-unité TM entraîne la fusion des membranes rétrovirales et cellulaires en reprenant sa conformation initiale (Kubo et al., 2012). Le pore de fusion ainsi créé s'élargit et permet l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme de l'hôte.

L'entrée par endocytose

Les rétrovirus peuvent toutefois également entrer dans les cellules par un autre mécanisme faisant intervenir l'endocytose des virions. Dans ce cas, une fois le rétrovirus endocyté dans de la cellule, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane dépend de l'acidité à l'intérieur de l'endosome. Cependant, ce mécanisme peut aussi mener à la destruction du rétrovirus par les cathepsins (Kubo et al., 2012; Nisole and Saib, 2004).

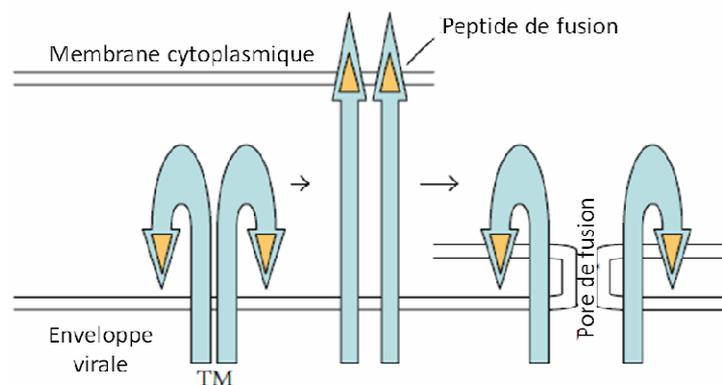


Figure 5 : fusion de la membrane grâce au changement conformationnel de la glycoprotéine TM (Kubo et al., 2012).

Lors de la reconnaissance par la glycoprotéine SU d'un récepteur spécifique à la surface cellulaire, la TM est exposée à la membrane cytoplasmique. Le changement conformationnel de la TM permet au peptide de fusion de s'ancrer dans la membrane cellulaire avant de reprendre sa forme initiale pour générer un pore de fusion propice à l'entrée de la capsid virale dans la cellule.

2.4.1.2. *La déstructuration de la capsid et la transcription inverse*

La déstructuration de la capsid.

La libération de la capsid rétrovirale dans le cytoplasme de l'hôte est immédiatement suivie d'une déstructuration partielle de la capsid virale. Celle-ci est généralement facilitée par la transcription inverse lors de la formation du Complexe de Transcription Inverse (CTI) (Arhel, 2010; Hulme et al., 2011).

Dans le cas du VIH pendant longtemps il n'était pas clairement établi si ces éléments étaient totalement éliminés ou s'il en reste une partie (Fassati and Goff, 2001; Hulme et al., 2011). Cependant il a été montré que les éléments de la capsid du VIH persistent dans le cytoplasme, comme dans le cas du MLV, favorisant ainsi le transport du CTI vers le noyau cellulaire (Arhel, 2010).

Le démantèlement se produit ensuite au cours de la conversion progressive du CTI en Complexe de Pré-Intégration (CPI) aux abords du noyau (Nisole and Saib, 2004). Ce complexe se libère ainsi de la capsid et des autres éléments de structures telles que la MA et la NC au moment de l'entrée dans le noyau où seules des traces de NC sont encore détectées (Arhel, 2010; Risco et al., 1995).

La transcription inverse

Au cours de cette évolution, le CTI se caractérise par la réalisation de la transcription inverse par la RT. Le moment et le lieu du démarrage de cette réaction ne sont pas encore bien déterminés et sont susceptibles de varier en fonction des virus considérés, dans le cas du virus foamy, et, contrairement à la plupart des rétrovirus, cette étape se déroule dans la phase tardive au moment de l'encapsidation du génome viral (Delelis et al., 2003).

Toutefois, il est clairement établi que cette réaction est initiée par l'hybridation d'un ARNt cellulaire au niveau de la séquence PBS, avec l'intervention de la NC (Figure 6) (Isel et al., 2010). La transcription inverse nécessite de nombreuses étapes avant d'être achevée. Au cours de ces étapes, deux sauts de séquences se réalisent (Figure 6). À l'issue de cette réaction, un ADN complémentaire (ADNc) est obtenu grâce aux trois activités enzymatiques qui caractérisent la RT, une activité ADN polymérase ARN dépendante, une activité ribonucléase H et une activité ADN polymérase ADN dépendante (Figure 6).

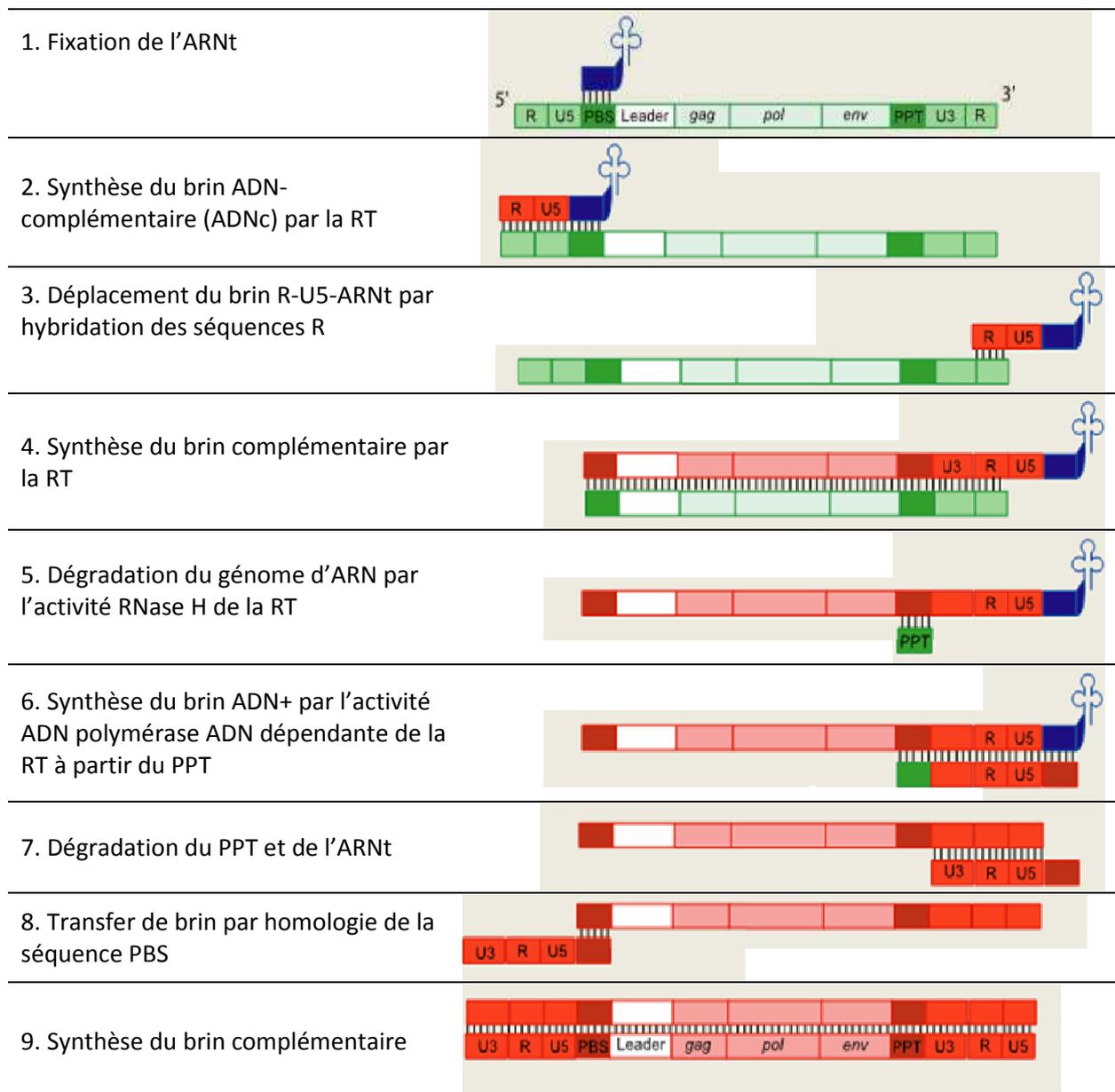


Figure 6 : les étapes de la transcription inverse ■ = ARN ; ■ = ADN.

2.4.1.3. Transport vers le noyau

Dans le cytoplasme

La majorité des études réalisées sur l'évolution des rétrovirus dans le cytoplasme concernent le VIH, le HFV et le MLV principalement. Ces études tendent à montrer que le CTI entrant, lorsqu'il n'est pas endocyté, interagit avec les filaments d'actines via la MA pour ensuite atteindre les microtubules (Anderson and Brown, 2005; Bukrinskaya et al., 1998). Puis, au cours de l'évolution du CTI en CPI, ce complexe est transporté par les dynéines vers le COMT (Centre Organisateur des Microtubules) via le réseau de microtubules avant sa translocation au noyau (Anderson and Brown, 2005; McDonald et al., 2002; Petit et al., 2003) (Figure 7).

La translocation dans le noyau

Les mécanismes de passage des microtubules au noyau ne sont pas encore bien déterminés. L'entrée dans le noyau diffère entre les rétrovirus simples et les lentivirus capables d'infecter les cellules quiescentes (Figure 7).

Dans le premier cas, qui concerne la majorité des rétrovirus, le CPI doit attendre une mitose et la dissolution de la membrane nucléaire pour atteindre le génome de l'hôte (Figure 7) (Lewis and Emerman, 1994; Roe et al., 1993). A noter qu'une étude datant de 2011 montre que le MLV serait capable d'infecter des cellules PC12 et des neurones corticaux de rat en arrêt de croissance (Liu et al., 2011b). Toutefois, les mécanismes impliqués dans ce cas restent à élucider.

Dans le second cas, qui concerne les lentivirus, le CPI est importé de manière active par une contribution des protéines Vpr, MA, CA et IN ainsi que de l'ADN FLAP central (Anderson and Brown, 2005; Nisole and Saib, 2004) dont l'efficacité des actions semblent se compléter (Figure 7). Certains résultats suggèrent que l'interaction de la CA avec la transportine 3 serait à elle seule suffisante pour réaliser ce passage (Logue et al., 2011). D'autres études montrent cependant que l'intégrase, dont la translocation vers le noyau est essentielle pour une infection productive, possède une NLS (Séquence de Localisation Nucléaire) nécessaire à l'import nucléaire mais que la mutation n'empêche pas (Bouyac-Bertoia et al., 2001). Dans tous les cas, les protéines de structure CA et MA ne semblent pas entrer avec le CPI dans le noyau.

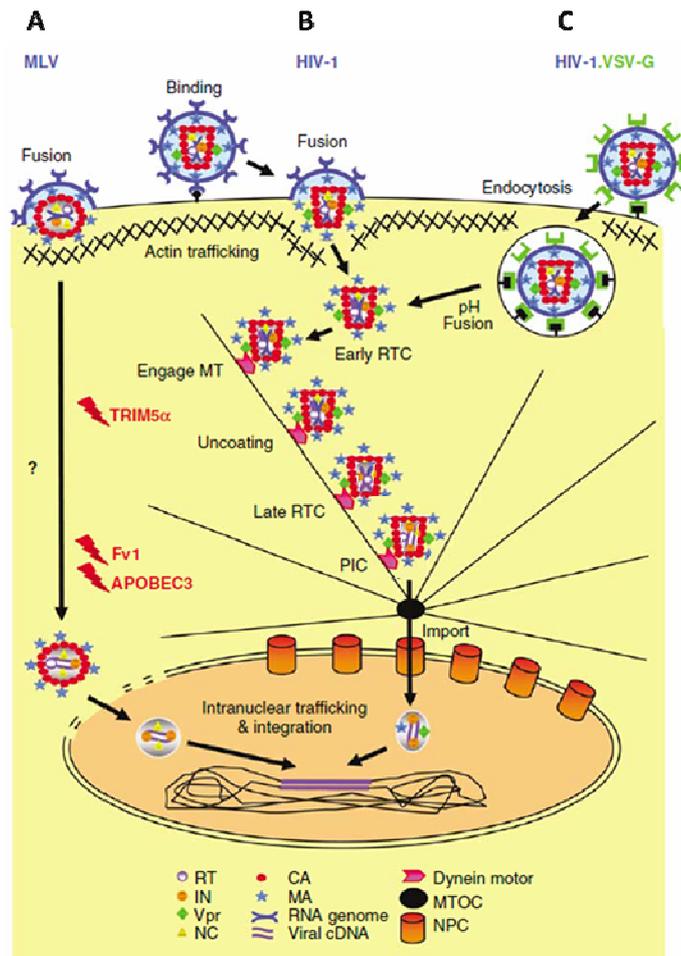


Figure 7 : Migration vers le noyau des rétrovirus entrant (Anderson and Hope, 2005).

(A) Transport d'un *Gammaretrovirus*, cas du MLV, dont les mécanismes de transport vers le noyau ne sont pas complètement élucidés. Le passage dans le noyau nécessite une rupture de la membrane nucléaire lors d'une mitose cellulaire. (B) Transport d'un *Lentivirus* tel que le VIH-1 (HIV-1). Le complexe de transcription inverse (RTC ou CTI) migre vers le noyau, transporté par les dynéines sur les microtubules (MT) vers le centre organisateur des microtubules (MTOC ou COMT). Le complexe de préintégration (PIC ou CPI) passe dans le noyau par les pores nucléaires. (C) Transport d'une particule virale de VIH-1 pseudotypée avec les protéines d'enveloppe du VSV (HIV-1.VSV-G). Les particules virales sont endocytosées et rejoignent les microtubules pour être transportées comme un VIH-1 sauvage.

2.4.1.4. Intégration du provirus

Le complexe de pré-intégration

Dans le noyau, le CPI issu du CTI n'est en général plus associé ni à la MA ni à la CA qui ont été éliminées avant son entrée (Nisole and Saib, 2004). Le complexe est composé de l'ADNc, de la NC, de l'IN et des PR (protéases) virales ainsi que d'autres facteurs cellulaires tels que les protéines du système de réparation de l'ADN, la NHEJ (Non-Homologous End Joining) Ku70 et 80, le facteur de transcription LEDGF/p75, le facteur BAF qui se lie à l'ADN et la protéine HMG I(Y) qui favorise l'intégration (Anderson and Brown, 2005; Masson et al., 2007).

L'ensemble de ces composants participe à la formation du CPI et assiste l'IN au niveau des différentes étapes de l'intégration, aux côtés d'autres facteurs non initialement associés au CPI, tel que LEDGF/p75 lors de l'intégration du VIH-1. Malgré l'implication de tous ces facteurs, cette étape d'intégration reste toutefois un événement rare, seuls 5 à 10% de l'ADN viral total sera intégré dans le génome de l'hôte (Beauclair et al., 2012).

L'intégrase et la réaction d'intégration

L'intégrase est l'enzyme principale de l'intégration du provirus. Elle est composée de trois domaines indépendant (Delelis et al., 2008) :

- une région N-terminale contenant un motif HHCC analogue à un doigt de Zinc et probablement impliquée dans la multi-mérisation de l'IN et la reconnaissance de l'ADN viral ;
- une région centrale constituée du domaine catalytique. Celle-ci présente la triade DDX₃₅E, très conservée et qui agit avec un cofacteur métallique cationique (Mn²⁺ ou Mg²⁺) coordonné par deux résidus de la triade (D64 et D116 pour l'IN du VIH-1) ;
- une région C-terminale qui possède une activité d'interaction non spécifique avec l'ADN, probablement associée à la stabilité du complexe à l'ADN.

L'IN peut former des dimères ou des tétramères en fonction de son activité enzymatique (Delelis et al., 2008). Probablement sous forme de dimère, elle génère l'activité de « 3'processing ». Cette réaction est une attaque nucléophile médiée par une molécule H₂O qui élimine deux nucléotides, adjacents au dinucléotide CA, à chaque extrémité 3'des LTR (Figure 8a et b). Cette réaction de maturation des extrémités 3'OH du génome rétroviral génère le substrat essentiel pour la réaction enzymatique de transfert de brin.

Probablement sous sa forme tétramérique, l'intégrase (IN) réalise le transfert de brin permettant l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte. Une fois le site d'intégration atteint, le complexe de transfert de brin entraîne une réaction de trans-estérification au niveau de l'ADN cible ouvrant le site d'intégration en bouts cohésifs et permettant une insertion covalente du provirus. L'étape suivante consiste à réparer les cassures formées par l'intervention des enzymes de la réparation de l'ADN cellulaire, avec pour résultat la duplication de la séquence ADN cible aux extrémités de l'ADNc (Figure 8d, e, f et g).

Les autres activités de l'intégrase

L'IN présente toutefois d'autres activités telles l'activité endonucléolytique.

Cette activité de l'intégrase, ressemble fortement au « 3'processing » et est réalisée par les tétramères de l'IN. Lors de l'intervention d'inhibiteurs de l'activité de transfert de brin (INSIT), cette activité se trouve favorisée (Figure 8c) (Hazuda, 2010). Elle nécessite une organisation symétrique des extrémités LTR pour cliver spécifiquement au niveau du dinucléotide CA les palindromes présents à la jointure des LTR.

Cette réaction génère les cercles comprenant 2 LTR dits cercles à 2-LTR. Ces formes particulières sont très stables et, étant donné la faible quantité des événements d'intégration (Beauclair et al., 2012), celles-ci peuvent constituer un réservoir viral inductible servant de précurseur à l'intégration. Les cercles à 2-LTR sont aussi transcriptionnellement actifs et permettent la synthèse d'ARNm codant pour les protéines accessoires chez le VIH (Beauclair et al., 2012; Delelis et al., 2008).

Les sites d'intégration

Les sites d'intégration du CPI ne sont pas ciblés aléatoirement : chaque type de rétrovirus présente des points chauds d'intégration. Ces sites diffèrent en fonction des rétrovirus et, jusqu'à présent, trois groupes ont été admis (Beauclair et al., 2012) :

- Les VIH et SIV qui ciblent préférentiellement les unités de transcription (TU) des gènes fortement transcrits, avec la présence sur ces sites d'un faible consensus palindromique similaire aux séquences retrouvées aux jonctions LTR-LTR ;
- Les MLV et PERV qui ciblent les îlots CpG à proximité des promoteurs et dans l'ADN nucléosomal (Moalic et al., 2009; Roth et al., 2011) ;
- Les HTLV-1 et ASLV qui ciblent également les îlots CpG mais de façon plus aléatoire, ne favorisant pas les sites de démarrage de la transcription.

Les sites d'insertion sont fortement influencés par l'interaction spécifique des composants du CPI et des protéines cellulaires et/ou de l'architecture des chromosomes. En effet, dans le cas du VIH-1 le LEDGF/p75 participe au ciblage de l'intégration, à la stabilité du tétramère et favorise ainsi l'activité de transfert de brin (Ciuffi et al., 2006; Hendrix et al., 2011). De plus, les protéines de l'import nucléaire telles que la transportine 3, la NUP358/RanBP2 ou BRD2 interagissent avec l'intégrase et favorisent son ciblage dans les régions riches en gènes.

Enfin, les protéines de remodelage de l'ADN cellulaire, telles que celles du complexe SWI/SNF modifient considérablement la localisation des sites d'intégration (Beauclair et al., 2012). L'action conjointe de tous ces éléments élimine ainsi le caractère aléatoire de l'insertion et leur présence donne une spécificité de cible propre à chaque type de rétrovirus.

Une fois intégré, le provirus persiste dans la cellule hôte et sert de matrice pour la transcription des différents éléments du rétrovirus et la réplication du génome rétroviral, ce qui permet de générer de nouvelles particules virales.

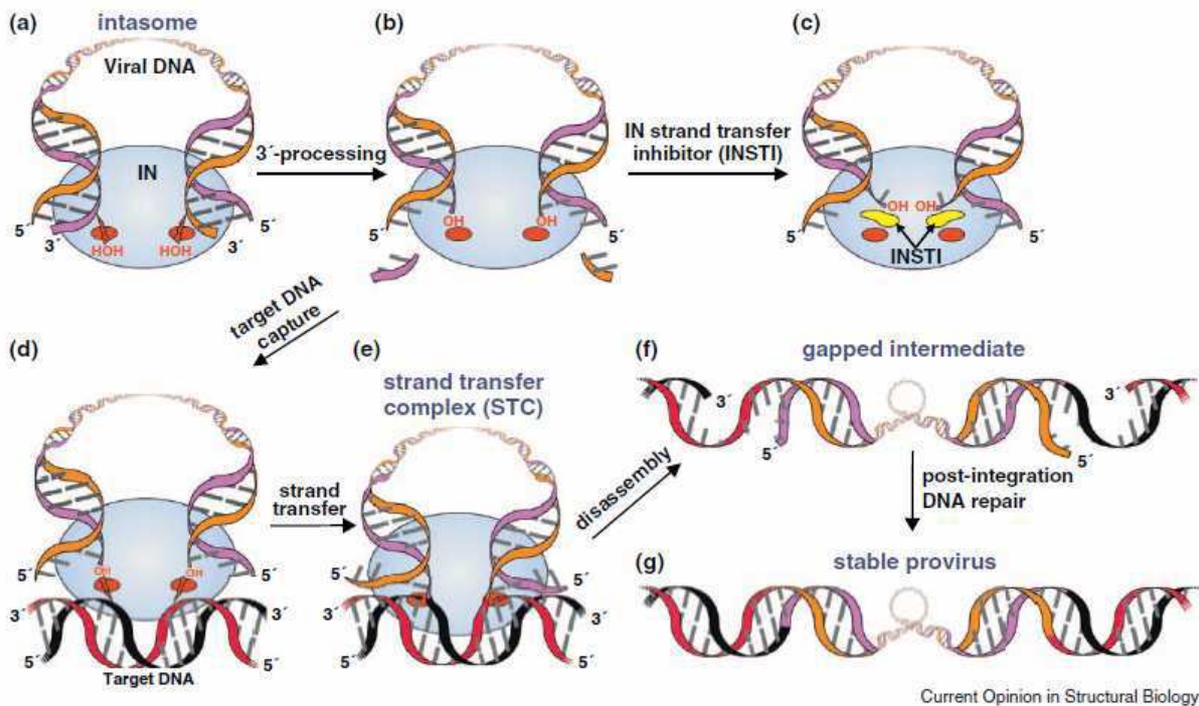


Figure 8 : processus d'intégration du provirus par l'intégrase virale dans le génome hôte (Cherepanov et al., 2011).

(a) Les extrémités franche du génome ADN du rétrovirus (intasome) sont prises en charge par l'intégrase. (b) Les dimère de la protéine procèdent à la maturation des extrémités de l'intasome par la réaction dit de « 3'-processing » libérant une extrémité 3'OH libre. (c) Le blocage de l'intégration par des inhibiteurs du transfert de brin de l'intégrase (INSTI) favorise la formation des cercles à 2-LTR. (d) Les intasomes préparés sont menés à leur site d'intégration par l'interaction des protéines cellulaires et du CPI. (e) les tétramère d'intégrase réalisent le transfert de brin entre l'ADN du site d'intégration dans le génome hôte et l'intasome préparé. (f) la machinerie de réparation cellulaire prend le relais et complète l'intégration en réparant les cassures simple brin formées aux jonctions de l'ADN proviral et du génome de l'hôte. (g) Le provirus est intégré dans le génome de l'hôte et peut s'exprimer en exploitant la machinerie de transcription cellulaire.

2.4.2. Expression du rétrovirus, la phase tardive

2.4.2.1. Expression des gènes

L'expression des gènes du provirus dépend de la machinerie cellulaire qui réalise les étapes de transcription, d'épissage et de traduction des éléments nécessaires à la constitution des particules virales.

La transcription

L'initiation de la transcription dépend du 5'LTR qui contient alors les séquences U3, R et U5, comme décrites précédemment (cf. § 2.3 Le génome des rétrovirus) (Coffin et al., 1997). Les promoteurs présents dans la séquence U3 sont des séquences similaires à celles des gènes eucaryotes et

permettent ainsi le recrutement de nombreux facteurs cellulaires dont l'ARN polymérase II. Celle-ci se fixe au début de la séquence R où s'initie la transcription.

C'est aussi dans la séquence R que se trouve le signal de terminaison de la transcription, le signal de polyadénylation. Ainsi, cette séquence est-elle la seule à se trouver à chaque extrémité de l'ARN rétroviral qui est maturé par l'ajout d'une coiffe en 5' et l'élongation de sa queue poly(A) en 3' (Yamamoto and Takase-Yoden, 2009).

L'épissage alternatif

Les ARNm produits suivent plusieurs destins. Ils peuvent rester tels quels ou être traités par la machinerie de l'épissage alternatif qui, en reconnaissant le ou les SD et SA, génèrent un ou plusieurs ARNm épissés, selon la complexité du rétrovirus (Figure 9A). Les ARNm non épissés sont employés pour la traduction des protéines Gag et Pro-Pol et/ou sont encapsidés dans les particules virales en formation. Dans le cas des génomes simples, comme pour le MLV, l'ARNm épissé code pour la protéine Env. Pour les génomes complexes, d'autres ARNm multiépissés sont générés et codent pour les différentes protéines accessoires (Figure 9A) (Coffin et al., 1997).

La traduction

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm non épissés sont pris en charge par les ribosomes libres tandis que l'ARNm de l'enveloppe, épissé, est pris en charge par les ribosomes du réticulum endoplasmique, employés à la synthèse des protéines sécrétées et de surface (Coffin et al., 1997) (Figure 9B). La traduction des protéines commence par le codon d'initiation (en générale AUG) qui, dans certains cas, comme pour l'ASLV, est le même pour toutes les protéines. A noter que dans la plupart des cas, chaque polyprotéine possède son propre AUG.

Par ailleurs, des séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site) ont été décrites chez certains rétrovirus mais existent probablement chez tous les rétrovirus. Ces séquences sont présentes dans la région « 5'leader » du messenger et permettent d'initier une traduction de manière interne (Yamamoto and Takase-Yoden, 2009). Chez le MLV, elle permet la synthèse des précurseurs Gag et Glyco-Gag. Ce dernier est un facteur d'infectivité ayant un rôle dans la résistance à APOBEC3 (Pizzato, 2010; Stavrou et al., 2013; Yamamoto and Takase-Yoden, 2009).

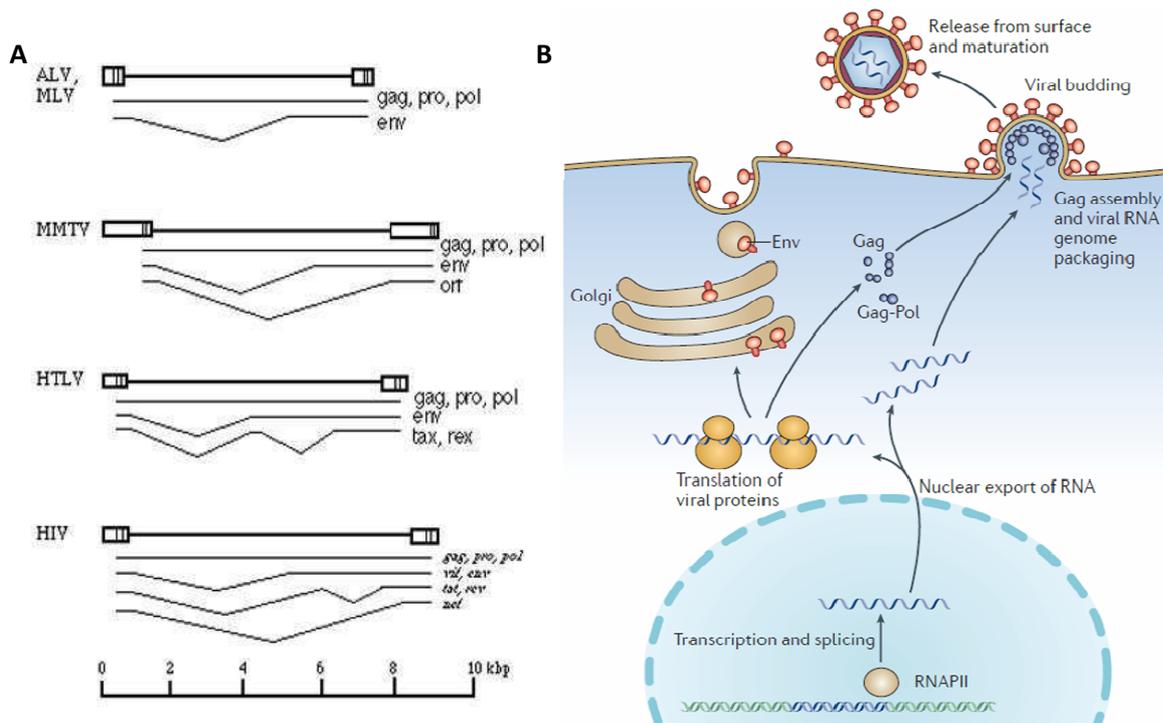


Figure 9 : la phase tardive du cycle de réplication des rétrovirus.

(A) Transcription des ARNm rétroviraux et leurs différents épissages alternatifs pour les rétrovirus à génome simple (ALV, MLV et MMTV) et à génome complexe (HTLV et HIV). L'échelle indique la taille des génomes en kilo paire de bases (kbp) (Coffin et al., 1997) (B) Morphogénèse et bourgeonnement. L'ARN polymérase de type II (RNAPII) transcrit l'ARNm rétroviral qui est épissé ou non dans le noyau. Les protéines de l'enveloppe sont traduites au niveau du réticulum endoplasmique puis prises en charge par le Golgi jusqu'à maturation elles migrent ensuite à la membrane cytoplasmique. Les protéines Gag, Pro et Pol sont traduites par les ribosomes libres et rejoignent les protéines de l'enveloppe à la membrane cytoplasmique pour leur maturation et le bourgeonnement des particules (Stoye, 2012).

2.4.2.2. Formation des particules virales (morphogénèse) et bourgeonnement

La morphogénèse

La morphogénèse des particules virales est essentiellement menée par les polyprotéines Gag et Gag-Pol. Celles-ci s'accumulent au niveau des membranes cytoplasmiques ou des endosomes, en fonction du type de cellules dans lesquelles se déroule l'infection (Sandrin and Cosset, 2006) (Figure 9B). C'est toutefois l'ajout d'un groupement myristoylé dans la partie N-terminale de la MA qui donne l'affinité de ces protéines à la membrane (Garoff et al., 1998).

Le site de l'accumulation de ces éléments est, dans certains cas, dépendant de la localisation des glycoprotéines d'enveloppe déjà incorporées à la membrane (Sandrin and Cosset, 2006) (Figure 9B). Le précurseur de ces glycoprotéines est préalablement clivé dans le Golgi par une protéase cellulaire pour former la SU et la TM. La TM contenant aussi un peptide R en C-ter, celui-ci doit être clivé par la protéase virale pour que la fusion à la membrane lors de l'infection puisse se réaliser (Brody et al., 1992).

La polyprotéine Gag est suffisante pour démarrer la multimérisation et fait intervenir le domaine C-terminal de la CA qui contient le MHR (Major Homology Region) (Chang et al., 2007; Hogue et al., 2009; Lampel et al., 2013). Cette étape est cependant facilitée par la clathrine qui favorise la stabilisation du complexe (Camus et al., 2007; Zhang et al., 2011).

Le génome viral, quant à lui, se dimérise par l'intermédiaire de sa séquence Ψ ; le dimer ainsi formé est reconnu par la polyprotéine Gag au niveau des doigts de Zn de la NC ce qui permet son encapsidation au cours de l'assemblage des éléments Gag et Gag-Pol (Basyuk et al., 2005; Gherghe et al., 2010; Paillart et al., 2004). Lors de ce processus, de nombreuses protéines cellulaires sont encapsidés de façon passive mais aussi de façon active, tel que la cyclophiline A (CypA) (Hammarstedt and Garoff, 2004), ce qui est également le cas des ARNt nécessaires à la réalisation de la transcription inverse (Isel et al., 2010).

Le bourgeonnement

Pour la plus part des rétrovirus, le bourgeonnement et la maturation des particules virales ont lieu simultanément. La maturation est réalisée par la protéase virale qui, suite à la dimérisation des éléments Gag-Pol, se retrouve dans sa forme active. Cet homodimère se clive par un mécanisme autocatalytique, se séparant ainsi des autres éléments (Oshima et al., 2004). L'activité de la protéase libère ainsi les composants structurels (MA, CA et NC), essentiels au bourgeonnement, et les composants enzymatiques (PR, RT et IN). La maturation commence avec la NC qui génère un dimère ARN mature par le complexe ribonucléoprotéique. La CA forme ensuite la capside virale et se lie à la MA au niveau de la membrane. Le relargage des particules est stimulé par le domaine L (late), retrouvé dans la protéine p12 du MLV ou p6 du VIH-1. Il a initialement été identifié chez le VIH-1 sur le domaine p6, situé dans la partie C-terminale de gag. Ce domaine présente le consensus P(T/S)AP et est présent chez d'autres virus tels que le virus Ebola. Lors de la maturation du rétrovirus le domaine L fait détourner la machinerie de la voie MVB (multi-vesicular bodies) que ce soit dans les vésicules intracellulaires ou au niveau de la membrane plasmique (Demirov and Freed, 2004). Ainsi la particule virale est libérée dans le milieu extracellulaire.

2.5. Les pathologies associées

L'infection par les rétrovirus peut mener à plusieurs types de pathologies suite à leur insertion au niveau de zones sensibles dans le génome hôte ou à leur expression. Tels que des lymphomes, des leucémies, des maladies neurodégénératives et/ou des immunodéficiences. Ces maladies peuvent être dues à trois groupes d'effets provoqués : i) par l'expression des composants du rétrovirus, ii) par la modulation de l'expression des gènes de l'hôte ou iii) par l'insertion des rétrovirus déstabilisant ainsi l'organisation du génome (Stoye, 2012).

C'est pour leurs effets oncogènes que les rétrovirus ont été étudiés en premier lieu. En effet, ces rétrovirus interviennent dans le contrôle de la prolifération cellulaire dont la dérégulation peut provoquer un cancer. Ainsi, trois types de mécanismes sont responsables de la transformation des cellules (Assil et al., 2011) :

- le rétrovirus peut avoir intégré un oncogène cellulaire dans son génome, c'est le cas du RSV par exemple. Suite à une infection celui-ci est exprimé de façon constitutive et entraîne le dérèglement et la transformation des cellules hôtes ;
- le rétrovirus peut générer des mutagénèses insertionnelles, c'est le cas du MLV chez la souris ou de l'ALV chez les aviaires par exemple. Il s'intègre à proximité d'un proto-oncogène cellulaire, tel que c-myc dans le cas de la leucose aviaire (Hayward et al., 1981), et entraîne ainsi la dérégulation de son expression menant à la transformation cellulaire ;
- l'expression d'une des protéines du rétrovirus peut aussi, dans certains cas, altérer des facteurs de l'hôte impliqués dans le contrôle de la division cellulaire, de la réparation ou dans l'apoptose. Menant, là-aussi, à la transformation de la cellule. C'est le cas du HTLV-1 et de sa protéine Tax par exemple (Azran et al., 2004).

Les premiers rétrovirus transformant identifiés ont été le RSV et l'ALV chez le poulet. Par la suite, de nombreux autres rétrovirus ont été identifiés comme le MLV et le FeLV, respectivement chez la souris et le chat, responsables de leucémie ou encore le KoRV chez le koala entraînant des lymphomes (Anai et al., 2012; Oliveira et al., 2007; Varmus, 1989).

Contrairement aux rétrovirus oncogènes, qui entraînent une dérégulation des cellules hôtes, les rétrovirus responsables d'immunodéficiences entraînent une diminution de la population des cellules de l'immunité. Ce sont essentiellement des lentivirus tel que le VIH, le SIV ou le FIV. Ces rétrovirus sont ainsi nommés en raison de leur longue période d'incubation et de l'évolution lente de la maladie. Ils entraînent une dégénérescence du système immunitaire. A titre d'exemple, le VIH est connu pour infecter les lymphocytes T CD4+ (Alimonti et al., 2003). Il peut entraîner la destruction de ces cellules lors de la primo infection, en détournant leur machinerie cellulaire afin de se répliquer, déstructurant ainsi l'intégrité de la membrane plasmique. Par la suite les cellules infectées ne sont plus détruites mais vont participer au processus dit de « baiser de la mort » au cours duquel les cellules infectées entraînent l'apoptose des cellules immunitaires saines à leur contact (Perfettini et al., 2005).

Bien que la majorité de ces pathologies soit dues à une infection par des rétrovirus exogènes, certaines d'entre elles ont des origines étroitement liées aux rétrovirus endogènes.

3. Les rétrovirus endogènes

Chez les eucaryotes, une grande partie du génome est composé de séquences répétées dispersées. Ces séquences, initialement interprétées, à tort, comme étant la « poubelle » des génomes, sont réparties en quatre principales classes : les transposons, les rétrotransposons (comprenant les éléments SINE et LINE), les rétrotransposons à LTR et les rétrovirus endogènes (ERV) (Figure 10). Ces éléments ont la particularité de pouvoir se déplacer par transposition au sein des génomes. Toutefois, chez les mammifères, seules les SINE, les LINE et les ERV en sont capables (Ribet and Heidmann, 2010).

Parmi les séquences virales des virus à ADN ou à ARN composant le génome des vertébrés, les séquences ERV sont les plus représentées, constituant à elles seules 3 à 14% des génomes actuellement analysés (amphibiens, mammifères, oiseaux, poissons, reptiles,...). Ils ont ainsi envahi ces génomes depuis plusieurs dizaines voire centaines de millions d'années (Horie et al., ; Pellett et al., 2012; Weiss and Stoye, 2013). Bien que leur grande majorité soit défectueuse et ne puisse pas générer de particules virales infectieuses, 1-2% de ces séquences sont toutefois amenées à jouer un rôle physiologique dans la cellule hôte.

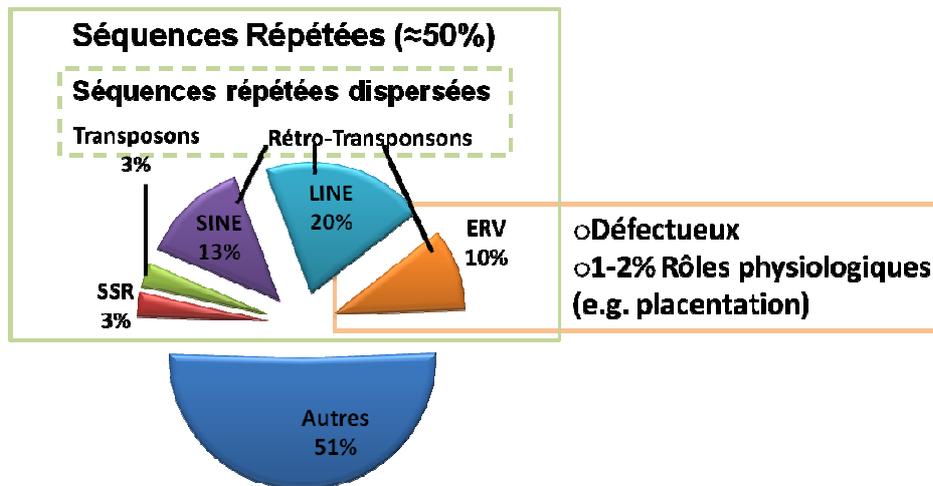


Figure 10 : répartition des séquences répétées dans le génome des mammifères.

Ces séquences sont représentées par les séquences répétées en tandem, ou simples séquences répétées (SSR) et les séquences répétées dispersées. Parmi ces dernières figurent les transposons, les courts et longs éléments nucléaires intercalés (SINE et LINE respectivement) et les rétrovirus endogènes (ERV). Ces derniers sont pour la plus part défectueux et non répliatifs, bien qu'1 à 2 pourcent des ces séquences sont généralement connus pour jouer un rôle physiologique chez son hôte.

3.1. Endogénéisation

3.1.1. Principe

Les rétrovirus infectent leur hôte en s'intégrant à leur génome sous forme de provirus. De cette façon, ils y figent leur propre génome. Cette infection se réalise généralement dans les cellules somatiques et se propage ainsi de manière horizontale d'une cellule hôte à l'autre. Il arrive cependant que ces rétrovirus infectent une lignée germinale et, lorsque celle-ci participe à un événement de fécondation, toutes les cellules de l'organisme possèdent alors le provirus intégré. Le rétrovirus devient alors un rétrovirus endogène se transmettant verticalement dans la lignée de l'individu, dit aussi de façon mendélienne, et ce, sans avoir à générer de particules infectieuses (Ribet and Heidmann, 2010) (Figure 11).

3.1.2. Diversité et composition

Ainsi les ERV dérivent-ils des différents genres de rétrovirus ayant un tropisme qui leur permet d'infecter les cellules germinales. Ce sont principalement les genres *alpha*, *bêta* ou *gammaretrovirus* qui sont endogénisés. Toutefois, on retrouve aussi les genres *delta*, *epsilon*, *supmaretrovirus* et, plus rarement les *lentivirus* (Katzourakis et al., 2009; Katzourakis et al., 2007; Ribet et al., 2008b). Il résulte de cela que les ERV ont généralement un génome simple et sont composés des gènes essentiels *gag*, *pro*, *pol* et/ou *env* et plus rarement un génome complexe qui peut alors coder pour des protéines accessoires (Katzourakis et al., 2009; Katzourakis et al., 2007; Yang et al., 1999).

3.1.3. Evolution

Suite à leur insertion, les ERV subissent de nombreuses modifications au cours de l'évolution de l'organisme hôte, entraînant le plus souvent leur inactivation totale ou partielle. Cette inactivation est généralement due à l'accumulation de mutations, de délétions ou de recombinaisons pouvant entraîner l'élimination, totale ou partielle, ou le remplacement des séquences rétrovirales (Ribet and Heidmann, 2010; Stoye, 2001). De ce fait, plus un rétrovirus est ancien, plus il accumule de modifications et ainsi plus il se fige dans le génome hôte ce qui le rend aussi de plus en plus difficile à identifier.

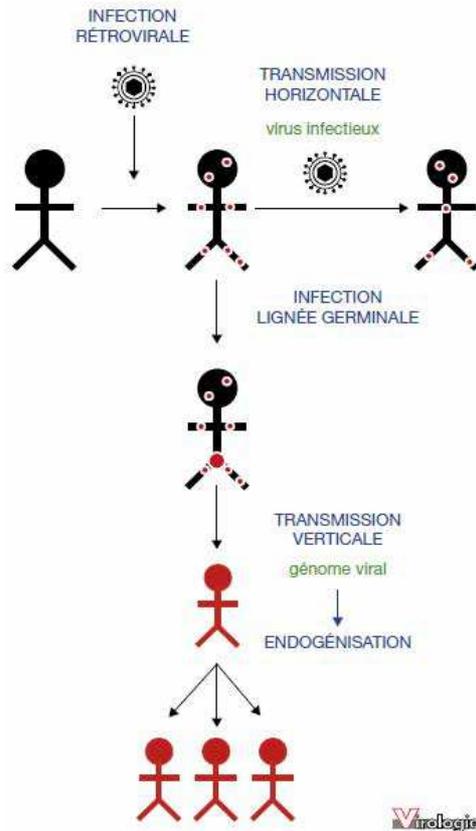


Figure 11 : Schéma de l'endogénéisation des rétrovirus dans le génome d'un hôte (Ribet and Heidmann, 2010).

La transmission des rétrovirus se réalise classiquement d'un hôte à l'autre de façon horizontale. C'est-à-dire que le rétrovirus infecte des cellules somatiques pour se répliquer. Il passe par une phase extracellulaire pour atteindre physiquement un autre individu. Les rétrovirus peuvent dans certains cas infecter une lignée germinale. Le rétrovirus s'intègre dans le génome de la cellule hôte et si celle-ci participe à un phénomène de fécondation, le provirus intégré se transmet alors verticalement à la descendance de l'hôte. Cette transmission est dite mendélienne, le rétrovirus est alors endogénéisé.

3.2. Classification

Il est par conséquent difficile de classer les rétrovirus endogènes et, à ce jour, aucune classification n'a été définitivement proposée. Toutefois, une nomenclature principale a été adoptée, fondée sur l'ajout d'une ou deux lettres devant ERV. Ces lettres correspondent à l'espèce dans laquelle il a été identifié. Ainsi chez la souris ils sont nommés MERV ou MuERV, pour Murin ERV.

A cela s'ajoute de nombreuses tentatives de nomenclature, réalisées pour différencier les types d'ERV existants chez l'homme. L'une d'elle est fondée sur le type d'ARNt s'hybridant spécifiquement à la séquence PBS, le code à une lettre de l'acide aminé correspondant à l'ARNt est ajouté à la fin de l'ERV, donnant ainsi pour les ERV humain reconnus par l'ARNt de la lysine le nom de HERV-K. Toutefois, des ERV très distants peuvent hybrider le même ARNt ce qui peut entraîner des erreurs de regroupement. De plus, le PBS n'est pas systématiquement présent.

D'autres systèmes ont donc été proposés en ajoutant, par exemple, le nom d'un gène voisin (HERV.ADP), le numéro d'un clone (HERV.S71), un motif acide aminé reconnu (HERV.FRD) ou encore le nom de la sonde utilisée pour le clonage de l'ERV (HERV.HML) (Stoye, 2012).

Cependant ces nomenclatures ne s'appliquent qu'aux HERV et présentent des difficultés à être adaptées chez l'ensemble des autres animaux. De plus elles se superposent mal à celle employée pour les rétrovirus exogènes avec qui les ERV sont très étroitement liés, celle-ci étant basée sur leur relation phylogénétique. Selon ce même principe, il est possible de regrouper les rétrovirus endogènes. Ainsi trois classes ont pu être identifiées (Figure 12). La classe I s'apparente au gamma et epsilon rétrovirus, la classe II est apparentée aux alpha, beta, delta, lentivirus et lentivirus et la Classe III est apparentée aux spumavirus (Gifford et al., 2005; Jern et al., 2005).

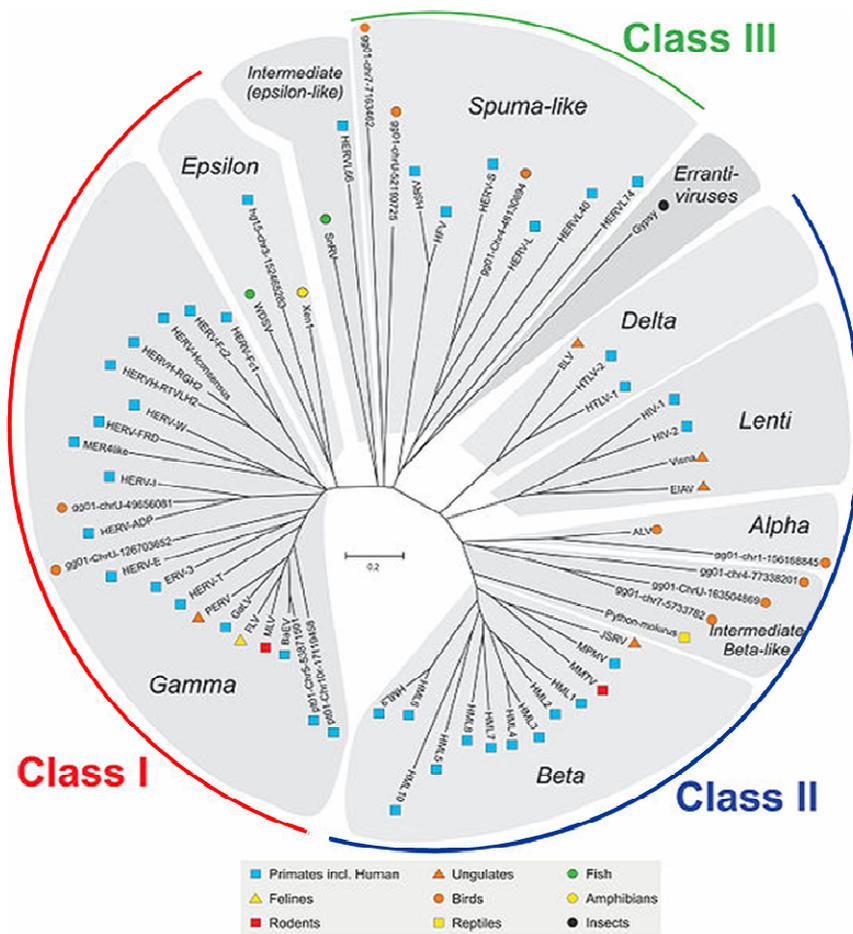


Figure 12 : Phylogénie des ERV et leur classification chez les animaux (Jern et al., 2005).

Cet arbre phylogénétique représente les principaux rétrovirus exogènes et endogènes des animaux. La proximité entre ces deux types de rétrovirus permet de classer les rétrovirus endogènes en 3 classes regroupant les différents genres correspondant aux rétrovirus exogènes. La classe I regroupe les genres *Gamma* et *Epsilonretrovirus*, à génome simple. La classe II regroupe les genres *Beta*, *Alpha*, *Lenti* et *Deltaretrovirus*. Ces ERV peuvent produire des polyprotéines Gag-Pol par un ou deux cadres de lecture différents plutôt que par le mécanisme de suppression du codon stop. La classe III est constituée du genre *Spumaretrovirus* (Gifford et al., 2005).

3.3. Domestication et devenir des ERV

Les rétrovirus exogènes, en infectant leur hôte, s'intègrent dans des zones généralement ciblées du génome. Ainsi les genres gammarétrovirus sont majoritairement identifiés au niveau des promoteurs des gènes actifs. Les ERV, au contraire, présentent une fréquence plus élevée dans les régions intergéniques que dans les unités de transcription. Ils sont aussi fréquemment retrouvés en anti-sens de la transcription dans les introns (Ribet and Heidmann, 2010; van de Lagemaat et al., 2006).

Cette différence avec leurs équivalents exogènes est associée à une pression de sélection qui s'est opérée au cours de l'évolution, favorisant ainsi les intégrations n'ayant pas une répercussion négative sur le génome hôte. En effet, l'intégration des rétrovirus dans le génome peut entraîner des modifications importantes chez celui-ci. Chez les rétrovirus exogènes ces perturbations sont généralement responsables de l'activation d'oncogènes à l'origine de nombreuses pathologies tandis que chez les ERV très peu de cas ont été répertoriés.

En effet, de nombreux processus entraînent la fixation de l'ERV, l'amenant, lui ou une partie de lui-même, à participer au métabolisme cellulaire ou à subir un contrôle très strict de la part de la cellule. Dans certains cas cependant, les contrôles menés ne suffisent pas ou plus, l'ERV peut alors être responsable de pathologies et/ou ré-émerger.

3.3.1. Rôles physiologiques

Toutefois, si les endogénisations à caractère néfaste pour l'hôte ne sont pas favorablement sélectionnées, celles qui génèrent un gain de fonction peuvent l'être. Les types d'effets suite à de telles insertions sont généralement similaires à ceux des rétrovirus exogènes mais agissant au profit de la cellule.

3.3.1.1. Expression d'un gène rétroviral

Dans certains cas l'expression conservée de protéines de rétrovirus va participer au développement de l'organisme hôte. Par exemple, chez les placentaires, la syncytine est une protéine issue du gène *env* de certains ERV. Cette glycoprotéine d'enveloppe favorise la formation du syncytiotrophoblaste par son activité fusogène (cf. § 2.4.1.1. L'entrée dans la cellule). De plus elle serait également impliquée dans la tolérance immunologique du fœtus par la mère.

Toutefois, ce gain de fonction chez les placentaires semble être associé à des événements indépendants d'endogénisation. En effet les gènes *env* des ERV impliqués sont radicalement différents dans le cas des primates, des rongeurs, des lagomorphes ou du mouton (Arnaud et al., 2008; Dupressoir et al., 2012; Heidmann et al., 2009; Ribet and Heidmann, 2010). Chez l'homme le gène *env* des HERV-W et HERV-FRD, associé aux gammarétrovirus, code pour les syncytines 1 et 2 (Blond et al., 1999; Mi et al., 2000). Ces protéines sont très distinctes par leur séquence et par leur

événement d'intégration, des syncytines A et B des *Muridae* qui peuvent être associées au genre gammarétrovirus, (Dupressoir et al., 2012; Dupressoir et al., 2005) et de celles des moutons codées par un enJSRV dont le génome est associé au genre betarétrovirus (Arnaud et al., 2008).

D'autres gains de fonctions de ce type ont été mis en évidence chez la souris ainsi que chez le mouton pour des facteurs protégeant l'hôte de l'infection par des rétrovirus proches. Ces facteurs de restriction seront abordés avec plus de précision dans la partie 5.2. Les facteurs de restriction.

Par exemple :

- Chez la souris, le facteur Fv1 est codé par le gène *gag* dont la séquence possède des similarités avec les éléments d'un MuERV-L. Ce facteur reconnaît spécifiquement les éléments CA de la capsid virale du MLV et bloque sa réplication à un stade précoce de l'infection (Benit et al., 1997; Hilditch et al., 2011).
- Le facteur Fv4 est un autre facteur de restriction, mais celui-ci est codé par le gène *env* d'un MuERV et bloque les récepteurs reconnus sur les cellules NIH3T3 par le MLV écotrope, grâce à un mécanisme d'interférence membranaire (cf. § 2.4.1.1. L'entrée dans la cellule) (Ikeda and Sugimura, 1989).
- Il en est de même chez le mouton pour l'enJSRV, qui dérive du betarétrovirus JSRV. L'expression du gène *env* de l'un des enJSRV bloque, elle aussi, l'infection à un stade précoce par interférence membranaire. Deux autres enJSRV, codant pour une polyprotéine Gag transdominante, ont été identifiés comme étant capables de bloquer l'infection à un stade tardif, en faisant jouer le mécanisme dit JLR (JSRV late restriction) (Arnaud et al., 2008; Mura et al., 2004; Spencer and Palmarini, 2012).

L'expression de ces ERV a ainsi été préservée grâce à leur capacité à entrer en compétition avec les pathogènes de leur hôte, donnant ainsi un avantage sélectif à celui-ci.

3.3.1.2. Modulation de l'expression d'un gène cellulaire

Comme les rétrovirus exogènes, les LTR des rétrovirus endogènes peuvent moduler l'expression des gènes de l'hôte, mais dans certains cas celui-ci peut en tirer un bénéfice. Parmi ces LTR il existe les LTR solo qui sont les restes d'une recombinaison entre les deux LTR d'un provirus ayant entraîné son excision. Ces séquences sont de 10 à 100 fois plus fréquentes que les ERV complets mais, bien qu'elles aient perdu toute capacité répliquative, ces LTR solo sont capables de moduler l'expression des gènes environnants comme des LTR classiques (Gimenez et al., 2010; Macfarlane and Simmonds, 2004; Stoye, 2001; Subramanian et al., 2011).

A titre d'exemple, le LTR ERV-9 solo participe actuellement au maintien de l'expression du gène humain de l'IRGM (immunity-related GTPase), une protéine impliquée dans l'immunité innée et dont l'activité a cessé chez certains primates il y a près de 50 millions d'années (Bekpen et al., 2009).

Un autre exemple concerne le gène de l'amylase humaine, l'AMY1C, qui possède en amont un LTR de provirus modulant son expression et permettant la sécrétion de l'amylase dans la salive (Meisler and Ting, 1993; Ting et al., 1992) ce qui a entraîné des conséquences importantes sur le développement humain et, par extrapolation, sur celui de l'agriculture (Stoye, 2012).

Un autre exemple touche à la reproduction et concerne le contrôle de l'expression de la GTAp63, une protéine qui protège les cellules germinales des cancers chez l'homme et les grands singes, soumise là aussi à une régulation par un LTR de ERV (Beyer et al., 2011).

De nombreuses autres modulations induites par les LTR ont été identifiées et ces modifications ont eu une grande incidence sur l'évolution des primates, 64% d'entre elles concernent leurs fonctions de reproduction et de développement (Oliver and Greene, 2011).

3.3.1.3. Réarrangements chromosomiques

L'insertion des ERV dans certaines zones du génome a été conservée et participe activement à la plasticité de celui-ci par la recombinaison des séquences répétées des LTR. Il a ainsi été montré que ces éléments peuvent entraîner la duplication des gènes ou leur délétion modifiant ainsi la fonction des gènes impliqués (Hughes and Coffin, 2001).

Ainsi les ERV participent-ils aussi à l'évolution rapide de certaines familles de gènes sous la pression d'un stress ou d'un stimulus environnemental tel que par exemple l'évolution des gènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II chez les mammifères (Jern and Coffin, 2008).

Par ailleurs, les EBR (Evolutionary Breakpoint Regions) des mammifères sont enrichies pour certaines catégories d'ERV. Ce qui suggère que de nombreux événements de recombinaison ont eu lieu à ces niveaux par l'intermédiaire des séquences répétées des ERV (Doxiadis et al., 2008; Groenen et al., 2012).

Enfin il a été proposé que les ERV pouvaient jouer un rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN impliquant la machinerie de réparation par recombinaison homologue (Lesage and Todeschini, 2005; Liu and Soper, 2009). Toutefois, l'insertion d'un ERV dans le génome hôte peut contribuer à des réarrangements moins importants tels que l'épissage des gènes. Il a ainsi été montré qu'un HERV, le RTVL-H, contribue à l'épissage alternatif du gène de la phospholipase A2 (Feuchter-Murthy et al., 1993).

3.3.2. Un contrôle très strict des ERV

Les insertions d'ERV qui n'ont pas d'impact suffisamment négatif sur le développement de l'hôte peuvent être fixées dans son génome. Cette fixation des ERV est liée à leur inactivation, totale ou partielle, favorisant le contrôle par l'hôte de leur expression au détriment de leur capacité à se répliquer.

Ce phénomène se réalise par un contrôle à caractère actif et/ou par une pression de sélection à caractère essentiellement passif. Dans le premier cas, le contrôle est lié aux facteurs de l'hôte tels que des modifications épigénétiques, des facteurs de restriction ou une évolution des facteurs cellulaires habituellement exploités par le rétrovirus. Dans le second cas, la pression de sélection donne lieu à une accumulation de modifications dans la séquence primaire des rétrovirus telles que des mutations, des délétions ou des recombinaisons. Ces deux modes de contrôle semblent se cumuler pour favoriser l'endogénéisation.

3.3.2.1. Méthylation de l'ADN

L'implication des mécanismes épigénétiques dans le contrôle de l'expression des ERV a été fortement suggérée après l'observation de la réactivation de certains ERV consécutive à une modulation des méthylations des cytosines de l'ADN.

En effet, la réexpression d'un MLV a été mise en évidence suite à un traitement au BrdU d'une culture de fibroblastes embryonnaires non infectées (Lowy et al., 1971). Il en est de même chez le poulet pour lequel un traitement au 5-azacytidine entraîne la réactivation de certaines ERV (Groudine et al., 1981; Weiss et al., 1971).

Ces analogues des pyrimidines sont responsables d'une forte modification de la méthylation de l'ADN pouvant entraîner la levée de l'inhibition de l'expression de ces ERV. Par ailleurs, les méthylations CpG au niveau des LTR des ERV ont été prouvées sur les HERV-K(HML-2) et montrent l'implication d'un tel mécanisme, favorisant le contrôle par l'hôte de ces provirus (Gimenez et al., 2010; Kahyo et al., 2013; Lavie et al., 2005).

3.3.2.2. Autres mécanismes épigénétique

Lors du développement embryonnaire, ces méthylations de l'ADN sont en partie levées en raison de leur reprogrammation (Haaf, 2006). Cependant, les rétrovirus s'intègrent parfois à proximité de gènes actifs. D'autres systèmes vont alors prendre le relais, ce qui évite une dérégulation de l'expression par la levée de leur inhibition.

Ainsi il a été montré que certains éléments LTR sont contrôlés par les méthylations de la lysine 9 sur l'histone H3 (Leung and Lorincz, 2012; Rowe and Trono, 2011). Il en est de même avec les protéines

TRIM28/KAP1 et ZFP809 qui agissent de concert en réprimant spécifiquement l'expression des rétrovirus endogènes dans les cellules embryonnaires (Matsui et al., 2010; Rowe and Trono, 2011; Wolf and Goff, 2009).

3.3.2.3. Implication des facteurs de restriction

Par ailleurs, les facteurs de restriction, comme nous allons le voir dans la partie « 5. Restriction virale », sont capables d'atténuer ou d'inhiber la propagation et la réplication des rétrovirus. Il est probable que ces mêmes mécanismes soient également impliqués dans le contrôle de l'expression de certaines séquences ERV.

En effet, il a été observé que des souris KO (knock-out) pour le facteur TREX1 (Three prime Repair Exonuclease 1) impliqué chez l'homme dans le syndrome d'Aicardi-Goutière, sont sujettes à une maladie auto-immune sévère. Un traitement par des drogues antirétrovirales, tel que l'AZT (Azidothymidine), permet d'éviter leur mort et, selon les drogues utilisées, améliore leur état de santé (Beck-Engeser et al., 2011). De ce fait, TREX1, qui est un régulateur de certains gènes stimulés par les interférons (ISG) (Hasan et al., 2013), pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression des ERV. Cependant il a été montré que cette même protéine TREX1 dégrade les produits abortifs de la transcription inverse du VIH et aide ainsi le virus à se répliquer (Yan and Chen, 2012). Toutefois, le mécanisme par lequel les ISG, tel que ZAP (Zinc-finger antiviral protein), pourraient contribuer au contrôle de la mobilité des ERV reste encore non défini (Stoye, 2012).

3.3.3. Pathologies associées

Les ERV qui échappent au contrôle de leur hôte peuvent être impliqués dans des pathologies. Mais cette implication n'est pas évidente à démontrer. Il est notamment difficile d'en distinguer les causes des effets dans la mesure où, dans de nombreux cas, la transcription d'ERV peut simplement être le reflet des changements physiologiques induits par la pathologie elle-même. Toutefois, il existe quelques cas pour lesquels l'association avec des ERV est possible et dont les mécanismes d'induction de la pathologie sont généralement les mêmes que ceux des rétrovirus exogènes.

3.3.3.1. Modulation de l'expression d'un oncogène

Dans le cas de l'implication d'un composant du rétrovirus, il a été mis en évidence que la surexpression de la protéine Rec du HERV-K pouvait jouer un rôle dans la formation de cellules tumorales, en déréprimant la transcription d'un facteur oncogène (Kaufmann et al., 2010).

Des effets associés à l'insertion d'un promoteur ou d'un amplificateur qui modulent l'expression d'un oncogène de l'hôte ont aussi été décrits (Cohen et al., 2009; Gimenez et al., 2010). C'est le cas par exemple du proto-oncogène CSF1R (Colony-Stimulating Factor 1 Receptor) impliqué dans des

lymphomes humains et dont l'expression aberrante est médiée par un LTR d'ERV (Lamprecht et al., 2010).

Plus récemment, l'implication d'un HERV dans un cancer du poumon a été mise en évidence (Kahyo et al., 2013). Cette étude suggère que le polymorphisme insertionnel des LTR solo du HERV-K(HML-2), dont l'endogénéisation et l'activité sont les plus récentes chez l'homme (Turner et al., 2001), serait impliqué dans la modulation de l'expression d'un oncogène et ce, suite à une levée de l'inhibition épigénétique de l'hôte liée à l'âge.

3.3.3.2. Insertion déstabilisante

L'insertion des ERV qui déstabilisent l'organisation du génome est toutefois plus fréquemment observée chez la souris où certaines de ces séquences endogènes sont encore actives. De fait, l'insertion d'un ERV dans l'intron d'un gène cellulaire peut entraîner un épissage générant un messager hybride cellule-virus (Maksakova et al., 2006).

De façon plus spectaculaire mais relativement rare, des recombinaisons peuvent se réaliser entre deux provirus entraînant une recombinaison chromosomique, ce qui est illustré par l'exemple de la délétion du chromosome Y associée à une infertilité chez l'homme (Sun et al., 2000).

Ces mutations sont essentiellement liées à la mobilité des rétrovirus endogènes qui, dans certains cas, émergent suite à une recombinaison avec un rétrovirus exogène ou présentent tout simplement encore une mobilité active.

3.3.3.3. Recombinaison entre ERV et exRV

Ces événements de recombinaisons ont été identifiés chez de nombreux animaux dont le chat, pour lequel une recombinaison entre les gènes d'enveloppes d'un enFLV, gammarétrovirus présent en de multiples copies dans le génome, et d'un exFLV (exogène), a généré un nouvel agent infectieux responsable de multiples pathologies dont des leucémies (Anai et al., 2012; Hartmann, 2012).

Il en est de même chez la souris concernant le MLV et le MMTV dont la forte mobilité est aussi responsable d'une transmission horizontale générant, entre autres, les cancers éponymes (Maksakova et al., 2006; Weiss, 2013).

3.3.3.4. Evolution des facteurs cellulaires de l'hôte

Il existe enfin un mécanisme de pression de sélection qui va favoriser l'hôte dans sa course aux armements contre son pathogène. Certaines mutations, sur des éléments essentiels à la réalisation du cycle du rétrovirus, présentent un avantage sélectif pour l'hôte, dans la mesure où elles diminuent les pathologies associées à une infection répétée par le pathogène.

Les plus connues concernent des mutations sur les récepteurs cellulaires, qui n'altèrent pas ou peu leur fonction physiologique. Ces mutations empêchent la reconnaissance des récepteurs par les glycoprotéines d'enveloppe (cf. § 2.4.1.1.L'entrée dans la cellule). Le rétrovirus peut alors à son tour évoluer vers la reconnaissance d'autres récepteurs (cas des MLV polytropes) et/ou vers l'infection des cellules d'une espèce naïve (cas des MLV xénotropes) (Kozak, 2010; Weiss, 2013).

Certains ERV peuvent ainsi « sauter » d'une espèce à l'autre, phylogénétiquement éloignées. Ce phénomène de xénotropisme semble toucher certains MuERV qui auraient évolué vers le GALV et le KoERV, récemment endogénisés et qui partagent un ancêtre commun (Oliveira et al., 2007; Tarlinton et al., 2008). Il pourrait en être de même entre certains gammarétrovirus tels que le RD114 (*Felis*) et le BaEV (babouin) ainsi qu'entre le FeLV et le MLV qui auraient envahi les différentes espèces correspondantes par un tel transfert horizontal suivie d'une endogénisation (Anai et al., 2012; Weiss, 2013).

3.3.4. Le cas du Koala, le suivi d'une endogénisation en temps réel.

Un phénomène récent d'endogénisation d'un gammarétrovirus observé chez le koala aurait débuté il y a moins de 200 ans (Avila-Arcos et al., 2013; Simmons et al., 2012). Ce phénomène a été mis en évidence par la coexistence des formes endogène et exogène du KoRV, d'une part, et, d'autre part, par l'hétérogénéité de la présence de l'endogène dans les différentes populations de Koala (Simmons et al., 2012; Tarlinton et al., 2006).

3.3.4.1. Des caractéristiques simultanément endogènes et exogènes

L'étude d'une colonie en captivité a en effet démontré une grande conservation des insertions entre les différents individus. De plus, pour un même individu, il n'y a pas de différence d'insertion dans les différents tissus. Ces éléments sont favorables à une transmission verticale du KoRV alors endogénisé (Tarlinton et al., 2008; Tarlinton et al., 2006).

Toutefois, l'analyse des différentes populations de koala a révélé de grandes variations des KoRV en nombre et en sites d'intégration dans les populations porteuses, alors que, pour un même ERV et pour une même espèce, une grande conservation est attendue (Tarlinton et al., 2006).

La majorité des KoRV présente par ailleurs une taille complète de leur génome dont les séquences sont très conservées. En effet, les variations observées dans les régions hyper-variables du gène *env* sont majoritairement silencieuses (63.5% des cas). De plus, il n'y a pas de mutation non-sens et les délétions identifiées conservent le cadre de lecture. Ces variations correspondent à ce qui est généralement observé pour des rétrovirus exogènes mais qui ne sont pas normalement observées pour des rétrovirus endogènes (Tarlinton et al., 2006).

3.3.4.2. *Une endogénisation qui se propage*

Le KoRV se propage donc à la fois horizontalement et verticalement. Cette propagation semble venir du nord de l'Australie avec une prévalence de l'enKoRV décroissant du nord au sud (Simmons et al., 2012). On ne peut toutefois pas complètement exclure que cette évolution du nord au sud puisse être liée à une diversité génétique entre les populations de Koala. Ainsi, ceux du sud pourraient présenter une plus grande résistance à l'infection par le KoRV que les Koala du nord (Simmons et al., 2012).

Cette diversité pourrait aussi être liée à un facteur environnemental tel qu'une transmission mécanique par un parasite. En effet, ce type de prévalence est également observé chez les chevaux ainsi que les bovins en ce qui concerne, respectivement, l'EIAV (equine infectious anaemia virus) et le BLV (bovine leukaemia virus), dont la prévalence décroît des régions tropicales vers les régions tempérées (Simmons et al., 2012).

3.3.4.3. *Implication de la diminution de l'infectiosité*

Par ailleurs, ce KoRV, qui présente à la fois des caractéristiques de rétrovirus exogènes et endogènes, est responsable de nombreuses pathologies telles que des néoplasies hématopoïétiques ainsi que des déficiences immunitaires associées à des infections opportunistes telles que des chlamydioses (Fiebig et al., 2006; Hanger et al., 2000). C'est aussi souvent le cas pour des rétrovirus exogènes ou endogènes répliquatifs tels que le GALV, le FeLV ou le MLV (Hartmann, 2012; Rosenberg and Jolicoeur, 1997). Le GALV est un rétrovirus exogène responsable de leucémies et de lymphomes chez le gibbon et présente 78% d'identité avec le koRV. Ces deux rétrovirus pourraient ainsi partager un ancêtre commun via l'intermédiaire d'un rongeur (Hanger et al., 2000; Oliveira et al., 2007; Tarlinton et al., 2008). Cette proximité et origine commune de ces deux rétrovirus permet d'utiliser le GALV comme moyen de comparaison pour étudier l'évolution du KoRV vers son endogénisation.

Des modifications très conservées ont ainsi été observées dans les gènes *gag* et *env* du KoRV et sont responsables d'une diminution de son infectiosité (Avila-Arcos et al., 2013; Oliveira et al., 2007). Dans la protéine Gag, le domaine L est important pour le bourgeonnement des particules virales (cf. § 2.4.2.2. Formation des particules virales (morphogénèse) et bourgeonnement). Chez le KoRV, des mutations à ce niveau ont été identifiées et sont responsables d'une diminution de l'efficacité du bourgeonnement (Oliveira et al., 2007). Au niveau du gène *env* la diminution de la cytopathogénicité du virus est due à des mutations sur deux motifs impliqués dans l'infectiosité du virus. Cette déficience passe probablement par une modification de la conformation de la glycoprotéine (Avila-Arcos et al., 2013; Oliveira et al., 2007). Il est toutefois intéressant de constater que l'un de ces deux motifs est toujours très conservé sous sa forme virulente (CETTG) chez les gammarétrovirus exogènes alors qu'il présente de nombreuses mutations chez tous les gammarétrovirus endogènes

jusqu'alors analysés, y compris chez les PERV-A, B et C (Oliveira et al., 2007). Ce motif semble donc être soumis à une forte pression de sélection impliquée dans l'endogénéisation des gammarétrovirus. Quoi qu'il en soit, le cumul de ces modifications participe à la faible infectiosité du KoRV, ce qui pourrait jouer un rôle pour faciliter son entrée et sa persistance dans le génome du koala.

Un modèle similaire d'endogénéisation récente a également été détecté chez le mouton, chez lequel certains enJSRV de type Bétarétrovirus se seraient intégrés et se propageraient depuis 200 ans. Ce phénomène ferait suite à l'émergence de l'enJSRV-26, capable d'échapper au système de restriction JLR, générant ainsi une forme exogène du JSRV pouvant infecter les lignées germinales du mouton (Arnaud et al., 2008).

L'ensemble de ces observations montre que l'endogénéisation passe par un stade où les deux formes, endogène et exogène du rétrovirus, coexistent mais dont l'infectiosité est fortement altérée. Cette situation peut toutefois générer un phénomène compétitif, où le rétrovirus endogène encore capable de se répliquer bloque l'infection par des virus similaires par interférence membranaire par exemple (Oliveira et al., 2007).

3.3.5. Les modes d'amplification

Les ERV sont des éléments répétés : à l'image des transposons et rétrotransposons, ils sont capables de se propager dans les génomes. Toutefois, l'intégrité des gènes et des éléments du provirus joue sur le mode de propagation chez son hôte et est fréquemment liée à l'ancienneté de l'endogénéisation du rétrovirus. Concernant la souris ainsi que le koala, de nombreux éléments sont encore capables de s'amplifier. Ils mettent à jour les différents systèmes d'amplification de ces séquences au travers du génome, suite à leur endogénéisation (Figure 13).

3.3.5.1. Amplification par la réinfection

La réinfection des lignées germinales concerne les ERV les moins altérés et passe par une phase extracellulaire (Figure 13). Chez la souris, seuls quelques éléments sont encore capables de s'amplifier de cette manière. C'est le cas pour le MLV et le MMTV, connus pour être responsables de cancers, mais aussi pour l'IAPE (pour élément rétroviral de la famille IAP contenant un gène d'Enveloppe) et GLN (rétrovirus murin utilisant l'ARNt de type glutamine (ARNt^{Gln})).

Toutefois, sur les nombreuses copies présentes dans le génome de la souris, seuls quelques rares éléments sont encore suffisamment intègres pour générer des particules infectieuses. Cela concerne uniquement 1 copie sur les 250 de l'IAPE et 1 sur les 80 du GLN (Ribet et al., 2008a; Ribet et al., 2008b; Ribet and Heidmann, 2010). Les autres ayant subi une pression de sélection entraînant l'accumulation de mutations délétères. Ces mutations sont principalement identifiées sur les gènes

nécessaires à la formation de particules virales comme *gag*, *pol* mais surtout le gène *env*, qui sont essentiels pour générer de nouvelles particules infectieuses.

L'analyse des mutations non synonymes et synonymes (rapport dN/dS) accumulées sur ces gènes a ainsi permis de déterminer le mode d'amplification d'anciens HERV à présent inactifs. Un rapport dN/dS proche de 1 traduit en effet l'absence ou une faible pression de sélection et le gène étudié n'a donc vraisemblablement pas été employé pour l'amplification du rétrovirus. Alors qu'un rapport fortement inférieur à 1 illustre une pression de sélection dite « purifiante ». Le gène en question joue un rôle essentiel pour mener une réinfection et subit donc davantage de mutations qui entraînent son inactivation, ce qui implique la fixation de l'ERV dans le génome hôte. Ainsi les HERV-K(HML-2), qui présentent un rapport très inférieur à 1, sont des rétrovirus probablement amplifiés au sein du génome humain par réinfection des lignées germinales (Belshaw et al., 2004).

3.3.5.2. L'amplification par intracellularisation

Certains ERV sont, par contre, incapables de générer des particules infectieuses. Leur mode d'amplification passe, malgré tout, par la formation de particules mais reste strictement intracellulaire et ne nécessite pas de gène *env* actif. Cette mobilité est aussi appelée rétrotransposition (Figure 13).

Chez la souris les éléments IAP et MusD sont très actifs à ce niveau et sont souvent responsables de mutations spontanées (Maksakova et al., 2006). Ces éléments ne possèdent pas de gène *env* mais restent toutefois distincts des rétrotransposons à LTR tels que Ty1 ou Ty3 qui ne possèdent pas non plus de gène d'enveloppe. Les IAP dérivent des IAPE mais ne possèdent pas le gène d'enveloppe. Les premiers présentent une mutation au niveau du domaine 5' du gène *gag*, qui leur apporte un signal d'adressage au réticulum endoplasmique, à la manière des Spumarétrovirus. De ce fait, les particules virales des IAP sont produites à l'intérieur des compartiments cellulaires, ce qui les contraint à rester strictement intracellulaire. Ce mécanisme aurait contribué à la perte de leur gène *env* qui aurait alors dégénéré progressivement (Ribet et al., 2007; Ribet et al., 2008a).

Les éléments Mus D montrent un mécanisme similaire : leur protéine Gag ne possède pas de signal de myristoylation. Ils ne sont, par conséquent, pas adressés à la membrane plasmique (cf. § 2.4.2.2. Formation des particules virales (morphogénèse) et bourgeonnement). De ce fait, comme dans le cas des IAP, les particules virales formées restent strictement intracellulaires, ce qui doit, là encore, entraîner la perte du gène *env* (Ribet et al., 2007; Ribet et al., 2008a).

Ce mode d'amplification peut aussi être attribué, dans le cas de certains éléments de la famille HERV-K(HML-3), par analyse de la séquence de leurs gènes. En effet, ceux-ci présentent un ratio dN/dS

concernant le gène *env* proche de 1 ce qui exclut un mode d'amplification par réinfection (Belshaw et al., 2004; Ribet and Heidmann, 2010).

Ce mécanisme intracellulaire des ERV est proche de celui des rétrotransposons à LTR et, bien qu'ils soient d'origine différente, ces derniers peuvent récupérer un gène d'enveloppe de rétrovirus et ainsi acquérir un cycle extracellulaire (Malik and Eickbush, 2001; Malik et al., 2000). Il est donc tout à fait possible que des rétrovirus puissent perdre puis récupérer un gène *env* autrement que par un mécanisme de recombinaison, tel que la trans complémentation.

3.3.5.3. Les ERV non autonomes

Les SINE sont des transposons non autonomes dont la séquence peut être amplifiée dans les génomes hôtes. Pour ce faire ils mobilisent la machinerie (la RT) des LINE qui sont des éléments compatibles et qui possèdent les éléments nécessaires à leur transposition, notamment la transcriptase inverse.

Il en est de même avec les ERV ayant perdu toutes ou la majorité de leurs séquences codantes. Ces éléments n'ont plus la possibilité de produire de particules virales leur permettant de se rétrotransposer. Ils peuvent toutefois mobiliser en trans la machinerie d'autres ERV ou d'éléments LINE afin de réinfecter les cellules ou de se rétrotransposer (Figure 13).

Chez la souris, l'élément VL30 ne possède plus ces séquences codantes. Toutefois, il possède toujours ses signaux d'encapsidation qui sont, par ailleurs, reconnus par le Gag du MLV. De ce fait, il peut être encapsidé dans les particules du MLV en formation et ainsi établir une transmission horizontale de son génome (Torrent et al., 1994). Dans ce sens, il a été montré que certains éléments de la famille des HERV-W ont détourné la machinerie des LINE pour se répandre dans le génome humain (Esnault et al., 2000; Heidmann et al., 1988; Pavlicek et al., 2002).

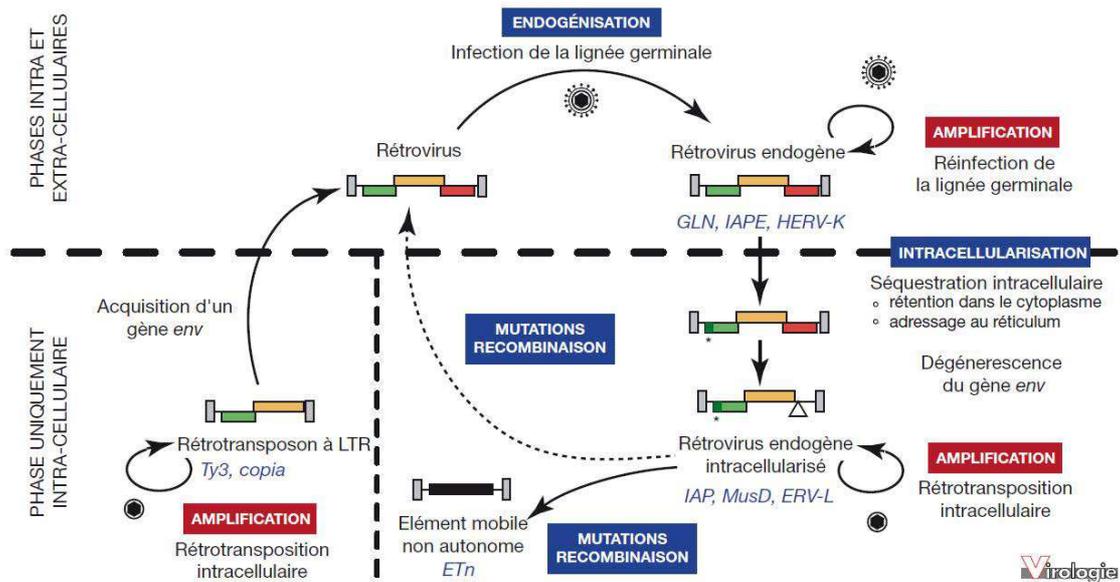


Figure 13 : Schéma des différents modèles d'évolution des ERV dans leur génome hôte (Ribet D. & Heidmann T., 2010).

Les rétrovirus récemment endogénisés ou émergeant se dispersent dans le génome de leur hôte (Amplification) par réinfection des lignées germinales. Par la suite les phénomènes d'intracellularisation entraînent une dégénérescence de la capacité répliquative de rétrovirus le limitant à une amplification par rétro-transposition. Les mutations de et les recombinaisons des ERV peuvent mener à l'immobilité totale de l'élément ou à son émergence permettant une nouvelle endogénisation ou amplification dans le génome hôte.

3.3.6. Emergence

La mobilité des ERV passe donc par l'expression de leur génome et, lorsque celui-ci possède une séquence d'encapsidation, cette dernière peut être reconnue et encapsidée par des particules virales d'un autre ERV ou d'un rétrovirus exogène suffisamment proche phylogénétiquement. Ainsi, lors de la reverse transcription, le génome de l'ERV peut recombiner avec un autre ERV similaire ou un génome de rétrovirus exogène.

3.3.6.1. Recombinaison entre un rétrovirus endogène et un exogène

Plusieurs formes de recombinaisons sont possibles, elles peuvent avoir lieu entre des rétrovirus exogènes et endogènes, l'endogène jouant alors souvent le rôle du donneur. L'exogène, qui reçoit un nouveau gène, voit ses caractéristiques modifiées, telles que son tropisme, ou bien l'endogène acquiert d'autres propriétés.

Il a été montré chez le poulet qu'une souche de RSV exogène peut recombiner avec l'enveloppe d'un rétrovirus endogène (Weiss et al., 1973). Il en est de même pour l'émergence de l'ALV-J, découverte dans la fin des années 1980. Elle est issue d'une recombinaison entre un ALV exogène et un EAV-HP (Endogenous Avian Retrovirus) (Sacco et al., 2004).

Ce type d'émergence a aussi été observé chez d'autres espèces, telles que le babouin (Benveniste et al., 1974; Benveniste and Todaro, 1974; Mang et al., 2000) ou le chat. Chez ce dernier, la recombinaison entre un FeLV-A exogène et l'enveloppe d'un FeLV endogène génère le FeLV-B. Il en est de même avec l'émergence du FeLV-D, concernant le transfert de l'enveloppe d'un ERV-DC (domestic cat) encore mobile et un FeLV. Ces rétrovirus recombinants sont responsables de nombreuses leucémies chez le chat (Anai et al., 2012; Hartmann, 2012; Weiss, 2013).

3.3.6.2. Recombinaison entre deux rétrovirus endogènes

Les recombinaisons peuvent aussi avoir lieu entre des rétrovirus endogènes. Ce genre d'évènement a notamment été observé chez la souris concernant les MLV. L'émergence peut être due à plusieurs évènements de recombinaisons entre différents MLV endogènes. Ainsi, d'une part, la recombinaison entre un MLV écotrope et les séquences LTR d'un MLV xénotrope et, d'autre part, avec l'enveloppe d'un rétrovirus polytrope, peut générer des particules infectieuses polytropiques. Celles-ci sont alors capables de réinfecter leur hôte, ce qui mène à des insertions mutagènes multiples (Stoye and Coffin, 1987; Weiss, 2013).

Ces sorties de rétrovirus endogènes, ne comprenant parfois qu'une partie de leur génome, peuvent être impliquées dans l'émergence de pathologies et notamment des cancers. Ceci se fait par la modulation de l'expression d'un oncogène mais également par l'intervention de l'activité immunosuppressive de la glycoprotéine d'enveloppe. En effet, bien que cette capacité soit détournée à la faveur de l'hôte dans le cas de la syncytine, il a été montré chez la souris que la recombinaison entre 2 ERV, un Emv-1 (Endogenous ecotropic MuLV 1) et un MLV endogène, génère des particules de tropisme de type B. Ces particules rétrovirales émergentes exercent une activité immunosuppressive dans des cellules tumorales et contribuent au processus dit « immunoediting ». Ce processus permet à ces cellules d'échapper au système immunitaire de la souris, ce qui favorise l'apparition de tumeurs invasives (Pothlichet et al., 2006).

Les évènements d'émergence concernent essentiellement des éléments rétroviraux encore mobiles. Bien que les recombinaisons les plus souvent observées s'effectuent entre l'enveloppe d'un ERV et un rétrovirus exogène, les ERV peuvent toutefois agir comme donneurs et/ou accepteurs des éléments viraux pour générer un nouveau recombinant. Chez l'homme, il n'existe plus d'ERV mobile, toutefois il a été montré dans la famille des HERV-K, qui présente les évènements de mobilité les plus récents, que quelques évènements de recombinaison suffisent à générer des particules virales infectieuses. Encore faut-il que de tels évènements de recombinaison soient possibles *in vivo* chez l'homme (Dewannieux et al., 2006).

3.3.6.3. Le contrôle de l'émergence des rétrovirus endogènes

Toutefois les cas de rétrovirus émergeant naturellement suite à des recombinaisons et générant des cancers sont rares. Le contrôle très strict qu'ont les cellules sur les rétrovirus endogènes contribue à réduire le risque. Cependant, une levée ou un affaiblissement de ces barrières pourrait être à l'origine de l'émergence de certains rétrovirus, comme c'est le cas pour l'enJSRV-26 capable d'échapper au système de restriction JLR (Arnaud et al., 2008).

Il a également été montré que des traitements avec des agents mutagènes, physiques et chimiques dégradant l'ADN essentiellement, ont induit l'expression d'un ERV aviaire à partir de cellules a priori non infectées par un tel virus (Weiss et al., 1971). Il en a été de même avec MLV ou le RaLV suite à des traitements altérant l'ADN, tels que des radiation aux UV, le BrdU, la cycloheximide, le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) ou encore le BPDE (benzo[a]pyrene diol epoxide)(Hohenadl et al., 1999; Hsieh and Weinstein, 1990; Lowy et al., 1971). Ceci pourrait s'expliquer par l'implication de certains ERV dans le système de réparation des cassures double brin de l'ADN (Lin and Waldman, 2001). Toutefois, il est aussi possible que les systèmes de contrôle des rétrovirus au niveau de l'ADN, tels que la méthylation de l'ADN ou des histones, puissent être relâchés temporairement lors de l'activation de la réparation de l'ADN, ce qui peut entraîner l'expression de certains ERV.

Par ailleurs, il a été suggéré que le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'émergence des ERV par l'intermédiaire d'un contrôle des produits bactériens, tel que les LPS (Lipopolysaccharides). Il a en effet été montré que les LPS bactériens (notamment au niveau de la flore intestinale) pouvaient être responsables de l'activation de MLV endogènes non écotropiques. Ainsi, dans le cas de souris immunodéficientes, il a été observé une émergence de MLV endogènes recombinants. Ces rétrovirus étaient alors capables de se répliquer et, à terme, d'entraîner des leucémies (Young et al., 2012).

3.3.7. Vers le contrôle des ERV

Ainsi les ERV peuvent-ils être divisés en deux catégories, les ERV modernes et les ERV anciens (Arnaud et al., 2008).

Les ERV modernes n'ont pas encore accumulé assez de mutations/délétions et le contrôle exercé par l'hôte n'est pas assez fort pour empêcher leur mobilité. Ces ERV sont donc encore dans une phase invasive du génome hôte, ce qui génère du polymorphisme insertionnel susceptible d'être à l'origine de pathologies. De plus, ces ERV peuvent facilement ré-émerger et ainsi générer des particules infectieuses. De ce fait, ils coexistent parfois avec une forme exogène. Leur potentielle participation physiologique chez l'hôte sera principalement d'ordre obstructif à la réplication des formes exogènes, comme c'est le cas des enJSRV et du système JLR (Arnaud et al., 2008).

A contrario, les ERV anciens ont souvent envahi les génomes avant la spéciation de nombreuses espèces et sont donc présents chez tous les individus d'une espèce donnée (Coffin, 2004). Ces rétrovirus sont complètement défectifs ; de ce fait, leur réémergence est peu probable et ces éléments ne sont pas mobiles. Ainsi la pression de sélection et le contrôle très strict exercé par l'hôte, font que ces ERV sont davantage impliqués dans la physiologie de l'hôte que dans des pathologies.

4. Les Rétrovirus Endogènes Porcins

4.1. Généralités

A la fin de l'année 2012, les résultats de l'analyse du dernier assemblage du génome porc (version Sscrofa 10.2) ont été publiés. Il a été observé que le génome du porc est composé d'environ 4,48% de séquences à LTR (Groenen et al., 2012) ce qui révèle un pourcentage d'ERV inférieure par rapport à la plupart des génomes des mammifères analysés jusqu'à présent, tout en présentant un ordre de grandeur équivalant à celui de la vache, un autre artiodactyle, soit 3,2% du génome (Garcia-Etxebarria and Jugo, 2010). Bien que tous les genres d'ERV soient représentés, la majorité de ces séquences ERV s'apparente au genre gammarétrovirus et au genre betarétrovirus, représentant respectivement environ 68% et 20% des PERV. Le genre gamma est réparti en 10 groupes, de γ 1 à 10 et le genre bêta en 4 groupes de β 1 à 4 (Groenen et al., 2012).

Le groupe γ 1 est le plus connu. Il rassemble les PERV-A, B et C, qui ont été initialement identifiés comme étant des PERV répliatifs (Patience et al., 2001; Takeuchi et al., 1998). Cependant, le séquençage récent du génome du porc a permis de montrer que la majorité des PERV sont défectifs et aucun des 20 locus identifiés du genre γ 1, les plus intacts, ne présente un jeu complet d'ORF. Les PERV, tels quels, ne sont donc pas répliatifs (Groenen et al., 2012). Ces PERV γ 1 sont les seuls à présenter une grande similarité de séquence avec les ERV d'autres mammifères. Ils sont notamment proches des MuERV apparentés au genre gammarétrovirus, tel que les MLV. Il est donc probable qu'ils partagent un ancêtre commun avec les MLV mais aussi les KoRV, les GaLV et les FeLV et peut être même avec les BaEV. Ces gammarétrovirus ont en commun de coexister avec des formes exogènes et/ou présenter une mobilité de leur génome à l'origine d'un polymorphisme insertionnel. Bien que la manière dont émergent les PERV répliatifs ne soit pas connue, il est toutefois raisonnable de penser que les PERV répliatifs identifiés puissent provenir d'évènements de recombinaison, comme il a été observé pour ces autres gammarétrovirus, par des mécanismes de rétrotransposition, de complémentation en trans ou de réinfection (cf. § 3.3.5. Les modes de mobilité) (Nascimento et al., 2011).

4.2. Les PERV réplicatifs,

Les PERV réplicatifs sont des rétrovirus de type C, du genre gammarétrovirus. Ils sont répartis en trois sous groupes, A, B et C, classifiés selon la séquence des gènes *env* (Akiyoshi et al., 1998; Le Tissier et al., 1997). Les PERV-A et B sont capables d'infecter in vitro d'autres cellules de mammifères en dehors de celles du porc et notamment celles de l'humain. De plus, il n'y a pas d'interférence membranaire entre ces PERV et d'autres rétrovirus phylogénétiquement proches tel que le MLV ou le FeLV. Ils interagissent donc avec des récepteurs différents, ils sont donc polytropes. Le PERV-C n'est, quant à lui, pas capable d'infecter des cellules autres que celles du porc, il est donc écotrope (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 1998; Wilson et al., 2000).

4.2.1. Le génome des PERV réplicatifs

Leur génome correspond au génome simple des gammarétrovirus, qui comprend les gènes essentiels au cycle réplicatif, *gag*, *pro*, *pol* et *env* et qui ont une taille d'environ 8,2 kb. Après l'intégration du provirus, l'expression des gènes est soumise à l'efficacité des promoteurs contenus dans le 5'LTR.

4.2.1.1. Les longues répétitions terminales

Les PERV réplicatifs possèdent des promoteurs faibles. De plus la région U3 est peu conservée par rapport aux séquences des autres rétrovirus de type C mais elle contient une boîte TATA conservée entre les différents sous-groupes A, B et C (Scheef et al., 2001).

Ces LTR, dans leur région U3, sont aussi composés de séquences répétées contenant divers sites putatifs de fixation de facteurs de transcription (Wilson et al., 2003). Seule la fixation du facteur de transcription cellulaire NF-Y, a cependant été démontrée à ce jour (Scheef et al., 2002). Les séquences de fixation de ce facteur, de 39 pb, présentent deux sous-répétitions de 18 pb et 21 pb chez les PERV A et B ; chez le PERV-C la boîte est plus courte et fait 37 pb avec une sous-répétition de 18 pb sensiblement différente (Denner et al., 2003). Ces séquences peuvent s'amplifier consécutivement à des passages répétés des rétrovirus sur des cellules humaines, allant selon le nombre de passages jusqu'à cinq répétitions (Denner et al., 2003). L'amplification de ces LTR est associée à une adaptation du virus aux cellules humaines, ce qui entraîne un temps d'infection plus court, un titre infectieux plus élevé et une réduction de la quantité de particules défectives (Denner et al., 2003; Scheef et al., 2001).

Les séquences R et U5 sont beaucoup plus conservées. Entre les deux séquences se situe le site de polyadénylation formant une tige boucle au site AAUAAA dans le 3'LTR. La séquence R possède par ailleurs des éléments inhibiteurs de la transcription (Scheef et al., 2002). La faiblesse de transcription des LTR pourrait être liée à l'endogénéisation des PERV (Coffin et al., 1997).

La séquence leader qui suit le 5'LTR est composée de nombreux autres éléments régulateurs (cf. § 2.3. Le génome des rétrovirus). Tel que le PBS des PERV, qui est reconnu par les ARNt-Gly pour les sous-groupes A et B et ARNt-Pro pour le sous-groupe C, qui par ailleurs est le même pour les MLV. En aval de cette séquence, de nombreuses tiges boucles participent à la dimérisation des ARN génomiques et à leur encapsidation. Chez les PERV une analyse *in silico* permet de retrouver deux séquences palindromiques et quatre tiges boucles, proches de ce qui existe chez le MLV, susceptibles de se former et d'intervenir dans cette fonction (Gherghe et al., 2010).

Dans cette région se trouve également le site SD qui, en s'associant avec le SA situé en amont du gène *env*, génère l'ARNm codant pour les glycoprotéines d'enveloppe. Par ailleurs, il existe une séquence ORF en amont du gène *gag* qui, dans le même cadre de lecture, peut générer une protéine GlycoGag. Mais si sa transcription existe chez le MLV, elle n'est pas prouvée chez le PERV.

4.2.1.2. Les gènes des PERV répliatifs

Les gènes *gag* et *pro-pol*

Les gènes codant les protéines Gag et Pro-Pol sont dans le même cadre de lecture mais sont séparés par un codon stop. Ce codon peut être ignoré par les polymérases grâce à un mécanisme de suppression de la lecture du codon stop, qui fait intervenir un ARNt-Gln (Akiyoshi et al., 1998). Deux précurseurs peuvent ainsi être formés.

Le précurseur de Gag, est nommé Pr65. Comme les autres gammarétrovirus, il possède un signal de myristilation. Lors de la maturation des particules par la protéase virale, il libère les protéines de matrice MA-p15, la protéine p12, de capsid CA-p27 et de nucléocapsid NC-p10, très proches de celles du MLV (Akiyoshi et al., 1998). De plus, le résidu 117 de la protéine CAp27 des PERV est un acide glutamique qui procure aux PERV répliatifs un tropisme équivalant au tropisme B des B-MLV (Lee et al., 2011; Wood et al., 2009).

Le précurseur de la polyprotéine Gag-Pro-Pol est Pr200. Le précurseur Pro-Pol contient la protéase PR-p14, la transcriptase inverse RT-p80 et l'intégrase IN-p46 (Akiyoshi et al., 1998).

Dans la protéine p12 se trouve le domaine L impliqué dans le bourgeonnement des particules virales (Demirov and Freed, 2004). Lors des processus d'endogénéisation ce motif est souvent muté, ce qui diminue la capacité infectieuse du rétrovirus (Oliveira et al., 2007; Yuan et al., 2000). Chez le PERV-C, l'une des parties de ce motif est mutée en PFAP, par rapport au motif dominant PSAP des autres PERV mais aussi du GALV, et du KoRV (Marcucci et al., 2008). Ce qui participe à réduire la capacité de bourgeonnement de ce rétrovirus.

Le gène d'enveloppe

Le gène *env* présente les plus grandes variations de séquence entre les différents gènes du rétrovirus. Ces variations sont généralement identifiées dans les zones sensibles des glycoprotéines impliquées dans l'entrée du rétrovirus. Leur évolution permet d'éviter au rétrovirus d'être détectées par le système immunitaire (Nascimento et al., 2011). De cette variation va dépendre le tropisme du rétrovirus. Le gène d'enveloppe est ainsi utilisé pour classer les rétrovirus en différents sous-groupes (Henzy and Johnson, 2013).

L'ORF (Open Reading Frame) du gène *env* chevauche celle du gène *pol* et, après maturation par la machinerie de l'épissage, l'ARNm de ce gène *env* code pour le précurseur Pr80. Celui-ci est clivé par des protéases cellulaires dans le Golgi tardif pour donner la glycoprotéine de surface SUgp70 et la glycoprotéine transmembranaire TMp15E (Akiyoshi et al., 1998).

Cette première contient les régions variables VRA et VRB composant le RBD (Receptor Binding Domain) qui interagit avec les récepteurs cellulaires. SU-gp70 contient aussi deux domaines PRRc (Prolin-Rich Region conserved) et PRRv (variable) impliqués dans la stabilité des particules à la surface cellulaire mais aussi dans la détermination du tropisme du PERV (Argaw and Wilson, 2012; Gemeniano et al., 2006).

Chez les rétrovirus exogènes, dans la région VRB, se trouve le motif CETTG, impliqué dans leur cytopathogénicité. Chez les PERV-B et C, comme chez tous rétrovirus endogènes jusqu'à présent analysés, ce motif est muté en CVTSN, ce qui altère l'infectiosité du rétrovirus (Oliveira et al., 2007).

Par ailleurs, le domaine TM possède des capacités immunosuppressives par l'intermédiaire du domaine ISU (immunosuppressive peptide), et permet ainsi l'inhibition de la prolifération des PBMC et l'induction de IL-10 (interleukine) *in vitro* (Denner and Tonjes, 2012).

Le tropisme des PERV réplicatifs

Les PERV réplicatifs A et B sont polytropes. Leur enveloppe reconnaît des récepteurs différents sur de nombreuses cellules de mammifères, mais les récepteurs impliqués sont peu connus.

Chez l'homme, deux récepteurs au PERV-A ont été identifiés et sont nommés HuPAR-1 et 2 (Ericsson et al., 2003). Ces récepteurs sont des transporteurs de la riboflavine et permettent en plus l'infection spécifique par le PERV-A et ses recombinants contenant son RBD, tel que le PERV-A/C (Mazari et al., 2012).

Toutefois les équivalents de ces récepteurs chez les autres mammifères sont généralement mutés (Leu-109-Pro) ou peu exprimés, empêchant ainsi l'infection par le PERV-A (Denner and Tonjes, 2012; Mattiuzzo et al., 2007). De plus, la spécificité de reconnaissance de ces récepteurs peut mener à une

interférence membranaire (Takeuchi et al., 1998). Cependant, bien qu'elle n'ait pu être mise en évidence chez les autres mammifères (Spencer et al., 2003), elle n'a pas encore été confirmée dans le cas des PERV répliatifs. D'autant que ces rétrovirus ont la possibilité d'infecter leurs cellules cibles par une transactivation moins spécifique (Lavillette and Kabat, 2004).

4.2.2. Exemple d'une émergence

4.2.2.1. L'âge des PERV

Les estimations pour dater l'intégration des ERV se basent sur la séparation des espèces et la présence ou l'absence d'un ERV similaire dans les différentes espèces analysées. Les études réalisées sur les *Suidae* estiment que l'intégration des PERV s'est réalisée il y a entre 3,5 et 7,5 millions d'années pour les sous-groupes A et B et 1,5 et 3,5 millions d'années pour les sous-groupes A et C à LTR à faibles répétitions (Niebert and Tonjes, 2005). La date d'apparition des PERV-C semble corrélée avec l'apparition du sous-groupe A à LTR à faibles répétitions, ce qui suggèrerait un évènement de recombinaison entre ces deux PERV.

4.2.2.2. L'expression des PERV dans les tissus porcins

Ces PERV-A, B et C sont exprimés dans tous les tissus du porc avec des expressions plus fortes dans certains tissus tels que les poumons (Bittmann et al., 2012; Bosch et al., 2000). Les différences d'expression observées entre les différents tissus d'un même porc dépendent de la présence des facteurs de transcription cellulaires, de l'activité transcriptionnelle des LTR, ainsi que du nombre de leurs répétitions dans la région U3 (Bittmann et al., 2012; Denner and Tonjes, 2012). Les niveaux de détection dépendent toutefois aussi des méthodes utilisées, des porcs étudiés et de leur état de santé. Effectivement il semblerait que chez des porcs malades aux Etats-Unis, il y ait eu une augmentation de l'incidence de la virémie d'un recombinant du PERV, le PERV-A/C (Pal et al., 2011).

4.2.2.3. La prévalence du PERV-C

En outre, les PERV répliatifs peuvent être présents en nombre variable au sein d'un même élevage (Herring et al., 2001), ce qui traduit une mobilité active des PERV au niveau somatique. Le PERV-C présente par ailleurs des variants différents entre les porcs allemands et les sangliers étudiés et certains en sont même totalement exempts (Akiyoshi et al., 1998; Bosch et al., 2000; Kaulitz et al., 2013; Liu et al., 2011a; Mang et al., 2001; Mazurek et al., 2013; Takeuchi et al., 1998). Le PERV-C semble donc avoir été endogénéisé plus récemment que les autres PERV.

Son intégration dans le génome de *Sus barbatus* a toutefois été estimée à 1,5 millions d'années. La datation de l'entrée de cet ERV ne peut donc pas être précisée pour l'instant, d'autant plus que la consanguinité des porcs d'élevage a dû accroître sa dispersion dans l'espèce. La possibilité d'un transfert horizontal entre les différents genres *Sus* est cependant possible.

4.2.2.4. La mobilité des PERV réplicatifs

Aucune séquence intègre des PERV n'a été détectée dans le génome du porc, mais il a été montré que ces rétrovirus sont capables de recombiner entre eux pour générer des particules infectieuses.

Ces rétrovirus partagent en effet une grande similarité de séquence, avec 85% entre les PERV-A et C et plus de 70% entre ces deux PERV et le PERV-B alors que les γ ERV partagent généralement 60% de similarité de séquence approximativement (Niebert and Tonjes, 2005). De plus, l'étude phylogénétique des ERV de type γ 1 chez les *Suidae* montre qu'ils ont subi par le passé une sélection dite purifiante de leurs gènes, c'est-à-dire que le rapport dN/dS est strictement inférieur à 1, ce qui suggère une transposition par réinfection et non par complémentation en trans ou par rétrotransposition en cis (Nascimento et al., 2011).

4.2.3. Le cas du PERV-A/C

Lorsque l'expression des différents sous-groupes est suffisante, des recombinaisons sont observées entre les PERV-A et B (Bosch et al., 2000; Kuddus et al., 2003; Lee et al., 2002) mais surtout entre les PERV-A et C qui présentent une plus grande similarité de séquences (Harrison et al., 2004; Niebert and Tonjes, 2005; Oldmixon et al., 2002). Il semblerait que ces recombinaisons puissent se produire avec des provirus non réplicatifs (Denner and Tonjes, 2012; Kaulitz et al., 2013; Machnik et al., 2005).

Il a été montré par le passé que le gène d'enveloppe du PERV-A a pu recombiner avec différents éléments du génome. Cela suggère que ce rétrovirus est hautement susceptible à la recombinaison et aurait ainsi pu s'adapter à l'environnement de son hôte. De ce fait, et par la forte similarité de séquence avec le PERV-C, ce dernier peut récupérer une partie du gène *env* du PERV-A et générer un PERV-A/C (Bartosch et al., 2004).

Les recombinants PERV-A/C possèdent jusqu'à 913 pb du PERV-A, entre la fin du gène *pol* et la séquence de la SU-gp70 dans le gène *env*, comprenant le RBD, le reste du génome provenant du PERV-C (Figure 14). Ainsi ce rétrovirus à l'origine écotropique devient polytropique et peut alors infecter de nombreux types cellulaires, y compris des cellules humaines. De plus il présente un titre infectieux supérieur à celui du PERV-A, se rapprochant du niveau des γ ERV hautement infectieux, tel que le MLV, le PERV-A ayant à l'origine un potentiel 100 fois inférieur à ces ERV (Bartosch et al., 2004; Oldmixon et al., 2002).

En plus du gain de l'enveloppe A, deux déterminants de l'augmentation de cette infectiosité ont été identifiés. L'un se situe dans le RBD et est consécutif à la substitution d'une isoleucine par une valine en position 140 de la gp70, entre les régions VRA et VRB et l'autre se situe au niveau du PRR (Figure 14) (Argaw and Wilson, 2012; Harrison et al., 2004).

Toutefois, ce recombinant n'est pas présent dans le génome du porc et n'a donc pas encore envahi les lignées germinales. L'amélioration de l'infectiosité de ce recombinant en fait un outil de choix pour étudier le cycle infectieux du PERV et les relations avec son hôte.

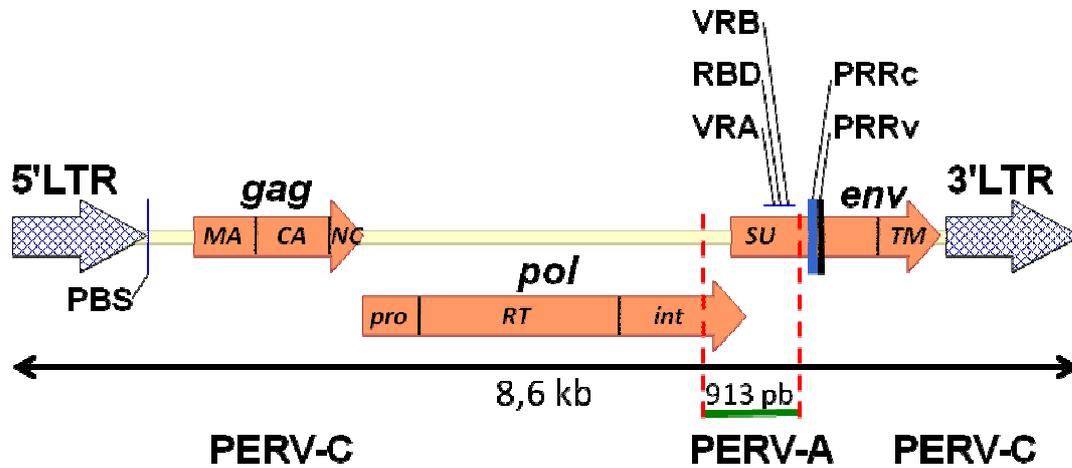


Figure 14 : schéma du génome ADN du PERV-A/C.

Le PERV-A/C, d'une taille d'environ 8,6 kilo bases (kb), est un rétrovirus à génome simple constitué des gènes *gag*, *pol* et *env*. Le nom des différentes séquences codantes des protéines essentielles sont indiqués dans les gènes. Les pointillés rouges indiquent la région de 913 paires de bases (pb) du PERV-A insérée dans le PERV-C après recombinaison. Les séquences de l'unité de surface (SU) de la glycoprotéine d'enveloppe impliquées dans l'infectiosité du rétrovirus sont indiquées au niveau du gène *env* : VRA et VRB = région variable A et B, respectivement ; RBD = receptor binding domain ; PRRc et PRRv = Prolin-Rich Region conservée et variable, respectivement.

4.3. Les PERV répliatifs et leur interaction avec leurs hôtes

L'émergence des ERV ainsi que l'acquisition d'une enveloppe endogène sont souvent responsables de l'apparition de pathologies telles que des leucémies chez les autres mammifères. Chez le porc en revanche, l'implication des PERV répliatifs dans de telles pathologies n'a jamais été démontrée, bien que les PERV soient surexprimés dans certains cas de lymphomes, de mélanomes ou de leucémies induites par irradiations (Dieckhoff et al., 2007; Frazier, 1985; Suzuka et al., 1985; Suzuka et al., 1986). L'infection par ces PERV répliatifs devrait pourtant mener à l'apparition de pathologies comme c'est le cas pour d'autres gammarétrovirus tel que le MLV. En effet il a été mis en évidence que les PERV s'intègrent avec un profil similaire à celui du MLV, c'est-à-dire préférentiellement au niveau des îlots CpG à proximité des gènes (Moalic et al., 2009). Ce genre d'insertion pouvant être responsable d'une dérégulation d'un oncogène ou d'un gène suppresseur de tumeurs (Coffin et al., 1997).

Afin de mieux comprendre le contrôle que peut mener l'hôte sur les PERV, de récentes études ont été menées sur une implication des mécanismes épigénétiques (Matouskova et al., 2013; Wolf et al., 2013). Ces études ont montré que l'expression des PERV- γ 1 est davantage réprimée dans les cellules

embryonnaires que dans le cas des familles PERV- γ 2 et β 3. Cette inhibition est réalisée par un mécanisme de méthylation des histones au niveau de leur LTR, mais elle ne semble pas mettre en jeu la détection des séquences PBS, comme c'est le cas pour le MLV par exemple (Wolf and Goff, 2009; Wolf et al., 2013).

La méthylation de l'ADN est un autre mécanisme épigénétique contrôlant l'expression des rétrovirus. Ce mécanisme, qui s'applique au niveau du 5'LTR de la majorité des PERV dans les tissus porcins, a par ailleurs été mis en évidence. Cette méthylation de l'ADN est résistante à de nombreux inhibiteurs de la méthylation. Une petite fraction de séquences PERV hypométhylées est toutefois détectée dans plusieurs organes de porc et dans les PK15 ; cette hypométhylation est corrélée avec un haut niveau d'expression des PERV (Matouskova et al., 2013). Cette hypométhylation est probablement due à la surinfection et l'intégration de nouvelles copies répliquatives et, de façon similaire, dans les tissus, certains LTR PERV non méthylés pourraient provenir de l'intégration au niveau somatique (Matouskova et al., 2013). Cependant ces mécanismes ne suffisent pas au contrôle des PERV, ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes tels que des facteurs de restriction.

L'émergence de ces rétrovirus et leur capacité à infecter d'autres espèces de mammifères, dont l'homme, amène à poser la problématique des zoonoses qui pourraient en résulter. Ce fut le cas avec l'épidémie du SIDA dont le virus, le VIH-1, est originaire du chimpanzé (Hahn et al., 2000). Le porc étant un candidat pour la xénotransplantation d'organes chez l'homme, la présence des PERV conduit à prendre des précautions quant à la possible transmission de ces rétrovirus ou de l'un de ses recombinaisons. Toutefois aucun cas de recombinaison entre les PERV et les HERV n'a jusqu'à présent été observé (Denner and Tonjes, 2012; Suling et al., 2003). De plus, bien que les PERV polytropiques puissent infecter des cellules humaines *in vitro*, une telle transmission des PERV répliquatifs n'a pas été identifiée jusqu'à ce jour dans des cellules humaines *in vivo* (Denner and Tonjes, 2012). Cependant, le risque subsiste et la découverte des facteurs de restrictions constitue une piste prometteuse pour la compréhension et la maîtrise de l'infection par les PERV.

5. La restriction virale

Les nombreuses études menées sur les interactions entre cellules hôtes et rétrovirus ont permis d'identifier et de caractériser un ensemble de macromolécules. Ces macromolécules sont de nature protéique principalement (ex APOBEC, TRIM) et ont notamment pour fonction de limiter la réplication virale. Ces travaux ont conduit à définir le concept de restriction virale impliquant un ensemble de facteurs antiviraux d'origine cellulaire, exprimés de façon constitutive qui *in fine*

constituent une immunité intrinsèque (Bieniasz, 2004). Cette immunité particulière se place dans le contexte plus général du système immunitaire.

5.1. Le système immunitaire

Lors d'une infection par un pathogène, les mammifères sont capables de générer une réponse immunitaire qui peut être spécifique ou ne pas l'être. L'immunité acquise permet la reconnaissance et l'élimination spécifique des pathogènes. Alors que l'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est non spécifique et limite leur réplication.

5.1.1. L'immunité acquise et l'immunité innée

L'immunité acquise met en place un mécanisme capable de reconnaître et d'éliminer sélectivement un pathogène étranger par la sécrétion de facteurs cellulaires. Elle repose sur les cellules de l'immunité : lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et lymphocytes B ainsi que les cellules présentatrices de l'antigène.

L'immunité innée est composée de quatre types de barrières, à commencer par une barrière physique, constituée de la peau et des muqueuses. Il y a ensuite une barrière physiologique où interviennent de nombreux facteurs tel que le lysozyme, le pH acide, la température, ou encore les interférons et les protéines du complément du sang. Vient après, une barrière dite phagocytaire car elle est constituée des cellules phagocytaires, tel que les monocytes, les neutrophiles et les macrophages. Enfin la 4^{ème} barrière est inflammatoire. C'est là que vont agir les cytokines, histamine et fibrine.

5.1.2. L'immunité intrinsèque

A ces défenses s'ajoute l'immunité intrinsèque. Elle est souvent associée à l'innée dans la mesure où elle est exprimée dans de nombreuses autres cellules non spécialisées dans l'immunité et qu'elle n'est pas forcément spécifique d'un pathogène. Elle peut être aussi régulée par les interférons et dans certains cas déclencher une réaction inflammatoire. Toutefois, elle s'en différencie sensiblement dans le sens où les cellules qui la constituent sont autonomes. Ces dernières ne nécessitent pas l'intervention de facteurs sécrétés et font intervenir les facteurs de restrictions (Emerman, 2006).

L'immunité intrinsèque présente trois étapes essentielles qui agissent avant que les facteurs de restriction n'interviennent sur le pathogène. Tout d'abord, les PRR (Pattern Recognition Receptors) détectent le pathogène entrant, puis activent les IRF (IFN-regulatory factor), qui vont permettre l'expression des IFN (interférons) (Figure 15A) (Schoggins and Rice, 2011).

5.1.2.1. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

Un ensemble de molécules appelées PRR reconnaissent d'abord plus ou moins spécifiquement les molécules étrangères du pathogène entrant aussi appelées les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Il existe quatre types de PRR chacun spécialisé dans la reconnaissance de différents pathogènes, les TLR (Toll-Like Receptors), les NLR (NOD-Like Receptors), les RLR (RIG-I-like Receptors) et les CLR (C-type Lectin Receptors) (Takeuchi and Akira, 2010).

Les TLR, dont plus de 13 ont été identifiés à ce jour, sont situés au niveau des membranes plasmique et endosomale et, selon les genres, sont capables de reconnaître tous les types de pathogènes. Les NLR, dont plus de 20 membres ont été identifiés, sont situés dans le cytosole et sont plus spécifiques des bactéries. Les RLR (RIG-I-like Receptors), sont des hélicases, aussi situées dans le cytosol, qui reconnaissent les ARN double brin des virus, dont le plus connu est RIG-I. Les CLR, sont situés au niveau des membranes plasmiques et reconnaissent les levures (Takeuchi and Akira, 2010).

5.1.2.2. Les facteurs de régulation des interférons

Lors de l'entrée d'un pathogène dans les cellules, ces détecteurs déclenchent une cascade de réactions menant à l'activation de NFκB et des IRF (IFN-regulatory factor). Ces facteurs sont des activateurs de la transcription qui selon les PRR activés expriment divers cytokines parmi les IFN (interférons), le TNF (Tumor Necrosis Factor) et les IL (interleukines) (Figure 15B) (Ozato et al., 2008). Les interférons de type I (IFNα et β) sont produits par de nombreux types cellulaires et notamment les cellules dendritiques (DC). Les interférons de type II (IFNγ) sont principalement synthétisés par les cellules NK (natural killer) et les lymphocytes T en réponse au IL-12 et au IFN de type I.

5.1.2.3. Les gènes stimulés par les interférons

Alors que les TNF et IL régulent la mort des cellules et le recrutement des cellules de l'immunité, les interférons activent la voie des JAK/STAT (Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription) permettant l'expression des ISG (Interferon-Stimulated Genes) qui agissent alors directement sur le pathogène entrant. Le « pattern » de ces gènes exprimé est différent en fonction des IFN impliqués dans leur activation (Figure 15C) (Ozato et al., 2008).

Toutefois un emballement de ces voies est responsable d'auto-inflammation et de maladies auto-immunes. De nombreux ISG régulent cette voie par l'activation ou l'inhibition des différents éléments qui la constitue (Figure 15 A et C). C'est le cas par exemple des SOCS-1, inhibiteurs des STAT1 ou de PIAS3, inhibiteur de la voie NFκB (McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008; Schoggins and Rice, 2011). De nombreux ISG ont une activité antivirale, qui atténue ou enrayer le cycle réplcatif des virus. Ils sont plus communément appelés facteurs de restrictions.

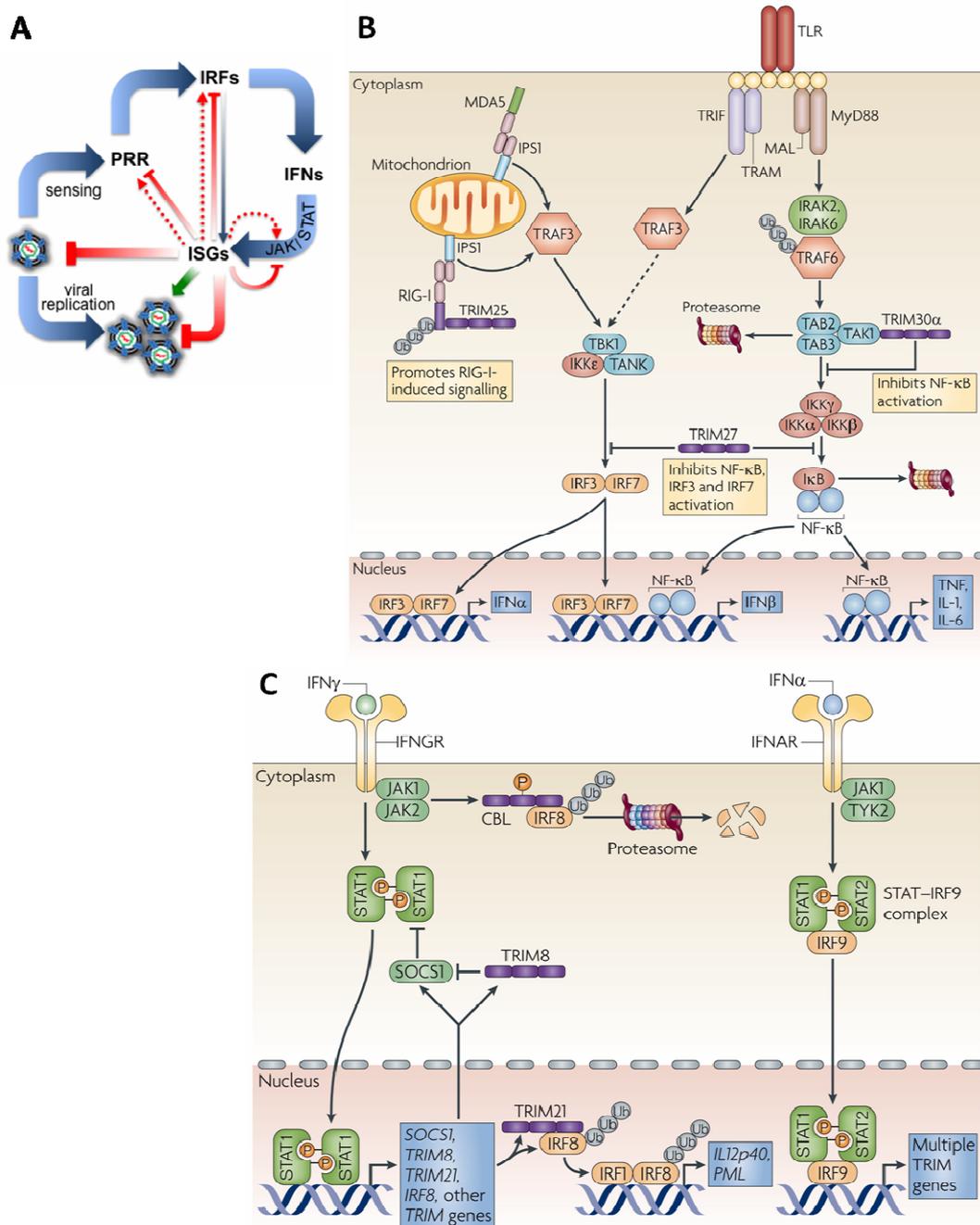


Figure 15: Les étapes de l'immunité intrinsèque.

(A) Schéma de l'activation des ISG. Les particules virales entrantes sont détectées par des senseurs, les PRR, qui déclenchent une voie de signalisation activant les facteurs de régulation des interférons (IRF). Ces facteurs favorisent l'expression des interférons (IFN) qui à leur tour déclenchent la voie de signalisation JAK/STAT menant à l'activation de l'expression des gènes stimulés par les interférons (ISG). Les facteurs exprimés par ces gènes régulent la voie de l'immunité innée et favorisent la restriction du pathogène entrant (Schoggins and Rice, 2011). (B) RIG-I, MDA5 et les TLR sont des PRR qui déclenche les voies de signalisation de NF-κB et des IRF permettant l'activation de l'expression des cytokines (INF, TNF et IL). (C) Les INF reconnaissent des récepteurs cellulaire et déclenchent la voie de signalisation JACK/STAT. Les STAT activés vont favoriser l'expression des ISG. Les TRIM, entre autres, sont des ISG qui régulent activement les différentes étapes de l'immunité innée et qui peuvent jouer le rôle de facteur de restriction (Ozato et al., 2008).

5.2. Les facteurs de restriction

Les facteurs de restriction virale sont représentés par diverses familles de protéines pouvant intervenir à différentes étapes du cycle du virus et sur les différents éléments qui le constituent (Figure 16). Ils sont connus chez des vertébrés tels que l'homme, les bovins ou les rongeurs et agissent sur des rétrovirus proches des PERV répliquatifs, de la famille des gamma-rétrovirus comme le MLV. Cependant, chez le porc, la caractérisation de la restriction rétrovirale se réduit pour l'instant à de rares études.

Toutefois, une étude approfondie de la littérature a permis d'identifier des facteurs pouvant potentiellement agir sur ces PERV en inhibant le cycle rétroviral. Ces facteurs ciblent les différents éléments de la particule rétrovirale tels que le génome, la capsid ou l'enveloppe (Figure 16).

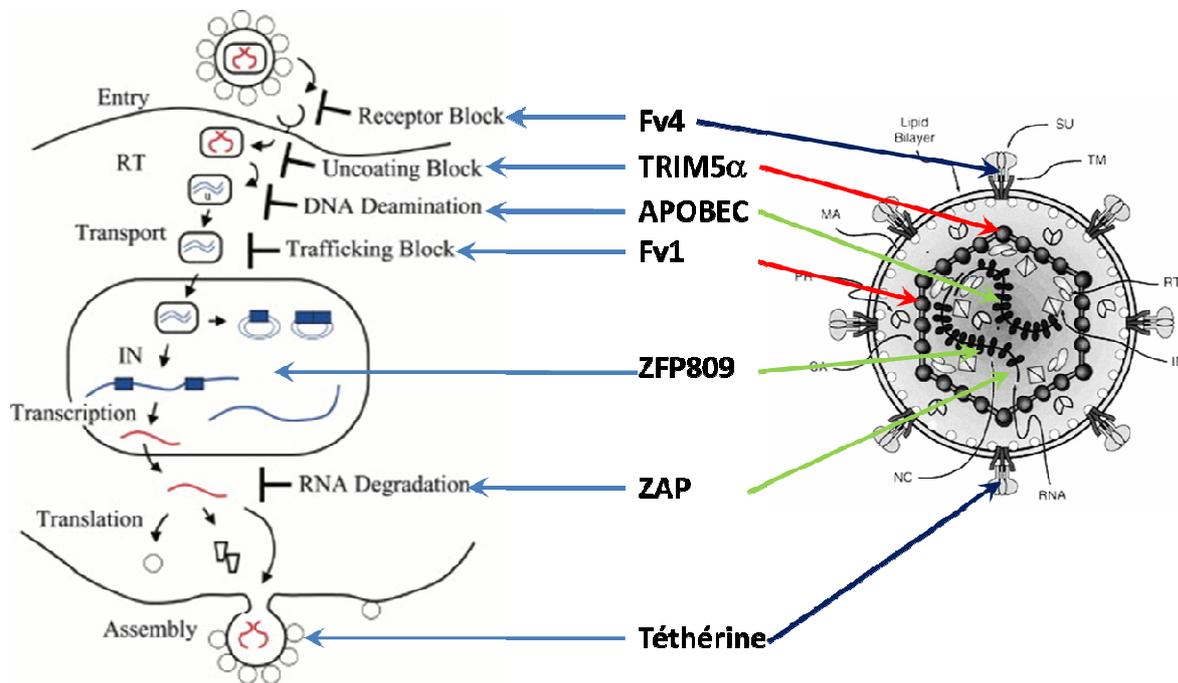


Figure 16 : Les étapes clé et les molécules du cycle répliquatif des rétrovirus affectés par les facteurs de restriction (schéma inspiré de l'article de Goff, S.P., 2004 (Goff, 2004)).

Les facteurs de restrictions sont nombreux et très variés. Cette diversité permet un ciblage de chacune des étapes du cycle répliquatif du rétrovirus, allant de la reconnaissance spécifique d'un récepteur cellulaire par les glycoprotéines d'enveloppe au bourgeonnement des particules virales. Chacun des éléments du rétrovirus seront ciblés par les différents mécanismes impliqués.

5.2.1. Les facteurs de restriction ciblant la séquence nucléique des rétrovirus

5.2.1.1. Protéine 1 contenant un motif alpha stérile et un domaine histidine-aspartate (SAMHD1)

SAMHD1 a été identifié comme étant un facteur de restriction du VIH-1. Ce facteur, également impliquée dans le syndrome d'Aicardi-Goutières, est ciblé par la protéine Vpx des lentivirus de

primate. Cette protéine accessoire entraîne la dégradation de SAMHD1 dans le protéasome et favorise ainsi la réplication des ces rétrovirus.

L'expression de SAMHD1 est entre autre dépendante des IFN de type I et s'effectue principalement dans les cellules quiescentes. Ce facteur cellulaire présente une activité phosphohydrolase sur les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) produisant des désoxyribonucléotides (dN) et des triphosphates inorganiques (Figure 17). Cette réaction entraîne un appauvrissement de la réserve en dNTP dans la cellule. Ces dNTP sont requis pour la synthèse de l'ADN par les ADN polymérases cellulaire et l'activité de la RT. Ainsi ce facteur empêche dans les cellules quiescentes la réplication du VIH-1 en lui subtilisant les dNTP présents dans les cellules quiescentes essentiels à la synthèse de reverse transcrit tardifs au cours de l'étape de transcription inverse (Figure 17) (Sze et al., 2013).

Cependant les gamma-rétrovirus se répliquent dans des cellules en division et donc en présence d'une forte quantité de dNTP et une faible expression du facteur SAMHD1. Il peu probable que ce facteur puisse naturellement mener une action de restriction sur les PERV répliatifs et plus généralement sur les gamma-rétrovirus.

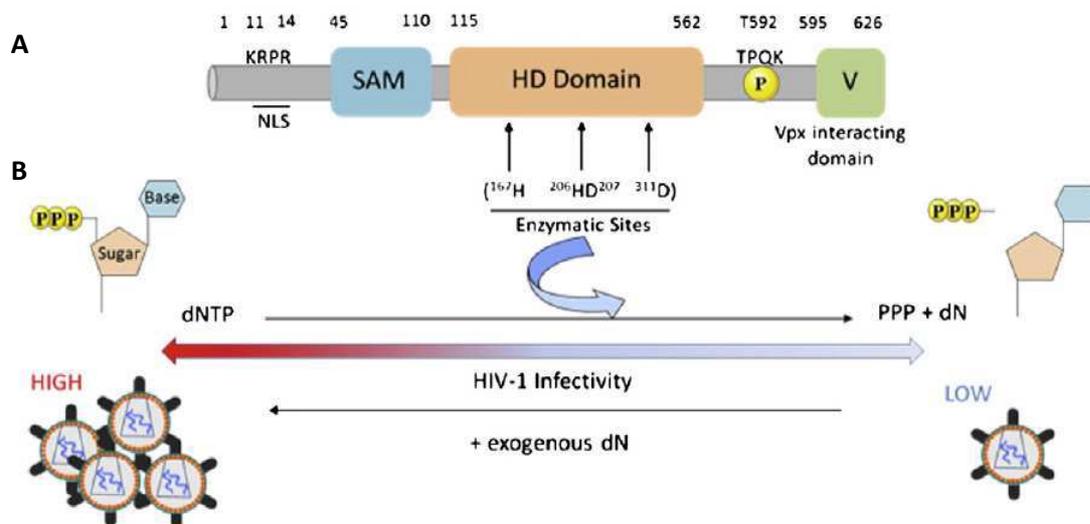


Figure 17 : Structure et activité antivirale de SAMHD1 (Sze et al., 2013).

(A) Structure de la protéine SAMHD1 présentée de la partie N-terminale à la partie C-terminale. NLS = signal de localisation nucléaire ; SAM= motif alpha stérile ; HD domaine = domaine Histidine-aspartate ; V = domaine d'interaction avec la protéine Vpx. (B) schéma de l'activité enzymatique de la protéine SAMHD1 catalysant les dNTP en dN + triphosphate inorganique. En parallèle est représenté la capacité du VIH-1 à se répliquer efficacement (HIGH) ou faiblement (LOW).

5.2.1.2. Les protéines Apobec

La famille des protéines AID/Apobec (Activation-induced deaminase / Apolipoprotein B editing catalytique polypeptide) possède de nombreux membres chez les primates humains et non humains. Ces protéines ont une activité cytidine déaminase (CDA). Parmi les quatre types répertoriés, allant de

1 à 4 en plus de AID, Apobec3 est le plus représenté et présente sept gènes chez l'homme, organisés en synténie sur le chromosome 22 (Figure 18A) (Goila-Gaur and Strebel, 2008; LaRue et al., 2009). Tous les membres de la famille ont une structure caractéristique, présentant un ou deux domaines catalytiques en doigt de zinc (CD), séparés d'un domaine pseudo catalytique (PCD) par un petit peptide de liaison. Initialement classifiées de A à H en fonction des domaines catalytiques, les protéines Apobec peuvent être classifiées en fonction de la présence ou de l'absence de différents motifs à doigt de zinc Z1, Z2 ou Z3. L'Apobec3F humaine, contient deux domaines Z2, celui situé dans sa partie N-terminale est non actif (Figure 18A) (Goila-Gaur and Strebel, 2008; LaRue et al., 2009).

Les protéines APOBEC3 (A3) des mammifères ont été identifiées comme étant des facteurs de restriction du VIH-1 et de nombreux autres rétrovirus (LaRue et al., 2008). Leur mécanisme d'action commence, lors d'une première infection, par leur encapsidation avec le génome rétroviral. Les protéines A3 peuvent ainsi agir sur l'ADN rétroviral simple brin lors de la transcription inverse et entraîner des hypermutations non viables pour le virus par une réaction de déamination qui entraîne la conversion des cytidines en uridines sur le brin négatif et, de ce fait, la conversion des guanines en adénosines sur le brin positif (Figure 18C) (Huthoff and Towers, 2008; Jonsson et al., 2006).

Les protéines Apobec des artiodactyles se situent, dans l'évolution, entre les rongeurs et les primates (Jonsson et al., 2006) et contrairement aux protéines de ces derniers, les domaines catalytiques actifs et inactifs sont inversés chez le porc lorsqu'il y en a deux (Figure 18B). Chez le porc, la famille des Apobec ne compte que deux gènes permettant l'expression de quatre protéines différentes, A3Z2, A3Z3, A3Z2-Z3 et un variant A3Z2-Z3 (SVA) (Dorrschuck et al., 2011; LaRue et al., 2008). A l'exception de SVA, les protéines porcines A3 sont actives contre les PERV répliquatifs et entraînent une conversion des cytidines avec une préférence pour les trinuécléotides 5'TGC pour A3Z2 et A3Z2-Z3 et 5'CAC pour A3Z3 (Dorrschuck et al., 2011). Cependant, l'A3Z2-Z3 endogène des cellules porcines PK15 ne présente qu'une très faible activité de restriction contre le PERV (Jonsson et al., 2007), probablement due à un effet « dose dépend ».

Le MLV possède un élément Glyco-Gag qui participe à contrer l'action d'A3 sur ce rétrovirus. La sensibilité des PERV à ce facteur de restriction met en doute une potentielle expression du Glyco-Gag, dans la mesure où il agirait de la sorte.

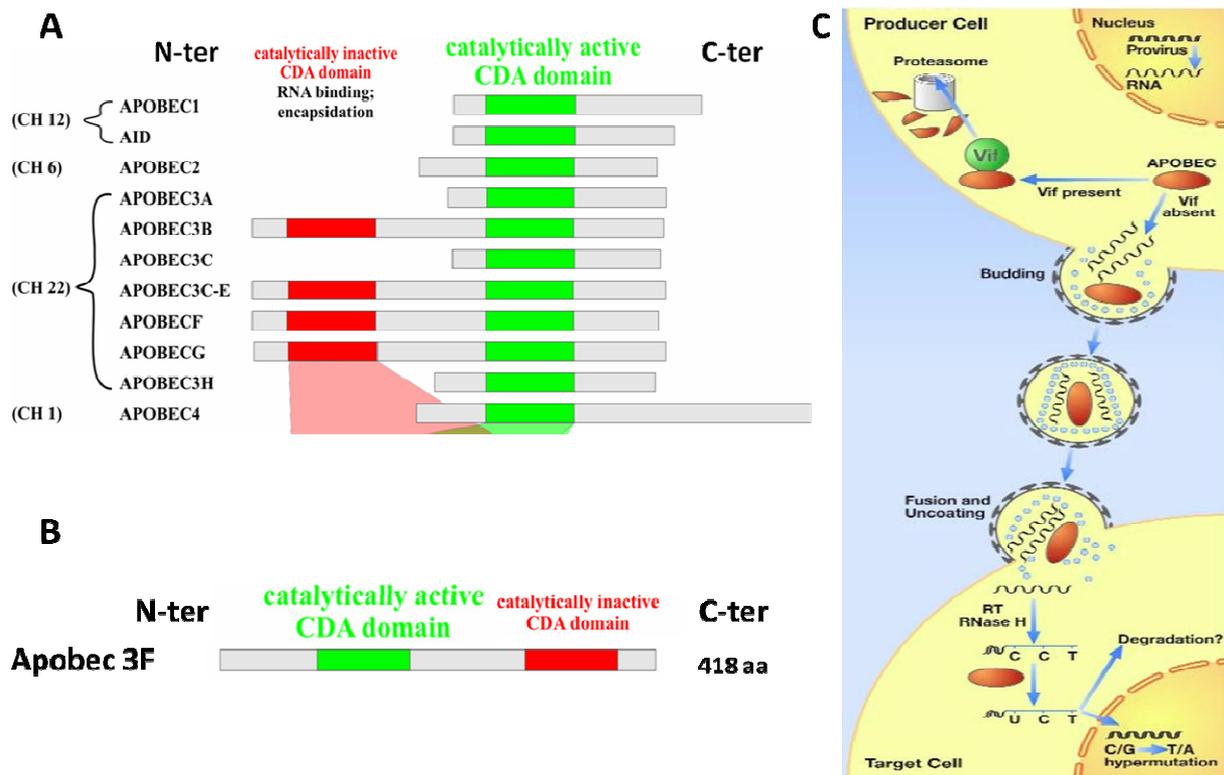


Figure 18 : la famille APOBEC.

(A) les protéines APOBEC chez les primates sont classés en 4 types. Le type 4 est le plus représenté et possède de nombreux gènes organisés en synthèse sur le chromosome 22. Les protéines A3 possède parfois 2 domaines catalytiques cytidine déaminase (CDA), celui en position N-ter est inactif (Goila-Gaur and Strebel, 2008). (B) Peu de gènes codes pour les protéines APOBEC chez les Artiodactyles, elles sont l'équivalent de la protéine A3F des primates. Lorsque 2 domaines catalytiques sont présents, celui en C-ter est inactif. (C) Schéma du mécanisme d'action d'APOBEC sur un rétrovirus tel que le VIH-1. La protéine Vif du VIH-1 limite l'encapsidation d'Apobec dans les particules virales en entrainant sa dégradation dans le protéasome. Lorsqu'Apobec est encapsidé il entraine des hypermutations du génome rétroviral au moment de l'étape de transcription inverse (RT) après infection d'une nouvelle cellule (Cohen, 2005).

5.2.1.3. ZFP809

D'autres facteurs de restriction sont spécifiques du génome des rétrovirus, ARN ou ADN. ZFP809, une Zinc Finger Protein, est par exemple spécifique des cellules embryonnaires. Ce facteur a été identifié chez la souris et il cible le PBS (Primer Binding Site) de type proline (PBS^{Pro}) du provirus, qui est la cible des ARNt (Wolf and Goff, 2009). Il permet la formation d'un complexe protéique en recrutant, entre autres, TRIM28/KAP-1, qui entraine la méthylation des histones au niveaux des LTR par le recrutement de la méthyltransférase ESET, ce qui bloque la transcription du provirus (Matsui et al., 2010; Rowe et al., 2010; Wolf and Goff, 2009) (Figure 19).

Chez le porc le PBS des PERV répliatifs est majoritairement de type Proline ou Glycine, on peut donc s'attendre à retrouver des facteurs de restriction du même type dans les cellules embryonnaires de porc. Toutefois, aucun homologue potentiel de ZFP809 n'a été identifié *in silico* (Wolf et al., 2013).

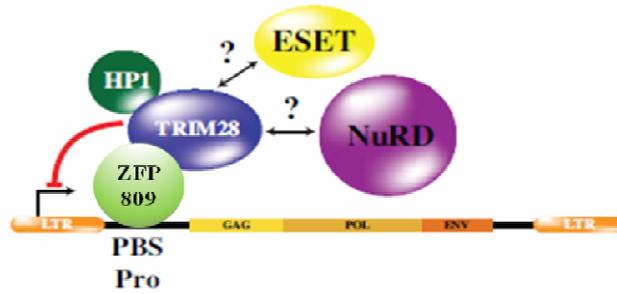


Figure 19 : Schéma de l'inhibition de la transcription des gènes rétroviraux par ZFP809 et TRIM28 (Wolf and Goff, 2009; Wolf et al., 2008).

Le facteur ZFP809 reconnaît les séquences PBS de type proline du MLV dans les cellules souches embryonnaires. Le complexe formé après le recrutement de nombreux facteurs cellulaires dont TRIM28 entraîne la répression transcriptionnelle du rétrovirus par des mécanismes de déacétylation ou de méthylation des histones pouvant impliquer NuRD ou les ESET.

5.2.1.4. Les protéines antivirales à domaines en doigt de zinc

Une autre Zinc finger protéine est la ZAP (Zinc-finger antivirale protein) aussi connue sous le nom de PARP-13 (poly(ADP-ribose) polymerase). Elle fait partie des rares protéines à porter un cluster de quatre zinc-finger de type CCCH (Guo et al., 2004).

Son action est essentiellement post-transcriptionnelle : elle fixe l'ARN rétroviral dans le cytoplasme et entraîne sa destruction (Goff, 2004). Son activité reste relativement spécifique des ARNm non cellulaires par la reconnaissance d'une petite séquence proche des 3'UTR, nommée ZRE (ZAP responsive element) (Gao et al., 2002; Goff, 2004).

C'est une protéine qui reste faiblement exprimée, mais qui cible des rétrovirus tel que le MLV (Gao et al., 2002; Guo et al., 2004; Zhu and Gao, 2008). Cependant une autre activité de ces protéines a été mise en évidence dans le cadre de l'immunité innée. En effet, il a été montré qu'une courte isoforme de ZAP, nommée ZAPS, est un stimulateur de la réponse interféron en ciblant et favorisant l'activité de RIG-1 (Hayakawa et al., 2011).

Les séquences des PERV répliquatifs sont phylogénétiquement proches du MLV, il est donc raisonnable de penser que des ZAP porcines puissent aussi agir sur les ARNm du PERV.

5.2.2. Les facteurs de restriction ciblant l'enveloppe

5.2.2.1. Les téthérines

Les téthérines bloquent la libération des particules virales et sont aussi connues sous le nom de CD317, BST2 ou encore de HM1.24. Les téthérines forment des homodimers qui sont insérés en N-terminale dans la membrane cellulaire par un domaine transmembranaire. La partie C-terminale est composée d'un domaine GPI (Glycosylphosphatidylinositol) qui va s'ancrer sur l'enveloppe virale et

ainsi empêcher la propagation du rétrovirus (Figure 20) (Sauter et al., 2010). L'activité antivirale de la Téthérine peut être induite par IFN de type I et consiste en la rétention de virions matures à la membrane plasmique de la cellule infectée. Ensuite, une proportion des virions est internalisée et s'accumule dans les endosomes. La protéine accessoire transmembranaire Vpu du VIH agit comme un antagoniste viral de la Téthérine (Figure 21) (Sauter et al., 2010). Bien que leur action ait été mise en évidence pour le VIH-1, ces facteurs ont un large spectre viral, pouvant agir tant sur les rétrovirus que sur les filovirus ou les arenavirus.

Une étude de 2009 (Mattiuzzo et al., 2010) a permis de montrer l'effet des téthérines porcines sur le PERV et le MLV dans un contexte humain. Elle a permis de mettre en évidence que les téthérines bloquent la libération des particules virales PERV-A et MLV. On peut par conséquent fortement s'attendre à les retrouver comme facteur de restriction des PERV répliquatifs.

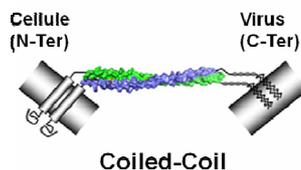


Figure 20 : schéma de la configuration de la protéine Téthérine.

La protéine forme un homodimère par son domaine Coiled-Coil. La partie N-terminale de la protéine possède un domaine hydrophobe qui lui permet de s'encrer dans la membrane cellulaire. La partie C-terminale possède un groupement GPI qui lui permet de s'encrer dans l'enveloppe virale.

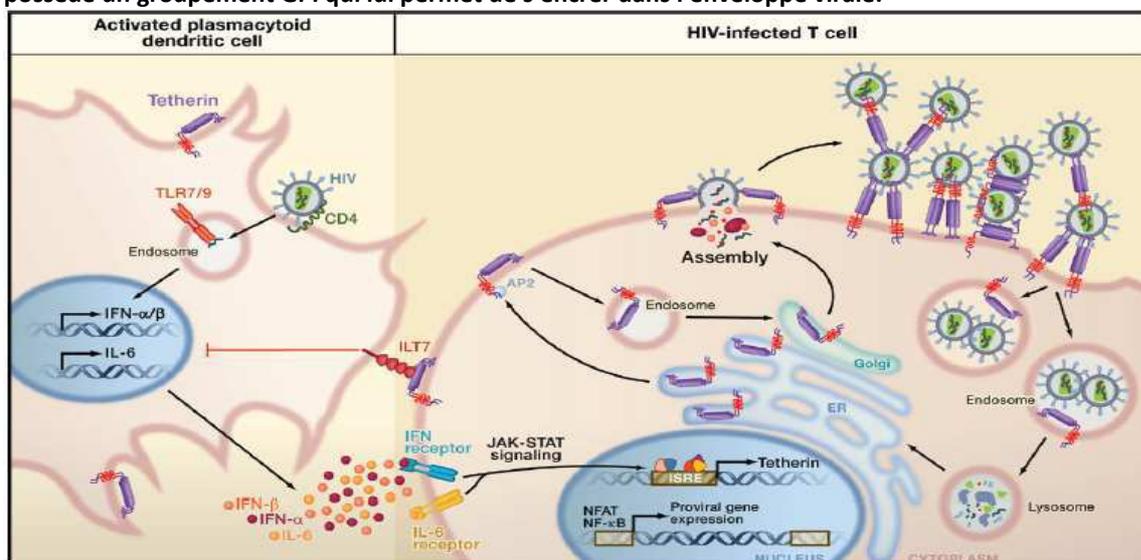


Figure 21 : schéma de l'activité des Téthérines contre l'infection du VIH-1 dans le cadre de l'immunité innée (Sauter et al., 2010).

La détection d'un pathogène par les PRR déclenche l'expression de cytokine qui vont aller activer la voie JAK/STAT menant à l'expression des ISG dont font partie les Téthérines. Ces protéines sont maturées dans le Golgi et rejoignent la membrane cellulaire. Lors du bourgeonnement des particules virales, elles vont s'encrer dans l'enveloppe virale et empêcher leur libération dans le milieu extracellulaire.

5.2.2.2. Le facteur Fv4

Le facteur Fv4 (Friend virus susceptibility-4) est codé chez la souris par le gène de la protéine d'enveloppe d'un MuERV (Takeda and Matano, 2007). Cette protéine d'enveloppe est défective ce qui lui permet, en s'incorporant dans l'enveloppe du MLV exogène, d'entrer en compétition avec la protéine d'enveloppe effective du rétrovirus. Par un effet dominant négatif, Fv4 bloque l'entrée du rétrovirus. Il joue un rôle d'interférence membranaire (Takeuchi and Matano, 2008). Un mécanisme similaire a été mis en évidence chez le mouton par l'expression de l'enveloppe d'un enJSRV générant, là aussi, une interférence membranaire contre l'infection du JSRV (Spencer et al., 2003; Spencer and Palmarini, 2012).

Chez le porc, un tel mécanisme n'a pas encore été démontré. Mais il est possible que la protéine d'enveloppe de PERV soit détournée en faveur de la cellule pour générer une interférence membranaire du même ordre que chez la souris ou chez le mouton (Takeuchi et al., 1998).

5.2.3. Les facteurs de restriction ciblant la capsid

5.2.3.1. Le facteur Fv1

Fv1 (Friend virus susceptibility-1) est un autre facteur de restriction d'origine endogène qui a été identifié chez la souris et qui cible spécifiquement la capsid des MLV (Hatzioannou et al., 2004). Il est codé par le gène *gag* du rétrovirus endogène MuERV-L. Ce facteur de restriction Fv1 bloque le cycle du gamma rétrovirus MLV dans les phases précoces. Il existe trois types de virus dotés de tropismes différents. Ces types viraux se différencient par le résidu aminé en position 110 de la protéine de capsid, qui correspond au site de fixation de Fv1. Le B-MLV est bloqué par le Fv1ⁿ, le N-MLV est bloqué par le Fv1^b et le NB-MLV est insensible à l'un et à l'autre (Stevens et al., 2004).

Des mécanismes similaires ont été identifiés chez le mouton. Deux locus d'enJSRV (enJS56A1 et enJSRV-20) expriment une protéine *gag* ayant un effet transdominant négatif, mais agissant dans les étapes tardives du cycle de réplication du rétrovirus (Arnaud et al., 2008; Mura et al., 2004).

Les PERV répliatifs sont aussi d'origine endogène, on peut donc s'attendre à identifier des effets transdominant négatifs ou plus proches de celui de Fv1 chez le porc.

5.2.3.2. Les protéines à motif tripartite

Les protéines TRIM sont une vaste famille codée par environ 70 gènes chez les mammifères. Ces gènes sont organisés en cluster et jouent des rôles très variés au sein de la cellule, certains n'ayant que des fonctions cellulaires tandis que d'autres interagissent avec les virus de façon plus ou moins spécifique et présentent des spectres d'action plus ou moins larges.

Les facteurs de restriction TRIM qui ciblent la protéine de capsid des rétrovirus agissent également sur la même boucle de Gag que Fv1 et bloquent le CPI (Pre-integration complex) au même stade, entraînant sa dégradation dans le protéasome (Huthoff and Towers, 2008; Uchil et al., 2008).

TRIM5 α , la plus connue des TRIM, cible le N-MLV (Perron et al., 2004). En revanche de nombreuses TRIM5 α de mammifère ne ciblent ni le B-MLV ni les PERV répliatifs A et A/C (Wood et al., 2009), notamment en ce qui concerne la TRIM5/Ref1 de la vache, équivalent au TRIM5 α humain (Goff, 2004; Wood et al., 2009). On peut donc envisager que tous les PERV répliatifs réagissent contre la TRIM5 α du porc, un autre artiodactyle, comme le B-MLV et les PERV-A et A/C contre la TRIM5 α bovine. Il semble donc peu probable de retrouver cette TRIM porcine comme facteur de restriction des PERV. Toutefois, chez la vache, d'autres protéines TRIM, autres que TRIM5 α , peuvent mener une activité de restriction contre l'infection de plusieurs lentivirus et gammarétrovirus, tels que le VIH-1 et le MLV (Si et al., 2006). Il ne serait donc pas surprenant d'identifier des protéines TRIM porcines pouvant mener une activité de restriction contre les PERV répliatifs.

La famille des protéines TRIM et leurs actions sur les virus seront abordées plus précisément dans la partie 6. La famille des protéines TRIM.

5.2.3.3. *Cyclophiline A*

Un autre facteur de restriction ciblant la protéine Gag de capsid est la Cyclophiline A. Elle agit sur une région adjacente aux sites d'interaction de Gag avec les TRIM et on retrouve parfois la Cyclophiline A associée à TRIM-5 α (Sayah et al., 2004). Néanmoins ce facteur ne possède aucun site de fixation sur la capsid des gamma-rétrovirus, il est donc très peu probable qu'il soit un candidat à la restriction des PERV répliatifs (Wolf and Goff, 2008).

6. La famille des protéines TRIM

Les protéines TRIM présentent trois motifs, d'où leur nom « Tripartit Motifs », elles sont aussi appelées RBCC, sigle défini par ces trois motifs qui les composent : un domaine RING, un ou deux motifs B-Box et une région Coil-Coiled (Figure 22A). Ces trois domaines sont hautement conservés et respectivement positionnés de la partie N-terminale à la partie C-terminale de la protéine (Massiah et al., 2006; Meroni and Diez-Roux, 2005; Ozato et al., 2008).

Les TRIM constituent une grande famille de protéines ayant largement évolué à partir d'un ancêtre commun dans l'ensemble du règne animal. Leur nombre varie selon les espèces, pouvant aller jusqu'à 208 gènes chez le poisson zèbre. Chez l'humain près de 100 gènes ont été identifiés, 67 chez la souris, une quarantaine chez le porc, une vingtaine chez les nématodes et moins de 10 chez les

diptères (Boudinot et al., 2011; Carthagna et al., 2009; Ozato et al., 2008; Rajsbaum et al., 2008; Sardiello et al., 2008).

Ainsi, les protéines TRIM, largement dupliquées chez les métazoaires, se trouvent impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires et peuvent se retrouver associées à des pathologies telles que désordres génétiques, désordres neurologiques, infections virales ou cancers (Horie-Inoue, 2013; Ito et al., 2008; Meroni and Diez-Roux, 2005). Mais cette famille joue aussi un rôle dans l'immunité innée (McNab et al., 2011; Nisole et al., 2005; Reymond et al., 2001; Uchil et al., 2013) et nombre de ses membres sont exprimés en réponse aux IFN (interféron) (Carthagna et al., 2009; Koba et al., 2013; Rajsbaum et al., 2008).

Les nombreuses études réalisées au cours de cette décennie ont permis de mieux comprendre et d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires de chacun des domaines qui caractérisent la famille.

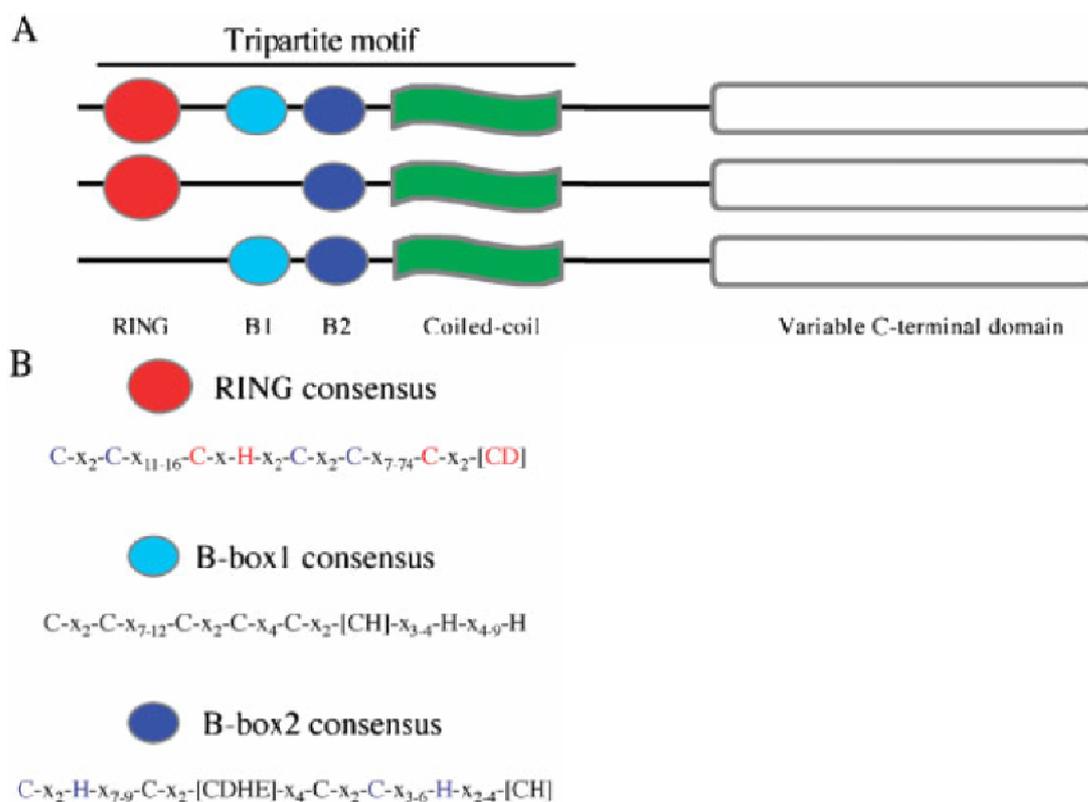


Figure 22 : Schéma des domaines caractéristiques de la famille des protéines TRIM et leur consensus de séquence protéique (Meroni and Diez-Roux, 2005).

(A) Les protéines à motif tripartite (TRIM) sont organisées de la partie N-terminale à la partie C-terminale d'un domaine RING, parfois absent, d'un ou de deux domaines B-box (B1 et B2) la B-box 2 étant toujours présente et d'un domaine Coiled-Coil. La partie C-terminale de la protéine est composée d'un ou plusieurs domaines dont la nature est variable au sein de la famille des protéines TRIM. (B) Les domaines RING et B-box sont des motifs à doigt de zinc de consensus bien défini dans la famille des protéines TRIM.

6.1. Caractéristiques des TRIM

6.1.1. Le domaine RING des protéines TRIM

Le domaine RING est retrouvé dans de nombreuses autres protéines que les TRIM. Il est cependant essentiellement impliqué dans des fonctions d'ubiquitination au travers de diverse E3 ubiquitine ligase (Freemont, 2000) (cf. famille des protéines RNF (Rebif New Formulation) comme défini par le HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee)). Ce domaine est situé 10 à 20 acides aminés après la 1^{ère} méthionine, long de 40 à 60 acides aminés présentant une structure en doigt de zinc, assortie de 2 ions Zn^{2+} (Figure 22B) (Meroni and Diez-Roux, 2005). Il existe deux types de domaines RING, les type H2 et C2 présentant le consensus C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-C/H-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C. Le type C2 est retrouvé dans la famille TRIM et présente une cystéine en 5^{ème} position à la place de l'histidine du type H2 (Figure 22B) (Freemont, 2000; Meroni and Diez-Roux, 2005).

6.1.1.1. L'ubiquitination

La réaction d'ubiquitination

Le domaine RING des E3 ubiquitine ligases joue un rôle crucial dans le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au substrat lors de la réaction d'ubiquitination chez les eucaryotes. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines qui consiste en la succession de trois étapes.

La première, l'activation, est réalisée par l'enzyme E1 qui active le groupement carboxylate C-terminal des ubiquitines. Chez l'homme deux gènes ont été identifiés et codés pour les protéines UBA1 et UBA6 (Figure 23).

La deuxième étape est celle de la conjugaison. Elle est médiée par l'enzyme E2, dont une trentaine de représentants existent chez les eucaryotes (van Wijk and Timmers, 2010). Elle récupère l'ubiquitine par une réaction de trans(thio)estérification, sur une de ses cystéines activées et permet ainsi le transfert sur le domaine RING ou équivalent de l'enzyme E3 (Figure 23).

La troisième et dernière étape correspond à la ligation au substrat par l'enzyme E3 qui permet la création d'une liaison isopeptidique entre le groupement carboxylate C-terminal de l'ubiquitine et une lysine de la protéine cible. Il existe de très nombreuses de ces protéines E3, plus de 300 ont pu être dénombrées. Cette fixation est toutefois réversible par l'intervention de protéines dédiées (Coiffic et al., 2010; Wertz and Dixit, 2010) (Figure 23).

Les protéines d'ubiquitines

Les ubiquitines sont des petites protéines de 8,5kDa qui peuvent être ajoutées seules sur les protéines : on parle alors de monoubiquitination. Cette dernière peut également être réalisée en plusieurs endroits sur la cible. Elles peuvent aussi être présentes en chaînes, on parle alors de

polyubiquitination en chaîne, la chaîne sera en revanche toujours réalisée sur une même lysine des ubiquitines.

Les mécanismes d'élaboration des chaînes ne sont pas encore bien connus. Cependant il a été proposé que la formation de ces chaînes dépendait de la capacité d'oligomérisation des enzymes E2 et E3 à créer une chaîne Ub avant la fixation sur la protéine cible. Ainsi ces chaînes sont transférées en un bloc au substrat (Streich et al., 2013). Le type d'ubiquitination réalisé sur les protéines et la lysine impliquée dans la chaîne vont déterminer le destin des protéines ciblées. En général, une polyubiquitination en chaîne réalisée sur la Lysine 48 ou 11 des ubiquitines, entraîne une dégradation du complexe par le protéasome et ainsi la libération des ubiquitines (Figure 23). Au contraire, une chaîne réalisée sur la Lysine 63 favorise l'assemblage de complexes protéiques et est associée à une activité liée à la voie NFκB, à la réparation de l'ADN ou au ciblage vers le lysosome (Napolitano and Meroni, 2012) (Figure 23). Les monoubiquitinations sont, quant à elles, davantage liées à l'orientation des protéines dans les différents compartiments ou à des processus cellulaires, tels que le trafic membranaire ou encore les endocytoses (Mukhopadhyay and Riezman, 2007; Wertz and Dixit, 2010).

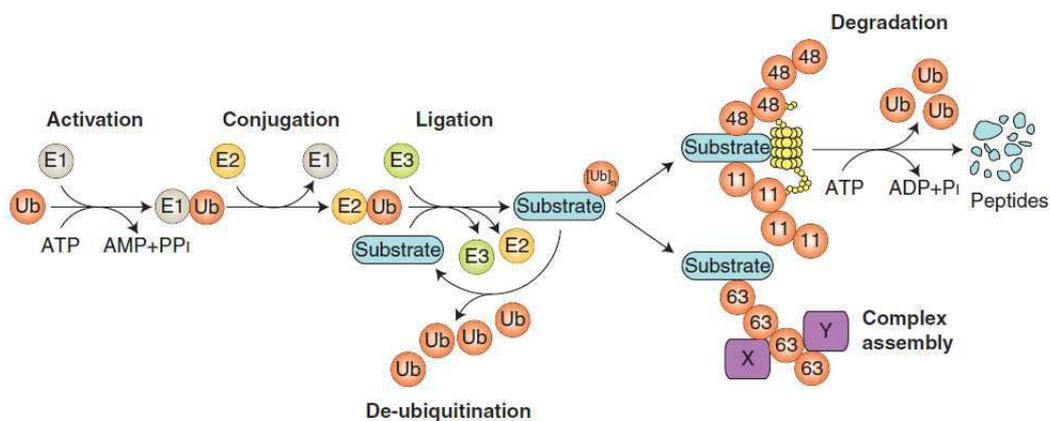


Figure 23 : Schéma des étapes de la réaction de l'ubiquitination (Wertz and Dixit, 2010).

L'étape d'activation est prise en charge par l'enzyme E1 qui active l'ubiquitine et la transfère à l'enzyme E2 pour la réaction de conjugaison qui permet ensuite le transfert de l'ubiquitine à l'enzyme E3. Lors de la réaction de ligation E3 l'ubiquitine est fixée de façon covalente sur la chaîne latérale d'une lysine de la protéine cible. Cette réaction est réversible avec l'intervention de protéines particulières. Des chaînes peuvent être formées sur les différentes lysines de l'ubiquitine. Ces polyubiquitination en chaîne sur des lysines 11 ou 48 entraînent la destruction de la protéine cible dans le protéasome. Sur la lysine 63 l'assemblage de complexes est favorisé.

6.1.1.2. Les protéines ressemblant aux ubiquitines, les UBL (Ubiquitin-like peptides)

Il existe toutefois d'autres modifications post traductionnelles réalisées par ces E3 ubiquitine ligases. En effet, plusieurs peptides ressemblant aux ubiquitines ont été identifiés, tels que les protéines SUMO, Nedd8 ou encore les ISG15 (interferon stimulated gene). Leur principe de fonctionnement est

le même que celui des ubiquitines. Ces autres modifications post traductionnelles interfèrent également sur le destin de la cible.

L'ISGylation

Les ISG15 sont des protéines de 15-17kDa, faisant partie des protéines induites par les IFN. De ce fait, elles sont souvent retrouvées comme étant impliquées dans des fonctions de régulation de la réponse antivirale telles que dans les infections à Sindbis virus, à VIH-1 ou à VHC (Katsounas et al., 2013; Zou et al., 2007). Bien que leur rôle dans cette voie ne soit pas encore complètement élucidé, il a été mis en évidence que ces protéines n'induisent pas la destruction de leur cible mais vont plutôt moduler leur activité (Sadler and Williams, 2008). Par exemple, TRIM25/EFP est une E3 ISG15 et ubiquitine ligase qui favorise l'activation de RIG-I par son ubiquitination (Gack et al., 2007). TRIM25 peut cependant moduler sa propre activité, sans entraîner sa destruction, par son autoISGylation entre les domaines RING et coiled-coil (Sadler and Williams, 2008; Zou et al., 2007). Comme dans le cas de l'ubiquitination, l'ISGylation est toutefois réversible.

La SUMOylation

Les SUMO (small ubiquitin-like modifier) sont des protéines d'environ 10kDa qui, comme les ubiquitines sont ancrées par une liaison peptidique sur la lysine d'un substrat. Cette fixation se fait généralement sur un site consensuel retrouvé sur les protéines cibles : Ψ -K-X-E/D. Toutefois, des interactions peuvent se faire de façon non covalente avec des cibles possédant le site SIM (SUMO interacting motif) composé d'un noyau hydrophobe à base de valine et d'isoleucine (V/I-X-V/I-V/I/L ou V/I-V/I-X-V/I).

Ces modifications post-traductionnelles sont majoritairement impliquées dans la modulation des fonctions des protéines et peuvent favoriser la stabilité des complexes par l'interaction SUMO-SIM. Quatre types de protéine SUMO ont été identifiés chez les mammifères. Les types 1, 2 et 3 sont ubiquitaires alors que le 4^{ème} est présent majoritairement dans les cellules de rein. Par ailleurs les types 2, 3 et 4 sont très proches les uns des autres, effectivement 2 et 3 présentent 95% d'identité et le type 4 en présente 86% avec les 2 et 3. Ces trois protéines sont très différentes du type 1. Les types 2 et 3 ne présentent que environ 45% d'identité avec celui-ci. Ils possèdent une lysine en position 11 leur permettant de générer des chaînes, ce que ne peut pas faire SUMO-1 (Coiffic et al., 2010).

De même que les réactions d'ubiquitination, la SUMOylation se réalise en trois étapes faisant intervenir les trois enzymes E1, E2 et E3 (Figure 23). Cette réaction peut, là aussi, être réversible et fait intervenir des protéases spécifiques telles que les SENP. L'enzyme d'activation E1 est un hétérodimère formé de Aos1/SAE1 et de Uba2/SAE2 (levure/mammifère, respectivement).

Contrairement aux ubiquitines, une seule enzyme de conjugaison E2 a été détectée. Cette enzyme, Ubc9 suffit cependant à réaliser une SUMOylation résiduelle chez les mammifères. Enfin, l'enzyme de ligation E3 est responsable de la spécificité et de l'efficacité de la SUMOylation. Seuls quelques types de protéines E3 ont été identifiés : les protéines PIAS, RanBP2, PC2 et certaines protéines TRIM.

Toutefois les TRIM se distinguent des autres E3 par une activité E3 SUMO ligase nécessitant l'interaction de leur domaine RING et B-box (Chu and Yang, 2011). Associées à leur grande diversité de cibles spécifiques ou non, ces caractéristiques en font un groupe d'intérêt pour l'étude de la SUMOylation. Par exemple, la TRIM19/PML est responsable d'une fonction de SUMOylation importante pour la formation des corps nucléaires PML nécessaires pour le contrôle post-transcriptionnel de nombreux facteurs de transcription (Wilkinson and Henley, 2010).

Ces modifications post-traductionnelles interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires, allant des fonctions liées à l'ADN à la régulation du cycle cellulaire, en passant par l'adressage des protéines. De ce fait, et par leur lien avec la fonction des protéines TRIM dont beaucoup de membres sont au cœur de l'immunité innée, ces protéines post-traductionnelles sont une cible importante des virus.

L'implication des différents types de SUMOylation peut, tour à tour, favoriser ou inhiber l'action des protéines virales impliquées dans le cycle répliatif des virus. De nombreux cas ciblent par ailleurs les corps nucléaires PML. Par exemple, la désSUMOylation de ces corps et la SUMOylation de IE2-p86, l'une des premières protéines exprimées lors de l'infection par l'HCMV, favorisent le cycle répliatif de ce virus tandis que la SUMOylation de IE1, une autre protéine exprimée précocement, entraîne son inactivation (Coiffic et al., 2010). Certaines protéines virales vont même présenter une activité E3 SUMO ligase, c'est le cas de K-bZip du KSHV (Kaposi sarcoma associated virus) (Coiffic et al., 2010).

Chez les rétrovirus, la protéine Tax du HTLV-1 détourne à la fois la machinerie de l'ubiquitination et de la SUMOylation pour favoriser la formation des corps nucléaires Tax dans le noyau, impliqués dans la transformation et la prolifération des cellules infectées, par la voie NFκB. Dans le cas du MLV, la SUMOylation de la CA est essentielle lors des phases précoces du cycle infectieux (Coiffic et al., 2010).

La SUMOylation, en particulier réalisée par et sur les protéines TRIM, intervient à différents niveaux cellulaires et prend ainsi une réelle importance dans l'interaction entre l'hôte et son pathogène (Chu and Yang, 2011). Par ailleurs, les enzymes E1, E2 et E3 de la SUMOylation sont de plus en plus des cibles thérapeutiques, en particulier dans les cas de cancers.

6.1.1.3. Des TRIM sans domaine RING

Toutefois, le domaine RING n'est pas présent chez toutes les protéines TRIM. Une petite dizaine de protéines chez l'homme ne le possèdent pas (Nisole et al., 2005). Par ailleurs, ce domaine RING n'est pas exclusif à cette famille, c'est pourquoi le domaine B-box est souvent considéré comme étant le déterminant critique de la famille des protéines TRIM, bien que lui aussi ne soit pas systématiquement présent (e.g. TRIM25) (McNab et al., 2011; Meroni and Diez-Roux, 2005). De ce fait, il semble plutôt que ce soit l'ordre N-ter vers C-ter et l'association d'au moins deux des trois domaines caractéristiques de la famille qui soient critiques à la nature des TRIM.

6.1.2. Les domaines B-box-1 et 2 des protéines TRIM

La B-box est un motif de fixation du Zn^{2+} dont la structure tridimensionnelle est proche de celle du domaine RING, bien que ce motif ne fixe qu'un seul ion (Massiah et al., 2006; Tao et al., 2008).

Il existe deux types de B-box qui se différencient dans la distribution des cystéines et histidines, résidus aminés impliqués dans les liaisons au Zn^{2+} (Figure 22B). La B-box 1 n'est pas systématiquement présente dans les protéines TRIM mais, lorsqu'elle est présente, elle est toujours en amont de la B-box 2 (Figure 22A). Cette dernière étant présente dans la grande majorité des membres de la famille TRIM.

En fait, bien que la B-box se doive d'être intacte dans de nombreuses fonctions biologiques, telle que la SUMOylation (Chu and Yang, 2011), les rôles des B-box 1 et 2 ne sont pas bien définis. Si la B-box de TRIM5 intervient dans la reconnaissance de la cible, il n'y a pas de fonction spécifique à ce jour attribuée à ce domaine (Meroni and Diez-Roux, 2005; Ozato et al., 2008).

Certaines études ont cependant montré une implication conjointe de ce domaine au domaine RING, dans la fonction de certaines TRIM. Il a en effet été montré que la monoubiquitination de la B-box1 de TRIM18/MID1 amplifie l'activité E3 ligase du domaine RING (Han et al., 2011). Il a également été montré que les B-box interviennent dans la formation de complexes à haut poids moléculaire tel que les corps nucléaires PML (Jensen et al., 2001).

Enfin, plus récemment, il a été montré que la formation de dimer par le domaine CC est susceptible de mener à la formation de structures d'ordre supérieur promues par l'action conjointe du RING et de la B-box2 (Li et al., 2011b). L'élément essentiel pour la formation de complexe reste cependant le domaine CC.

6.1.3. Les domaines Coiled-coil (CC) des protéines TRIM et les multimérisations

Les domaines CC sont localisés en aval des domaines B-box 2. Ils correspondent à un motif d'une centaine de résidus aminés et sont en général composés de deux à trois sous-domaines. Les motifs

composants les domaines CC sont très peu conservés au sein de la famille TRIM, à l'exception des résidus aminés hydrophobes comme la leucine, qui sont requis dans la structure et conditionnent la fonctionnalité des domaines CC (Meroni and Diez-Roux, 2005; Ozato et al., 2008).

Ces domaines jouent un rôle important dans les interactions homodimériques et hétérodimériques avec les autres TRIM ou protéines. Ces interactions protéiques peuvent aussi nécessiter la contribution des domaines adjacents, notamment la B-Box et les domaines C terminaux comme le domaine PRYSPRY (Li et al., 2011b; Napolitano and Meroni, 2012). Ces interactions sont à l'origine de la grande complexité de ce groupe dont l'activité, médiée par le domaine RING, varie en fonction de ses interactants. Comme abordé précédemment, le type de modification post-traductionnel varie en fonction de l'E2 avec laquelle elle interagit.

Par ailleurs les homointeractions jouent sur l'adressage des TRIM vers les différents compartiments cellulaires. Il a en effet été montré que des mutations sur le domaine CC entraînent une distribution diffuse des TRIM dans la cellule (Reymond et al., 2001; Short and Cox, 2006). A titre d'exemple, pour les protéines qui le possèdent, ce domaine CC est important dans la formation des complexes multimériques de haut poids moléculaire que sont les corps nucléaires PML, composés de TRIM19/PML et exclusivement présents dans le noyau. Un autre exemple concerne la trimérisation de TRIM5 α , celle-ci est requise pour sa fixation à la capsid des rétrovirus et implique les domaines CC et PRYSPRY (Li et al., 2011b; Napolitano and Meroni, 2012). Ainsi une même protéine TRIM peut générer différents multimères et différentes modifications post-traductionnelles et, de ce fait, agir sur un ensemble de cibles variées.

6.1.4. Les Domaines C-ter, vers une classification des TRIM

Les domaines C-terminaux des TRIM sont composés d'un ou plusieurs motifs dont les actions combinées s'ajoutent à l'action des domaines caractéristiques de la famille et apportent une plus grande spécificité d'action à la protéine. Jusqu'à présent, onze motifs distincts, généralement retrouvés dans d'autres familles de protéines, ont pu être identifiés (Tableau 3). Leurs combinaisons limitées chez les TRIM a permis d'organiser la famille en plusieurs classes pour lesquelles les spécificités d'actions sont globalement similaires. Chez les vertébrés, certaines classes sont toutefois plus représentées que d'autres.

6.1.4.1. Les domaines C-terminaux les plus représentés :

Les motifs PRY et SPRY

Les motifs PRY et SPRY, également appelés B30.2, sont souvent associés l'un à l'autre, bien que ce dernier soit parfois retrouvé seul dans certains domaines C-ter. Ces domaines sont les plus représentés de la famille. On les retrouve dans les groupes C-I et C-IV (Tableau 3) et sont présents

dans les deux tiers des membres de la famille. Le motif PRY est composé d'environ 60 aa et le domaine SPRY d'environ 140 aa. Ces deux motifs s'organisent en plusieurs feuillets β antiparallèles arrangés en sandwich β (Grutter et al., 2006).

Bien que le motif SPRY ne soit retrouvé que chez les plantes, les animaux et les champignons, B30.2 est retrouvé uniquement chez les vertébrés (Rhodes et al., 2005) et présente une expansion rapide du nombre de gènes le contenant chez ces animaux. Effectivement, ils sont présents dans dix autres familles protéiques chez l'homme mais le restent majoritairement dans la famille TRIM. Ainsi ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que le développement et la croissance. Mais ce motif est principalement impliqué dans des fonctions d'immunité innée et de restriction virale (Grutter et al., 2006). De plus, leur système de fonctionnement est similaire à celui des antigènes-anticorps (Grutter and Luban, 2012). Cela implique qu'ils aient un groupe de cibles réduit (e.g. TRIM21) (James et al., 2007; McNab et al., 2011). De ce fait, et de par leur implication dans l'immunité innée, cette expansion peut être mise en parallèle avec l'évolution et l'expansion des récepteurs immuns suite à l'apparition des mécanismes de l'adaptation de l'immunité (Ozato et al., 2008). Une étude de 2008 réalisée par Uchil P.D. et ses collaborateurs sur trente-six TRIM humaines et dix neuf TRIM murines, a en effet montré que vingt d'entre elles sont impliquées dans des fonctions de restriction rétrovirale, dont quatorze présentent les domaines PRYSPRY ou SPRY. Il est donc possible qu'une pression de sélection vers une application dans les défenses immunitaires ait eu lieu (e.g. TRIM5 et orthologues) (Diaz-Griffero et al., 2006; Si et al., 2006; Uchil et al., 2008).

La boîte COS (C-terminal subgroup one signature)

La boîte COS est présente dans les groupes C-I, C-II et C-III de la famille (Tableau 3) mais elle est aussi représentée dans d'autres familles de protéines (Short and Cox, 2006). Elle est toujours juxtaposée au domaine CC et est impliquée dans la localisation des protéines dans certains compartiments cellulaires du fait de sa fonction de liaison des protéines aux microtubules (Ozato et al., 2008).

Fibronectine de type 3 (FN3)

La boîte COS est souvent associée au domaine FN3 puisque celui-ci est retrouvé dans les groupes C-I et C-III (Tableau 3). Ce domaine contient des sites de fixation pour l'ADN et l'héparine. Dans le groupe C-I, ces deux domaines se combinent avec le domaine SPRY et parfois B30.2. Toutefois, aucun rôle n'a clairement été attribué à ces domaines (Ozato et al., 2008). Seul TRIM1 qui fait partie de ce groupe, a été identifié comme étant un facteur de restriction. Comme TRIM5 α il inhibe l'entrée du N-MLV mais pas celle du B-MLV. TRIM1 agit également sur l'expression et le relargage de ce rétrovirus (Uchil et al., 2008).

6.1.4.2. C-ter moins représentés

De nombreux autres domaines sont également représentés dans la famille des protéines TRIM mais dans une proportion moins importante. Parmi eux on trouve les motifs NHL (NCL-1, HT2A and LIN-41), le domaine immunoglobuline de type filamine et les domaines BROMO (bromodomains) et PHD (plant homeodomains).

Les motifs NHL sont spécifiques au groupe C-VII (Tableau 3), mais sont toutefois retrouvés dans d'autres familles de protéines. Ces motifs sont composés d'environ quarante résidus et présentent généralement deux à six répétitions, chez les TRIM on en dénombre toujours cinq à six. Ce domaine est impliqué dans les interactions protéine-protéine (Meroni and Diez-Roux, 2005).

L'immunoglobuline de type filamine est un domaine retrouvé dans les groupes C-VII et C-X (Tableau 3). Dans le groupe C-VII il est associé au domaine NHL et est impliqué dans la dimérisation de la liaison transversale de l'actine.

Les domaines BROMO et PHD sont toujours associés l'un à l'autre et reconnaissent les lysines acétylés, comme ceux en N-ter des histones. Ils forment la classe très conservée des TRIM C-VI, aussi connues sous le nom de protéines TIF1. Les TRIM qui les possèdent sont localisées dans le noyau et, par leur liaison à l'ADN, sont souvent associées à la répression transcriptionnelle des gènes via une autoSUMOylation (Ivanov et al., 2007). TRIM28 est le représentant le plus connu de cette classe. Elle agit avec ZFP809 dans les cellules embryonnaires et entraîne l'inhibition de la transcription des provirus et rétrovirus endogènes (Wolf and Goff, 2009).

Trois autres domaines sont moins représentés encore : il s'agit des domaines ARF (ADP ribosylation factor-like), de MATH (Meprin et Tumour-necrosis factor receptor (TNFR)-Associated factor (TRAF) homology) et d'un domaine transmembranaire.

Le premier domaine compose le groupe C-IX : il est associé au trafic vésiculaire intracellulaire. TRIM23 est le seul représentant de cette classe connue chez l'homme et est associé à la régulation de TRAF6 et 3 dans les voies de signalisation de l'immunité innée (McNab et al., 2011).

Le domaine MATH représente le groupe C-VIII et est impliqué dans l'association et l'interaction aux récepteurs de certaines protéines TRAF (e.g. TRIM37).

Et enfin le groupe C-XI présente des TRIM possédant un domaine transmembranaire (Ozato et al., 2008). Les protéines TRIM13 et 59, seules représentantes connues de ce groupe chez l'homme et la souris, sont aussi impliquées dans la restriction virale de certains gammarétrovirus (Uchil et al., 2008).

6.1.4.3. Classification des TRIM

L'étude des domaines C-terminaux des TRIM a abouti à une première classification de la famille en onze classes, auxquelles s'ajoute un groupe de protéines non classifiées (NC) (Ozato et al., 2008). Ces classes sont structurées en fonction de la présence ou de l'absence des différents domaines de la partie C-terminale des protéines, précédemment décrites (Tableau 3). La plus représentée est la classe C-IV qui correspond aux protéines contenant les domaines SPRY ou PRYSPRY. Cette organisation a l'avantage de faciliter la compréhension des fonctions de ces protéines chez les animaux.

Toutefois elle ne tient pas complètement compte de l'évolution des TRIM et de leurs différents domaines. Une autre classification a ainsi été proposée par Ignacio Marin (Marin, 2012) qui repose, non plus sur la structure en C-terminale, mais sur l'analyse *in silico* des séquences et de leur répartition phylogénétique. Les TRIM s'organisent alors en neuf sous-familles allant de A à I, dans lesquelles se répartissent les différentes classes précédemment proposées, auxquelles s'ajoute un groupe comprenant les sous-familles J à Q dans lesquelles se répartissent la classe C-V et les protéines non classées.

Cette classification présente un intérêt pour la compréhension de l'évolution de ces protéines dans le monde du vivant et montre ainsi que la sous-famille A (classe C-VIII) est commune aux autres eucaryotes. Cette sous-famille comprend le domaine MATH, qui est associé aux protéines TRAF. Ce sont d'autres ubiquitines ligases qui présentent de nombreuses similarités avec le domaine MATH et qui sont également impliquées dans l'immunité innée des vertébrés. Ainsi I. Marin a montré que la famille des protéines TRIM aurait émergé avant le règne animal.

Tableau 3 : Les différentes classes de TRIM selon la caractéristique des domaines C-terminaux

Classe	C-ter caractéristiques	Exemple	Sous famille
I		TRIM1 (MID2)	B
		TRIM9	
		TRIM18 (MID1)	
II		TRIM54	B
III		TRIM42	I
IV		TRIM5	G
		TRIM22	
V		TRIM8 TRIM19 (PML)	J et L
VI		TRIM28	E
VII			C
VIII		TRIM37	A
IX		TRIM23	D
X		TRIM45	C
XI		TRIM13 TRIM59	H
NC		TRIM44	K, M, N O, P et Q

Légende du tableau 3

Symbole	Domaine
	Coil-coiled
	Fibronectine de type 3
	SPRY
	Filamine-type immunoglobuline
	PRY
	NHL
	Domaine transmembranaire
	ARF
	BROMO
	PHD
	MATH
	COS

6.2. Les rôles et évolution des TRIM

6.2.1. Diversification dans le règne animal (organisation dans les chromosomes)

Les fonctions cellulaires

L'expression des TRIM dans les tissus est très hétérogène, d'autant que le profil d'expression dans les tissus de l'hôte adulte diffère de celui des cellules embryonnaires. Dans les tissus adultes, près de la moitié des TRIM sont ubiquitaires, les autres sont exprimées dans un tissu particulier ou de façon plus globale dans de multiples organes (Reymond et al., 2001; Short and Cox, 2006).

Ainsi, TRIM30 chez la souris n'est exprimée que dans la rate alors que TRIM27 est exprimé dans de nombreux tissus tels que le foie, les poumons, le cerveau, les gonades etc... Par ailleurs, un même gène TRIM peut générer différents isoformes suite à l'épissage alternatif des gènes, menant à des localisations et des fonctions distinctes de ces isoformes. C'est le cas de TRIM19 pour laquelle neuf isoformes, au moins, ont été identifiées et se localisent dans le noyau ou dans le cytoplasme, où ils mènent différentes actions telle que la formation des corps nucléaires PML, qui sont localisés dans le noyau (Bernardi and Pandolfi, 2007; Jensen et al., 2001). Le gène TRIM5 est lui aussi connu pour ces différentes isoformes. L'isoforme α est la plus célèbre et est responsable de la restriction de nombreux rétrovirus, dont le VIH-1. Certaines isoformes présentent en revanche un domaine B30.2 tronqué et ne sont pas impliquées dans la restriction des rétrovirus (Stremlau et al., 2004).

Les protéines TRIM vont ainsi être impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, le développement ou encore l'apoptose (Reymond et al., 2001; Stremlau et al., 2004). De ce fait, les TRIM interviennent dans de nombreuses pathologies telles que la fièvre méditerranéenne familiale due à une mutation sur le gène de TRIM20 (Grutter et al., 2006). Des mutations sur le gène de TRIM18 sont également responsables dans un syndrome lié à l'X « X-linked Opitz G/BBB syndrom », caractérisé par des anomalies faciales (Trockenbacher et al., 2001). Dans d'autres cas, certaines TRIM sont responsables d'activités oncogéniques. C'est le cas de TRIM19, 27 et 24 (Napolitano and Meroni, 2012). Toutefois, cette famille de protéines est principalement impliquée dans les fonctions liées à la restriction virale.

6.2.2. Implication dans la défense immunitaire

La famille des protéines TRIM est largement impliquée dans l'immunité innée. Vingt TRIM humaines et murines approximativement sont impliquées dans la restriction rétrovirale à des stades précoces et/ou tardifs. Une majorité fait partie de la classe C-IV (Uchil et al., 2008). En outre, nombre de gènes de ces protéines TRIM sont induits par les interférons de type I et II (Carthagena et al., 2009; Rajsbaum et al., 2008). Et par l'activité de leur domaine RING, elles peuvent induire des ISGylation,

dont l'ISG15 fait partie des gènes induits par les interférons et impliqués dans la réponse à l'infection de nombreux pathogènes (Katsounas et al., 2013; Zou et al., 2007).

6.2.2.1. Induction des TRIM par les IFN

Plusieurs études ont montré que l'expression de nombreuses protéines TRIM est induite par les interférons. En effet, vingt-sept des soixante-douze TRIM testées dans des cellules de lymphocytes et MDM (Monocyte-derived macrophages) humaines (Carthagen et al., 2009) et dix-sept des vingt-huit TRIM testées dans des cellules de macrophages primaires, DC et cellules T de souris (Rajsbaum et al., 2008) sont régulées par les IFN.

De plus, les promoteurs de certaines de ces protéines, dont TRIM5 α , 8, 19, 22 et 25, possèdent un élément IRFE (IFN regulatory factor elements) et/ou ISRE (IFN-stimulated response element) qui sont des sites de fixation des IRF (IFN regulatory factors) (Carthagen et al., 2009; Ozato et al., 2008).

Ces TRIM sont des facteurs de restriction avérés et, bien que les mécanismes d'action des IFN dans la restriction virale ne soient pas encore bien compris, il apparaît clairement que les protéines de la famille des TRIM sont des médiateurs proéminents de cette activité antivirale. Ceci pourrait expliquer l'importante évolution de la famille des TRIM par rapport à l'évolution des systèmes immunitaires des vertébrés.

6.2.2.2. Régulation des IFN par les TRIM

Régulation positive de la voie des IFN par les TRIM

Cette voie de signalisation de l'immunité innée est également activée puis entretenue par des protéines TRIM, induites ou non par les IFN. Il a été montré que seize protéines TRIM humaines sur les quarante-trois étudiées induisent la voie de signalisation NF κ B et/ou AP-1 (Activator Protein 1). La moitié fait partie de la classe C-IV contenant les domaines PRYSPRY et SPRY (Uchil et al., 2013). Ces observations, complétées lors de multiples études, montrent l'implication de différentes TRIM à chaque étape de la voie de signalisation NF κ B et des IRF (Figure 24).

Certaines TRIM sont impliquées au niveau de la reconnaissance des pathogènes en favorisant l'activation des PRR. Ainsi, il a été montré que TRIM25, induite par les IFN, reconnaît le domaine CARD (Caspase-Recruitment Domain) de RIG-1 par son PRYSPRY et entraîne son ubiquitination. Ceci favorise son interaction avec le MAVS lors de la détection d'ARNdb étranger par les RLR. Toutefois, il a aussi été démontré que l'activité d'ISGylation de TRIM25 pourrait intervenir à cette étape suggérant une implication des deux mécanismes (Gack et al., 2007; McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008). Le fait que d'autres PRR possèdent un domaine CARD pourrait impliquer TRIM25 sur une fonction de régulation plus large.

Cependant, d'autres TRIM interagissent avec des PRR. Il a ainsi été démontré que les activités des TLR3 et 4 sont respectivement favorisées par les TRIM56 et 62, deux autres protéines régulées par les IFN. TRIM56 interagit directement avec le TLR3 et favorise son activité indépendamment de sa fonction E3 ligase. La fonction de TRIM62 reste, quant à elle, à éclaircir, mais elle semble agir au niveau de la branche TRIF du TLR4 (Shen et al., 2012; Uchil et al., 2013). Enfin, il est souvent considéré que TRIM5 α agit, elle aussi, comme un PRR. Sa capacité à détecter spécifiquement la capsid des rétrovirus grâce à son domaine PRYSPRY, couplé à son activité E3 ligase permet d'y fixer une chaîne de polyubiquitine Lys-63 entraînant ainsi l'activation du complexe TAK-1 (Pertel et al., 2011).

Plus loin dans la voie de signalisation, TRIM23 interagit dans certains cas avec TRAF6 et favorise ainsi la voie de l'immunité innée. Il a aussi été montré qu'il active la voie NF κ B et IRF3 par l'ubiquitination du facteur NEMO en aval de TLR3 (NF κ B essential modulator) (McNab et al., 2011). Certaines protéines présentent des modes d'action plus variés.

C'est le cas de TRIM8 qui est impliqué dans plusieurs étapes de régulation de la voie de signalisation des IFN (Figure 24) (McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008). Chez la souris, il a été montré que TRIM8 déstabilise SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1), probablement grâce à son activité de E3 ubiquitine ligase et renforce ainsi l'activité JAK-STAT (Ozato et al., 2008; Toniato et al., 2002). En outre, l'orthologue humain empêche le fonctionnement de PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT3). Pour mener à bien cette fonction, TRIM8 agit par translocation du facteur du noyau vers le cytoplasme, améliorant ainsi l'activité p65 du facteur NF- κ B (Okumura et al., 2010; Tomar et al., 2012). TRIM8 est également un activateur de la TAK1, en amont du facteur de transcription NF- κ B, à la faveur d'une polyubiquitination du résidu K63 (Li et al., 2011a). Il est à noter qu'à ce niveau, le facteur de restriction TRIM5 α , en coopération avec l'E2 UBC13/UEV1A, favorise aussi l'activité de TAK1 (Grutter and Luban, 2012).

L'exemple le plus notoire et ambigu est toutefois celui de TRIM21/Ro52 qui est un membre de la famille des TRIM induits par les IFN. Elle semble activer IRF8 par une activité E3 ubiquitine ligase et ainsi pourrait participer, dans le noyau, à la régulation de nombreuses fonctions de l'immunité telles que l'expression des IL-12p40 ou des TRIM19/PML (McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008). Toutefois, certaines publications montrent des résultats contradictoires dans lesquels TRIM21 semble être à la fois un régulateur négatif et positif de la voie des IFN en ciblant et régulant différents facteurs tel que les IRF3, 5 et 8 ou encore en inhibant le facteur IKK β (Figure 24) (McNab et al., 2011).

Ces résultats, bien qu'ils ne soient pas encore clairement élucidés, sont en faveur des multiples rôles que peuvent jouer les TRIM dans la cellule et montrent la difficulté de les étudier et de déterminer

clairement leur implication dans le métabolisme cellulaire. En particulier, dans la mesure où TRIM21/Ro52 est un auto-antigène qui reconnaît la région Fc des IgG et pourrait de ce fait présenter une activité de restriction virale intéressante. Il a en effet été montré que, lors de l'infection par un Adenovirus marqué par des anticorps, TRIM21/Ro52 se fixe aux particules entrant dans la cellule et entraîne leur dégradation par le protéasome par son activité E3 ubiquitine ligase. Cette réactivité avec les IgG l'implique cependant dans certaines maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjögren et le SLE (Systemic Lupus Erythematos).

Régulation négative de la voie des IFN par les TRIM

Une fois la voie des IFN activée, de nombreux facteurs agissent, suite à leur expression par les IFN ou non, afin d'éviter que le système ne s'exprime en excès et ne génère une réponse inflammatoire incontrôlée. TRIM21, lorsqu'il est suscité, présente des effets ambigus, et pourrait être un facteur modérateur de cette voie. D'autres facteurs ont des effets similaires (Figure 24).

TRIM38, par exemple, qui n'est pas un facteur de restriction, est par contre régulée par les IFN de type I et agit au niveau des PRR. Elle reconnaît les branches TRIF en aval de TLR3 grâce à son domaine PRYSRY. Ainsi TRIM38 entraîne la dégradation de TRIF dans le protéasome par une polyubiquitination K48 (Figure 24) (Xue et al., 2012).

D'autres facteurs régulent cette voie à des niveaux plus avancés et de façon sensiblement différente. En effet, chez la souris, TRIM30 α , longtemps considérée comme l'équivalent murin de TRIM5 α , est un élément régulé par les IFN et qui se fixe aux adaptateurs TAB2 et 3 pour entraîner leur dégradation par le lysosome (Figure 24) (McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008).

TRIM27 est une protéine qui présente des effets multiples, également connus sous le nom de RFP (Ret Finger Protein). Elle a été identifiée comme étant un facteur de restriction (Uchil et al., 2008). Toutefois, elle n'est pas induite par les IFN et elle est impliquée dans l'inhibition de cette voie par une interaction avec les IKK. Ces derniers sont des facteurs essentiels pour l'activation de NF κ B et des IRF, TRIM27 semble reconnaître les IKK α , β et ϵ et pourrait ainsi empêcher leur dimerisation avec NF κ B ou IRF3, ce qui entraîne un blocage de leur translocation vers le noyau (Figure 24) (Ozato et al., 2008; Zha et al., 2006).

TRIM11 présente des effets similaires à ce même niveau. Elle n'est pas non plus induite par les IFN et est impliquée de façon ambiguë dans la restriction du MLV. Elle favorise à la fois l'entrée du N-MLV en dégradant TRIM5 α mais elle est aussi responsable de l'inhibition de l'expression de ce même rétrovirus (Uchil et al., 2008). Toutefois, une étude récente a révélé une inhibition des IFN β par la

TRIM11 (Lee et al., 2013). Ce travail a montré une liaison de TRIM11 à TBK1 via une interaction CC qui inhibe la signalisation TBK1 sans entrainer sa dégradation par le protéasome (Figure 24).

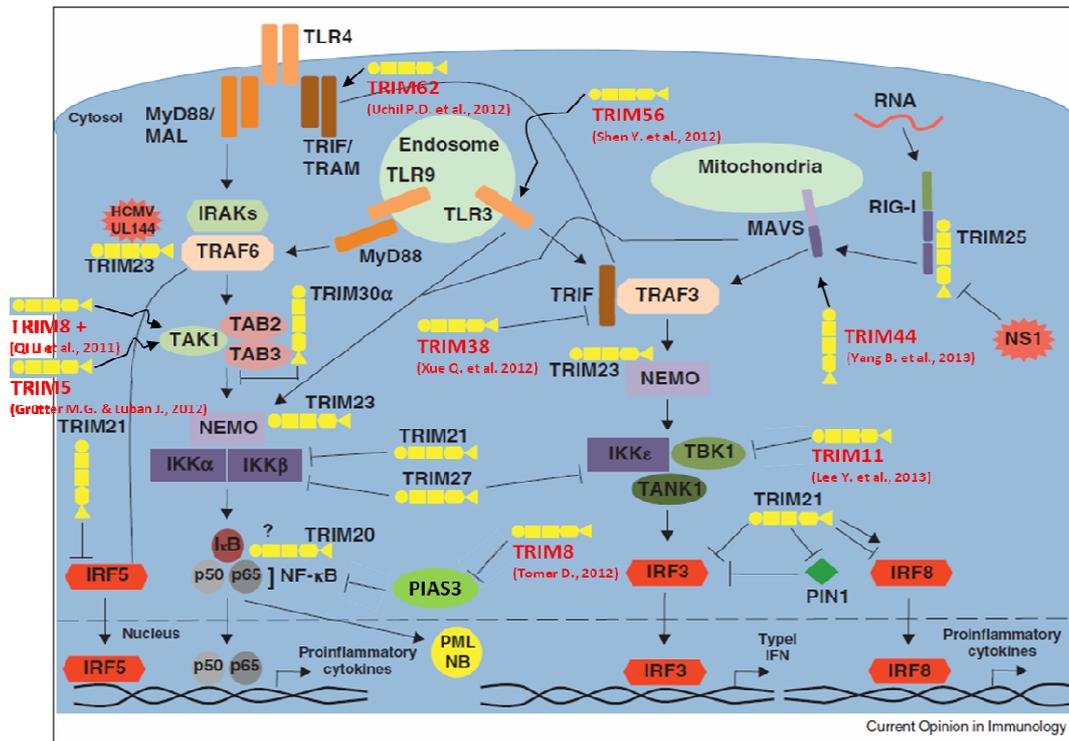


Figure 24 : Schéma de l'implication des TRIM dans la voie de signalisation des IFN.

Schéma issu de l'article de McNab FW et al, 2011, complété des données issues des publications récentes (noms indiqués en rouge et publications cités entre parenthèse). Les senseurs PRR (TLR ou RIG-I) détectent le pathogène entrant et déclenche les voies de l'immunité innée par l'activation des protéines TRAF. Ce qui mène à l'activation des IRF et de NF-κB permettant l'expression des cytokines, dont les IFN. Les protéines TRIM (en jaune) sont des ISG dont l'expression des gènes est induite par l'intermédiaire des IFN et la voie JAK/STAT. A leur tour ces protéines TRIM vont pouvoir activer (flèches) et/ou inhiber (connecteur barré) les différents facteurs de cette voie de l'immunité innée. Cette régulation complexe pourra favoriser la restriction d'un pathogène ou moduler cette voie afin d'empêcher un emballement pouvant mener à une auto-inflammation.

6.2.2.3. L'importance des TRIM dans la cellule

L'ensemble de ces facteurs bloque de différentes manières les étapes de la voie de signalisation de NFκB et des IRF et semble ainsi favoriser l'infection par les pathogènes. Toutefois, cette voie reste très complexe et une dérégulation de l'un de ces éléments peut mener à des maladies auto-immunes. Cette régulation est donc cruciale pour l'homéostasie de ce système. En effets, les expériences menées sur les souris concernant TLR TRIM21, génèrent, dans le cas de mutant double négatif, un développement présentant des symptômes similaires à la SLE. Par ailleurs, certaines études concernant ces maladies chez l'homme ont montré l'implication de la surexpression de certaines TRIM effectrices de la voie des IFN (Jefferies et al., 2011; Sjöstrand et al., 2012) ou encore l'implication de la mutation du domaine PRYSPRY de TRIM20/PYRIN dans le syndrome FMF (Fievre Méditerranéenne Familiale) (Grutter et al., 2006; McNab et al., 2011).

Objectifs de la thèse

L'approfondissement des connaissances des interactions entre les virus et leur hôte a permis de définir le concept de restriction virale en relation avec l'existence de facteurs de restriction. Ces facteurs de restriction ont d'abord été caractérisés chez les espèces modèles (souris, homme) même si certaines caractérisations ont également été réalisées chez les artiodactyles, en particulier chez le porc.

L'objectif de la présente thèse est par conséquent d'étudier les facteurs de la restriction virale intervenant dans l'infection du porc par le PERV et d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de contrôle cellulaire de l'hôte sur ce rétrovirus endogène. En particulier dans la mesure où celui-ci a pu être sujet à une réémergence et qu'aucune pathologie ne lui est associée chez le porc.

La première stratégie entreprise a visé à caractériser les macromolécules potentiellement impliquées dans la restriction rétrovirale chez le porc. Elle s'est fondée sur la création d'une banque d'ADNc du porc d'une complexité suffisamment exhaustive pour permettre de réaliser un criblage de l'ensemble des facteurs potentiellement impliqués dans une résistance du porc à l'infection par le PERV. Le niveau attendu de complexité de la banque n'ayant pas été atteint, la stratégie a par la suite été révisée et réorientée vers une étude ciblée des facteurs de restriction déjà identifiés chez d'autres mammifères et potentiellement impliqués dans la restriction du PERV.

Notre choix s'est porté sur les protéines TRIM qui restent largement inexplorées chez le porc. De plus la mise en évidence de leur implication dans le système immunitaire inné a conduit en 2008 à une étude exhaustive des membres de cette famille et tout particulièrement des interactions entre les protéines TRIM et les rétrovirus chez l'homme et chez la souris (Uchil et al., 2008).

Mothes et son équipe ont travaillé sur 36 protéines humaines et 19 protéines murines et ont montré que 20 de ces protéines sont impliquées dans la restriction du MLV et du HIV-1. Sachant que de nombreuses analogies existent entre le B-MLV (Murine Leukemia Virus de tropisme de type B) et les PERV répliatifs (ce sont des gamma-rétrovirus qui ont un tropisme de type B), l'hypothèse avancée est qu'une partie de la restriction rétrovirale exercée vis-à-vis du PERV est probablement médiée par des membres de la famille TRIM (Tripartite Motif).

Ainsi des orthologues porcins ont été sélectionnés par homologie de séquences aux protéines TRIM bovines, humaines et murines intervenant dans la restriction rétrovirale du B-MLV. L'étude de leurs effets sur le cycle rétroviral des PERV répliatifs a été réalisée dans des cellules d'origine humaine. Les connaissances bibliographiques de ces protéines sont synthétisées ci-dessous dans le tableau 4.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets des protéines TRIM étudiées dans cette thèse.

FBIII = Fibronectine de type III ; FR = Facteur de restriction ; ES = cellules souches embryonnaires ; DéUb = déubiquitination.

Protéines	Classe	Domaines C-ter	Stimulation par les IFN	Activité	Références
TRIM1	I	COS+FBIII +B30.2	Non	FR MLV, cible NF-κB	Uchil et al. 2008 & 2012
TRIM5α	IV	B30.2	IFN-I et II	PRR (active TAK1)+ FR (cible CA MLV et VIH)	Grütter et al., 2012
TRIM8	V	ING?	IFN-I et II	Inhibe SOCS-1 ; inhibe PIAS3 (ES) ; active TAK1	Toniato et al., 2002 ; Tomar et al., 2012 ; Li et al., 2011
TRIM11	IV	B30.2	Non déterminé	Inhibe TRIM5α ; inhibe TAK1 ; FR MLV et HIV (expression et relargage)	Uchil et al., 2008 ; Lee et al., 2013
TRIM27	IV	B30.2	Non	Inhibe IKK ; FR MLV et HIV (relargage)	McNab et al., 2011 ; Uchil et al., 2008
TRIM44	NC	∅	Non déterminé	DéUb protéines cibles (ZF-UBP) stabilise VISA et FR NDV, VSV et SeV	Urano et al., 2009 ; Yang et al., 2013

Matériel et Méthodes :

Partie I : Criblage des facteurs de restriction du porc

1. Validation des outils de la stratégie de criblage : l'outil de mesure de l'infection par le PERV-A/C

Le criblage de la banque est réalisé selon un paramètre particulier, la résistance à l'infection par le PERV-A/C. Cela nécessite de construire un outil spécifique à cette étude qui est développé à partir du PERV-A/C, clone AY570980, fourni par Y.Takeuchi.

1.1. Construction d'un PERV-A/C exprimant la GFP

Le criblage de la banque de cDNA nécessite l'utilisation d'un outil robuste et parfaitement maîtrisé. La capacité du PERV-A/C-TK à exprimer les transgènes insérés est préalablement testée par l'utilisation d'un transgène dont l'expression peut être facilement quantifiée. L'expression du gène de la GFP, en remplacement du gène de la TK, peut être mise en évidence par détection de la fluorescence par microscopie à fluorescence ou par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Le succès de ces constructions passe donc par une maîtrise préalable d'un vecteur construit sur la base du PERV-A/C et exprimant efficacement la GFP.

Une équipe de chercheurs coréens a construit un vecteur PERV-A GFP qui exprime efficacement la GFP (Park et al., 2010). Cette stratégie est reprise pour réaliser un PERV A/C co-exprimant la GFP par insertion d'une cassette en aval du gène *env* et contenant la séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) de l'encephalomyocarditis virus (ECMV) en amont du gène de la GFP (Figure 25).

L'insertion de la cassette nécessite l'ajout de deux sites de restriction uniques, MluI et Sall, en 3' du gène *env* (Figure 25). Ceci est réalisé par une mutagenèse dirigée en utilisant le kit « QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit » (Agilent Technologies). La cassette IRES-EGFP est extraite du vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) par une amplification PCR avec l'amorce sens oGVB3183-F : ACGCGTGAAGCTGGCCGCTAGCCCGGATCCGCCCTCTCC-3', permettant d'ajouter le site unique MluI en 5' de la cassette et l'amorce anti-sens oGVB3183-R : GTCGACCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG-3', permettant d'ajouter le site unique Sall en 3' de la cassette. Celle-ci est ensuite insérée en aval du gène *env* après la double digestion MluI et Sall du vecteur et de l'insert. La ligation de l'insert dans le vecteur est réalisée par l'activité de la T4 DNA ligase (Biolabs) (Figure 25). Après transformation dans les bactéries *E.coli* XI1BlueMRF', l'intégrité de l'insertion et de la séquence de l'ensemble du vecteur est confirmée par séquençage.

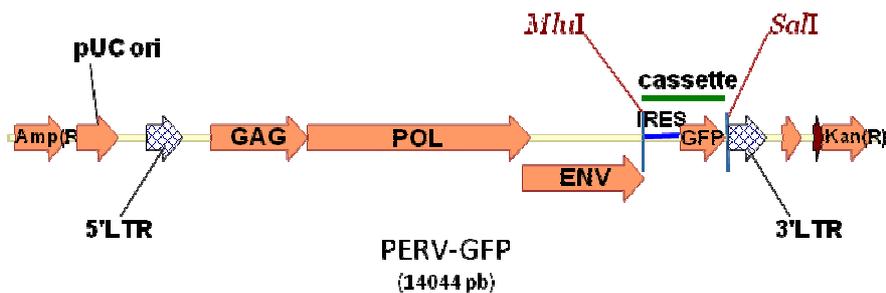


Figure 25 : schéma du PERV-GFP correspondant au vecteur PERV-A/C IRES-GFP.

La construction s'inspire des travaux de l'équipe de S.H. Park (Park et al., 2010). Les sites de restrictions MluI et Sall ont été additionnés par mutagenèse dirigée aux extrémités de la cassette IRES-EGFP dans le vecteur pIRES2-EGFP (Clontech), ainsi qu'à l'extrémité 3' du gène Env dans le vecteur PERV-A/C. La cassette est insérée en sens dans le vecteur PERV, après digestion enzymatique des sites uniques MluI et Sall et par une réaction de ligation.

1.2. Production de particules PERV infectieuses

Afin de pouvoir infecter les lignées cellulaires de l'étude de façon reproductible, une lignée cellulaire stable productrice de particule PERV-GFP est réalisée à partir de cellules HEK293. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits à $2,5 \times 10^5$ cellules/puits. Après 24h d'incubation, elles sont transfectées avec $10\mu\text{g}$ de vecteur PERV-GFP par la méthode de lipofection (Lipofecatime LTX Reagent, Invitrogen). Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence puis passées et récoltées 48h post transfection pour évaluer le niveau de transfection par cytométrie de flux (FC500MPL, Beckman).

1.3. Infection des cellules HEK293 par un surnageant infectieux PERV

Des essais préliminaires d'infection sont réalisés sur les trois lignées de l'étude, les HEK293, les PK15 et les ST-IOWA. L'expérience est réalisée en triplicata pour les inoculum non concentrés (NC) et en duplicata pour les inoculum concentrés. Les cellules sont ensemencées à 8×10^4 cellules par puits dans des plaques 12 puits. Après 24h, le surnageant des cellules productrices PERV est récolté puis filtré avec un filtre de $0,45\mu\text{m}$. 20ml de surnageant sont ultra centrifugés à 22000g pendant 2h à 4°C et les culots sont resuspendus dans 2ml de DMEM complet (5%SVF + 1% Peni/Strepto). Le milieu de culture des cellules est ensuite changé avec 1ml d'inoculum concentré ou non et additionné de polybrène pour une concentration finale de $8\mu\text{g/ml}$ par puits. Au bout de 24h post infection (pi), le milieu des cellules est changé et remplacé par du milieu frais.

1.4. Construction des outils de criblage de la banque

Ce PERV-GFP permet d'obtenir des particules infectieuses capables d'exprimer la GFP. Sur la base de ce vecteur PERV-A/C-IRES-GFP, des constructions sont réalisées afin de tester l'efficacité de la sélection des populations cellulaires sensibles ou résistantes à l'infection. Le gène de la GFP est remplacé par un des gènes de sélection identifié pour l'étude : -le gène de la TK, entraînant la mort

des cellules en présence de GCV, -le gène de la puromycine acétyltransférase (PAC) ou celui de -l'hygromycine B phosphotransférase (HP) (Figure 26). Ces deux derniers gènes entraînent, respectivement, la dégradation de la puromycine et de l'hygromycine et permettent, sous pression de sélection, de conserver les cellules infectées résistantes à ces antibiotiques ce qui entraîne un enrichissement de la population cellulaire infectée.

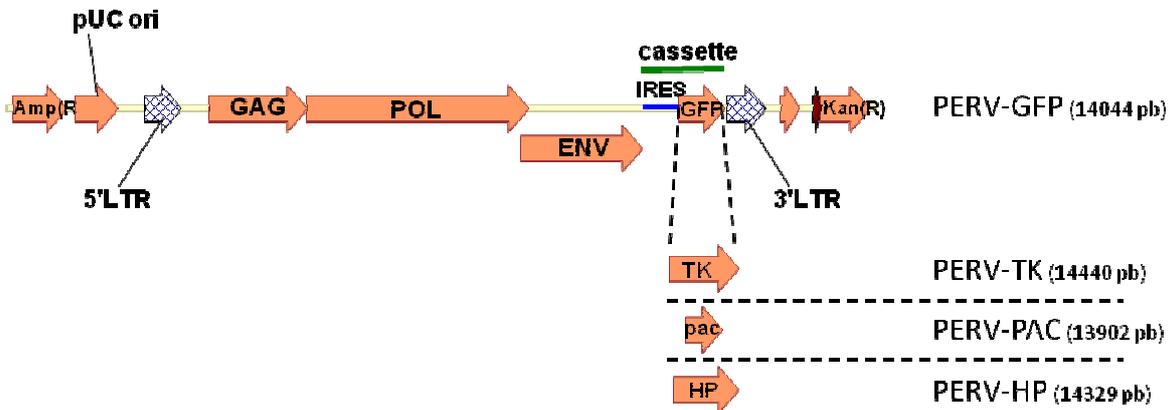


Figure 26 : vecteurs de sélection construits sur la base du PERV-GFP.

Le gène de la GFP du vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) est remplacé par les gènes de sélection TK, PAC ou HP. Ces différentes cassettes sont insérées dans le PERV-A/C de façon similaire que pour construire le PERV-GFP. Les vecteurs PERV-TK, PERV-PAC et PERV-HP correspondent aux vecteurs PERV-A/C ayant reçue respectivement les cassettes IRES-TK, IRES-PAC et IRES-HP. Celles-ci permettent respectivement l'expression de la thymidine kinase (TK), de la puromycine N-acétyltransférase (PAC) et de l'hygromycine phosphotransférase (HP).

2. Construction d'une banque d'ADNc

S.T. Valente et S.P.Goff utilisent dans leur stratégie une technique simple de transcription inverse des ARNm (Valente and Goff, 2009) (Figure 27). En théorie, cette technique permet de générer une quantité d'ADNc de 50 à 500ng et une complexité de banque de l'ordre de 10^6 à 10^7 clones par réaction (CFU/R°) après insertion dans le vecteur d'expression pBabe-HAZ (Figure 27). Le bruit de fond toléré pour ce clonage doit être de l'ordre de 10^3 CFU/R°.

Pour contrôler les différentes étapes de la production de la banque et évaluer la quantité d'ADNc obtenu, la technique d'origine prévoit un dosage par la radioactivité des cDNA. Le laboratoire ne disposant pas de cette technique, le dosage se fait par Bioanalyser (Agilent). Un échantillon à chaque étape du procédé est ainsi dosé. Cependant, le Bioanalyser possède une limite de détection de 25ng/ μ l. Le rendement théorique étant de 50 à 500ng, cela annonce un probable dépassement de la limite inférieure de détection dans les étapes finales en fonction de la concentration de l'échantillon analysé.

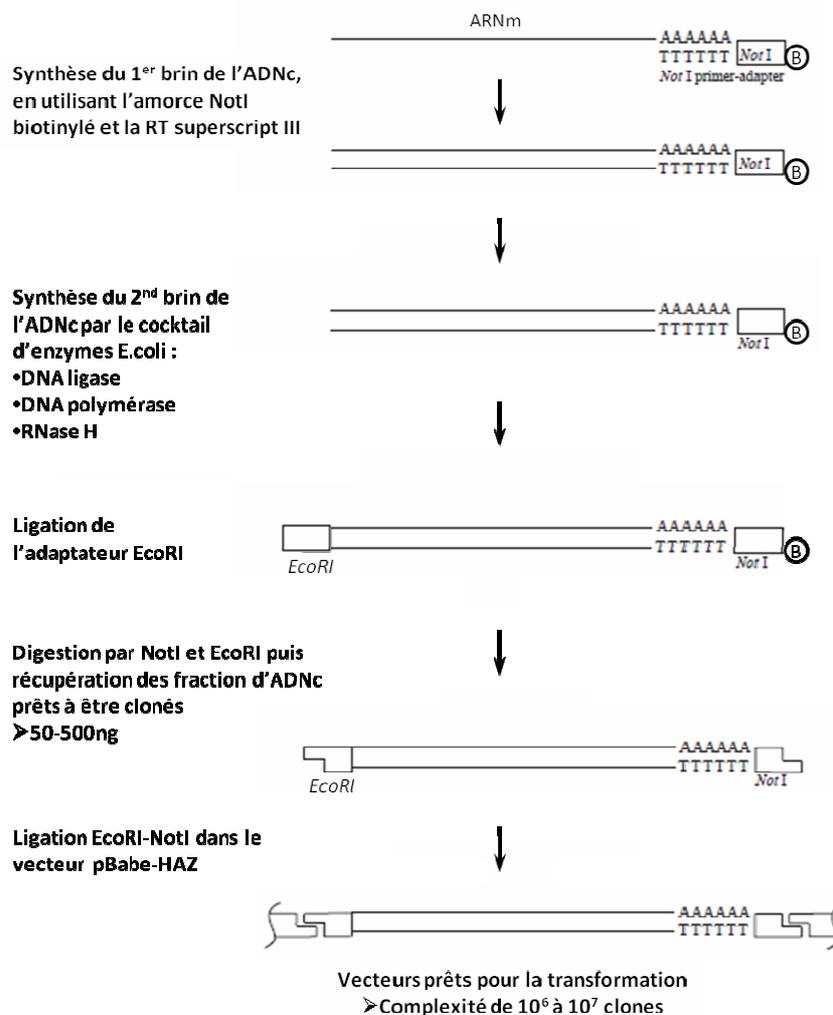


Figure 27 : Etapes de la synthèse des ADNc des ARNm du porc.

Cette méthode est adaptée du protocole de S.T. Valente et S.P. Goff. L'ADNc est synthétisé en 2 étapes. La première fait agir une reverse transcriptase en présence d'une amorce polyT contenant le site de restriction NotI. La seconde, grâce à un cocktail d'enzymes, dégrade l'ARN, synthétise le brin complémentaire et répare les jonctions inachevées. Le B encadré correspond à la biotine ajoutée à l'extrémité de l'amorce NotI, elle favorise la ligation de l'adaptateur EcoRI à l'extrémité 5' de l'ADNc. Les ADNc ainsi achevés sont digérés avec les enzymes EcoRI et NotI pour pouvoir être insérés dans le vecteur d'expression eukaryote pBabe-HAZ.

2.1.Extraction des ARN messenger

Dans un premier temps, les ARN totaux sont extraits des cellules PK15 par la méthode d'extraction des ARN au TRIzol. Il s'agit d'une méthode d'extraction au phénol chloroforme réalisée en condition acide (pH 4-6), ce qui permet de récupérer les ARN dans la phase aqueuse qui sont séparés de l'ADN (phase organique et interphase) et des protéines (interphase).

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lysées par ajout de 1ml de réactif TRIzol (phénol coloré) par 9,4cm² de surface de culture cellulaire. Les lysats sont additionnés de 200µl de chloroform:isoamylalcohol (24:1) par ml de TRIzol. Après agitation puis décantation par centrifugation (12.000g 15min à 4°C), la phase aqueuse qui contient les ARN totaux est récupérée.

Pour précipiter les ARN, 500µl d'isopropanol glacé sont ajoutés par 1ml de TRIzol utilisé initialement puis le mélange est incubé au moins 15min à -20°C et centrifugé pendant 10min à 12.000g à 4°C. Les ARN ainsi précipités sont lavés à l'éthanol (70%) puis repris dans 50µl d'eau exempte de RNase.

Enfin, les ARNm sont purifiés des ARN totaux en utilisant et en suivant les recommandations du kit d'extraction Oligotex (Qiagen).

2.2. Transcription inverse des ARNm

La synthèse du premier brin nécessite l'utilisation de la RT Superscript III (Invitrogen) en suivant les recommandations du fabricant. Cette réaction est amorcée avec l'amorce NotI biotinylé et contenant une queue poly T (5'Biotin-GGGGGCGGCCGC(T)₂₂VN-3'). L'amorce est préalablement hybridée aux ARNm par une incubation à 70°C pendant 7min suivie d'un refroidissement lent et graduel de 0,1°C par seconde, jusqu'à la température de 45°C. Le mix réactionnel de la transcription inverse est ensuite ajouté dans le tube maintenu à 45°C. La synthèse est réalisée au thermocycler sur trois incubations successives de 45°C pendant 20min, 50°C pendant 30min et 55°C pendant 30 min.

Pour la synthèse du second brin, ce premier mix réactionnel est additionné d'un cocktail d'enzymes d'origine bactérienne et son tampon (DNA Ligase, DNA polymérase et RNase H d' *E. coli*), la réaction est réalisée à 16°C pendant 2h. Puis elle est achevée et complétée par l'ajout d'une T4 DNA polymérase pendant 5 minutes à 16°C.

Les ADNc ainsi synthétisés sont purifiés de leur mix réactionnel au phénol chloroforme à pH neutre (7-8) (phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) puis ils sont précipités de la phase aqueuse à l'acétate d'ammonium glacé (7,5M) pendant une incubation d'1h à -80°C suivie d'une centrifugation à 14.000g de 30min à 4°C. Ils sont ensuite lavés à l'éthanol 70% et sont enfin repris dans 34µl d'eau exempte de RNase.

2.3. Ajout de l'adaptateur EcoRI et préparation des extrémités des ADNc

A l'issue de la synthèse du second brin, les ADNc présentent une extrémité franche en 5' et une extrémité flanquée de l'adaptateur NotI en 3' biotinylé (Figure 27). Pour réaliser le clonage dans le vecteur pBabe-HAZ, un adaptateur contenant le site de l'enzyme de restriction EcoRI est ajouté en 5', la biotine de l'adaptateur NotI l'empêchant de se fixer à l'extrémité 3' des ADNc.

Les oligonucléotides de l'adaptateur sont préalablement hybridés l'un à l'autre et forment le dimer suivant :



Le brin anti-sens est complété d'un phosphate à son extrémité 5' pour faciliter sa ligation aux extrémités franches des ADNc. La réaction de ligation est ensuite réalisée à 16°C pendant 16h, en présence de l'enzyme T4 DNA ligase (Biolabs).

Le produit de ligation est purifié des réactifs de la réaction par une extraction au phénol chloroforme suivie d'un lavage à l'éthanol à 70% comme décrit précédemment (voir partie « Transcription inverse des ARNm »). Enfin, le produit de ligation est repris dans 78µl d'eau exempte de RNase pour être digéré dans une même réaction pendant 3h à 37°C par les enzymes de restriction NotI et EcoRI de haute fidélité (Biolabs) dans le tampon 4 du fournisseur.

2.4. Fractionnement par la taille de la population des ADNc par chromatographie d'exclusion

Les ADNc synthétisés et préparés pour les adaptateurs EcoRI et NotI sont ensuite passés sur une colonne de chromatographie d'exclusion. Celle-ci piège les résidus d'amorces et d'adaptateurs ainsi que les fragments incomplets d'ADNc (<500pb) et permet de séparer les ADNc en fonction de leur taille. L'éluat est fractionné en trois parties, la première fraction permettant d'éliminer le tampon et les composants de l'étape précédente. Les ADNc de grande taille de 1 à 2 kb (kilobases) contournent facilement la résine et sont peu retenus, ainsi ils sont élués dans la seconde fraction. Les ADNc de taille intermédiaire, de 500 à 1000pb (paires de bases), sont davantage retenus par la résine mais ont une taille suffisamment importante pour ne pas être piégés dans les pores de la résine, ils sont donc élués dans la fraction 3.

2.5. Clonage des ADNc dans le vecteur d'expression pBabe-HAZ

Le vecteur pBabe-HAZ est préalablement linéarisé par la même double digestion utilisée pour la préparation des ADNc. Les vecteurs linéaires sont purifiés des fragments issus de la digestion, par extraction de gel avec le kit QIAEXII (Qiagen). L'extraction est réalisée sans exposition au UV ni ajout de BET (Bromure d'Éthidium).

Théoriquement, la fraction 2 suffit à générer une banque d'une complexité de 10^6 clones mais, afin d'accroître nos chances de réaliser une banque suffisamment complexe, les deux dernières fractions sont utilisées pour le clonage.

Avant de procéder au clonage, le vecteur linéarisé et les ADNc sont mélangés ensemble pour obtenir le ratio molaire optimisé vecteur:insert de 2:1. Ainsi pour 720ng d'ADNc, 4,65µg de vecteurs linéarisés sont ajoutés. Le mélange est ensuite précipité à l'acétate d'ammonium glacé (7,5M) puis lavé à l'éthanol à 70% comme décrit précédemment. Enfin le culot ADNc + vecteur est repris dans 80µl d'eau ultra pure. La réaction de ligation est ensuite réalisée à 16°C pendant 16h, en présence de 5µl de T4 DNA ligase (Biolabs) à 400U/µl, 10µl de tampon 10X et 5µl d'ATP (20mM).

Enfin le produit de ligation est utilisé pour transformer les bactéries XL1 Blue MRF' (Stratagen) par électroporation. Pour cette étape, afin d'éviter la production d'arc électriques, le produit de ligation est préalablement purifié du mix réactionnel par une extraction au phénol chloroforme suivie d'un lavage à l'éthanol à 70%, comme décrit précédemment. Le culot d'ADN est repris dans 5µl d'eau ultra pure puis réparti dans trois tubes contenant chacun 40µl de bactéries électrocompétentes. L'électroporation est ensuite réalisée dans des cuves d'électroporation de 0,1cm, à 1,8kV/mm, 25µF et 200Ω.

Après avoir été reprises dans 1ml de milieu de culture SOC (Super Optimal Catabolite), une série de trois dilutions au 1/10 des bactéries transformées est préparée dans 1ml de SOC chacune. Puis 200µl de chaque série sont étalés sur du LB agar contenant 100µg/ml d'ampiciline. Les bactéries sont ensuite ensemencées de 16-24h à 30°C.

La détermination de la complexité de la banque est obtenue par le calcul du nombre de colonies qui résultent de l'étalement de l'intégralité des 3 ml de bactéries transformées. Le résultat est déterminé en comptant les colonies ayant poussé sur les boîtes de Pétri de la gamme des bactéries diluées. Le calcul utilisé est le suivant :

$$Y = (N \times 5) / v = (N / d) \times 5^E - 3$$

$$\text{Complexité} = Y \times 3000$$

N = Nombre de cellules dans 200µl (=>CFU)

N x 5 = Nombre de cellules dans 1ml de milieu SOC

d = facteur de dilution

v = 1000 x d (en µl)

Y = nombre de colonies par µl (de 1ml de SOC)

Partie II : Etude de la restriction virale par les TRIM

1. Stratégie de mise en évidence d'une activité des protéines TRIM porcines sur le cycle réplcatif des PERV

La spécificité de l'action des protéines TRIM sur la réplication des PERV est étudiée par l'expression et la modulation dirigée du niveau d'expression des facteurs TRIM dans un système cellulaire hétérologue. Pour cela, deux techniques sont mises en œuvre : d'une part une technique d'expression/surexpression de ces facteurs par transfection dans un modèle cellulaire sensible à l'infection PERV, tel que les HEK293 et, d'autre part, une technique de répression de l'expression, induite ou non, par atténuation de l'expression des TRIM par une méthode d'ARN interférence (Dieckhoff et al., 2008). La mise en évidence de l'activité des ces TRIM sur le PERV est visualisée par l'outil de génétique inverse exprimant la GFP et construit sur la base du PERV-A/C lors de la stratégie de criblage des facteurs de la restriction chez le porc.

La stratégie mise en place nécessite donc la création et la validation de trois types d'outils :

- Le vecteur d'expression des différents gènes TRIM étudiés ;
- Le vecteur d'expression des shRNA dirigés spécifiquement contre ces mêmes TRIM ;
- Un outil PERV-A/C.

1.1.Expression des Protéines TRIM.

Les séquences codantes des différentes protéines TRIM porcines sélectionnées sont extraites de cellules de porc avant d'être clonées dans le vecteur d'expression eucaryote le pcDNA3.1/V5-His. Ce vecteur permet une expression stable des gènes candidats par une sélection au G418 des cellules transfectées. De plus les gènes candidats se retrouvent marqués par l'épitope V5 et le marqueur poly-histidine en C-terminale de la protéine. Ce qui permet le marquage des différentes protéines exogènes par la méthode Western Blot en utilisant des anticorps commerciaux (Figure 28).

Expression des TRIM

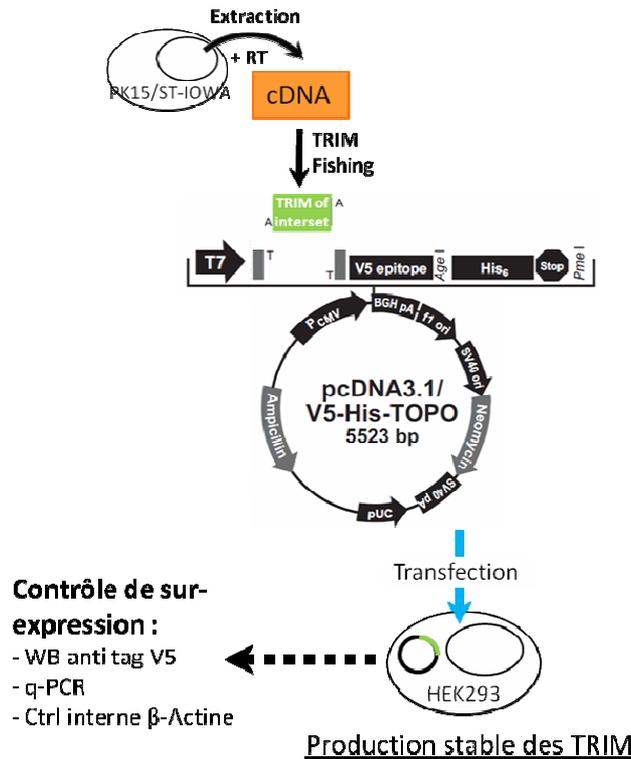


Figure 28 : Schéma de la stratégie de surexpression des TRIM dans les cellules HEK293.

Les ARNm codant pour les protéines TRIM d'intérêts sont extraits de cellules porcines puis rétro-transcrits en ADNc. Le gène est ensuite cloné dans un vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA et la bonne orientation de l'insertion est vérifiée par séquençage. Les vecteurs construits sont amplifiés dans les bactéries *E.coli* TOP10 puis, après extraction, sont transfectés séparément dans des cellules HEK293. Ces cellules sont soumises à une pression de sélection au G418 afin de constituer des lignées cellulaires exprimant de façon stable chacune des protéines TRIM de l'étude.

1.1.1. Construction des vecteurs d'expression eucaryotes des TRIM

Les séquences nucléiques des protéines TRIM sélectionnées pour l'étude sont récupérées à partir des ARNm des cellules PK15 ou ST-IOWA. Une transcription inverse précède donc l'amplification spécifique de la séquence cible par une PCR à activité terminale transférase qui permet ensuite le clonage des séquences dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His TOPO-TA.

L'extraction des ARN totaux puis des ARNm et l'étape de transcription inverse sont réalisées comme précédemment décrit pour la construction de la banque d'ADNc du porc (cf. § 3.1.Extraction des ARN messagers et 3.2.Transcription inverse des ARNm).

1.1.1.1. Amplification des séquences codantes des TRIM d'intérêt

Les séquences codantes des TRIM d'intérêt sont amplifiées par une PCR à activité terminale transférase à partir des ADNc des PK15 ainsi produits. Les amorces utilisées sont spécifiques de chaque extrémité de la séquence codante, ainsi les amorces sens contiennent le codon initiateur et

les amorces anti-sens permettent d'éliminer le codon stop dans la partie 3' du gène (Tableau 5). Ces amorces sont désignées à partir des séquences identifiées dans les bases de données (Tableau 12 partie résultats).

Les PCR ont été réalisées en suivant les conditions prescrites par Invitrogen pour l'utilisation de la Platinum Taq polymérase High Fidelity (Tableau 6). Dans le cas de séquences riches en bases Guanine (G) et Cytosine (C), le milieu réactionnel est additionné de 5% de DMSO, ce qui est le cas des TRIM8 et 11 (plus de 60% de GC). Les séquences codantes des protéines TRIM sélectionnées ont ainsi été amplifiées à partir des ADNc des ARNm des PK15 et des cellules ST-IOWA pour TRIM44 (Figure 29).

Tableau 5 : récapitulatif des amorces utilisées pour le clonage des séquences TRIM d'intérêt.

TRIM	amorces sens	amorces anti-sens
TRIM1	atggaaacactggagctgaattg	atggcaagctttcatcccag
TRIM5	atggcttcaggcatcctggagaac	agagcccggcgagcacagaatc
TRIM8	atggcggagaattggaagaactgc	gctcgtcacgtagtgttggtg
TRIM11	atggccgccccgactgtccacc	ctggggagccagcatgtc
TRIM27	atggcctccgggagcgtggccgag	aggggaggtctccatggaatg
TRIM44	atggcctccggagggggcgcg	tgtgtcctcttcttctcactg

Tableau 6 : Conditions PCR utilisées pour chaque TRIM d'intérêt à extraire.

PCR = polymérisation chain reaction ; T°Hyb = température d'hybridation en degré Celsius

Conditions PCR		TRIM1	TRIM 5	TRIM8	TRIM 11	TRIM 27	TRIM 44
T° Hyb (°C)		50	55	50	55	55	50
94°C		2	2	1	1	2	2
30x	94°C	15"	15"	15"	15"	15"	15"
	T°Hyb	15"	15"	15"	15"	15"	15"
	68°C	2'15"	1'45"	1'45"	1'45"	1'45"	1'15"
68°C		5	5	5	5	5	5

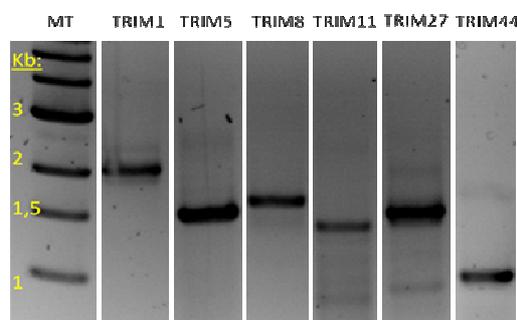


Figure 29 : Profil de migration de l'amplification des séquences génétiques des TRIM d'intérêt.

Les ADNc des protéines TRIM sont amplifiés par PCR à partir du transcriptomes de cellules porcines. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose à 10% permettant de confirmer l'amplification des différentes séquences et de réaliser leur extraction sur gel en vue de les cloner. MT = marqueur de taille ; Kb = Kilo Base.

1.1.1.2. Clonage des séquences codantes des TRIM d'intérêts

La construction de l'outil de sur-expression des TRIM porcines est réalisée à l'aide du kit de clonage InvitroGen pcDNA3.1/V5-His TOPO-TA. Ce kit permet de cloner rapidement un produit PCR Adénylé aux extrémités 3'.

Les séquences amplifiées des ADNc des TRIM sont purifiées par extraction de gel (QIAEXII, Qiagen) et clonées dans le vecteur d'expression eucaryote le pcDNA3.1/V5-His TOPO-TA (Figure 30) selon la procédure présentée par Invitrogen. Après transformation dans les bactéries TOP10, les clones obtenus sont séquencés pour valider l'intégrité, la bonne orientation de la séquence nucléique ainsi que la fusion avec le tag V5-His en 3'. Toutefois, concernant TRIM1, deux isoformes ont été identifiées et arbitrairement nommées α et β . TRIM1 α , initialement identifiée sur Genbank, diffère de l'isoforme β par l'absence d'une séquence de 90 nucléotides au milieu du gène.

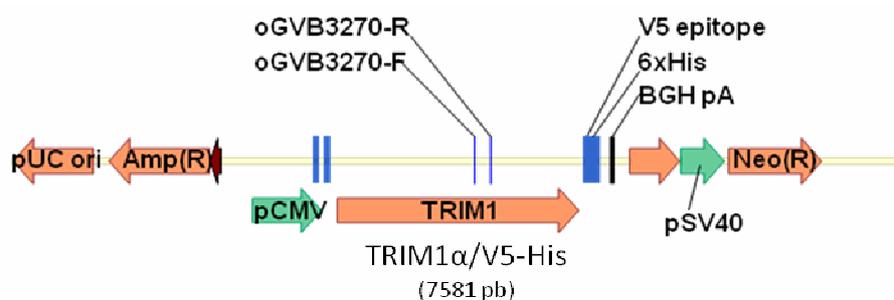


Figure 30 : Schéma du vecteur d'expression eucaryote des TRIM.

Le vecteur de TRIM1 α est présenté à titre d'exemple ; le cas des autres TRIM suit le même modèle. La séquence codante de la protéine d'intérêt est insérée en aval du promoteur universel pCMV (cytomégalovirus), dans le même cadre de lecture. En 3' de la séquence codante, sont fusionnées celles codant pour les marqueurs V5 et Histidine.

A l'issue de ce clonage, les séquences nucléiques TRIM 1 α/β , 5, 8, 11, 27 et 44 se trouvent dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-His. Ces vecteurs sont renommés respectivement : TRIM1 α /V5-His, TRIM1 β /V5-His, TRIM5/V5-His, TRIM8/V5-His, TRIM11/V5-His, TRIM27/V5-His, TRIM44/V5-His.

1.1.2. Construction du mutant TRIM44 Δ Su

La protéine TRIM44 contient dans sa partie C-terminale une séquence putative de fixation des protéines SUMO qui pourrait être impliquée dans une altération de la migration de la protéine en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Un mutant pour ce site putatif de fixation est donc réalisé par mutagenèse dirigée, dans le but de tester son implication dans la modification de la migration de la protéine.

Le site putatif identifié est composé de l'enchaînement des acides aminés P-K-A-E, les protéines SUMO se fixant sur lysine (K) de ce site, en position 327 de la protéine. La substitution de la lysine par une arginine (R) permet d'empêcher cette fixation. La mutation K327R est donc réalisée en utilisant

les amorces de mutagénèse sens et anti-sens : oGVB3605-F (5'-GAATCAGCTGAGCCCGCGGGCAGAGGGCGACG-3') et oGVB3605-R (5'-CGTCGCCCTCTGCCCGCGGGCTCAGCTGATTC-3').

La mutagénèse est réalisée en deux étapes. A partir du vecteur d'expression de TRIM44 (TRIM44/V5-His), deux PCR sont réalisées. L'une amplifiant la partie 5' de la séquence codante de TRIM44 jusqu'au site de la mutagénèse, en utilisant l'amorce sens de TRIM44 (Tableau 6) et l'amorce oGVB3605-R. Et l'autre amplifiant la partie 3' de la séquence codante avec l'amorce anti-sens de TRIM44 (Tableau 6) et l'amorce oGVB3605-F.

Ensuite, une troisième PCR à activité terminale transférase est réalisée à partir du produit d'amplification des deux premières PCR. Les amplicons de la partie 5' et de la partie 3' de la séquence codante sont mélangés et préalablement incubés pour favoriser l'hybridation deux à deux des brins complémentaires des deux fragments. Les amorces sens et anti-sens des extrémités de la séquence codante (Tableau 6) sont ensuite ajoutées pour en permettre l'amplification complète. Ainsi, seuls les amplicons complets et mutés peuvent être amplifiés de cette manière.

Enfin, le produit PCR adénylé est cloné dans le vecteur pCDNA3.1/V5-His-TOPO TA, renommé TRIM44ΔSu. Après transformation dans les bactéries TOP10, les clones obtenus sont séquencés pour valider la mutation du site de fixation des SUMO en 3', l'intégrité et la bonne orientation de la séquence nucléique.

1.1.3. Construction des lignées cellulaires d'expression des TRIM

Les cellules HEK293 sont des cellules humaines sensibles à l'infection par les PERV répliatifs (Bartosch et al., 2004; Takeuchi et al., 1998). Ces lignées sont un outil de choix pour pouvoir évaluer l'effet de la surexpression des protéines TRIM sur le cycle infectieux du PERV-A/C. Ainsi des lignées cellulaires sont-elles réalisées, permettant une expression efficace des différentes protéines sélectionnées. La capacité de ces lignées à exprimer les protéines TRIM est ensuite évaluée par RTq-PCR (Amplification des rétro-transcrits par PCR quantitative) pour l'étape de transcription et par Western Blot pour l'étape de la traduction des protéines. Enfin, la modulation potentielle de la vitesse de croissance de ces lignées cellulaires est vérifiée par le test de viabilité des cellules au MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

1.1.3.1. Transfection des cellules HEK293 par les vecteurs d'expression des TRIM

Les différentes protéines TRIM clonées dans le vecteur pCDNA3.1/V5-His, ainsi que le vecteur contrôle lacZ, sont transfectées dans les cellules HEK293 ; 4 X 10⁵ cellules/puits sontensemencées dans des plaques 12 puits. Après 24h d'incubation, les cellules sont transfectées avec 2μg d'un

vecteur TRIM ou lacZ par une méthode de lipofection (Lipofectamine LTX, Invitrogen). 48h après la transfection, les cellules sont passées et soumises à une pression de sélection au G418 maintenue pendant 30 jours au moins, à une concentration de 0,5mg/ml. Ceci permet de générer des lignées cellulaires exprimant les TRIM de façon constitutive. La pression de sélection est maintenue pour la suite de l'étude mais à un dosage plus faible, 0,1mg/ml au lieu de 0,5mg/ml. Cela permet de réduire l'effet toxique sur les cellules qui pourrait avoir un impact sur le métabolisme des cellules sur le long terme.

1.1.3.2. *Evaluation de la transcription des gènes TRIM*

Les RTq-PCR sont réalisées à partir des ARN totaux extraits des cellules par le kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega). Les séquences des ARNm des différentes TRIM sont quantifiées par l'utilisation d'amorces spécifiques (Tableau 7). La quantification est réalisée par une méthode relative, calculée avec le $\Delta\Delta C_t$ contre le dosage de l'expression du gène ubiquitaire de la β -actine, en présence d'un contrôle négatif. Les quantités relatives (RQ) obtenues sont ensuite rapportées à la lignée de référence de la TRIM considérée.

Tableau 7 : récapitulatif des amorces utilisées pour l'évaluation de la transcription des TRIM d'intérêt dans les différentes lignées cellulaires.

Les amorces ont été construites à l'aide du logiciel Primer Express version 2.0.0 (Applied Biosystems).

TRIM	Nom	amorces sens(F)	amorces anti-sens(R)
TRIM1	oGVB3270	CTCTGTAAGTGCCTCCCATGACA	ATGTTGGGTACAATCATCCAGCTA
TRIM5	oGVB3274	CGGATGTGCGGCGTTACT	TCACCGTTTCGGACATGTAAGT
TRIM8	oGVB3271	TACCCCAATGGCTCCGC	GCCACGGAAGAAGTAACAGTT
TRIM11	oGVB3272	TGCAGAGGATCTCAAGGGAAAG	GCTGGGTCTCCACATTTTCT
TRIM27	oGVB3273	GGAGCAAATCCAGAACCAGC	GGCTCAAGAGTTCAGCTCGTG
TRIM44	oGVB3275	CATGGGCTCGATTTGAGTACCT	CCTTCAATCCGCCTGAGTCTT
lacZ	oGVB3602	TTCGCTACCTGGAGAGACGC	TCATATTTAATCAGCGACTGATCCAC
B-Actine		GATCGTGCCGGACATCAAG	GGCCATCTCCTGCTCGAA

1.1.3.3. *Evaluation de la traduction des protéines*

L'expression des protéines dans les différentes lignées cellulaires est évaluée par la méthode du Western Blot. Afin de pouvoir détecter les protéines par cette méthode, elles sont préalablement extraites des cellules par sonication. Pour ce faire, les cellules sont reprises dans du Laemmli additionné de 4% d'un cocktail inhibiteur des protéases (Roche). Elles sont ensuite soumises pendant 30 secondes à des ultra-sons ce qui permet de libérer les protéines dans la solution de Laemmli. Les débris cellulaires sont ensuite culotés par centrifugation 10min à 20.000g à 4°C et les surnageants sont récupérés.

Pour pouvoir évaluer correctement la taille de la séquence des protéines, elles sont dénaturées 5min à 95°C puis additionnées de 5% de β -mercaptoéthanol. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide à 10%. La migration des échantillons est effectuée pendant 1h30 à 150V.

La détection des protéines est réalisée sur membrane de nitrocellulose. Pour cela, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose alors juxtaposée par une électrophorèse réalisée pendant 1h à 90V. La membrane sur laquelle se trouvent les protéines est incubée pendant 1h dans une solution de TBST (Tris Buffered Saline + 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait et 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) afin de bloquer les sites non spécifiques sur lesquels peuvent se fixer les anticorps (Ac) utilisés. Après lavage de la membrane au TBST, les protéines sont exposées à un Ac I^{aire} anti V5 issu de la souris et dilué au 1/5000 dans une solution de TBST contenant 5% de lait. Ainsi, seules les protéines contenant le tag V5 fixent cette Ac I^{aire}. Après de nouveaux lavages au TBST, les protéines marquées avec l'Ac anti V5 de souris sont exposées à un Ac II^{aire} anti souris couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) et dilué au 1/5000 dans une solution de TBST contenant 5% de lait.

Enfin, la révélation est réalisée en chambre noire sur un film photographique (Kodak) avec les réactifs de révélation ECL Prime (Amersham). Ces deux réactifs sont mélangés à volume égal et déposés pendant 5 minutes sur la membrane marquée par les Ac I^{aire} et II^{aire}. Ces réactifs contiennent du luminol qui, lors de sa catalyse par l'HRP de l'Ac II^{aire}, émet un signal chimioluminescent. Lorsque la membrane est mise en contact avec un film photographique, celui-ci est marqué par le signal émis au niveau des Ac II^{aire} indirectement liés aux protéines d'intérêt.

1.1.3.4. Evaluation de la croissance des différentes lignées cellulaires TRIM

La capacité de croissance des différentes lignées HEK293-poTRIM et la lignée contrôle HEK293-lacZ est évaluée par un test MTT et comparée à la croissance de la lignée sauvage HEK293-WT sur une durée de 72h. Les différentes lignées cellulaires sontensemencées dans 3 plaques de 96 puits indépendantes. A 24, 48 ou 72h après ensemencement, une plaque est utilisée pour le test de prolifération. Le milieu est changé pour 100 μ l de DMEM additionné de 0,5mg/ml de solution de MTT. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4h à 37°C dans une atmosphère à 5%CO₂. Les cellules viables réduisent ainsi le MTT pour former des cristaux de formazan dans les mitochondries. L'ensemble est dissous dans 100 μ l d'une solution de lyse (isopropanol et HCl 23:1) et homogénéisé sur un agitateur de plaque. L'absorbance est lue à 570nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaque de 96 puits.

1.2.ARN Interférences.

La seconde stratégie utilise les mécanismes des ARN interférant existant naturellement dans les cellules eucaryotes. Ceci consiste à élaborer les shRNA (short hairpin RNA = petits ARN en épingle à cheveux) ciblant chaque ARNm TRIM. Les oligonucléotides codant pour les shRNA sont synthétisés puis clonés dans un vecteur d'expression (psiRNA-h7SKhygro). Ce vecteur permet une expression stable des shRNA sous une sélection à l'hygromycine. Le niveau de l'efficacité de l'atténuation de l'expression des gènes ciblés est visualisé par q-PCR spécifique des gènes concernés (Figure 31).

Knockdown des TRIM

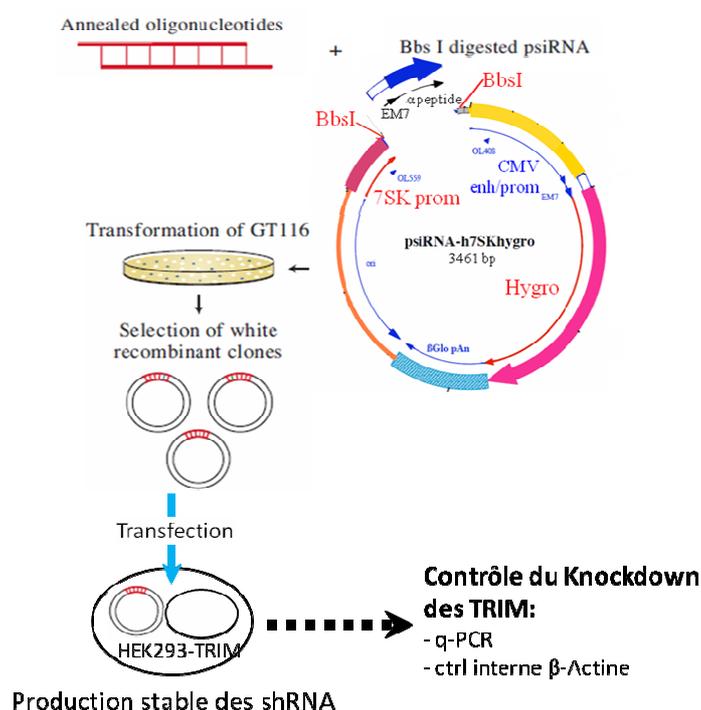


Figure 31 : schéma de la stratégie par atténuation de l'expression des TRIM dans les cellules HEK293 exprimant les différentes TRIM d'intérêt.

Des séquences ADN codantes pour des shRNA spécifiques des protéines TRIM de l'étude sont élaborées avec les outils bioinformatiques d'InvivoGen et de [GenScript](#). Les oligonucléotides ainsi construits sont insérés dans un vecteur d'expression des shRNA (psiRNA-h7SKhygro) après une digestion par l'enzyme BbsI suivie d'une ligation. Ces vecteurs sont amplifiés dans les bactéries GT116 puis transfectés dans les cellules HEK293 exprimant les différentes protéines TRIM. Ainsi les shRNA exprimés peuvent bloquer spécifiquement l'expression des protéines TRIM ciblés. L'efficacité de cette atténuation (knockdown) est évaluée par q-PCR.

1.2.1. L'atténuation de l'expression des gènes des TRIM par les ARN interférant.

L'atténuation de l'expression des TRIM est réalisée en utilisant le kit psiRNA-h7SKhygro G1 (InvivoGen). Trois éléments sont nécessaires pour constituer un shRNA (Figure 32) :

- Une séquence de 19-21 nucléotides spécifique du gène cible, appelé brin guide ;
- Une séquence complémentaire au brin guide, appelé brin passager ;

- Une séquence liant les 2 premières permettant la formation de la boucle de l'épingle à cheveux.

Il existe un biais concernant les ARN interférant, le phénomène dit de « *off-target* ». Il s'agit essentiellement d'un ciblage non spécifique du siRNA formé. Ceci est dû à une complémentarité d'une partie de la séquence du brin guide, nommée la « *seed région* », sur des séquences 3'UTR des ARNm de l'organisme cible. En comparant ces séquences à partir d'une banque génomique de l'organisme concerné, l'outil informatique génère des séquences de shRNA n'ayant pas d'aspécificité de cible.

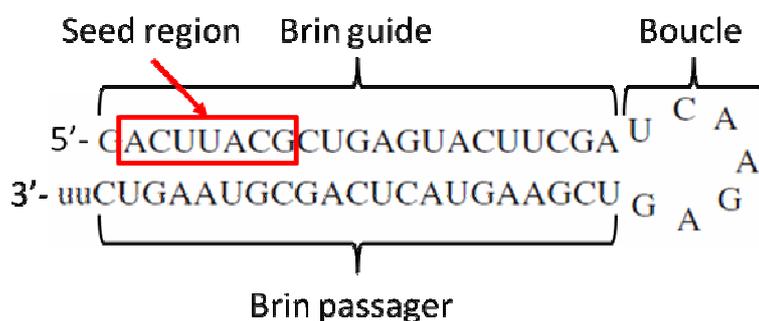


Figure 32 : schéma d'un shRNA avant maturation par le complexe Dicer-TRBP-PACT.

Le shRNA est un palindrôme qui forme une épingle à cheveux (tige-boucle). Cette molécule est prise en charge par le complexe Dicer-TRBP-PACT pour sa maturation. Après maturation seul le brin guide d'une 20^{aine} de nucléotides subsiste et est alors associé au complexe RISC-Argonaute. Le brin guide permet la reconnaissance spécifique d'une séquence ARN complémentaire qui est alors dégradé par le complexe RISC-Argonaute.

1.2.2. Construction des vecteurs d'expression eucaryotes des shRNA anti TRIM

La création des séquences des shRNA est réalisée en utilisant les outils informatiques d'InvivoGen (www.sirnowizard.com) et de GenScript (www.genscript.com). Sirnowizard sert à générer les extrémités de la séquence du shRNA, qui permettent le clonage dans le vecteur d'expression et la boucle liant les 2 brins complémentaires. Le reste de la création des séquences est réalisé à l'aide de GenScript qui permet de comparer les séquences de shRNA au génome du porc afin d'éviter les effets « *off-target* » et de créer les « *scrambles* » correspondant.

La construction des séquences nucléiques des shRNA tient compte du fait que l'atténuation d'un gène par un ARN interférant n'est jamais assurée. C'est pourquoi il est conseillé de réaliser au moins 3 shRNA différents pour atténuer efficacement l'expression d'un gène (Tableau 8).

Tableau 8 : Exemple des séquences ADN codant pour les shRNA ciblant les TRIM8 et 11

n°	Position	GC%	Oligo	Séquences shRNA
TRIM08				oGVB3259
1	201	42.86	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGAACCTGAAGCTCACTAACATCAAGAGATGTTAGTGAGCTTCAGGTTCTT 3' 5' CAAAAAGAACCTGAAGCTCACTAACATCTCTTGAATGTTAGTGAGCTTCAGGTTCTG 3'
2	630	47.62	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGCTATACAAGCTCGAGTCAGATCAAGAGTCTGACTCGAGCTTGTATAGCTT 3' 5' CAAAAAGCTATACAAGCTCGAGTCAGACTCTTGAATCTGACTCGAGCTTGTATAGCG 3'
3	1403	42.86	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGTTCTGTGGACAACCTGTTACTCAAGAGAGTAACAGTTGTCCACAGAACTT 3' 5' CAAAAAGTTCTGTGGACAACCTGTTACTCTCTTGAAGTAACAGTTGTCCACAGAACG 3'
TRIM11				oGVB3260
1	1083	52.38	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGAACGCCAACCGTAAGGAGAATCAAGAGTTCTCCTTACGGTTGGCGTTCTT 3' 5' CAAAAAGAACGCCAACCGTAAGGAGAACTCTTGAATCTCCTTACGGTTGGCGTTCTG 3'
2	1212	52.38	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGGGCATCTTTCTGGACTACGATCAAGAGTCGTAGTCCAGAAAGATGCCCTT 3' 5' CAAAAAGGGCATCTTTCTGGACTACGACTCTTGAATCGTAGTCCAGAAAGATGCCCG 3'
3	524	52.38	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCGGCAGAAATGTGCTGACAGAGTCAAGAGACTCTGTGACACATTTGCGCTT 3' 5' CAAAAAGGCAGAAATGTGCTGACAGAGTCTCTTGAATCTGTGACACATTTGCGCG 3'

Enfin le « *scramble* » est un contrôle négatif pour chaque shRNA. Il permet de distinguer les effets séquences spécifiques des effets séquences non spécifiques d'un shRNA donné. Il a la même composition en nucléotides mais est réalisé en mélangeant les nucléotides de la séquence du shRNA à contrôler, tout en s'assurant que cette nouvelle séquence ne possède pas d'affinité pour le génome du porc. En comparant les pourcentages en bases G et C des différents shRNA construits, il a été mis en évidence 4 groupes de shRNA ayant strictement le même pourcentage GC (Tableau 8 et 9). Ces groupes permettent la réalisation de 4 « *scrambles* » qui recouvrent les différents types de compositions des shRNA (Tableau 9).

Tableau 9 : Exemple des séquences ADN codant pour les scramble des shRNA ciblant les TRIM8 et 11

n°	Position	GC%		Séquence du Scramble :
TRIM08				oGVB3266
2		42.86	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCATTGTCATGAGAATTGAGTGGCAGCAGATACGCTATCGATCAACATCTGACTT 3' 5' CAAAAAGTCAGATGTTGATCGATAGCGTATCGTGCCACTCAATTCTCATGACAATG 3'
TRIM11				oGVB3265
1		52,38	Oligo 1 Oligo 2	5' ACCTCAGTAGCGACTCACGAGCGATAGGTTACGTGCAACAACCTAGTTCGGTCTTT 3' 5' CAAAAAGAGCCGAACCTAGGTTGTTCGACGTAACCTATCGCTCGTGAGTCGCTACTG 3'

Les séquences oligonucléotidique des shRNA et leur contrôle sont synthétisés puis clonés dans le vecteur d'expression eucaryote le psiRNA-h7SK-Hygro G1 (InvivoGen) en utilisant le site de restriction BbsI permettant une insertion directionnelle. Après transformation dans les bactéries GT116, les clones obtenus sont séquencés afin de valider l'intégrité de la séquence nucléique et l'orientation des inserts.

1.2.3. Co-transfection transitoire des shRNA et de leur TRIM correspondantes

L'atténuation de l'expression des poTRIM sans pression de sélection des cellules est réalisée par transfection transitoire. Les cellules HEK293 sont ensemencées en plaque 24 puits à 3×10^5

cellules/puits. Après 24h d'incubation, les cellules sont co-transfectées par lipofection avec les TRIM et leur shRNA respectifs, pour un ratio de 1:10 (TRIM:shRNA), soit 25ng de vecteur d'expression d'une TRIM ou de la GFP et 250ng de vecteur d'expression du/des shRNA correspondant.

L'efficacité de l'atténuation de l'expression de la condition de co-transfection par la GFP et le shRNA spécifique de la GFP est évaluée de 24 à 48h post transfection au microscope à fluorescence et au FACS. L'efficacité est également évaluée, pour l'ensemble des conditions, par RTq-PCR, comme décrit précédemment pour la validation de l'expression des TRIM.

1.2.4. Expression constitutive des shRNA dans les lignées cellulaires HEK293-poTRIM

Les shRNA sont transfectés dans les lignées cellulaires poTRIM afin d'obtenir des lignées exprimant de façon constitutive les différents shRNA permettant d'atténuer l'expression des TRIM correspondantes. Pour cela, les différentes lignées poTRIM sontensemencées dans une plaque 12 puits à 4×10^5 cellules/puits. Une lignée cellulaire productrice du PERV-GFP et dont 100% des cellules sont GFP positives est utilisée afin de valider l'efficacité de l'atténuation de l'expression par les shRNA. Après 24h d'incubation, chaque lignée TRIM est transfectée par lipofection avec $2\mu\text{g}$ d'un vecteur d'expression des shRNA correspondant ou des vecteurs « scramble » (Scbl). La lignée témoin est transfectée dans les mêmes conditions avec $2\mu\text{g}$ de shRNA anti GFP. 48h après la transfection, les cellules sont passées et soumises à une pression de sélection au G418 à 0,5mg/ml et à l'hygromycine à $50\mu\text{g}/\text{ml}$.

La pression de sélection est maintenue pendant au moins 30 jours et permet de générer une population cellulaire résistante aux deux antibiotiques et exprimant les vecteurs d'expression des TRIM et des shRNA qui leur sont spécifiques. Des RTq-PCR sont réalisées, comme décrit précédemment, pour la validation de l'expression des TRIM et avec les mêmes amorces, afin d'évaluer l'efficacité de l'atténuation de l'expression.

1.3. Infection des lignées cellulaires TRIM par l'outil de génétique inverse PERV-GFP

L'outil de génétique inverse PERV-GFP, construit pour la sélection des facteurs de restriction de la banque d'ADNc du porc, est repris pour cette stratégie. Cet outil permet de visualiser et de quantifier rapidement l'infection par cytométrie de flux. Il génère par ailleurs des particules virales répliquatives. Ainsi est-il possible d'évaluer, sur des cinétiques courtes ou longues, la permissivité ou la résistance à l'infection PERV des cellules sur-exprimant une protéine TRIM, avec ou sans atténuation de l'expression spécifique de la TRIM considérée (Figure 33).

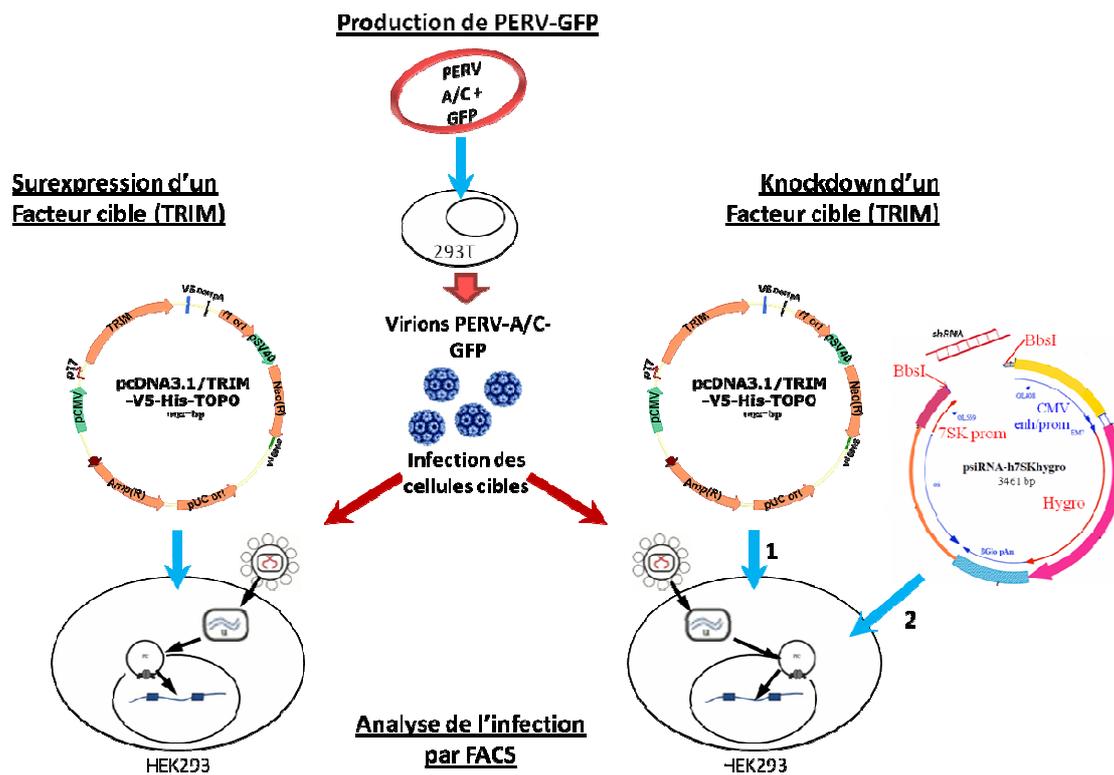


Figure 33 : Schéma de la stratégie de mise en évidence de l'action des TRIM sur le cycle de réplication des PERV.

Trois outils ont été construits, l'un permettant la sur-expression des protéines TRIM dans les cellules HEK293, un autre permettant l'atténuation de l'expression de ces mêmes protéines TRIM et enfin un PERV exprimant la GFP. Ainsi les cellules exprimant les protéines TRIM sont infectées par le PERV-GFP en présence ou non de l'outil d'atténuation de l'expression des TRIM. L'expression de la GFP du PERV dans les cellules infectées peut ensuite être analysée par cytométrie de flux au cours du temps afin d'évaluer l'évolution de l'infection selon les protéines TRIM en présence.

L'infection des lignées cellulaires TRIM est réalisée sur des plaques 24 puits. Les cellules sontensemencées à 6×10^4 cellules/puits. Après 6h d'incubation, le surnageant des cellules productrices du PERV-GFP est récolté et filtré sur un filtre à $0,45\mu\text{m}$. Les cellules sont ensuite changées pour un inoculum dilué au 1/10 en présence de $8\mu\text{g/ml}$ de polybrène. 24h après l'infection, les lignées cellulaires TRIM et les témoins sont changés pour du milieu frais. Au bout de 48h supplémentaires d'incubation et, par la suite, tous les 3-4 jours, les cellules sont passées.

A chaque passage, les cellules sont récoltées et réparties en trois fractions. La première est utilisée pour suivre la cinétique par cytométrie de flux et ainsi évaluer les niveaux d'infection de la population cellulaire (%GFP+) et d'expression des gènes viraux (MFI). La seconde est employée pour explorer par q-PCR la phase précoce du cycle infectieux dans les cellules infectées. Et la dernière fraction est utilisée pour évaluer par q-PCR l'étape de transcription du virus au cours de la phase tardive du cycle infectieux. Dans le même temps, le surnageant est récolté afin d'évaluer par RTq-PCR le relargage des particules/génome viral. Les cellules récoltées sont culotées et conservées à sec

à -80°C avant l'extraction des acides nucléiques. Les surnageants sont centrifugés à 8000g pendant 10min. Le surnageant est ensuite séparé du culot formé avant d'être filtré à 0,45µm puis congelé à -80°C.

Les techniques développées ci-avant permettent de mettre en évidence des effets des protéines TRIM sur le cycle infectieux du PERV. Afin de caractériser les mécanismes d'action de ces protéines TRIM, des techniques d'analyses plus fines sont ensuite élaborées.

2. Caractérisation des mécanismes d'action des TRIM sur les PERV

Les protéines TRIM, pour lesquelles une action sur l'infection par les PERV est observée, font l'objet d'une caractérisation préliminaire de leurs mécanismes d'action. Pour cela, quatre étapes du cycle des PERV répliatif sont visées (Figure 34).

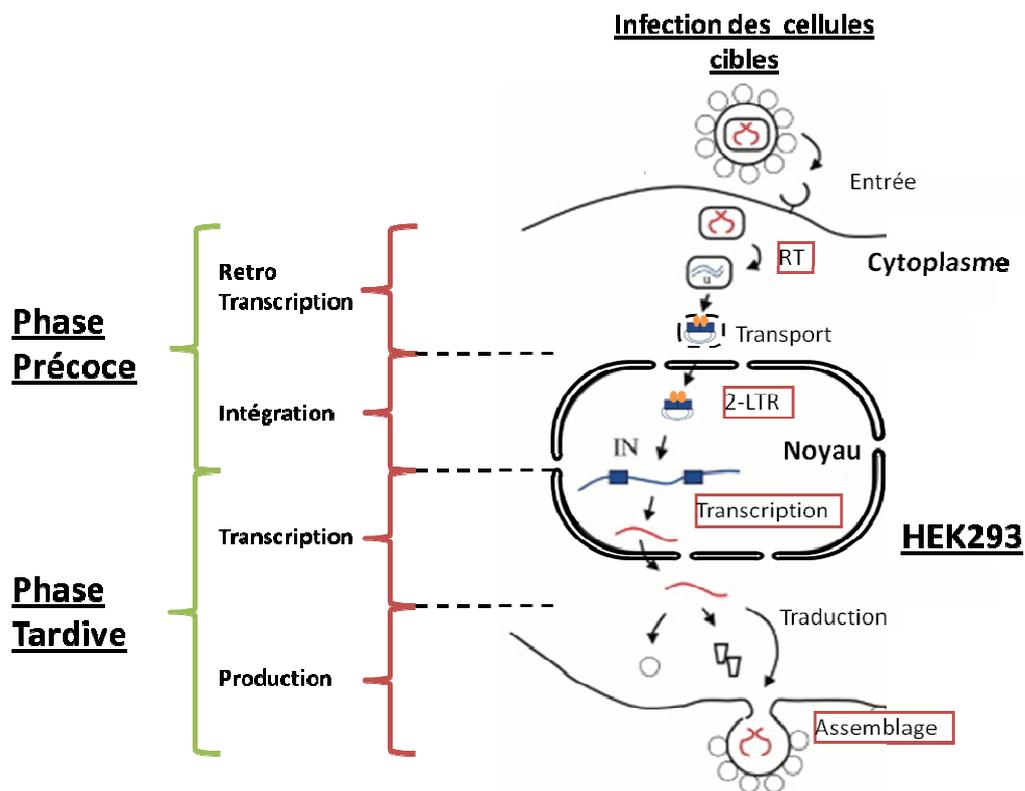


Figure 34 : Schéma des étapes essentielles du cycle de réplication du PERV ciblé pour la caractérisation des mécanismes d'action des TRIM sur les PERV.

Le cycle infectieux du PERV dans les cellules HEK293 peut être divisé en 2 phases, précoce et tardive. La première comprend l'étape d'entrée, la rétro-transcription (RT), le transport vers le noyau et l'étape d'intégration du provirus dans le génome hôte. La phase tardive comprend la traduction, l'assemblage des particules PERV et leur bourgeonnement. Chacune de ces étapes produit une molécule particulière qui peut être spécifiquement dosée par qPCR.

2.1. La phase précoce

Lors de la première phase du cycle infectieux, deux étapes clés sont ciblées. La première concerne la synthèse des ADNc issus de la réaction de transcription inverse (RT) ; la seconde, l'accumulation des cercles à 2-LTR précédant l'étape d'intégration du provirus dans le génome de l'hôte (Figure 35A). L'évaluation de ces étapes est complétée par le dosage par une q-PCR Alu des provirus intégrés (Butler et al., 2001) (Figure 35A).

2.1.1. La transcription inverse

Suite à l'entrée dans le cytoplasme de la cellule hôte et au cours du transport vers le noyau, le génome du rétrovirus (ARN positif simple brin) subit en premier lieu une étape de rétro-transcription produisant *in fine*, un pro-génome viral à ADN double brin, nommé rétro-transcrit tardif (Figure 35A). Celui-ci peut être extrait du cytoplasme et dosé par q-PCR en utilisant des amorces ciblant les dernières parties du génome rétro-transcrites, qui se situent au niveau du PBS (Anderson et al., 2006; Butler et al., 2001) (Figure 35B et tableau 10).

Ainsi, le dosage de ces molécules permet-il d'évaluer l'entrée des génomes viraux dans la cellule et les éventuels blocages pouvant avoir lieu au moment de la transcription inverse. Cependant, bien que la quantité des événements d'intégration soit généralement faible, de l'ordre de 5 à 10% selon les rétrovirus (Beauclair et al., 2012), ce dosage tient compte des provirus intégrés dans le génome hôte. Afin d'affiner la quantification des rétro-transcrits tardifs, une estimation de la quantité de provirus intégrés est envisagée par une q-PCR Alu (Butler et al., 2001). La quantité de provirus dosée par cellules peut alors être soustraite à la quantité de génome PERV dosée afin d'obtenir la quantité de génome ADN PERV non intégrés, ce qui correspond à la quantité de rétro-transcrit tardif issu d'une transcription inverse complète.

2.1.2. L'intégration

A la suite de l'étape de transcription inverse, et pendant sa migration vers le noyau cellulaire, le PIC (complexe de pré-intégration) se constitue autour du génome proviral en le circularisant pour former des cercles à 2-LTR (Long Terminal Repeat) (Figure 35A). Ce complexe, une fois dans le noyau, permet l'intégration du provirus dans le génome hôte par transfert de brin initié par l'intégrase rétrovirale (Figure 35A). Ces cercles sont une forme éphémère du cycle de réplication du rétrovirus. Un blocage de l'étape d'intégration du provirus entraîne leur accumulation dans les cellules infectées (Delelis et al., 2005; Hazuda et al., 2000). Afin de tester le passage de cette étape, les cercles à 2-LTR sont extraits des cellules hôtes et dosés par q-PCR en utilisant des amorces amplifiant spécifiquement les 2 LTR conjoints (Butler et al., 2001; Delelis et al., 2005; Friedrich et al., 2010) (Figure 35B et tableau 10).

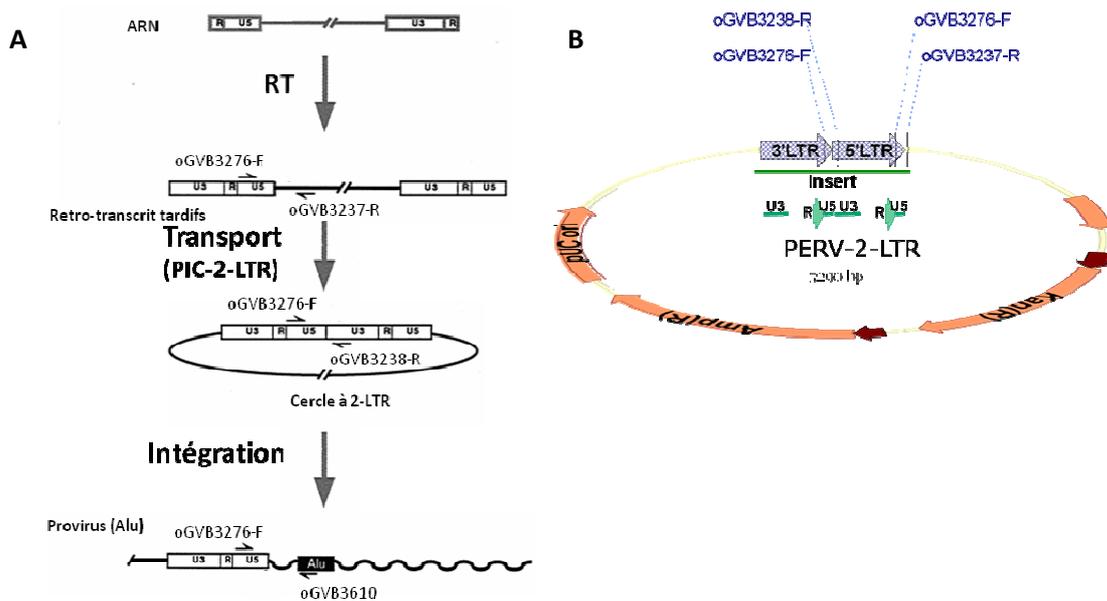


Figure 35 : Stratégie de la quantification des marqueurs moléculaires de l'étape précoce.

(A) Schéma des étapes précoces évaluées et des cibles moléculaires détectées par q-PCR (Butler, Hansen et al. 2001). (B) Schéma du plasmide PERV-2-LTR. Les 2-LTR conjoints et leurs séquences adjacentes ont été clonées dans un vecteur TOPO-TA (Invitrogen). Ce vecteur est utilisé pour la gamme de standard lors de la quantification des rétro-transcrits tardifs et des cercles à 2-LTR.

Ces molécules sont récupérées par l'extraction de l'ADN total des cellules avec le kit « DNeasy Blood & Tissue » (Qiagen) en utilisant le protocole « Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells ». Le dosage de ces marqueurs moléculaires est réalisé par q-PCR par le dosage au SYBR green (Anderson et al., 2006; Butler et al., 2001) et nécessite la création d'amorces spécifiques permettant leur détection (Tableau 10). Pour chaque cible un contrôle négatif sans matrice ADN atteste de la pureté des réactifs.

Les résultats sont calculés par une méthode absolue contre une gamme de standard réalisée en duplicata, allant de 10^2 à 10^8 copies du plasmide PERV-2-LTR (Figure 35B). La quantité de cellules présente dans chaque échantillon analysé est estimée avec une courbe standard de la détection du gène ubiquitaire de la β -actine en fonction de la quantité de cellules allant de $1,25 \times 10^{-1}$ à $1,25 \times 10^4$ HEK293. La quantité de cellules GFP positives peut ainsi être estimée pour chaque échantillon quantifié en multipliant la quantité de cellules dosées par le pourcentage de cellules GFP positives. Les résultats sont ensuite rapportés à la quantité de cellules GFP+.

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la détection des marqueurs moléculaire de la phase précoce.

RTT = rétro-transcrits tardifs ; F = amorces sens ; R = amorces anti-sens ; T°Hyb = température d'hybridation en degré Celsius.

Cible	Nom des Oligo	Séquences	T°Hyb (°C)
RTT	oGVB3276-F	5'-ACCGCTTCTCGTGAGTGATTAAG-3'	64
	oGVB3237-R	5'-GTCGGTTCTCGGGTGTTAGG-3'	64
2-LTR	oGVB3276-F	5'-ACCGCTTCTCGTGAGTGATTAAG-3'	64
	oGVB3238-R	5'-CCTATAAGGAACAACTCTGGAATTCAG-3'	64
Alu	oGVB3276-F	5'-ACCGCTTCTCGTGAGTGATTAAG-3'	64
	oGVB3610	5'-TGCTGGGATTACAGGCGTGAG-3'	64

2.1.3. Dosage des provirus intégrés

Les éléments Alu sont de courtes séquences dispersées (SINE) dans le génome des mammifères faisant partie de la famille des rétrotransposons. Leur fréquence dans le génome hôte peut permettre d'identifier un provirus qui s'est intégré à proximité. Ainsi, en couplant une amorce spécifique de l'extrémité 3' du génome du provirus à une amorce spécifique de l'extrémité 5' d'une séquence Alu, un amplicon peut être synthétisé (Figure 35A et tableau 10). Cependant, afin d'augmenter la détection de ces amplicons, l'élongation est réalisée sur 1min 30sec. La détection d'un tel amplicon est donc caractéristique d'une intégration. Toutefois, toutes les intégrations ne peuvent être quantifiées de la sorte, la quantité des intégrations est donc sous-estimée. Pour obtenir une estimation plus précise, le dosage par une q-PCR Alu des provirus intégrés nécessite l'utilisation de gamme de standard spécifique (Butler et al., 2001).

Pour réaliser cette gamme, des cellules, dont 100% de la population exprime le PERV, sont traitées pendant 2 semaines avec 1µM d'AZT. Cette drogue inhibe efficacement la transcription inverse du PERV et empêche donc toute nouvelle infection. Une gamme de dilution de 10⁻¹ à 10⁻⁵ de ces cellules est ensuite soumise à la q-PCR utilisée pour le dosage des rétro-transcrits tardifs et contre la gamme de standard associée (PERV-2-LTR). Ainsi l'absence d'infection permet de quantifier exclusivement les provirus PERV déjà intégrés dans ces cellules. Cette même gamme de cellules traitées à l'AZT est analysée avec la q-PCR Alu. La comparaison de la quantification précise des provirus et des résultats de l'amplification des séquences PERV-Alu permet d'obtenir une gamme de standard des provirus intégrés.

2.2. La phase tardive

La phase tardive concerne les différentes étapes qui suivent l'intégration et, en particulier : l'expression des gènes du rétrovirus, la formation des particules virales et leur relargage dans le milieu extracellulaire.

2.2.1. Evaluation de l'expression des gènes du PERV.

L'expression des gènes du PERV peut être évaluée par cytométrie de flux par une mesure du paramètre de la MIF. Pour cela, la transfection du PERV-GFP permet de shunter les étapes précoces du cycle du rétrovirus qui ont lieu lors d'une infection classique. Ceci permet d'évaluer spécifiquement l'expression du PERV en éliminant toute influence de la phase précoce.

Les cellules HEK293 sontensemencées dans des plaques 24 puits à 5×10^4 cellules/puits. Après 24h d'incubation, les cellules sont co-transfectées par lipofection (Lipofectamine LTX reagent, Invitrogen) avec 50ng de vecteur d'expression des TRIM, 500ng d'un vecteur d'expression d'un shRNA spécifique de la TRIM considérée ou du scramble correspondant et 200ng de vecteur PERV ou d'ADN carrier. La condition de transfection lacZ est co-transfectée avec le shRNA spécifique de la luciférase ou avec le scramble correspondant. Le niveau d'expression des TRIM et l'efficacité de l'atténuation de leur expression sont évalués 48h pt par RTq-PCR et western blot. Le niveau de transfection et l'expression des gènes du PERV sont mesurés par cytométrie de flux (FC500MPL, Beckman) 48h pt avec les paramètres de pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+) et la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules GFP+ (MIF GFP+).

2.2.2. Evaluation de la transcription des gènes du PERV

Une fois le génome rétroviral intégré dans le génome de l'hôte, le provirus est transcrit en ARNm afin de permettre l'expression des différents éléments composant la particule virale et l'amplification de son génome. L'efficacité de cette étape peut être évaluée en quantifiant les transcrits du PERV par RTq-PCR, à l'aide des amorces spécifiques ciblant les transcrits du gène *env* utilisés à une température d'hybridation de 64°C (sens oGVB3279-F 5'-GGCCATGGGAGATGGAAAG-3' et anti-sens oGVB3279-R 5'-GAATGGAGCCTGGTTGTTTACC-3'). Les RTq-PCR sont réalisées par le dosage au SYBR green avec le kit « Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step ». Ce kit permet, pour une même réaction PCR, la réalisation de la transcription inverse des ARN, suivie de l'amplification des ADNc formés. L'ARN total est extrait des cellules avec le kit SV 96 Total RNA Isolation System (Promega). Cette quantification est réalisée par une méthode relative en calculant le $\Delta\Delta C_t$ contre le gène de ménage, la β -actine et en présence d'un contrôle négatif d'amplification. Pour chaque échantillon, la quantité des ARNm PERV est normalisée en la rapportant à la quantité estimée en cellules et au pourcentage de cellules GFP+.

Résultats

Partie I : Criblage des facteurs de restriction du porc

Les facteurs de restriction virale ont principalement été caractérisés dans les espèces modèles (souris, homme). Quelques caractérisations ont cependant également été réalisées chez les artiodactyles (Jonsson et al., 2006; LaRue et al., 2008; Sawyer et al., 2007; Si et al., 2006) dont le porc (Dorrschuck et al., 2011; Mattiuzzo et al., 2010). Mais ces études ne concernent que certaines protéines TRIM, APOBEC3 et les Tetherines. Afin d'identifier d'autres facteurs de restriction pouvant agir, chez le porc, contre l'infection par le PERV, nous nous sommes intéressés à une stratégie permettant de sélectionner et de récupérer des facteurs de restriction virale, à partir d'une banque de ADN complémentaires (ADNc).

1. Stratégie de criblage des facteurs de restriction

S. Valente et S.P. Goff ont récemment publié une stratégie de criblage de facteurs de restriction virale contenus dans une banque d'ADNc. Ils ont appliqué cette stratégie à l'étude des facteurs de restriction du VIH-1 chez l'Homme (Valente and Goff, 2009). Cette stratégie est construite autour d'un vecteur d'expression rétrovirale de type MLV de ces ADNc, le pBabe-HAZ, permet de réaliser le criblage selon un facteur conférant à la cellule le caractère de résistance à l'infection par le virus. Celui-ci exprime un transgène de sélection, tel que le gène de la thymidine kinase (TK). En présence d'une drogue relative au transgène, tel que le ganciclovir (GCV), les cellules sensibles à l'infection sont éliminées. Les clones résistants sont ensuite sélectionnés ce qui permet de récupérer l'ADNc ayant apporté la résistance et de vérifier son action contre l'infection par le virus. S. Valente et S.P. Goff ont pu identifier trois clones résistants à l'infection par le VIH-1. L'un exprimant l'ADNc codant pour la partie N-terminale de hnRNPU (Valente and Goff, 2006) et les deux autres codant pour la partie N-terminale du facteur eIF3f (Valente et al., 2009a; Valente et al., 2009b). Cette stratégie est adaptée à l'étude de la restriction des PERV réplicatifs chez le porc et à l'identification des facteurs de restriction de ce dernier.

1.1. Identification des facteurs de restriction du PERV-A/C

Les facteurs de restriction potentiels des PERV sont, dans un premier temps, criblés au sein d'une banque d'ADNc de porc. Cette banque est construite à partir des ARNm (ARN messenger) de cellules porcines, les PK15, et clonée dans le vecteur rétroviral d'expression pBabe-HAZ (Figure 36 partie 1). Ce vecteur possède les LTR du MLV (murine leukemia virus), un système de sélection et d'expression

eucaryote ainsi qu'un site Lox-P, du système d'excision de l'ADN Cre-Lox (Figure 37). Ce site Lox-P se situe au niveau du 3' LTR et se retrouve alors dupliqué à chaque extrémité après intégration du provirus (Figure 37).

A partir de ces clones, des particules virales défectives sont produites par tri-transfection, avec utilisation de deux autres vecteurs dits « helper ». Le pMD.G est le premier de ces vecteurs « helper », il contient le gène d'enveloppe amphotrope VSV-G (vesicular stomatitis virus Glycoprotein). Le second est le vecteur pHIT60, il contient les gènes *gag* et *pol* du MLV (Figure 36 parties 2 et 3).

Ces trois vecteurs ont été fournis par S.P. Goff et sont utilisés selon le même protocole. Les particules virales formées permettent d'introduire la banque dans des cellules sensibles à l'infection par les PERV, les cellules HEK293, avec au maximum un facteur par cellule (Figure 36, partie 4). Les cDNA codant pour des facteurs de restriction et introduits dans les cellules sont, par la suite, sélectionnés par l'utilisation d'une technique de criblage appropriée. Cette étape doit toutefois être réalisée dans un laboratoire de type L3 et nécessite des autorisations auprès du MESR qui a saisi pour ce faire le Haut Conseil en Biotechnologie. Ces autorisations ont pu être obtenues (Cf. Annexe I).

Les cellules qui n'ont pas acquis le facteur conférant la résistance à l'infection, qui ne contiennent par conséquent pas de facteurs d'intérêt, sont éliminées. A cette fin, le gène de la TK de l'herpès virus humain est inséré sur la base du PERV-A/C (PERV-A/C-TK). Ainsi les cellules infectées par le PERV-A/C-TK, en présence de GCV (Figure 36 partie 5), transforment-elles ce produit en un dérivé toxique ce qui entraîne la mort de ces cellules. Après plusieurs cycles d'infections à faible MOI (Multiplicity of Infection) et sous la pression de sélection au GCV, les cellules subsistantes contiennent potentiellement un facteur de restriction d'intérêt. Ces candidats sont validés dans une étape de criblage supplémentaire.

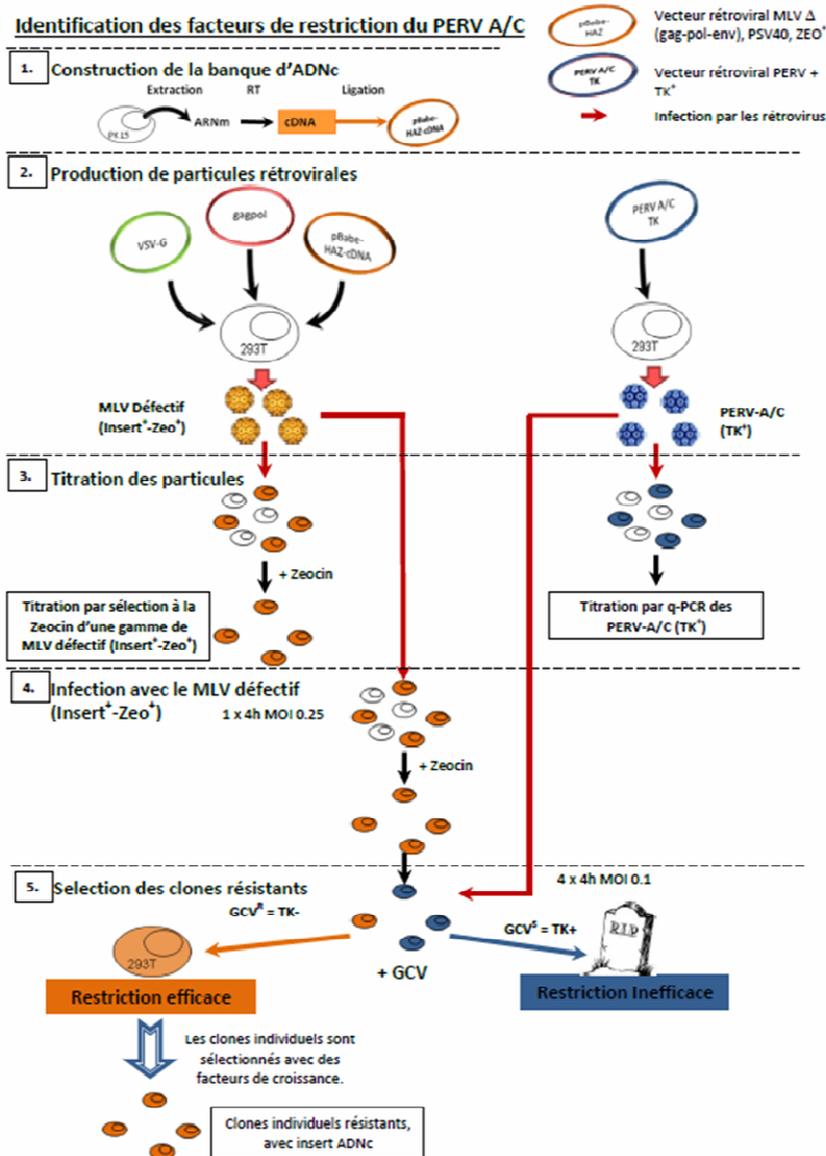


Figure 36 : Schéma de la stratégie de sélection du porc des facteurs de restriction à l'infection par le PERV-A/C dans la banque de cDNA.

Après le clonage des ADNc du porc dans le vecteur d'expression eucaryote pBabe-HAZ, celui-ci est utilisé pour produire par tri transfection des particules virales défectives. Ces particules sont utilisées pour infecter des cellules HEK293 à une MOI précise de 0,25 afin que chaque cellule reçoive au plus un ADNc. Les cellules infectées sont sélectionnées à la Zéocin puis infectées par le PERV-A/C-TK. Ainsi les cellules dont l'ADNc n'apporte pas de résistance à l'infection possèdent le gène de la TK du PERV, qui transforme le ganciclovir (GCV) ajouté dans le milieu de culture en un produit toxique pour la cellule. Au contraire, les cellules contenant un ADNc apportant une résistance à l'infection par le PERV ne sont pas affectées par le GCV. Ces cellules survivantes sont récupérées afin d'étudier l'origine de la résistance.

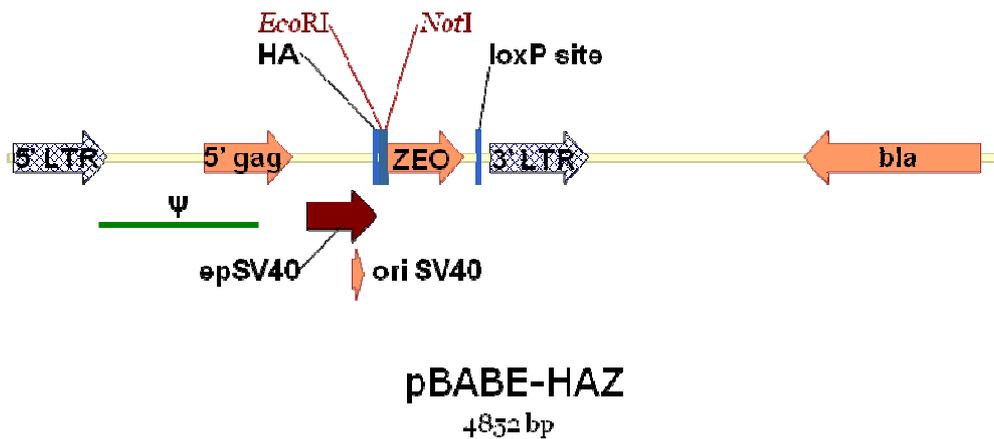


Figure 37 : vecteur d'expression de la banque pBabe-HAZ.

Ce vecteur est construit sur la base d'un gammarétrovirus murin, le MLV, dont les gènes essentiels ont été éliminés. Ce vecteur possède en 3' du promoteur eucaryote du SV40 un site d'insertion des ADNc entre les sites de restrictions *EcoRI* et *NotI* permettant ainsi l'expression de la séquence codante en plus du gène de résistance à la zéocine/néomycine. Il contient aussi un site *Lox-P*, du système d'excision de l'ADN Cre-*Lox*. Ce site *Lox-P* se situe au niveau du 3' LTR et se retrouve alors dupliqué à chaque extrémité après intégration du provirus.

1.2. Caractérisation des inserts ADNc des clones résistants

Une sélection est ensuite envisagée afin de valider le crible des facteurs et de permettre l'étude de ceux-ci *in silico* et *in vitro*. Les clones sélectionnés et résistants à l'infection par le PERV sont récupérés et traités individuellement. Chaque clone subit une série de trois tests (Figure 38) : (i) le premier test consiste à soumettre le clone à l'infection par le PERV pour vérifier de nouveau sa résistance ; (ii) le second test consiste à éliminer le cDNA par un système Cre-*Lox*, en utilisant le vecteur pCre-Neo. Ce clone, rendu théoriquement sensible de nouveau, est soumis à l'infection par le PERV. La récupération effective d'un phénotype sensible à l'infection montre que l'insert éliminé était responsable de la résistance ; (iii) le troisième test est réalisé après extraction de l'insert cDNA par PCR (Amplification par Réaction de Polymérisation en Chaîne). Celui-ci est de nouveau cloné dans le vecteur pBabe-HAZ puis réintroduit par l'intermédiaire de particules virales défectives dans des cellules HEK293 vierges qui sont alors soumises à l'infection par le PERV. Cela permet de vérifier que l'insert extrait apporte effectivement une résistance à cette infection. Un quatrième essai est réalisé en tant que témoin négatif de la résistance à l'infection PERV, avec des cellules transfectées par un vecteur pBabe-HAZ vide d'insert.

Criblage des ADNc des clones résistants

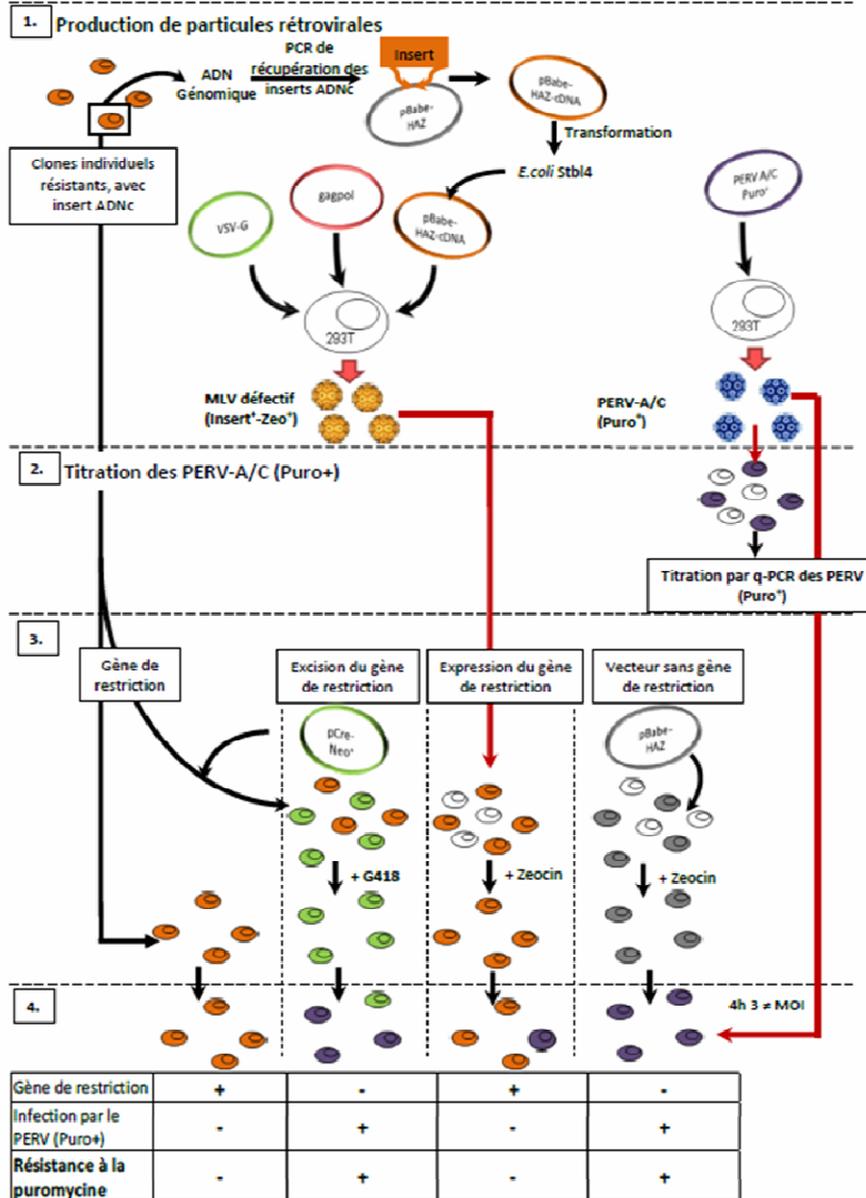


Figure 38 : Schéma de la stratégie de criblage des candidats potentiels sélectionnés pour la restriction par le PERV-A/C.

Les cellules, dont l'ADNc a apporté une résistance, sont isolées et amplifiées. Ces lignées monoclonales sont ensuite soumises à un test afin de vérifier que la résistance à l'infection par le PERV est efficace et bien dû à l'ADNc apporté. D'une part l'ADNc est récupéré puis reclone dans le vecteur pBabe pour produire de nouvelles particules rétrovirales déficientes contenant un gène potentiel de restriction du PERV. Ces particules sont utilisées pour infecter comme précédemment des cellules HEK293. D'autre part un portion de la ligné monoclonale est transfectée par un vecteur pCre afin d'exciser l'ADNc par le système Cre-lox. Ces cellules sont ensuite infectées par un PERV contenant le gène de résistance à la puromycine. Les cellules possédant l'ADNc devraient résister à l'infection et donc ne pas résister à une pression de sélection à la puromycine alors que celles traitées par le système Cre-lox ou avec un vecteur pBabe vide ne doivent pas résister à l'infection et donc survivre en présence de puromycine. Un tel résultat confirme que le gène sélectionné est un facteur de restriction.

Les particules virales employées pour l'infection dans ces tests sont les mêmes que les particules utilisées pour la première étape de sélection. Toutefois, et afin d'éviter une adaptation des cellules

au système de sélection au GCV, le système à la puromycine ou à l'hygromycine est utilisé. Le PERV-A/C-TK contient donc également soit le gène de résistance à la puromycine soit le gène de résistance à l'hygromycine. Les cellules résistantes à l'infection n'acquièrent donc pas ce gène de résistance et meurent sous un traitement à cet antibiotique.

A l'issue de ces tests, les facteurs sélectionnés peuvent-être analysés et caractérisés en étant comparés aux facteurs connus pour la restriction virale des organismes voisins et des rétrovirus de la même famille.

2. Validation des outils de la stratégie de criblage : l'outil de mesure de l'infection par le PERV-A/C

L'infection des cellules contenant la banque d'ADNc du porc doit être parfaitement maîtrisée et contrôlée afin d'obtenir des niveaux d'infection reproductibles. A cette fin un PERV-A/C exprimant la GFP a été construit et est produit dans des cellules HEK293.

2.1. Production de particules PERV infectieuses

Des cellules HEK293 ont été transfectées par le PERV-A/C-GFP. Au deuxième jour post transfection (pt) l'analyse des cellules par cytométrie de flux montre que 19% des cellules sont positive à la GFP et que ces cellules présentent une moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) de 10 (Figure 39 A et B). Au bout de quelques jours pt, l'observation des cellules au microscope à fluorescence permet d'identifier des îlots de cellules fluorescents dans le vert (Figure 39 C, D et E).

L'évolution des cellules est suivie à chaque passage et permet d'observer un phénomène de surinfection (Wilson et al., 2000). De ce fait, au bout de 25 jours, 100% des cellules sont positives à la GFP pour une moyenne d'expression de 60 (MIF, comparé à des cellules HEK293-WT générant une autofluorescence à 0,7) (Figure 39A et B). Le surnageant de ces cellules est utilisé, dilué ou non dilué, pour infecter les cellules cibles à la MOI désirée.

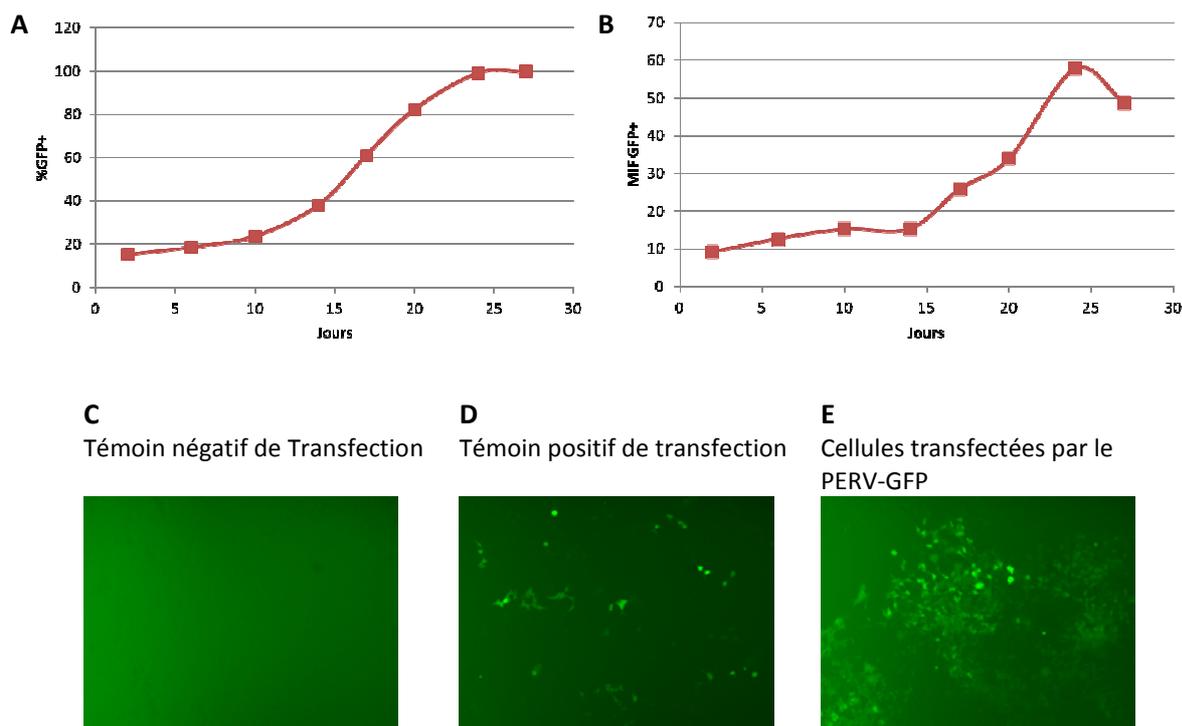


Figure 39 : Observation de l'évolution de la surinfection des cellules transfectées par le PERV-GFP.

(A) et (B) graphiques de l'évolution de la surinfection par le PERV-GFP des cellules HEK293 transfectées et suivies au FACS. (A) pourcentage de cellules exprimant la GFP (%GFP+) en fonction du temps. (B) Moyenne d'intensité de fluorescence des cellules exprimant la GFP (MIF GFP+) en fonction du temps. (C), (D) et (E), champs de cellules HEK293 observés au microscope à fluorescence objectif 10x, 7 jours après transfection. (E) les cellules transfectées par le PERV-GFP présentent 60% de cellules GFP positives.

2.2. Infection des cellules HEK293 par un surnageant infectieux PERV

Le surnageant des cellules productrices du PERV-GFP est utilisé pour évaluer la capacité des particules virales à infecter les cellules de l'étude, les HEK293 et les cellules porcines PK15 et ST-IOWA. Un test de concentration par ultracentrifugation du surnageant infectieux en particule virale est mené sur les cellules. Ceci est réalisé afin d'évaluer la possibilité d'augmenter au besoin l'infection des cellules.

A 48h pi les HEK293 et les ST-IOWA présentent un peu moins de 15% de cellules exprimant la GFP. Les HEK293 infectées avec de l'inoculum concentré présentent un taux d'infection plus élevé d'environ 10% par rapport aux mêmes cellules avec inoculum non concentré. Les PK15 restent non permissives à cette infection, ce qui conforte notre modèle d'étude (Figure 40).

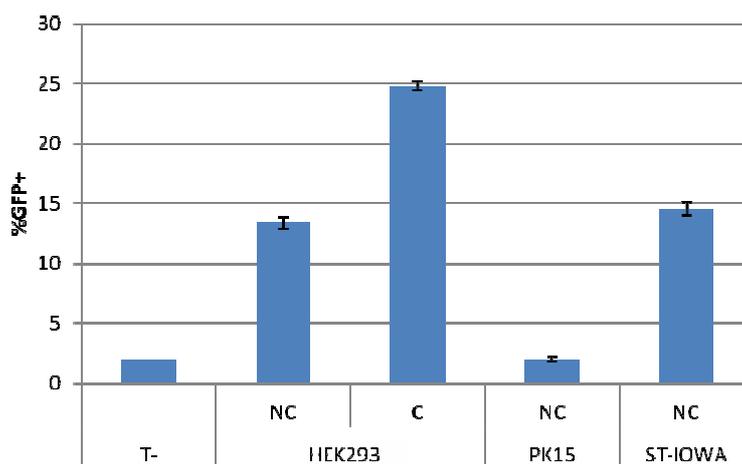


Figure 40 : Histogramme de l'évolution du pourcentage de cellules infectées par le PERV-GFP et exprimant la GFP 48h pi.

T- = témoin négatif de l'infection, cellules HEK293 non infectées; NC = inoculum non concentré ; C = inoculum concentré x10.

Cependant, les particules virales PERV ne résistent pas bien aux processus de congélation à -70°C et de décongélation (Wilson et al., 2000). De ce fait, la conservation d'un surnageant infectieux de MOI connu n'est pas possible. L'infectiosité des surnageants peut par ailleurs varier en fonction des cellules productrices préparées et du niveau d'expression du PERV-GFP. Pour atteindre le niveau d'infection désiré, la capacité infectieuse des surnageants fraîchement récoltés est préalablement testée sur plusieurs dilutions (1/50, 1/25, 1/10 et non dilué). La dilution ayant le niveau d'infection le plus proche de 0,2 à 0,3 de MOI à 36h pi est retenue.

Ce niveau d'infection présente l'avantage d'être suffisamment bas pour permettre d'observer l'évolution de l'infection sur le long terme et d'éviter de dépasser les capacités des facteurs étudiés à agir sur le PERV. Mais il est suffisamment élevé pour éviter d'atteindre la limite de détection du FACS. Les cellules cibles sont par la suite infectées avec un nouveau surnageant infectieux fraîchement récolté et provenant des mêmes cellules productrices. Un contrôle est réalisé en parallèle afin de vérifier si le niveau d'infectiosité est du même ordre de grandeur que celui du précédent surnageant. Ainsi, la dilution du surnageant infectieux au 1/10 présente-t-elle généralement une MOI entre 0,2 et 0,3 à 36h pi. Ce niveau d'infection est convenable et est retenu pour la suite de l'étude.

3. Construction d'une banque d'ADNc

S.T. Valente et S.P.Goff utilisent dans leur stratégie une technique simple de transcription inverse des ARNm (Valente and Goff, 2009). En théorie, cette technique permet de générer une quantité d'ADNc de 50 à 500ng et une complexité de banque de l'ordre de 10^6 à 10^7 clones par réaction (CFU/R°)

après insertion dans le vecteur d'expression pBabe-HAZ. Le bruit de fond toléré pour ce clonage doit être de l'ordre de 10^3 CFU/R°.

Pour contrôler les différentes étapes de la production de la banque et évaluer la quantité d'ADNc obtenu, la technique d'origine prévoit un dosage par la radioactivité des cDNA. Le laboratoire ne disposant pas de cette technique, le dosage se fait par Bioanalyser (Agilent). Un échantillon à chaque étape du procédé est ainsi dosé. Cependant, le Bioanalyser possède une limite de détection de 25ng/μl. Le rendement théorique étant de 50 à 500ng, cela annonce un probable dépassement de la limite inférieure de détection dans les étapes finales en fonction de la concentration de l'échantillon analysé.

3.1.Extraction des ARN messager

Dans un premier temps, les ARN totaux sont extraits des cellules PK15 par la méthode d'extraction des ARN au TRIzol. Il s'agit d'une méthode d'extraction au phénol chloroforme réalisée en condition acide (pH 4-6), ce qui permet de récupérer les ARN dans la phase aqueuse qui sont séparés de l'ADN (phase organique et interphase) et des protéines (interphase). Les ARN extraits des PK15 ont un profil de bonne qualité et sont en quantité suffisante (Figure 41). Une fois les ARNm purifiés des ARN totaux, la qualité de leur extraction est vérifiée au Bio-Analyser (Figure 42A échantillon E1).

L'extraction des ARNm par les méthodes utilisées, permet d'obtenir entre 5 et 10μg d'ARNm pour $1,5 \times 10^7$ cellules avec un rendement moyen de 2,5%. Cette étape d'extraction est critique pour obtenir une bonne qualité de banque d'ADNc. Une fois validée, la construction de la banque peut commencer.

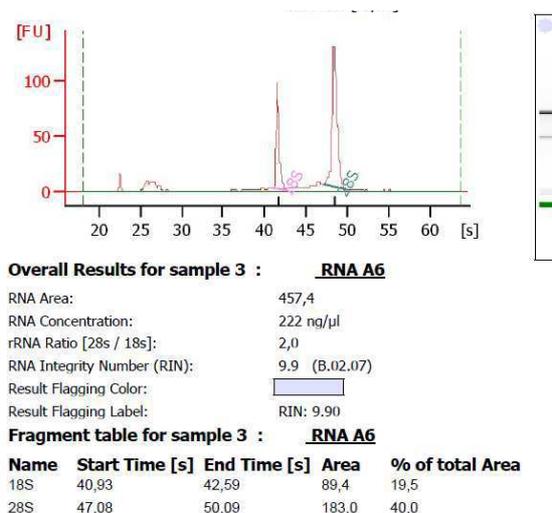


Figure 41 : Exemple de résultat obtenu après l'extraction des ARN totaux des cellules de PK15.

Ces échantillons sont poolés par 8 ce qui permet d'obtenir une quantité d'ARN totaux de 8 à 12μg, sachant que 5 à 10μg sont suffisants pour réaliser la transcription inverse.

3.2.Synthèse des ADN complémentaires

Les ADNc sont synthétisés en suivant le protocole proposé par S.T. Valente et S.P. Goff. Ainsi les quantités d'ADNc dosées après la synthèse du second brin sont détectables et de l'ordre de 4-7 μ g (Figure 42A échantillon E2). Cette quantité est suffisante pour l'obtention de la banque désirée.

Les ADNc sont ensuite fractionnés en fonction de leur taille sur colonne de chromatographie d'exclusion. Ceci afin de purifier les échantillons des débris des étapes de synthèse et d'optimiser les réactions de ligation de la banque dans le vecteur d'expression, le pBabe-HAZ. La quantité d'ADNc contenu dans les éluas numéros 2 et 3 issus du fractionnement est estimée au Bioanalyser et est de l'ordre de 500 à 1000 ng dans chacune des fractions 2 et 3 (Figure 42A échantillons E3 et E4).

La quantité d'ADNc obtenu est suffisante pour pouvoir obtenir une banque de complexité de l'ordre de 10⁶ clones. La fraction 2 contient les ADNc d'une taille supérieur à 1000 pb mais ne sont pas visibles au Bioanalyser, en dépit de la trop grande dilution de l'échantillon (Figure 42 échantillons E3). Cette fraction 2 est d'abord utilisée pour la confection de la banque. La fraction 3 contient les ADNc d'une taille comprise entre 500 et 1000 pb (Figure 42 échantillons E4). Cette fraction est utilisé en deuxième recours afin d'augmenter la complexité de la banque.

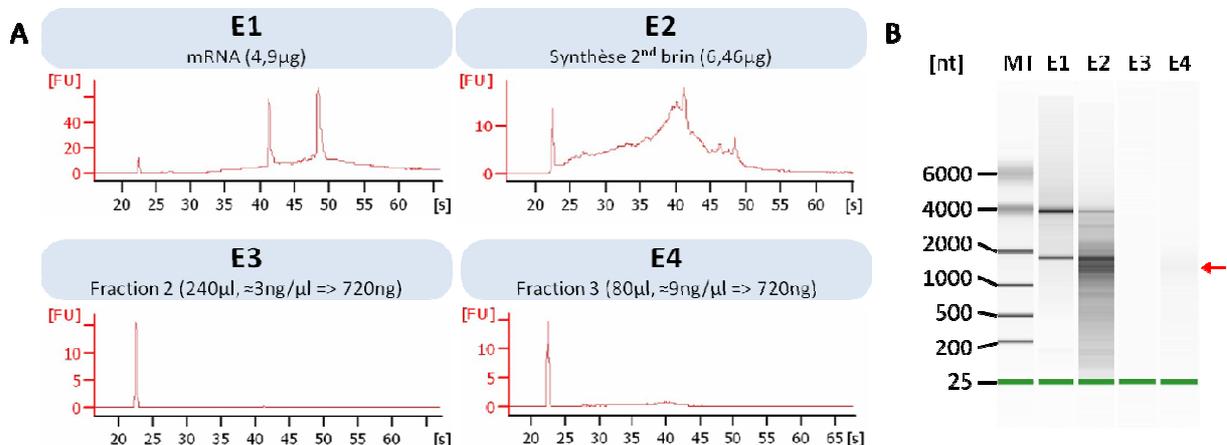


Figure 42 : Evaluation au Bioanalyser des étapes principale de la synthèse d'ADNc.

(A) Electrophoregrammes de la migration des molécules ADN ou ARN (B) Représentation sous forme de gel de la migration des molécules ADN ou ARN. [FU] = unité de fluorescence arbitraire ; [nt] = nucléotides ; MT = marqueur de taille ; E1 = échantillon prélevé après extraction des ARNm ; E2 = échantillon prélevé après la synthèse du second brin ; E3 et E4 = échantillon prélevé de la fraction 2 et 3, respectivement, issu de la chromatographie d'exclusion. La flèche en rouge indique la traînée formée par les ADNc récupérés dans la fraction 3. Le marqueur de taille est simple brin alors que les ADNc sont double brin, la taille réelle des ADNc est donc 2 fois plus petite que celle indiquée.

4. Bilan de la construction d'une banque d'ADNc du porc

Plusieurs essais de banques ont été réalisés et, en dépit des améliorations obtenues, le clonage dans le vecteur d'expression pBabe-HAZ n'a pas permis d'obtenir une complexité suffisante de la banque. La banque la plus complexe qui ait été obtenue contient $1,86^E5$ clones pour un bruit de fond non détecté (Tableau 11). Cette efficacité est caractérisée par le T+ (témoin positif du clonage) et a présenté $2,86^E4$ CFU/R°, soit plus d'un log de moins que ce qui était prévu. Par ailleurs les bactéries commerciales ont présenté une efficacité de transformation de 8^E8 CFU/ μ g de pUC19 (Tableau 11), soit plus de 1 log de moins que ce qui est annoncé par le fabricant et qui correspond à celle obtenue avec les bactéries électro-compétentes préparées au laboratoire.

Tableau 11 : Résultat d'une tentative de clonage des cDNA de la banque du porc dans le vecteur pBabe-HAZ dont l'efficacité de clonage a été améliorée.

Banque (Fractions 2 et 3)			
Complexité	T+ (CFU/R°)	T- (CFU/R°)	pUC19 (CFU/ μ g)
1,86E+05	2,86E+04	0,00E+00	8,00E+08

Partie II : Etude de la restriction virale par les TRIM

La banque d'ADNc porcins obtenue n'ayant pas atteint la complexité souhaitée, nous avons fait le choix d'abandonner cette stratégie et de focaliser notre étude sur un nombre limité de protéines issues de la famille TRIM. Plusieurs éléments nous ont amené à choisir la famille des protéines TRIM pour réaliser une approche ciblée de l'étude des facteurs de restriction des PERV réplicatifs : i) En 2008, une étude globale des protéines de la famille des TRIM a été menée par Mothes W. (Uchil et al., 2008). Cette étude a montré l'implication de 20 de ces membres étudiés dans la restriction du MLV ; ii) Les PERV réplicatifs sont des gammarétrovirus endogènes qui possèdent un tropisme de type B, ce qui les rend insensibles à certaines TRIM5 α de mammifère (Lee et al., 2011; Wood et al., 2009). Au vu de la proximité phylogénétique des PERV et MLV, les orthologues porcins des protéines TRIM murines actives sur le MLV peuvent être des homologues fonctionnels vis-à-vis des PERV réplicatifs.

Une stratégie a donc été élaborée pour permettre d'étudier la relation des TRIM porcines avec ces rétrovirus.

L'étude ciblée des effets des protéines TRIM porcines sur le cycle réplicatif du PERV est effectuée sur des protéines pour lesquelles des effets de restrictions ont déjà été référencés dans la littérature contre des rétrovirus proche du PERV, tel que le MLV (Uchil et al., 2008). Après la sélection et l'analyse des protéines TRIM porcines d'intérêt, leurs séquences codantes sont clonées à partir d'ARN extraits de lignées cellulaires porcines. Ceci afin de développer les outils moléculaires nécessaires pour la mise en œuvre de cette étude. Une fois ces outils TRIM développés et validés, ils sont utilisés pour évaluer les effets potentiels des protéines TRIM sur le cycle infectieux de l'outil PERV-GFP, préalablement élaboré.

1. Sélection des TRIM d'intérêt

La sélection des protéines TRIM d'intérêts est réalisée à partir des connaissances bibliographiques disponibles. Les orthologues porcins de ces protéines sont ensuite identifiés dans les bases de données informatiques. Enfin, l'annotation et l'intégrité de ces séquences est vérifiée en comparaison avec les orthologues connues chez les organismes proches, tel que l'homme et la souris qui sont les mammifères dont les gènes sont les plus référencés, et la vache qui est un cétartiodactyle proche du porc.

1.1. Identification et sélection de protéines TRIM porcines

Une première sélection de protéines TRIM d'intérêt est réalisée à partir des résultats décrits par l'équipe du Pr. Mothes W. concernant l'étude réalisée sur de nombreuses TRIM humaines et murines (Figure 43) (Uchil et al., 2008). Parmi les vingt TRIM ayant une action de restriction contre le MLV et le VIH-1, les gènes des protéines ayant présenté les effets les plus intenses contre les B-MLV et NB-MLV sont sélectionnés dans l'hypothèse d'une conservation fonctionnelles chez le porc des TRIM actives chez l'homme et chez la souris et ceci, bien que les effets observés des TRIM murines sur le MLV soient parfois différents de ceux observés pour les TRIM humaines sur le MLV.

Les protéines TRIM humaines 11, 27, 41 et 44 ont des effets identiques à leur équivalent murin sur le MLV. Il en est de même pour les TRIM 8, 25 et 39 bien qu'avec un niveau d'efficacité parfois différent. En revanche, les TRIM15, 19, 21 et 31 ne présentent pas les mêmes effets (Figure 43). En effet, ces protéines présentent peu ou pas d'activité vis-à-vis du MLV et ne seront par conséquent pas prises en compte en première intention. Enfin certaines protéines TRIM humaines ont des effets significatifs sur le MLV et, bien qu'elles n'aient pas été étudiées pour leur orthologue murin, elles présentent toutefois un intérêt pour l'étude, c'est le cas des TRIM1, 13, 14, 26, 32 et 62.

A ces protéines s'ajoutent des témoins négatifs ne présentant aucun effet sur le cycle répliatif du B-MLV. Les protéines TRIM5 (analogue de la TRIM30 murine) et 44, rentrent dans cette catégorie.

Ainsi sont sélectionnées en première intention les protéines TRIM1, 5, 8, 11, 27 et 44.

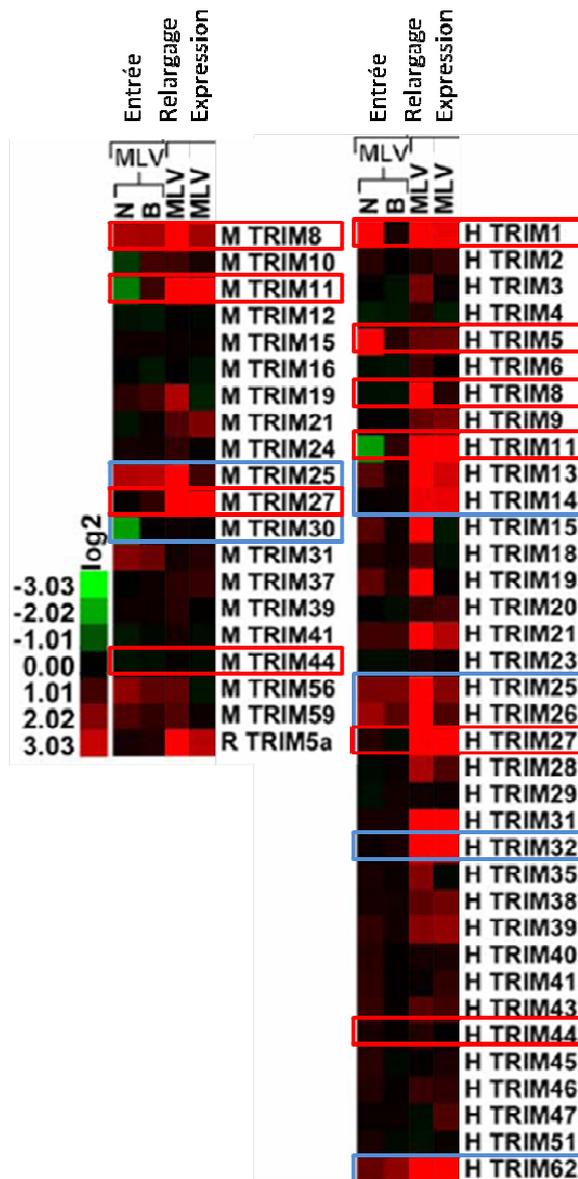


Figure 43 : Graphique récapitulatif des effets des TRIM humains (H) et murins (M) sur le MLV contre les phases précoces et tardive du cycle répliatif du rétrovirus (Uchil P.D. et al., 2008).

L'action de la protéine est représentée par une échelle log₂ d'un effet favorisant l'infection (nuance verte) à un effet inhibiteur (nuance rouge). Les deux premières colonnes (N et B-MLV) correspondent aux effets sur l'entrée du rétrovirus. Les 3^{ème} et 4^{ème} colonnes présentent les effets sur le NB-MLV au niveau du relargage et de l'expression. Encadrées en rouge les TRIM sélectionnées en première intention; Encadrées en bleu les TRIM d'intérêt mais non retenues pour l'étude (Uchil et al., 2008).

1.2.Récupération des séquences protéiques TRIM sur les bases de données

Les protéines TRIM sélectionnées sont connues chez l'homme (huTRIM) et la souris (muTRIM), la recherche des séquences de leurs orthologues porcins (poTRIM) et bovins (boTRIM) est réalisée à double sens sur BLASTn/p (à partir de la base de données GenBank) et BLAT de l'USCS (<http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>). Cette recherche à double sens permet de valider que

les séquences porcines et bovines identifiées sont bien celles qui présentent le maximum d'identité par rapport à la séquence d'origine. Au début du projet, la version 9 du génome porcin était disponible (Sscrofa9). Publiée en septembre 2009 elle recouvrait 98.3% du génome porcin (Archibald et al., 2010). A ce moment là, la majorité des séquences porcines sont annotées comme étant des protéines putatives, seule parmi les protéines retenues poTRIM5 avait déjà été décrite (Sawyer et al., 2007; Uenishi et al., 2007). Toutes les séquences nucléiques et protéiques porcines et bovines sélectionnées ont pu être identifiées et présentent systématiquement les meilleurs pourcentages d'identité et de recouvrement.

1.3. Analyse et validation de l'intégrité des séquences protéiques des orthologues TRIM récupérées

Une analyse BLASTp permet de comparer deux à deux les pourcentages d'identité et de recouvrement des orthologues respectifs (Tableau 12). Elle est complétée par une analyse phylogénétique construite à partir d'un alignement multiple. L'arbre ainsi obtenu va illustrer la divergence entre les séquences des différentes protéines par leur distribution et la longueur des branches, dont l'échelle représente le nombre de substitution pour 100 acides aminés (Figure 44). Ces analyses permettent de confirmer la récupération des séquences porcines et bovines, leur homologie avec les séquences humaines et murines et le niveau de conservation des domaines dans la famille des protéines TRIM.

1.3.1. Les orthologues de TRIM1/MID2

Les orthologues de la protéine TRIM1/MID2 présentent une très forte conservation de séquence, soit 99% d'identité, entre les différents mammifères étudiés (Tableau 12 et figure 44). Cette protéine présente les domaines caractéristiques de la famille RBCC dont deux B-box. Toutefois la protéine TRIM1 de *Bos taurus* ne recouvre que 65-67% de ses orthologues (Tableau 12) ; la partie N-terminale est tronquée, ce qui comprend le domaine RING et la B-box 1. TRIM1 fait partie du groupe C-I (Short and Cox, 2006), elle possède un domaine SPRY, ce qui explique sa proximité aux protéines TRIM du groupe C-IV, qui comprend les protéines TRIM 5, 11 et 27. Cependant, TRIM1 possède aussi les domaines COS et FN3, ce qui explique la longueur de la branche de ce cluster illustrant une divergence entre les TRIM1 et le groupe C-IV (Figure 44).

1.3.2. Les orthologues de TRIM8

Les protéines TRIM8/GERP des différentes espèces étudiées présentent, elles aussi, une très forte conservation de séquence, de 98-100% d'identité (Tableau 12), et se regroupent dans un même cluster (Figure 44). La TRIM8/GERP présente aussi deux B-box. Elle est classée dans le groupe C-V, groupe dont les protéines ne présentent pas de domaine C-terminal caractéristique (Short and Cox,

2006). Cela explique l'éloignement de ce cluster des autres groupes (Figure 44). Toutefois, certaines études ont permis d'identifier la présence d'un domaine fonctionnel putatif ING (Inhibitor of Growth proteins N-terminal histone-binding motif), impliqué dans l'interaction avec les histones H3 modifiées ou non (Culurgioni et al., 2012), ainsi que d'un domaine inconnu riche en proline dans l'extrémité C-terminale, qui n'a pas de fonction clairement définie ; ce domaine C-terminal serait impliqué dans la stabilité de la protéine et sa localisation nucléaire (Tomar et al., 2012). La protéine TRIM8/GERP est par ailleurs impliquée dans plusieurs étapes de la voie de signalisation des IFN et des cytokines pro-inflammatoires (Li et al., 2011a; Okumura et al., 2010; Ozato et al., 2008; Tomar et al., 2012; Toniato et al., 2002).

1.3.3. Les protéines du groupe C-IV

Les protéines TRIM5, 11 et 27 et leurs orthologues sont groupées dans des clusters distincts mais proches les uns des autres dans l'arbre phylogénétique (Figure 44). Elles possèdent toutes les domaines caractéristiques de la famille RBCC et font partie du groupe C-IV car elles possèdent uniquement le domaine B30.2 (PRY/SPRY) dans leur partie C-terminale (Short and Cox, 2006) (Figure 44). Un grand nombre des protéines de ce groupe est connu pour intervenir dans l'immunité innée des cellules des mammifères (Ozato et al., 2008). Ces protéines présentent donc un intérêt particulier dans le cadre de notre étude.

Les protéines TRIM5 sont regroupées dans un même cluster, cependant ces orthologues sont aussi très divergents les uns des autres. En effet, ces protéines partagent de 49 à 62% d'identité et les longueurs de branche les plus grandes au sein du même cluster (Tableau 12 et figure 44).

La protéine poTRIM11 a été initialement identifiée sur la banque de donnée GenBank sous le numéro d'accès XP_003123672.2. Sa séquence protéique ne présentait alors que 72 à 81% d'identité avec les orthologues humain, murin et bovin (Tableau 12). Cette première annotation est le résultat d'une analyse automatique et présente des délétions et des acides aminés non identifiés dans la séquence prédite. Cependant, une analyse BLAT sur la dernière version du génome porc (version Sscrofa10.2/susScr3 du SGSC disponible depuis Août 2011) à partir des séquences nucléotidiques des TRIM11 humaines murine et bovine a permis d'identifier une autre poTRIM11 putative. Celle-ci est plus longue de 51 acides aminés et présente respectivement 91%, 86% et 98% d'identité avec ses orthologues humain, murin et bovin (Tableau 12). Cette séquence est depuis référencée sur la base de données GenBank sous le numéro d'accès JAA53691.1. La séquence protéique de ces TRIM bovines et porcines est retenue pour la suite de l'étude (Tableau 12). Par ailleurs, la protéine TRIM11 a été décrite chez l'homme et chez la souris comme un facteur favorisant l'entrée du N-MLV. Elle

bloque cependant ensuite le MLV lors des autres étapes. Pour ces raisons, cette protéine est sélectionnée pour la suite de l'étude.

Les TRIM27 sont très conservées : elles présentent 99-100% d'identité et des longueurs de branches quasi nulles entre elles (Tableau 12 et figure 44). Ces protéines sont impliquées dans des fonctions conservées de régulation de la voie de signalisation des IFN et des cytokines pro-inflammatoires (McNab et al., 2011; Uchil et al., 2013).

1.3.4. Les orthologues de TRIM44

Les orthologues TRIM44 sont relativement bien conservés et présentent de 77 à 91 % d'identités (Tableau 12). Toutefois les protéines TRIM44 diffèrent beaucoup des autres protéines TRIM dans l'arbre phylogénétique (Figure 44). Ceci s'explique d'une part par l'absence de domaine C-terminal et d'autre part par la substitution du domaine RING par un domaine présentant des similarités avec le domaine ZF-UBP (Zinc-Finger Domain Found in Ubiquitin Hydrolases/Protease). De ce fait, cette protéine n'est pas associée à une fonction E3 ubiquitine/SUMO ligase, mais à une fonction de débubiquitination de ses protéines cibles (Urano et al., 2009; Yang et al., 2013). Ainsi cette protéine fait-elle partie des protéines TRIM non classifiées (Short and Cox, 2006) et a récemment été classée à part dans la sous famille P (Marin, 2012).

Tableau 12 : Pourcentages d'identités de l'alignement Blast et identifiants Genbank des séquences protéiques TRIM humaines et murines d'intérêt et de leurs équivalents bovines et porcines.

Entre parenthèse est indiqué le pourcentage de recouvrement des séquences lorsque celui-ci est strictement inférieur à 90%.

		Homo sapiens	Mus musculus	Bos taurus	Sus scrofa	Protein accession number
TRIM 1	Homo sapiens	-	99	99 (65)	99	NP_438112
	Mus musculus	99	-	99 (67)	99	NP_035975
	Bos taurus	99	99	-	99	XP_002699930.1
	Sus scrofa	99	99	99 (67)	-	XP_003360458
TRIM 5	Homo sapiens	-	50	59	58	NP_149023
	Mus musculus	50	-	50	49	XP_997808
	Bos taurus	59	50	-	62	NP_001029970
	Sus scrofa	58	49	62	-	NP_001037997
TRIM 8	Homo sapiens	-	98	99	99	NP_112174
	Mus musculus	98	-	98	98	NP_444330
	Bos taurus	99	98	-	100	NP_001178405
	Sus scrofa	99	98	100	-	XP_001928939
TRIM 11	Homo sapiens	-	90	92	86	NP_660215
	Mus musculus	90	-	97	81	NP_444398
	Bos taurus	92	87	-	92	NP_001071388
	Sus scrofa	91	86	98	-	JAA53691.1
		74	72	81	82	XP_003123672.2
TRIM 27	Homo sapiens	-	99	99	99	NP_006501
	Mus musculus	99	-	99	99	NP_033080
	Bos taurus	99	99	-	100	NP_001069267
	Sus scrofa	99	99	100	-	XP_003128283
TRIM 44	Homo sapiens	-	82	88	91	NP_060053.2
	Mus musculus	85	-	79	86	NP_064663.2
	Bos taurus	87	77	-	88	NP_001098484.1
	Sus scrofa	91	86	85	-	XP_003122913.1

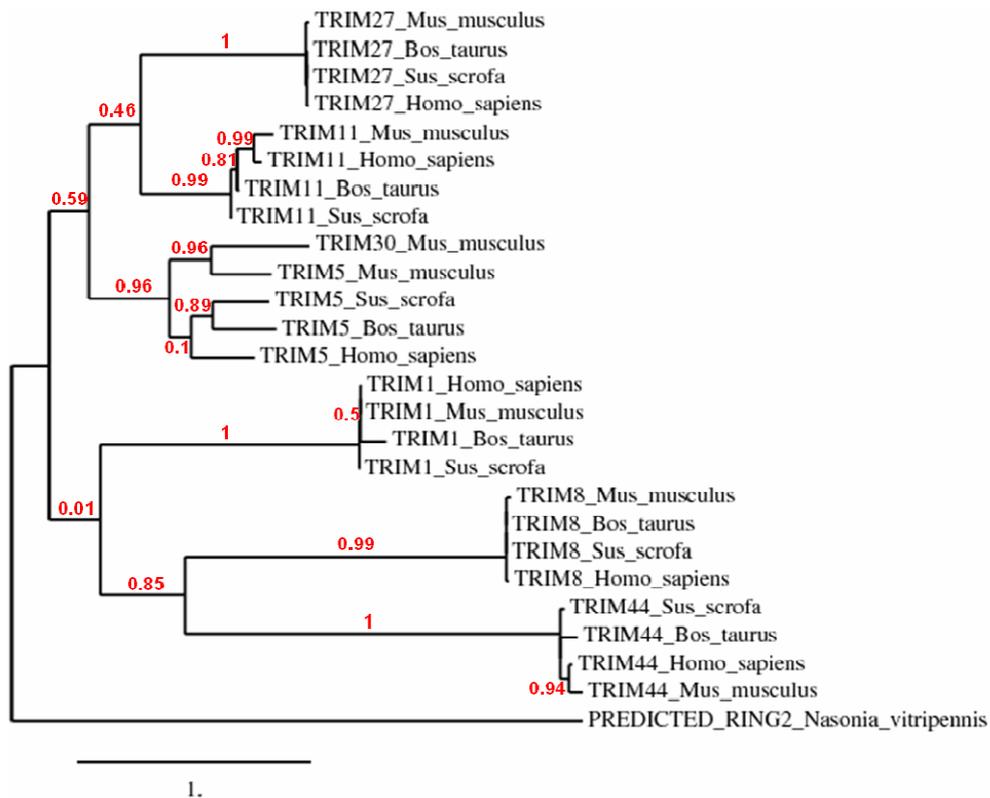


Figure 44 : Arbre phylogénétique des protéines TRIM porcines sélectionnées et de leurs orthologues humain, murin et bovin.

Arbre réalisé avec la méthode du maximum de vraisemblance par l'utilisation des outils internet du site « phylogeny.fr » qui compile trois logiciels (MUSCLE, PhyML et TreeDyn). Les nombres en rouge indiquent les valeurs de « bootstrap ». L'arbre est représenté sous forme de phylogramme ce qui prend en compte la divergence des séquences par la taille des branches (échelle = nombre de substitutions pour 100 acides aminés). L'arbre est enraciné avec l'isoforme de la protéine RING2 de *Nasonia vitripennis* (XP_001608228.2) qui est une E3 ubiquitine ligase putative contenant un domaine similaire au RING.

1.4. Conclusion sur la sélection des TRIM d'intérêts

A l'issue de l'analyse *in silico* des séquences de ces protéines TRIM sélectionnées, nous disposons d'un groupe de quatre protéines TRIM porcines pour l'étude de leurs effets sur l'infection par le PERV, qui sont les poTRIM1, 8, 11 et 27, ainsi que d'un groupe de deux protéines TRIM porcines retenues, a priori, comme témoin négatif de la restriction rétrovirale, les poTRIM5 et 44.

2. Validation des outils moléculaires nécessaires

Pour étudier les effets des protéines TRIM sélectionnées sur le cycle infectieux des PERV, l'utilisation de deux techniques est envisagée. La première permet la surexpression des différentes protéines TRIM dans les cellules par leur clonage dans un vecteur d'expression eucaryote. La seconde permet l'atténuation de l'expression de ces protéines par l'utilisation d'un système d'expression de shRNA dirigés spécifiquement contre ces mêmes TRIM. Cependant l'intégrité et l'efficacité de ces outils doit être vérifiée afin de pouvoir attester de la valeur des résultats obtenus.

2.1.L'outil de surexpression des gènes des TRIM

Afin de construire des lignées cellulaires d'expression des différentes TRIM sélectionnées, leurs séquences codantes doivent être préalablement extraites de cellules porcines, tel que les PK15 ou les ST-IOWA. Ensuite ces séquences sont clonées dans le vecteur d'expression eucaryote le pcDNA3.1/V5-His et, par transfection, ces vecteur permettent de générer des lignées cellulaires HEK293 polyclonales exprimant les TRIM de l'étude. Toutefois l'expression unique de ces protéines doit être vérifiée dans chacune des lignées cellulaires ainsi constituées.

2.1.1. Etude de l'expression dans les tissus des différentes protéines TRIM sélectionnées

Pour s'assurer que la séquence codante de ces protéines puisse être récupérée dans les cellules de PK15 et ST-IOWA, disponibles au laboratoire, une analyse *in silico* de leur expression dans les différents tissus porcins est préalablement réalisée.

La description des EST (Expressed Sequence Tag) est une source de renseignement précieuse pour identifier les tissus exprimant une protéine d'intérêt. Il existe par ailleurs également des banques de données générées à partir d'études micro-array, regroupant les niveaux d'expression de nombreux gènes dans les tissus humains et murins (BioGPS : <http://biogps.org/#goto=welcome>). Ainsi, pour chaque orthologue TRIM, une liste des tissus dans lesquels l'expression de ces protéines a été identifiée est générée (Tableau 13).

Malgré l'absence de données concernant le porc, il est possible d'inférer l'expression de la protéine d'intérêt dans des cellules ou des tissus de porc, par analogie entre différentes espèces et ainsi d'y trouver les ARNm correspondants (Tableau 13). Ainsi, le recoupement de ces données suggère que les gènes des TRIM d'intérêt ont de forte probabilité d'être exprimés dans les cellules PK15, issues de reins de porc, et ST-IOWA, issues de testicules de porc (Tableau 13). Toutefois la séquence codante de la protéine TRIM44 n'a pu être amplifiée qu'à partir des cellules ST-IOWA.

Tableau 13 : tableau récapitulatifs des tissus où les différentes TRIM se trouvent exprimées.

n.d. = non déterminé ; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.

TRIMs	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>
TRIM1	Reins	Cerveau, yeux, cœur, poumon, intestin, ovaire, glandes mammaires...	n.d.	Testicules
TRIM5	Reins, testicules, peau, poumon, rate, cerveau, pancréas, yeux, muscles...	Reins, testicules ...	n.d.	Prostate, thymus, PBMC
TRIM8	Reins, testicules	n.d.	n.d.	Reins, testicules...
TRIM11	Testicules, poumon, intestin, ovaires, glandes mammaires, sang...	Reins, testicules	Peau, colon, ovaires, glandes mammaires, rate, cerveau...	intestin, n.d. glandes thymus,
TRIM27	Testicules, foie, placenta, cerveau, lymphes, sang, yeux...	Testicules, poumon, cerveau, foie, ovaires, glandes mammaires...	Peau, glandes mammaires, cerveau...	n.d. muscles,
TRIM44	Reins, testicules ...	Reins, testicules ...	n.d.	Reins...

2.1.2. Caractérisation des lignées cellulaires exprimant les poTRIM

Les séquences codantes des différentes protéines TRIM ont pu être correctement extraites des cellules porcines puis clonées dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His. Ces vecteurs sont transfectés dans les cellules HEK293 qui, soumises à une pression de sélection au G418, génèrent des lignées cellulaires polyclonales exprimant les TRIM de façon constitutive. Ces lignées cellulaires sont évaluées pour leur capacité à exprimer les différentes protéines TRIM de l'étude et pour l'uniformité de leur croissance.

2.1.2.1. Evaluation de l'expression des protéines TRIM

La capacité des différentes lignées cellulaires HEK293 à exprimer les protéines TRIM est évaluée par RTq-PCR et par Western Blot. Ces mesures sont effectuées à 36h post transfection et 30 jours post transfection.

2.1.2.1.1. Evaluation de la transcription des gènes TRIM

La détection des ARNm est réalisée par RTq-PCR avec un couple d'amorce spécifique pour chaque TRIM testées. Dès 36h post transfection, chaque lignée exprime correctement une seule séquence

TRIM (Figure 45). Cependant l'amplification des ARNm de la poTRIM27 présente un bruit de fond dû à l'amplification de l'ARNm de la huTRIM27 endogène. En effet, entre l'homme et le porc, cette protéine est la plus conservée des TRIM étudiées. Elle présente 99% d'identité pour sa séquence protéique et 95% d'identité pour sa séquence codante avec un recouvrement total. Ce bruit de fond est aussi présent pour des cellules sauvages (HEK293-WT) cultivées et récoltées indépendamment de l'étude. Les amorces choisies ne sont pas assez spécifiques de la TRIM27 porcine dans ce cas.

En ce qui concerne la protéine TRIM1 β , son expression dans les cellules HEK293 est comparée à celle de TRIM1 α . En méthode relative, une telle différence n'est pas significative et correspond davantage aux variations techniques qu'à de réelles variations biologiques (Goni et al., 2009). En effet la différence des Δ Ct entre TRIM1 α et β (normalisé à la β -actine) est faible, de 0,3Ct (Δ Ct T1a = -4,59 contre Δ Ct T1b = -4,3).

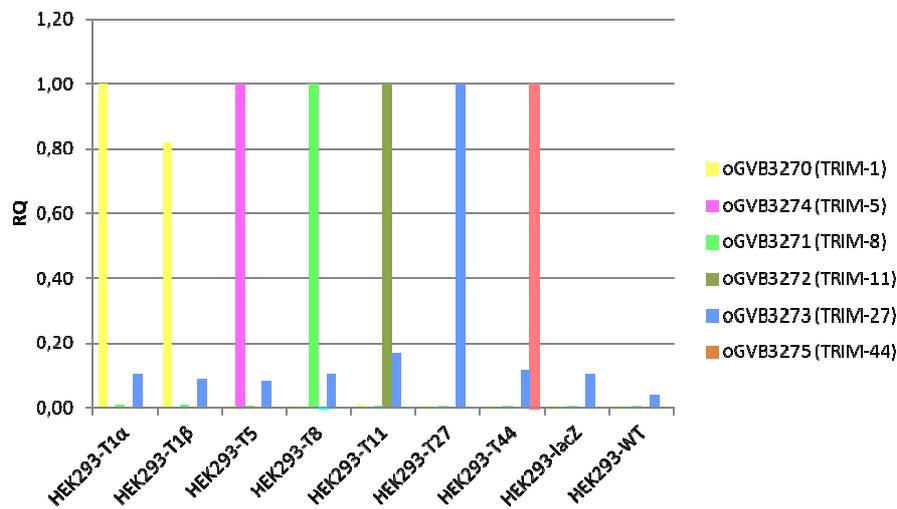


Figure 45 : Dosage de l'expression des ARNm TRIM par RTq-PCR.

Chaque couleur correspond à une paire d'oligonucléotides spécifique d'une protéine TRIM. La quantification est réalisée par une méthode relative, calculée avec le $\Delta\Delta$ Ct, en présence d'un contrôleur négatif. Les quantités obtenues sont normalisées avec le dosage de l'expression du gène ubiquitaire de la β -actine (Δ Ct) puis pour chaque lignée cellulaire, la quantité dosée avec les amorces ciblant une TRIM donnée est comparée à la quantité dosée dans la lignée cellulaire d'expression de cette TRIM ($\Delta\Delta$ Ct). Ce qui permet de calculer les quantités relatives (RQ). Dans le cas de TRIM1 α et β , les quantités dosées sont comparées à celles obtenues avec la lignée cellulaire HEK293-T1 α .

2.1.2.1.2. Evaluation de la traduction des protéines

Les séquences codantes des protéines TRIM ont été clonées en fusion dans la partie C-terminale de la protéine avec les tags V5 et His, ces marqueurs sont facilement détectables en Western Blot (WB) par l'utilisation d'anticorps ou de sondes spécifiques. Ainsi l'expression et la taille des protéines TRIM dans les cellules transfectées est confirmée dès 36h post transfection. La détection est réalisée avec un anticorps anti V5 qui se fixe sur le tag en fusion de la protéine (Figure 46A & B).

Dans certains cas plusieurs bandes sont observées. Ceci peut être dû à de nombreux phénomènes tels que des modifications post traductionnelles, des synthèses de protéines non achevées ou encore à des dégradations partielles de la protéine. Ces bandes supplémentaires sont en général de plus faible intensités (e.g. TRIM11 et TRIM5). Dans le cas de TRIM1, l'isoforme TRIM1 α diffère de l'isoforme β par l'absence d'une séquence de 90 nucléotides au milieu du gène, probablement issue d'un épissage alternatif du messenger de TRIM1 (Figure 46C). Cela se traduit par une différence de 3,5kDa entre les deux protéines (Figure 46A & B). En WB chacune de ces protéines présente deux bandes séparées d'environ 10kDa et d'intensité similaire (Figure 46A). L'analyse de la séquence codante de TRIM1 montre qu'elle possède un codon d'initiation alternatif ATG situé à 111 résidus du codon d'initiation originel, soit une différence d'environ 12,7kDa (Figure 46C). Ceci peut expliquer la présence de la bande plus légère. Ce codon d'initiation alternatif conserve le cadre de lecture de la protéine et est suffisamment proche du promoteur CMV pour entraîner la transcription d'une protéine plus courte (Figure 46C).

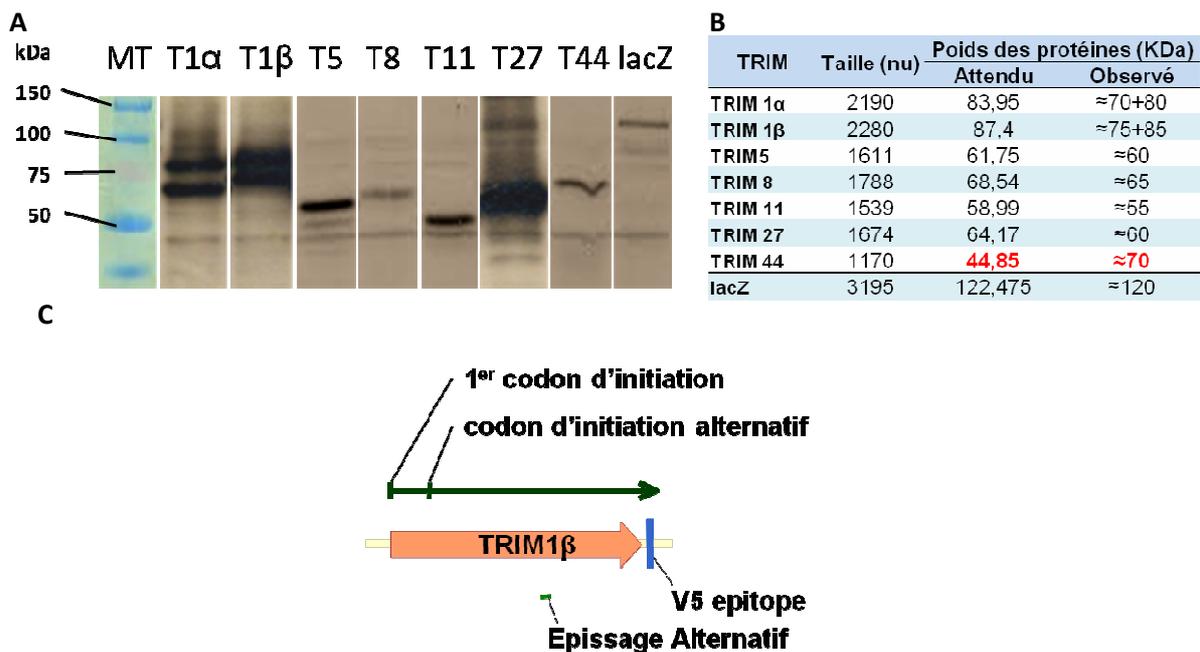


Figure 46: Analyse de l'expression des TRIM dans les cellules HEK293.

(A) Western Blot dirigé contre le tag V5 en fusion des protéines TRIM exprimées dans les cellules HEK293. (B) Tailles attendues pour chaque protéine TRIM en fusion des tag V5 et His. (C) schéma du gène de TRIM1 β qui a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His.

Le cas particulier de la protéine poTRIM44

En western Blot la taille apparente de la protéine poTRIM44 n'est pas conforme à ce qui était attendu avec un poids moléculaire apparent de 70 kDa au lieu des 44,85 kDa théoriques (Figure 46A). Une telle différence pourrait être liée à une modification post traductionnelle. La majorité des

protéines TRIM participe aux modifications post traductionnelles d'ubiquitination et de sumoylation via leur activité E3 ubiquitine/sumo ligase menée par l'action combinée des domaines RING et B-box qu'elles portent (Chu and Yang, 2011; Meroni and Diez-Roux, 2005) mais elles en sont aussi la cible (Brandariz-Nunez et al., 2013).

TRIM44 présente, dans sa partie C-terminale, un motif putatif de conjugaison des protéines SUMO (SCM), le site P-K-A-E (Figure 47A). Celles-ci se fixent sur la lysine du site cible, de consensus Ψ -K-X-E/D, de façon covalente, elles ont une taille de 10kDa et les isoformes 2 et 3 peuvent générer des chaînes (Anckar and Sistonen, 2007; Chu and Yang, 2011; Coiffic et al., 2010). Cette modification post traductionnelle pourrait expliquer le surplus de taille de 30kDa observé pour TRIM44. Bien qu'une seule bande majoritaire pour cette protéine soit visible alors qu'une telle modification devrait entrainer la présence de plusieurs bandes espacées les unes des autres de 10kDa. La mutation du site putatif de sumoylation n'entraîne cependant aucune modification de la masse apparente de la protéine (Figure 47B). Par ailleurs, dans certains cas, la taille des protéines peut varier en fonction du type cellulaire utilisé et des modifications post traductionnelles induites (Shi et al., 2012). Cependant, la transfection de ce même gène dans des cellules PK15 génère le même profil de migration de la protéine que dans les cellules HEK293 (Figure 47B).

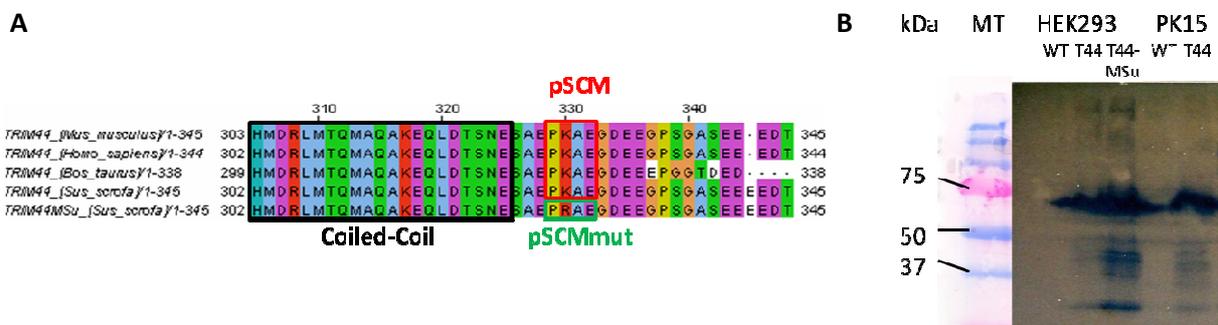


Figure 47 : Caractéristiques de la protéine TRIM44.

(A) Alignement de la partie C-terminale des séquences protéiques des TRIM44 murine, humaine, bovine et porcine et de TRIM44 mutée K327R sur le motif putatif de conjugaison des protéines SUMO (TRIM44MSu). L'alignement est réalisé avec le logiciel Muscle disponible sur internet. pSCM = putatif SUMO-conjugating motif ; pSCMmut = pSCM muté K327R. **(B)** Western Blot de la protéine TRIM44 (T44) et TRIM44MSu (T44MSu) dans les cellules HEK293 et PK15.

L'analyse *in silico* de la séquence protéique de TRIM44 montre une protéine très acide. Elle présente 29,9% d'aspartate (D) et de glutamate (E), ce qui lui confère un potentiel isoélectrique (pI) de 4,18 (Figure 48A). Une analyse par prédiction du désordre protéique à l'aide du logiciel « Psipred » (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) montre le profil d'une protéine potentiellement très déstructurée, notamment entre les deux domaines structuraux ZF-UPB et la B-box-2 (Figure 48B et C). Ces paramètres ont déjà été décrits pour des protéines ayant aussi un profil de migration

aberrant en SDS-PAGE (Alves et al., 2004; Garcia-Ortega et al., 2005). Il en résulte un appauvrissement de la protéine en domaines hydrophobes ce qui entraîne un défaut de fixation du SDS et donc une modification de la migration du complexe SDS-protéine. La structure potentiellement désordonnée de TRIM44 pourrait être à l'origine de la migration aberrante observée en WB.

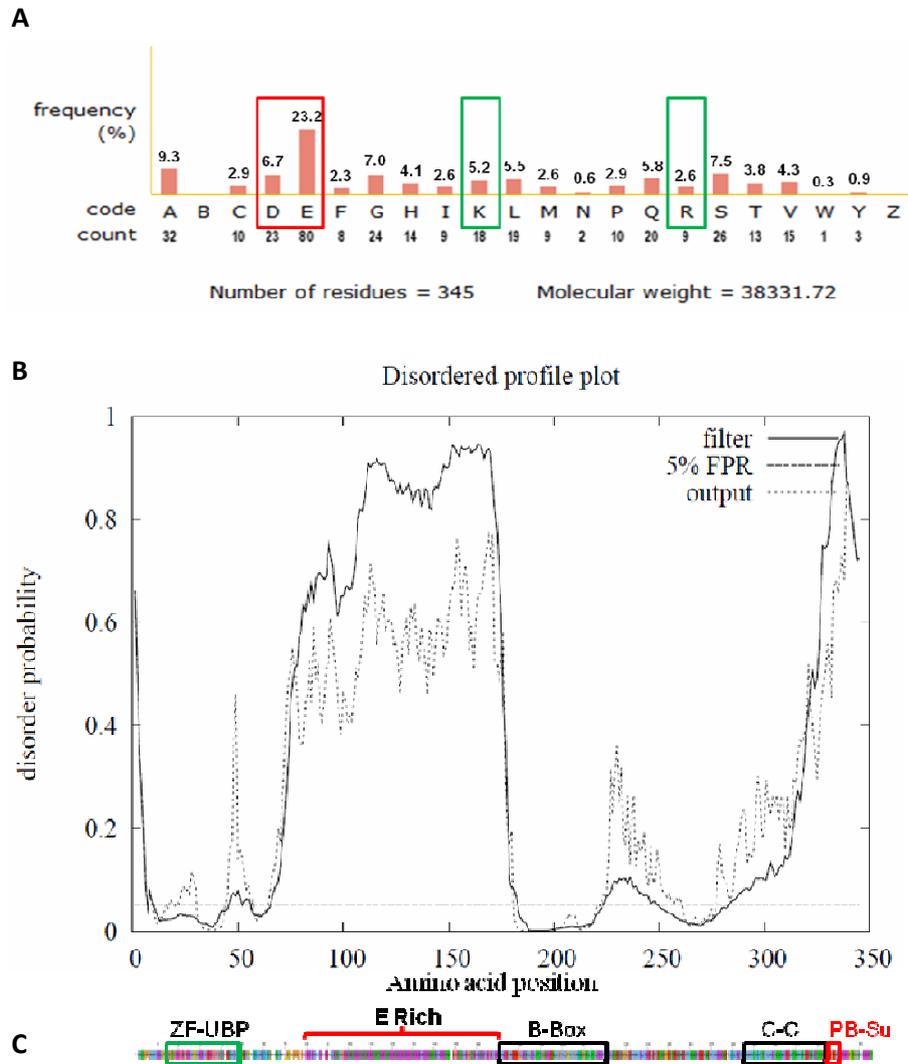


Figure 48 : Analyse de la séquence protéique de la poTRIM44.

(A) Analyse de la composition en acide aminée de TRIM44, réalisé avec l'outil internet "Protein Information Resource". Encadrés en rouge, les acides aminés acides, Aspartate et Glutamate (D et E respectivement). Encadrés en vert les acides aminés basiques, Lysine et Arginine (K et R respectivement). (B) Représentation graphique du profil du désordre protéique de la protéine poTRIM44. La prédiction du désordre est réalisé avec le logiciel « The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench » en utilisant la méthode de prédiction « DISOPRED2 ». (C) schéma de la séquence de la protéine poTRIM44. ZF-UBP = Zinc-Finger Domain Found in Ubiquitin Hydrolases/Protease ; E Rich = zone riche en glutamate ; C-C = domaine Coiled-Coil ; PB-Su = site putatif de SUMOylation.

2.1.2.2. Evaluation de la croissance des différentes lignées cellulaires

Les protéines TRIM sont des facteurs connus pour participer à de nombreuses fonctions essentielles, dont la croissance cellulaire (Reymond et al., 2001). L'expression de ces transgènes porcins dans les

HEK293 peut donc potentiellement modifier la croissance de ces cellules et de ce fait influencer les paramètres mesurés de l'infection par le PERV-GFP.

Le test MTT, habituellement utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire, permet de doser la quantité de cellules vivantes présentes dans un échantillon. Ainsi si la vitesse de croissance des lignées cellulaires HEK293-poTRIM est modifiée, la quantité de cellules dosées sera différente de la lignée sauvage au cours du temps. Ce test permet donc de s'assurer que nos lignées cellulaires présentent des vitesses de croissance similaires.

Les lignées cellulaires HEK293-poTRIM sont comparées à des cellules non transfectées et des cellules transfectées par le même vecteur mais pour lequel le cDNA TRIM est remplacé par le gène codant la protéine lacZ, qui ne présente a priori aucune activité dans les cellules eucaryotes. Le test ne montre pas de différence significative de la viabilité cellulaire sur 72h (Figure 49). Les différentes lignées cellulaires réalisées présentent des cinétiques de prolifération similaires et sont comparables pour l'étude de l'infection par le PERV.

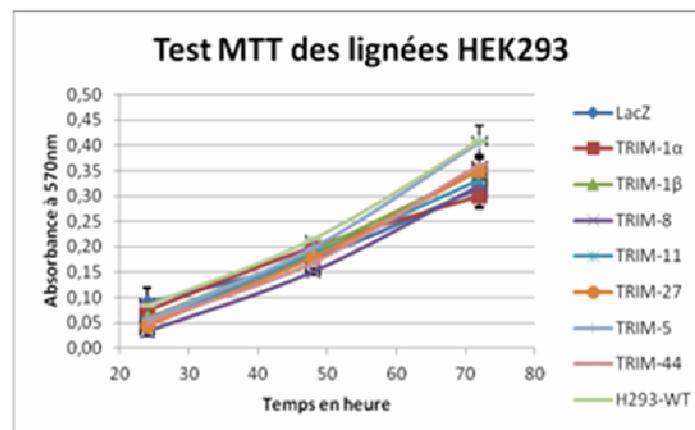


Figure 49 : Test MTT réalisé sur les lignées cellulaires HEK293-TRIM comparé aux cellules non transfectées et transfectées par le vecteur lacZ.

Le test est réalisé en triplicata pour chaque point de mesure, sur des cellulesensemencées à $4,5 \cdot 10^3$ cellules par puits en plaques 96 puits. Les cellules sont analysées tous les 24h pendant 72h. Le traitement est effectué pendant 4h avec une solution de MTT à $500 \mu\text{g/ml}$ et solubilisées et homogénéisées dans de l'isopropanol acidifié (23:1 isopropanol HCl 1N).

2.1.3. Conclusion sur la construction des lignées HEK293-poTRIM

A l'issue des 30 jours de la phase de sélection au G418, les différentes lignées sélectionnées surexpriment toutes de façon constitutive la protéine TRIM porcine qui leur a été ajoutée. Ces lignées cellulaires sont validées et utilisées pour évaluer les propriétés potentielles des TRIM sur le cycle infectieux du PERV. Les lignées sont réévaluées régulièrement afin de s'assurer tout de long de l'étude que les protéines TRIM sont correctement exprimées dans chacune des lignées cellulaires.

2.2.L'outil de l'interférence ARN des TRIM

Un outil inhibant spécifiquement l'expression des TRIM étudiés est élaboré, afin de pouvoir consolider les effets potentiels des protéines TRIM sur le cycle répliatifs du PERV. Le système psiRNA-h7SKhygro permet d'exprimer les shRNA qui ont été construits pour cibler spécifiquement les protéines de l'étude. Dans un premier temps, ce système est évalué pour son efficacité à créer une interférence sur les ARNm des différentes poTRIM dans les premiers jours après sa transfection. Puis il est testé pour générer une expression constitutive de ces ARN interférant dans les différentes lignées cellulaires HEK293-poTRIM.

2.2.1. Efficacité des shRNA sur des temps court après transfection

Afin d'évaluer l'efficacité des shRNA sur les TRIM de l'étude, des transfusions transitoires sont effectuées et analysées avec les différents vecteurs d'expression des shRNA. Tout d'abord le témoin de l'efficacité du système est analysé, puis, dans les mêmes conditions opératoires, l'atténuation de l'expression des gènes des TRIM est testée.

2.2.1.1. Evaluation de l'efficacité du système psiRNA-h7SKhygro

Le shRNA spécifique de la GFP, témoin d'efficacité du kit, est co-transfecté avec un vecteur d'expression de la GFP dans des cellules HEK293. Au bout de 24h et de 48h post transfection (pt), les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Ce témoin montre une diminution nette de la quantité de cellules fluorescentes dès 24h pt par rapport aux conditions sans shRNA spécifique de la GFP (Figure 50A). L'analyse par cytométrie de flux permet de confirmer et de quantifier la diminution de la fluorescence. Dans ces conditions, le shRNA anti GFP entraîne une diminution de 80% des cellules positive à la GFP par rapport aux conditions sans shRNA spécifique de la GFP (Figure 50B). De plus la MIF (qui caractérise l'expression moyenne de la GFP dans la population cellulaire) des cellules restantes positives pour la GFP (20%), montre une diminution d'environ 60% par rapport à la condition sans shRNA (Figure 50C). L'atténuation de l'expression de la GFP est par conséquent efficace.

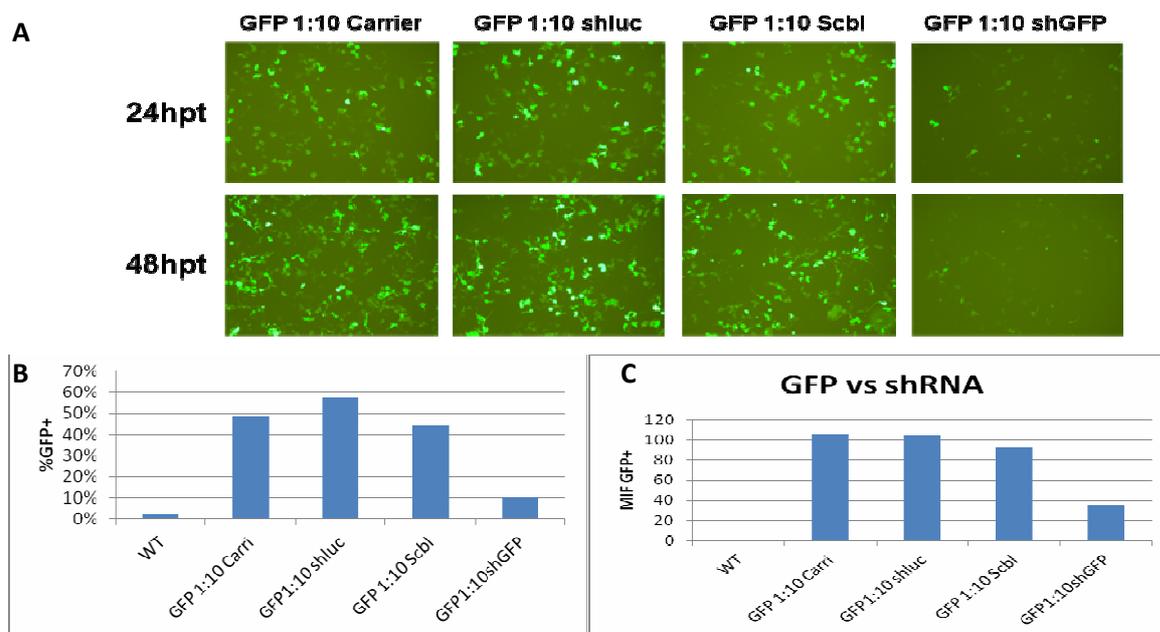


Figure 50 : Evaluation du knockdown de la GFP par le shRNA anti GFP du kit psiRNA-h7SKhygro G1.

Carrier = ADN de saumon ; shluc = shRNA spécifique des transcrit de la luciférase ; Scbl = Scramble ; shGFP = shRNA spécifique des transcrit de la GFP. (A) Photos représentatives des populations cellulaires observées au microscope à fluorescence, 24h et 48h post transfection (pt), grossissement x40. (B) et (C) Analyse par cytométrie de flux des cellules 48h pt. (B) Pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+). (C) Moyenne de l'intensité de la fluorescence des cellules GFP+ (MIF GFP+).

L'efficacité de l'atténuation de l'expression par le shRNA du kit est avérée dans des conditions de co-transfection. Il est toutefois nécessaire de tester le système avec des lignées sur lesquelles la protéine est exprimée de façon durable et constitutive. L'expérience est réalisée sur une lignée cellulaire dont 100% de la population exprime la GFP du PERV-GFP depuis plus de 30 jours, avec une intensité moyenne de 35 à 40, pour une autofluorescence des cellules de 0,7. Le shRNA anti GFP ainsi que les témoins « scramble » et shluc (shRNA non spécifique de la GFP) sont transfectés dans les mêmes conditions que pour l'expérience précédente mais sans le vecteur d'expression de la GFP.

Quelque soit la condition analysée, 72h après transfection, 100% des cellules restent GFP+ (Figure 51A & B). Cependant, en présence du shRNA spécifique de la GFP, une deuxième population se distingue de la première (Figure 51A). Cette nouvelle population (région F, figure 51), représente 44% environ de la population totale et possède une intensité moyenne de 5, tandis que la première population (région G, figure 51), conserve une intensité légèrement inférieure à 35 et comparable à celle du témoin shluc (Figure 51A & C). Dans ces conditions, 44% de la population cellulaire est affectée par les shRNA et, parmi ces cellules, l'efficacité de l'atténuation de l'expression de la GFP est d'environ 85%.

Ces cellules expriment fortement et continuellement la GFP depuis plus de 30 jours, et sachant que la $\frac{1}{2}$ vie de cette protéine est approximativement de 26h (Corish and Tyler-Smith, 1999), il n'est pas

surprenant que toutes les cellules émettent encore une fluorescence suffisante pour être considérées comme positives au FACS. Cependant ce problème ne devrait pas se poser avec les protéines TRIM, qui possèdent en général un temps de demi-vie court allant de moins d'une heure à plus de 4h selon les protéines TRIM considérées (Bell et al., 2012; Fletcher and Towers, 2013).

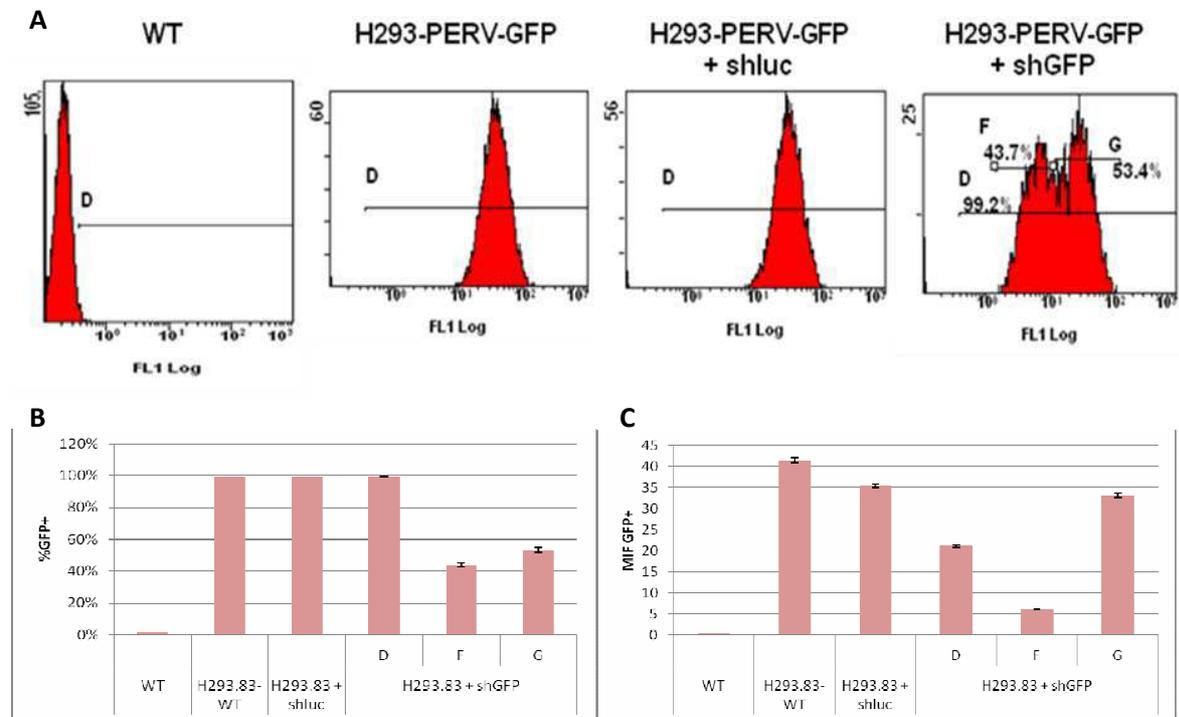


Figure 51 : Evaluation de l'efficacité des shRNA spécifique de la GFP 72h post transfection, sur une lignée PERV-GFP.

WT = HEK293 sauvages ; H293-PERV-GFP = HEK293 transfectées par le PERV-GFP ; +shLuc = cellules transfectées par le shRNA anti luciférase +shGFP = cellules transfectées par le shRNA anti GFP. (A) Populations cellulaires fluorescent dans le vert (FL1, échelle logarithmique) observées par cytométrie de flux. (B) paramètre du pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+). (C) paramètre de la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules GFP+ (MIF GFP+).

2.2.1.2. Evaluation de l'atténuation de l'expression des TRIM par transfection transitoire

L'atténuation de l'expression des TRIM est testée dans les conditions de co-transfection, en utilisant séparément les trois shRNA spécifiques de la TRIM considérée (Figure 52). L'expérience est réalisée sur les TRIM8 et 11 : ces protéines présentent en effet un fort intérêt pour l'étude révélée par les expériences d'infection et de transfection réalisées en parallèle (cf. § 3.1.1. Evaluation des effets sur l'infection des PERV sur des périodes courtes). Les « scramble » (Scbl) correspondant à chaque shRNA de l'expérience sont utilisés comme témoin négatif de l'atténuation. En présence de TRIM8 et TRIM11, ce témoin ne montre aucune différence significative de l'expression de la protéine en comparaison des résultats obtenus sans shRNA et permet de valider l'expérience (Figure 52A et B).

poTRIM8

Dans le cas de la protéine poTRIM8, les shRNA #1 et #3 génèrent une diminution de la quantité des transcrits mesurée avec une efficacité modérée qui est respectivement de 28% et 36% par rapport au témoin sans shRNA. Le shRNA #2 est plus efficace et présente une atténuation de 62% par rapport au témoin de référence (Figure 52A). C'est donc le shRNA #2 qui est retenu pour la réalisation d'une atténuation de poTRIM8.

poTRIM11

L'essai réalisé sur la protéine poTRIM11 présente des effets similaires aux effets observés sur TRIM8 : les shRNA#1 et #3 présentent une atténuation peu efficace, respectivement de 32% et 23% par rapport au témoin sans shRNA. Le shRNA #2 est plus efficace et présente une atténuation de 58% par rapport au témoin de référence (Figure 52B). C'est donc le shRNA #2 qui est retenu pour la réalisation d'une atténuation de poTRIM11.

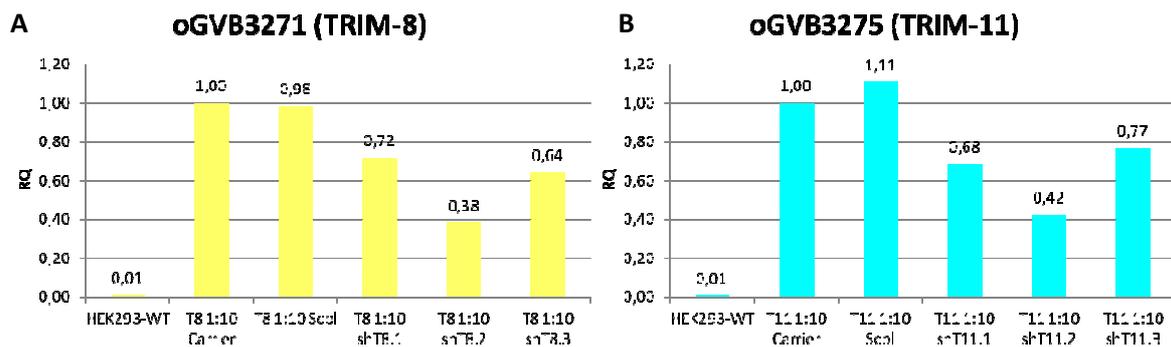


Figure 52 : Evaluation de l'efficacité des différents shRNA par dosage des transcrits par RTq-PCR des protéines poTRIM8 et 11 de l'étude.

Les résultats sont exprimés en quantité relative (RQ) à la condition de référence « TRIMX 1:10 carrier » (qui ne contient pas de shRNA). La méthode de calcul utilisée est le $\Delta\Delta Ct$ en utilisant le gène de ménage de la β -actine. Carrier = ADN de saumon ; Scbl = Scrambl correspondant aux shRNA utilisés ; HEK293-WT = HEK293 sauvage ; T8 = TRIM8 ; shT8.1 = shRNA #1 spécifique de TRIM8 (cette nomenclature est la même pour les TRIM11). (A) et (B) expériences réalisées respectivement sur les TRIM8 et 11.

2.2.2. Construction d'une lignée d'expression constitutive du système des shRNA

Le système de l'atténuation de l'expression des TRIM par leur shRNA spécifique est efficace sur des temps court après la transfection (24-72h pt). Ce système est prévu pour pouvoir exprimer les shRNA de façon constitutive dans les cellules eucaryotes. En effet, le vecteur d'expression contient un gène de sélection à l'hygromycine procurant une résistance à cet antibiotique.

Les lignées cellulaires HEK293-poTRIM8 et 11 sont transfectées dans les mêmes conditions, avec les vecteurs d'expression des shRNA qui leur sont spécifiques. Ces cellules sont cultivées en présence

des deux antibiotiques, l'hygromycine et le G418. Un témoin d'efficacité de l'interférence ARN est réalisé à partir d'une lignée infectée par le PERV-GFP dont 100% des cellules expriment la GFP et un vecteur d'expression d'un shRNA spécifique de la GFP, la sélection est réalisée en présence d'hygromycine seulement.

Au bout de 20 jours les lignées poussent de façon stable en présence des antibiotiques. L'efficacité de l'interférence ARN des TRIM ou de la GFP est évaluée par RTq-PCR sur les lignées cellulaires transfectées avec le système des shRNA spécifique comparées aux mêmes lignées cellulaires non transfectées (Figure 53). Aucune diminution significative de l'expression des TRIM n'est identifiée. Il en est de même avec le contrôle shRNA spécifique de la GFP. Dans ces conditions il n'est pas possible d'obtenir une lignée TRIM dont l'expression est atténuée.

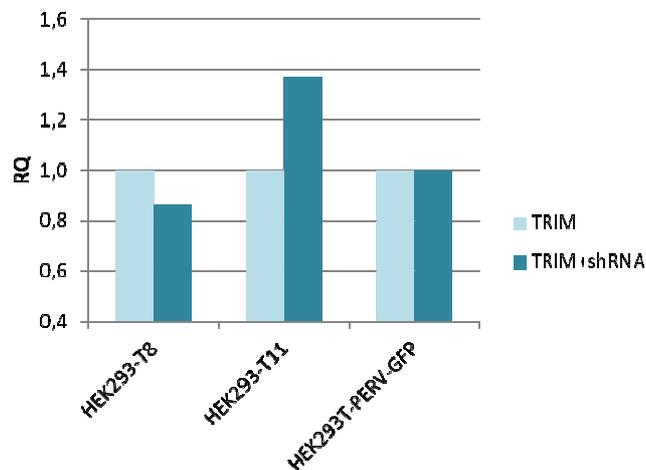


Figure 53 : Analyse de l'efficacité de l'atténuation constitutive de l'expression des gènes poTRIM8 et 11.

q-PCR réalisée sur les lignées cellulaires poTRIM8 et 11, en absence de shRNA (TRIM, barres claires) ou en présence de shRNA (TRIM + shRNA, barres foncées). Les résultats sont exprimés en quantité relative (RQ) calculés par la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Ainsi les quantités dosées sont normalisées par le dosage du gène de ménage de la β -actine (ΔCt) puis comparé ($\Delta\Delta Ct$) à la condition de référence qui est la lignée sans shRNA pour chaque lignée cellulaire poTRIM évaluée.

2.2.3. Conclusion sur le système d'atténuation de l'expression des TRIM par les shRNA

L'outil de l'atténuation de l'expression des gènes des TRIM porcines de l'étude est efficace jusqu'à 72h après sa transfection. En revanche, dans les conditions utilisées au laboratoire, le système de sélection prévue sur le vecteur d'expression des shRNA ne permet pas de générer des lignées cellulaires avec une interférence ARN efficace. Dans notre étude ce système est donc utilisé uniquement en transfection transitoire pour étudier les effets des TRIM sur le cycle réplcatif du PERV.

3. Mise en évidence et caractérisation d'une activité de restriction des TRIM sur le PERV

Les différentes lignées HEK293-poTRIM, préalablement réalisées, expriment séparément et de façon constitutive soit les différentes protéines TRIM porcines de l'étude soit le témoin d'expression lacZ. Ces lignées sont utilisées pour évaluer les effets potentiels des protéines poTRIM sélectionnées sur le cycle répliatif du PERV. A cette fin, des infections sont menées sur les lignées cellulaires HEK293-poTRIM avec l'outil PERV-GFP construit dans le cadre de cette étude. Ainsi, les protéines TRIM présentant des effets significatifs sur l'infection par le PERV, sont retenues. Leurs effets sur le cycle répliatif du PERV seront caractérisés à l'aide de méthodes fines permettant la quantification des différents marqueurs moléculaires d'étapes essentielles du cycle rétroviral.

3.1. Influence des poTRIM sur l'infection PERV

Les lignées cellulaires HEK293-poTRIM ainsi que la lignée contrôle exprimant lacZ, sont infectées par le PERV-GFP à une faible MOI, afin d'éviter une potentielle saturation des TRIM exprimées mais suffisamment éloignée du bruit de fond et de la limite de détection du cytomètre de flux pour permettre de mesurer les effets potentiels sur l'infection PERV (Passerini et al., 2006; Sayah and Luban, 2004). Les infections sont ainsi réalisées à des MOI de l'ordre de 0,2 à 0,3 à 36h pi et analysées par cytométrie de flux sur plusieurs jours après l'infection.

Grâce à l'expression de la GFP du PERV, cette analyse permet de mesurer deux paramètres essentiels : -d'une part, les cellules détectées positivement pour la GFP, sont des cellules infectées par le PERV qui expriment suffisamment cette protéine. Ainsi la quantité de ces cellules détectées dans la population donne le paramètre de pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+) soit la proportion de la population cellulaire infectée par le PERV. ; -d'autre part, l'intensité de la fluorescence détectée est corrélée à l'expression de la GFP du PERV et à la quantité de GFP présente dans une même cellule. Ainsi la moyenne de l'intensité de fluorescence (MIF) mesurée dans une population cellulaire infectée (GFP+) illustre l'expression moyenne du PERV dans cette population.

3.1.1. Evaluation des effets sur l'infection PERV sur des périodes courtes

L'infection des lignées TRIM a été suivie pendant 72h par cytométrie de flux avec un point de prélèvement effectué toutes les 24h. Pour les lignées exprimant TRIM1 α et β , TRIM27 et TRIM5, par rapport à la lignée témoin exprimant lacZ, cette première expérience ne montre aucun effet significatif sur l'infection PERV, que ce soit en quantité de cellules GFP positives ou en MIF (Figure 54). La lignée TRIM8 montre, quant à elle, une légère diminution significative, de la quantité de cellules GFP positives à partir de 48h pi (Figure 54A). Au contraire, les lignées exprimant TRIM11 et TRIM44 présentent une augmentation de 40% et de 15% dès 24h pi. Cet effet s'estompe cependant à

partir de 48h pi (Figure 54A). Des effets concernant ces protéines sont aussi visibles avec le niveau d'expression du rapporteur GFP (la MIF). Dans le cas de la lignée exprimant TRIM8, on observe une diminution significative de 10% de l'expression du gène rapporteur à partir de 48h pi. La lignée exprimant TRIM11 génère, quant à elle, une hausse progressive de la MIF qui devient significative à 72h pi avec une augmentation de 10%. Il en est de même avec TRIM44 pour laquelle l'effet est beaucoup plus important que pour TRIM11 et ce dès 48h pi (+20%) pour atteindre 30% environ d'augmentation à 72h pi (Figure 54B).

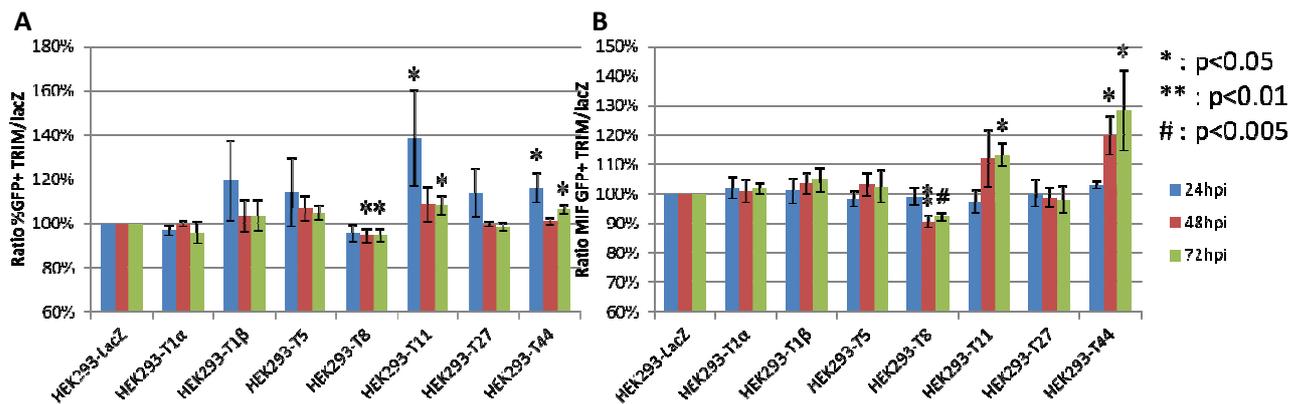


Figure 54 : Analyse, par cytométrie de flux, de l'infection des lignées HEK293 par le PERV- GFP suivie pendant 72h.

Le surnageant infectieux a été dilué au 1/10 ce qui correspond à une MOI de 0,25 à 48hpi. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la lignée lacZ. (A) pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+). (B) moyenne d'intensité des cellules GFP positives (MIF GFP+).

Cette première série d'expériences a permis de mettre au point le protocole d'infection des cellules par le PERV et d'identifier des protéines agissant différemment sur son cycle infectieux. La protéine poTRIM8 présente un léger effet de restriction vis-à-vis de l'infection PERV ; inversement la protéine poTRIM11 semble favoriser l'infection par le PERV des cellules HEK293. La protéine poTRIM5 avait été sélectionnée comme témoin négatif de la restriction du PERV, ces premières observations confortent ce choix. Il en était de même pour poTRIM44, cependant, contrairement à poTRIM5, la lignée exprimant poTRIM44 entraîne une surexpression du gène rapporteur.

Les protéines poTRIM1α et β et poTRIM27 ne présentent en revanche pas d'effets significatifs sur les différents paramètres évalués jusqu'à 72h pi. Ces protéines ne seront pas investiguées plus en avant dans le cadre du présent travail.

3.1.2. Evaluation des effets sur des périodes longues de l'infection PERV

Les variations des paramètres étudiés restent faibles 72h après l'infection, notamment dans le cas de TRIM8. Etant donné que le PERV-GFP utilisé est répliquatif, l'infection s'amplifie au cours du temps. Le suivi de l'évolution de cette infection sur des temps plus long permet donc potentiellement

d'amplifier les effets observés dans les différentes lignées cellulaires. En effet, si une protéine poTRIM a une action sur l'infection PERV l'effet, stimulateur ou inhibiteur, observée sur une plus longue période elle devrait s'accroître.

L'analyse de la cinétique d'infection est menée sur les lignées cellulaires retenues, pendant 21 jours avec une MOI initiale, mesurée à 72hpi, de 0,38 (Figure 55A et B). Les trois cinétiques réalisées permettent de récolter des cellules pour la caractérisation du mécanisme d'action de ces TRIM sur le cycle réplcatif du PERV. L'évolution de cette infection présente une phase exponentielle entamée après le 11^{ème} jour et atteint un niveau maximum moyen de 67% au 18^{ème} jour (Figure 55A). Cette état stationnaire perdure jusqu'à la fin de l'expérience.

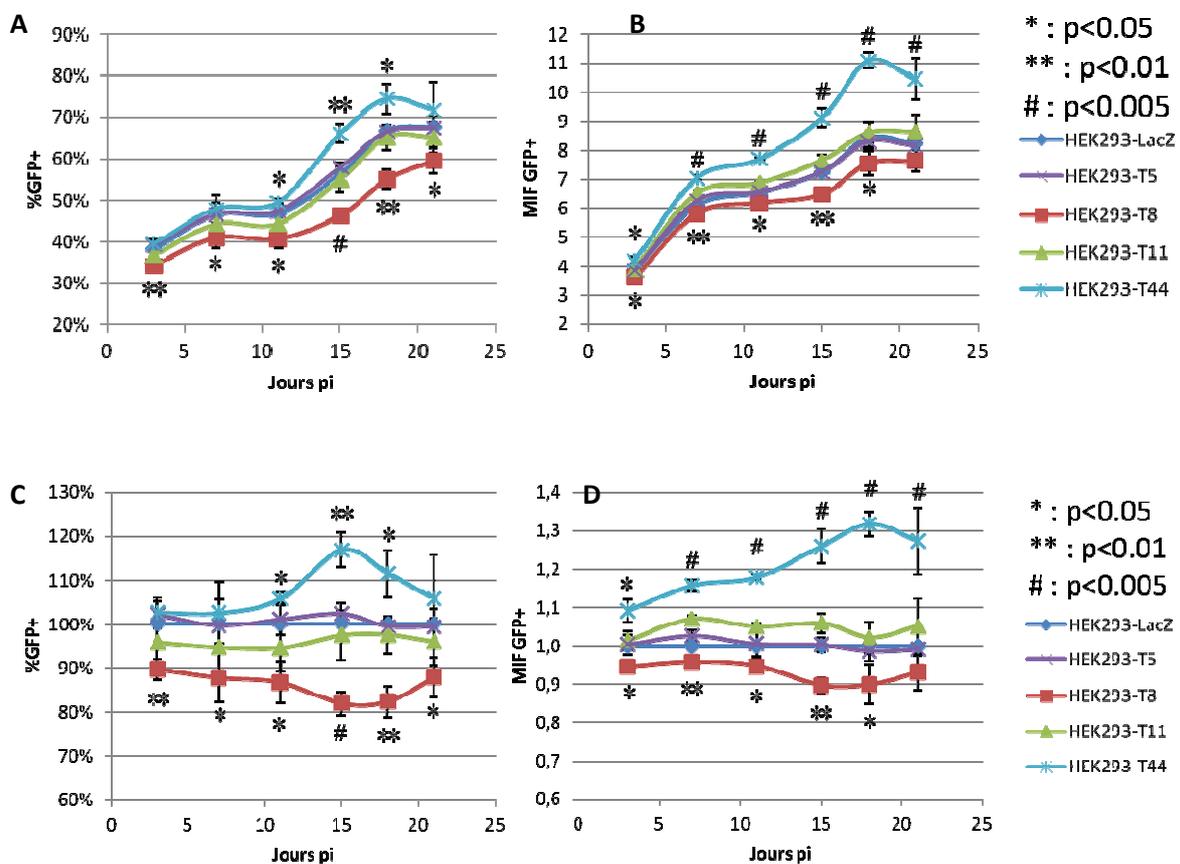


Figure 55 : Analyse par cytométrie de flux de la cinétique d'infection des lignées HEK293 par le PERV-IRES-GFP mesurée de 72h à 21 jours pi.

Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées à partir d'un surnageant infectieux dilué au 1/10 pour une MOI moyenne de 0,38 à 72hpi. Chaque expérience est réalisée en triplicata. (A) et (C) Pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+). (B) et (D) Moyenne d'intensité des cellules GFP positives (MIF GFP+). (C) et (D) les valeurs de paramètres mesures pour les lignées TRIM sont rapporté à celles du contrôle lacZ.

Les lignées exprimant les poTRIM5 et 11 ne présentent pas d'effets significatifs sur l'ensemble de la cinétique par rapport à la lignée contrôle lacZ, pour le pourcentage de cellules GFP positives comme

pour la MIF GFP+ (Figure 55A et B). Seules les lignées exprimant TRIM8 et 44 montrent une amplification des effets préalablement décrits ci-dessus (Figure 55).

Le cas de TRIM5 α

La lignée exprimant poTRIM5 ne présente pas de différences significatives par rapport à la condition lacZ (Figure 55). Ceci en fait un bon témoin négatif de l'influence des TRIM porcines sur l'infection par le PERV et permet de compléter les observations de l'équipe de Towers G.J. concernant les TRIM5 α d'autres mammifères sur le PERV [169]

%GFP+ de TRIM8

La lignée exprimant poTRIM8 présente une diminution de 5% de la quantité de cellules GFP positives par rapport à lacZ. Cette diminution reste constante de 72h au 11^{ème} jour pi (Figure 55A et C) et s'accroît à partir du 15^{ème} jour pour atteindre une différence significative et maximale de 12% au 18^{ème} jour par rapport à la lignée lacZ. Cette différence s'estompe légèrement (-8%) au 21^{ème} jour pi.

%GFP+ de TRIM44

La lignée exprimant poTRIM44 présente, à l'inverse de la lignée poTRIM8, une augmentation significative de l'infection des HEK293 par le PERV à partir de J+11 pi par rapport à lacZ (Figure 55A et C). La réplication virale entre plus vigoureusement en phase exponentielle dans les cellules à tester que dans les cellules de référence lacZ. Le nombre de cellules GFP positives atteint une valeur maximale à J+15 pi correspondant à une valeur supérieure de 10% par rapport aux cellules de référence lacZ (Figure 55A et C). Cette différence s'estompe au cours des deux derniers points évalués de la cinétique pour une différence résiduelle de +4% au 21^{ème} jour pi.

MIF GFP+ de TRIM8

Le niveau d'expression du gène rapporteur dans la cellule sur-exprimant poTRIM8 diminue de 5 à 10% par rapport à la cellule de référence lacZ entre le 3^{ème} et le 15^{ème} jour pi (MIF de 6,49 pour TRIM8 contre 7,24 pour lacZ au 15^{ème} jour ; Figure 55B et D). Cette différence s'estompe légèrement à la fin de cette cinétique (-7% ; Figure 55B et D).

MIF GFP+ de TRIM44

Dans le cas de la lignée exprimant poTRIM44, l'expression du gène rapporteur augmente de 9% dès 72h pi par rapport à la cellule de référence lacZ (MIF de 4,55 pour poTRIM44 contre 3,85 pour lacZ ;

Figure 55B et D) et s'accroît par la suite de façon continue pour atteindre un maximum de +32% de la condition lacZ au 18^{ème} jour pi. Elle s'atténue au 21^{ème} jour pour une différence de +27%.

3.1.3. Evaluation de l'expression du PERV par transfection transitoire

Dans le cas de TRIM11, les effets précoces observés entre 24h pi et 72h pi ne se traduisent pas par une différence dans la cinétique d'infection longue par rapport aux lignées témoins (LacZ). Il est possible que ces effets soient momentanés et exclusivement impliqués dans les débuts de l'infection par le PERV. Afin d'approfondir cette question, une expérience supplémentaire est réalisée pour évaluer l'expression du PERV dans les étapes tardives de l'infection et sur un temps court.

Lors d'une infection classique, les étapes précoces du cycle infectieux ne peuvent être évitées. Il est toutefois possible de contourner les étapes essentielles de l'entrée du virus dans la cellule pour n'évaluer l'expression du rétrovirus que dans les étapes plus tardives. Ceci est réalisé par une méthode de transfection des cellules (Figure 56) qui permet d'introduire dans la cellule directement le génome viral sous sa forme ADN. Il peut donc être exprimé sans passer par son extraction de la capsid, sa transcription inverse et son intégration dans le génome hôte (Uchil et al., 2008).

Le PERV-GFP a donc été co-transfecté dans les cellules HEK293 soit avec le vecteur poTRIM11 et son vecteur shRNA spécifique ou son contrôle « scramble » (Scbl) soit avec le vecteur contrôle lacZ et le shRNA anti luciférase (shRNALuc), contrôle du système psiRNA-h7SKhygro, ou son contrôle Scbl (Figure 56). Le shRNALuc n'inhibe théoriquement pas l'expression de lacZ mais permet de contrôler qu'un shRNA exprimé par le système psiRNA-h7SKhygro n'altère pas le métabolisme de la cellule.

Malgré la transfection des différents vecteurs réalisée à des concentrations constantes, les différentes conditions, lacZ et poTRIM11 présentent des taux de cellules GFP positives différents entre elles (Figure 56A). La condition poTRIM11 affiche un taux inférieur de 20% de la quantité de cellules GFP+ par rapport à la condition lacZ. Toutefois, ces deux conditions ne présentent pas de différences entre leur contrôle Scbl et leur condition avec shRNA (Figure 56A).

L'analyse de l'expression du PERV dans la condition lacZ ne présente pas de différence entre le contrôle Scbl et le contrôle du kit shRNALuc. Toutefois, bien qu'aucune différence dans le niveau de cellules GFP+ n'ait été observée au sein de la condition poTRIM11, la présence du shRNA spécifique de cette protéine rehausse significativement de 17,7% le niveau d'expression du PERV (Figure 56B). poTRIM11 semble donc inhiber l'expression du PERV. Cet effet est contradictoire avec celui observé à 24h pi mais il pourrait avoir un rôle compensateur et expliquer l'absence d'effets observés pour la suite de la cinétique.

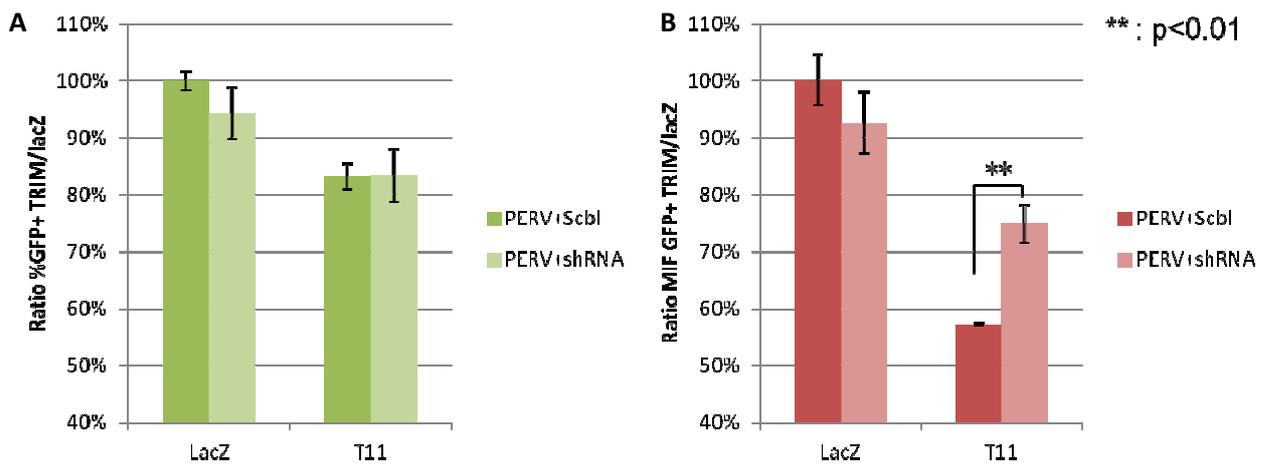


Figure 56 : Analyse par cytométrie de flux de la phase tardive du cycle infectieux du PERV.

L'expérience est réalisée en triplicata sur des cellules HEK293, tri-transfectées avec le PERV-GFP, les poTRIM 11 (T11) et le contrôle « scramble (Scbl) » des shRNA (PERV+Scbl) ou avec un shRNA spécifique de la poTRIM11 (PERV+shRNA). L'analyse est réalisée 48h après la transfection. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition témoin lacZ sans shRNA (Scbl). Le vecteur lacZ est transfecté soit avec le Scbl soit par le shRNA spécifique de la luciférase. (A) pourcentage de cellules GFP positives (%GFP+). (B) moyenne d'intensité des cellules GFP positives (MIF GFP+).

3.1.4. Bilan de la mise en évidence des effets des protéines TRIM sur le cycle répliatif du PERV

Les analyses par cytométrie de flux ont permis d'écartier de l'étude les protéines poTRIM1 α et β ainsi que la poTRIM27 dont les lignées cellulaires n'ont pas présenté d'effets significatifs lors de l'infection par le PERV-GFP. Toutefois, les lignées cellulaires contenant les protéines poTRIM8, 11 et 44 ont influencé l'infection par le PERV de façon significative. Par ailleurs la lignée cellulaire contenant la protéine poTRIM5 α n'a pas présenté d'effets lors de l'infection PERV, ce qui conforte notre choix de l'utiliser comme témoin négatif de la restriction virale sur le PERV. Cependant les réels effets de ces protéines sur le cycle infectieux du PERV ne sont pas connus. Afin d'approfondir ces questions et pour déterminer les étapes ciblées lors du cycle de répliation du PERV par ces TRIM, des analyses q-PCR sont réalisées sur les cellules infectées lors de ces cinétiques.

3.2. Caractérisation des effets des TRIM sur le cycle infectieux du PERV

Le cycle infectieux d'un rétrovirus dans sa cellule hôte peut être séparé en deux phases principales, la phase précoce et la phase tardive. La première phase concerne les étapes qui ont lieu entre l'entrée du rétrovirus et son intégration de son pro-génome dans le génome de l'hôte. La seconde phase concerne les étapes qui ont lieu à partir de la transcription du génome et des gènes du provirus jusqu'à la libération, dans le milieu extracellulaire, des particules virales néoformées. La réalisation des étapes clés de ce cycle peut être évaluée par le dosage d'intermédiaires moléculaires spécifiques de ces différentes étapes.

Ainsi les étapes du cycle infectieux du PERV sont évaluées afin d'identifier les étapes ciblées par les poTRIM de l'étude.

3.2.1. Analyse des étapes précoces du cycle infectieux du PERV

Lors de la phase précoce du cycle infectieux, deux principales étapes sont évaluées : -Le dosage des retro-transcrits tardifs, issus de l'étape de la transcription inverse, permet d'évaluer la quantité de particules virales entrantes ainsi que les potentiels blocages qui peuvent avoir lieu lors du transport du rétrovirus (cf. § « 2.1.1.La transcription inverse »); le dosage des cercles à 2-LTR permet de caractériser un blocage de l'intégration.

3.2.1.1. Evaluation de l'efficacité du dosage des rétro-transcrits tardifs et des cercles à 2-LTR.

L'efficacité du dosage par q-PCR des marqueurs moléculaires des étapes précoces est évaluée à l'aide de deux drogues connues pour bloquer ces étapes chez le MLV et le VIH-1. La première drogue est l'AZT (Azidothymidine aussi appelé Zidovudine) qui inhibe la transcription inverse. La seconde est le RAL (Raltégravir) qui inhibe l'intégration. Ces drogues ont été obtenues du « NIH AIDS Research and Reference Reagent Program ».

Les inhibiteurs de la phase précoce du PERV

L'AZT est une RTI (Revers Transcriptase Inhibitor) utilisée dans les traitements contre l'infection du VIH. Cette drogue est capable de bloquer l'activité enzymatique de la transcriptase inverse du VIH mais aussi celle des PERV (Qari et al., 2001; Stephan et al., 2001). Le blocage de l'infection du PERV-GFP par l'AZT est efficace dès les doses les plus faibles utilisées (Figure 57). La dose de traitement retenue est de 1 μ M.

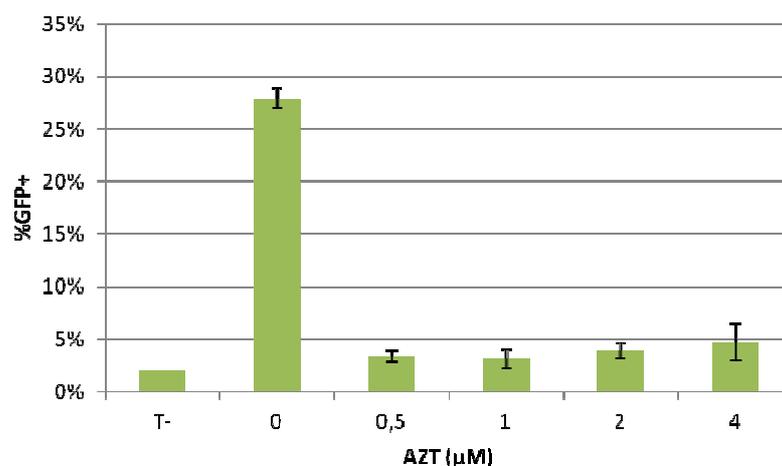


Figure 57 : Analyse FACS 24hpi du pourcentage de cellules HEK293 infectées par le PERV (%GFP+) en présence d'une gamme de concentration d'AZT (en μ M). T- = cellules HEK293 non infectées.

Le RAL est un inhibiteur de l'activité de transfert de brin de l'intégrase (INSTI, Integrase Strand Transfer Inhibitor) du VIH-1 et permet d'en bloquer l'infection (Summa et al., 2008). Cette drogue est efficace contre de nombreux rétrovirus, dont le MLV, avec toutefois une efficacité variable en fonction des rétrovirus concernés. Les résidus acides aminés ciblés par le RAL et potentiellement impliqués dans la résistance contre cette drogue ont pu être mis en évidence (Koh et al., 2011). Les intégrases du PERV et du MLV, INp46, présentent 54% d'identité. Leur comparaison montre que les résidus impliqués dans l'interaction avec le RAL sont conservés (Figure 58A). Le PERV est donc potentiellement sensible au RAL. Des essais d'infection du PERV-GFP en présence d'une gamme de concentration du RAL allant de 0 à 10 μ M ont permis d'identifier une concentration efficace à 95% (EC95) de 0,1 μ M (Figure 58B).

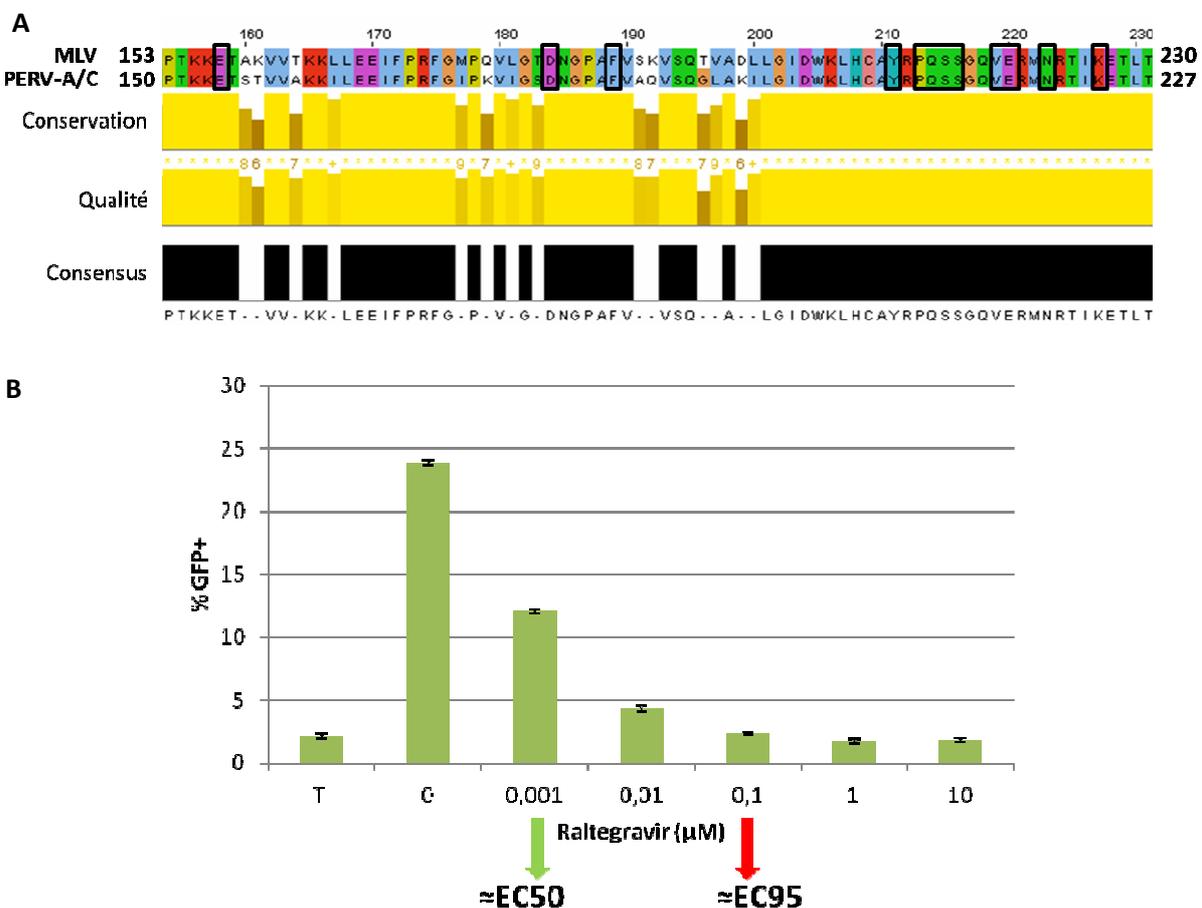


Figure 58 : Etude de l'efficacité du RAL sur le PERV-A/C.

(A) Alignement d'une portion de l'INp46 du MLV et du PERV-A/C réalisé par le logiciel MUSCLE. Encadrés en noir, les résidus impliqués dans l'interaction avec le RAL. (B) Analyse FACS 48hpi de l'infection des HEK293 par le PERV-GFP en présence d'une gamme de concentration du RAL.

Evaluation du dosage des rétro-transcrits et des cercles à 2-LTR

Des cellules HEK293 sont infectées par le PERV-GFP en présence ou non de 1 μ M d'AZT ou de 0,1 μ M de RAL (Figure 59). Des cellules transfectées par le PERV sont utilisées comme témoin positif de la

détection des marqueurs moléculaires (T+). Ces cellules subissent un phénomène de surinfection et, de ce fait, après plus de 25 jours pt, 100% des cellules sont GFP+. A 24hpi, les cellules infectées présentent 28,8% de cellules positives pour la GFP (Figure 59A). Les conditions traitées par l'AZT ou le RAL présentent une forte diminution de la détection des cellules GFP+, avec respectivement 4% et 8,7% de cellules positives (Figure 59A). Toutefois le niveau d'expression de ces conditions, évalué par la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF GFP+), est équivalent à celui des cellules non infectées, qui est inférieur à 0,7 de MIF (Figure 59B).

Le dosage par q-PCR dans les cellules non infectées ne permet de détecter ni les rétro-transcrit tardifs ni les cercles à 2-LTR (Figure 59C et D). Les amorces choisies sont spécifiques au PERV. Les cellules transfectées ou infectées par le PERV permettent la détection des rétro-transcrits tardifs et/ou des génomes PERV et des cercles à 2-LTR, les amorces utilisées sont donc fonctionnelles (Figure 59C). Le dosage des rétro-transcrits tardifs présente une quantité relative cinq fois plus élevée pour le T+ que pour la condition PERV (Figure 59C). Ceci s'explique par le fait que la population est plus riche en PERV-GFP (100% des cellules GFP+) et que chaque cellule est plus riche en provirus intégrés et en rétro-transcrit tardifs car elles sont issues d'une transfection et de surinfection permanente. De ce fait, elles présentent aussi une quantité de cercle à 2-LTR plus élevée que la condition PERV (Figure 59D). La différence de la quantité de cercles à 2-LTR de la condition T+ par rapport à la condition PERV (Figure 59D) est toutefois plus faible que la différence observée dans le cas du dosage des génomes PERV-GFP (Figure 59C). Cette différence s'explique par le fait que le dosage des cercles à 2-LTR ne concerne que des formes éphémères du cycle contrairement aux génomes PERV.

En présence d'AZT, ni les génomes PERV ni les cercles à 2-LTR ne sont détectés. La quantité de cellules GFP+ détectée au FACS est faible et proche du bruit de fond (3,9%) (Figure 59A, C et D). De plus l'intensité moyenne mesurée (MIF GFP+) est comparable à celle des cellules non infectées (Figure 59B). L'AZT inhibe efficacement l'infection des cellules par le PERV, les génomes sous formes ARN ne sont pas rétro-transcrits et ne sont donc pas détectés.

Le RAL n'agit au contraire qu'après l'étape de RT et de la formation des cercles. De ce fait, des marqueurs moléculaires sont détectés. Cependant, on constate un dosage de rétro-transcrits tardifs deux fois inférieure en présence de RAL qu'en condition infectée non traitée (Figure 59C). Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence d'intégration ce qui favorise la dégradation des génomes s'ils ne sont pas circularisés (Hazuda, 2010). En revanche, le dosage des cercles à 2-LTR présente, dans cette condition, près de huit fois plus de molécules circularisées qu'en condition non traitée

(Figure 59D). Le blocage de l'intégration entraîne une formation massive des cercles à 2-LTR des génomes PERV non intégrés.

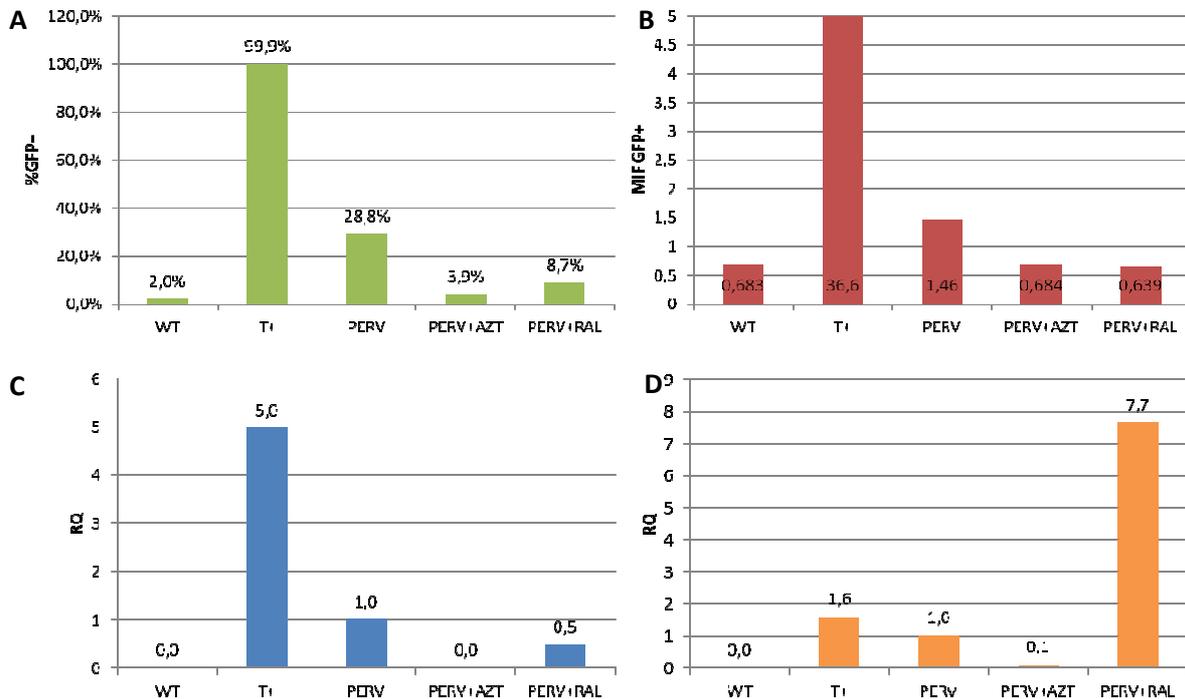


Figure 59 : Evaluation de l'efficacité du dosage par q-PCR des rétro-transcrits tardifs.

(A) Analyse FACS de la quantité de cellules infectées par le PERV (GFP+). (B) Analyse FACS de l'expression du PERV dans les cellules infectées (MIF GFP+). (C) Dosage par q-PCR des rétro-transcrits tardifs. (D) Dosage par q-PCR des cercles à 2-LTR. Les dosages sont réalisés par une méthode relative, les quantités relatives (RQ) sont obtenues par le calcul du $\Delta\Delta Ct$ contre la β -actine et référencées à la condition des HEK293 infectées par le PERV sans traitement à l'AZT ou au RAL. WT = cellules HEK293 non infectées par le PERV-GFP. T+ = cellules transfectées par le PERV pendant plus de 25 jours.

Le blocage de l'entrée du rétrovirus ou de sa transcription inverse est responsable d'une diminution du niveau de l'infection des cellules, de la quantité de génomes PERV, intégré ou non, et de son expression. Au contraire, le blocage de l'intégration, bien qu'il entraîne lui aussi une diminution de l'infection et de l'expression, entraîne une augmentation de la proportion des formes persistantes que sont les cercles à 2-LTR. Cette augmentation s'accompagne d'une légère diminution des génomes PERV sûrement dû à leur dégradation en dépit de leur intégration ou de leur circularisation [44]. Au cours d'une cinétique d'infection le blocage de l'intégration se traduit d'une part par l'augmentation de la quantité des cercles à 2-LTR dans la cellule à un moment donné de la cinétique et d'autre part par une diminution de l'expression du rétrovirus et donc de l'infection dans la cinétique.

3.2.1.2. Analyse des rétro-transcrits tardifs

L'évaluation des rétro-transcrits tardifs dans les lignées cellulaires poTRIM5, poTRIM11 et poTRIM44 infectées par le PERV ne montre pas de différences significatives par rapport au contrôle lacZ (Figure 60A). Les deux premiers points de la cinétique quantifiés ne présentent pas non plus d'évolution significative de la quantité de transcrits tardifs. Leur nombre augmente toutefois par la suite de 1,2 log à partir de J+7 pi (11,42 transcrits tardifs par cellule GFP+) jusqu'à atteindre un état d'équilibre à J+15 pi (177 transcrits tardifs par cellule GFP+) qui perdure jusqu'à la fin de la cinétique (figure 60A). La quantité de rétro-transcrits tardifs de la condition lacZ augmente cependant sensiblement au dernier point de la cinétique et se différencie alors significativement de celle des lignées cellulaires poTRIM5, poTRIM11 et poTRIM44.

La lignée cellulaire poTRIM8 présente quant à elle un ralentissement dans l'évolution de la quantité de transcrits tardifs par rapport au contrôle lacZ. En effet, bien qu'aucun effet n'ait été constaté au niveau des deux premiers points de cinétiques, une diminution de la quantité de transcrit est observée à partir du 11^{ème} jour pi, aboutissant à une diminution significative à J+15pi d'un facteur 2 par rapport au contrôle lacZ (Figure 60A). Cette différence s'estompe par la suite au moment où la quantité de transcrits tardifs se stabilise au niveau de celle du contrôle lacZ à J+18pi, soit un point de cinétique après la stabilisation observée pour cette lignée. L'évolution plus lente de la phase exponentielle des transcrits tardifs de la lignée poTRIM8 corrèle avec ce retard dans l'atteinte de l'état stationnaire par comparaison à la lignée de contrôle (Figure 60A).

3.2.1.3. Analyse des cercles à 2-LTR

Les lignées cellulaires poTRIM5 et poTRIM11 ne présentent pas de différences significatives par rapport à la lignée contrôle lacZ (Figure 60B). Par ailleurs, pour ces lignées, la quantité de cercles à 2-LTR reste constante au cours des deux premiers points cinétiques. Par la suite, les quantités de cercles 2-LTR augmentent d'environ 1,3 log du 7^{ème} jour pi (0,016 cercles à 2-LTR par cellules GFP+) jusqu'à atteindre un état stationnaire au jour 15 pi (0,32 cercles à 2-LTR par cellules GFP+ ; figure 60B). La quantité de cercle à 2-LTR diminue d'un facteur 2 à 3 au cours des deux derniers points cinétiques.

L'évolution de la quantité des cercles à 2-LTR est plus lente pour la lignée cellulaire poTRIM8 comparée aux lignées LacZ ou poTRIM5 ou 11 (Figure 60B). Même si aucune différence significative n'est observée pour le premier point de cinétique, la quantité en cercle 2-LTR est plus faible pour cette lignée d'un facteur 2,5 à J+7 pi par rapport à celle du témoin lacZ et par rapport au premier point de cinétique. L'écart entre les deux lignées cellulaires s'intensifie par la suite jusqu'à atteindre une différence maximale d'un facteur 3,5 au 11^{ème} jour pi (Figure 60B). L'augmentation de la quantité

en cercle à 2-LTR est plus lente pour la lignée poTRIM8 que pour la lignée lacZ et la différence s'estompe à l'atteinte de la phase stationnaire à J+18pi, soit 1 point de cinétique après le contrôle lacZ (Figure 60B). De plus, comme dans le cas des autres lignées cellulaires, la quantité des cercles à 2-LTR diminue au dernier point de la courbe.

Le dosage des cercles à 2-LTR dans la lignée cellulaire poTRIM44 présente une légère augmentation (Figure 60B). A l'image des autres lignées cellulaires aucun effet n'est observé au premier point de la cinétique. Par la suite, la lignée cellulaire poTRIM44 présente une augmentation progressive et significative de la quantité des cercles à 2-LTR à partir de J+7pi qui atteint une valeur supérieure d'un facteur 2 celle du témoin lacZ au 11^{ème} jour pi (Figure 60B). Puis, la quantité en cercle rejoint l'état stationnaire de lacZ au jour 15 pi et diminue d'un facteur 2-3, comme pour les autres lignées cellulaires (sauf poTRIM8-HEK293) durant les deux derniers points cinétiques (Figure 60B).

3.2.1.4. Analyse de l'intégration des pro-génomés.

La quantité de provirus intégré est évaluée afin d'affiner et de consolider les effets observés sur les transcrits tardif et sur le dosage des cercles à 2-LTR. Le seuil de détection des provirus intégrés par la méthode Alu est moins sensible que la détection des autres marqueurs moléculaire dans la phase précoce, dans la mesure où elle dépend de la proximité de l'intégration d'un PERV à une séquence Alu. De ce fait, le premier point de la cinétique ne permet pas de détecter de telles insertions et n'est donc pas représentable sur un graphique à échelle logarithmique (Figure 60C).

Comme pour le dosage des précédentes étapes, la cinétique des intégrations des lignées cellulaires poTRIM5 et poTRIM11 ne présente pas de différences significatives avec la lignée contrôle lacZ. De même, ces trois lignées présentent une augmentation de la quantité des intégrations de près de 2 log entre les jours 7 pi (0,29 intégration par cellules GFP+) et 15 pi (21,09 intégration par cellules GFP+ ; figure 60C). Jour qui correspond au début de la phase stationnaire. Toutefois, au dernier point de la cinétique une diminution sensible de la quantité des intégrations est observée pour la lignée poTRIM11 (-5 intégrations par cellules GFP+) et de façon significative pour la lignée poTRIM5 (-10 intégrations par cellules GFP+) par rapport à la lignée contrôle lacZ (33 intégration par cellules GFP+ ; figure 60C).

En ce qui concernant la lignée cellulaire poTRIM8, une diminution significative de la quantité d'intégration d'un facteur 2 est observée à J+15pi par rapport à la lignée contrôle lacZ (Figure 60C). Cette diminution est similaire à ce qui est observé pour la quantité des rétro-transcrits tardifs et s'estompe ensuite à partir de J+18pi, lorsque le niveau d'intégration se rapproche de celui du contrôle lacZ, alors en état stationnaire (Figure 60C).

L'évolution de la quantité d'intégration de la lignée poTRIM44 évolue de façon similaire à celle observée pour les cercles à 2-LTR (Figure 60B et C). En effet, cette quantité augmente de façon significative par rapport au contrôle lacZ aux jours 7 et 11 pi et, respectivement, d'un facteur 6,9 et 2,7 (Figure 60C). Cette différence s'estompe ensuite à l'atteinte d'un état stationnaire à partir du jour 15 pi, puis est suivie, comme dans le cas de la lignée poTRIM5, d'une diminution significative, par rapport au contrôle lacZ, au dernier point de la cinétique (Figure 60C).

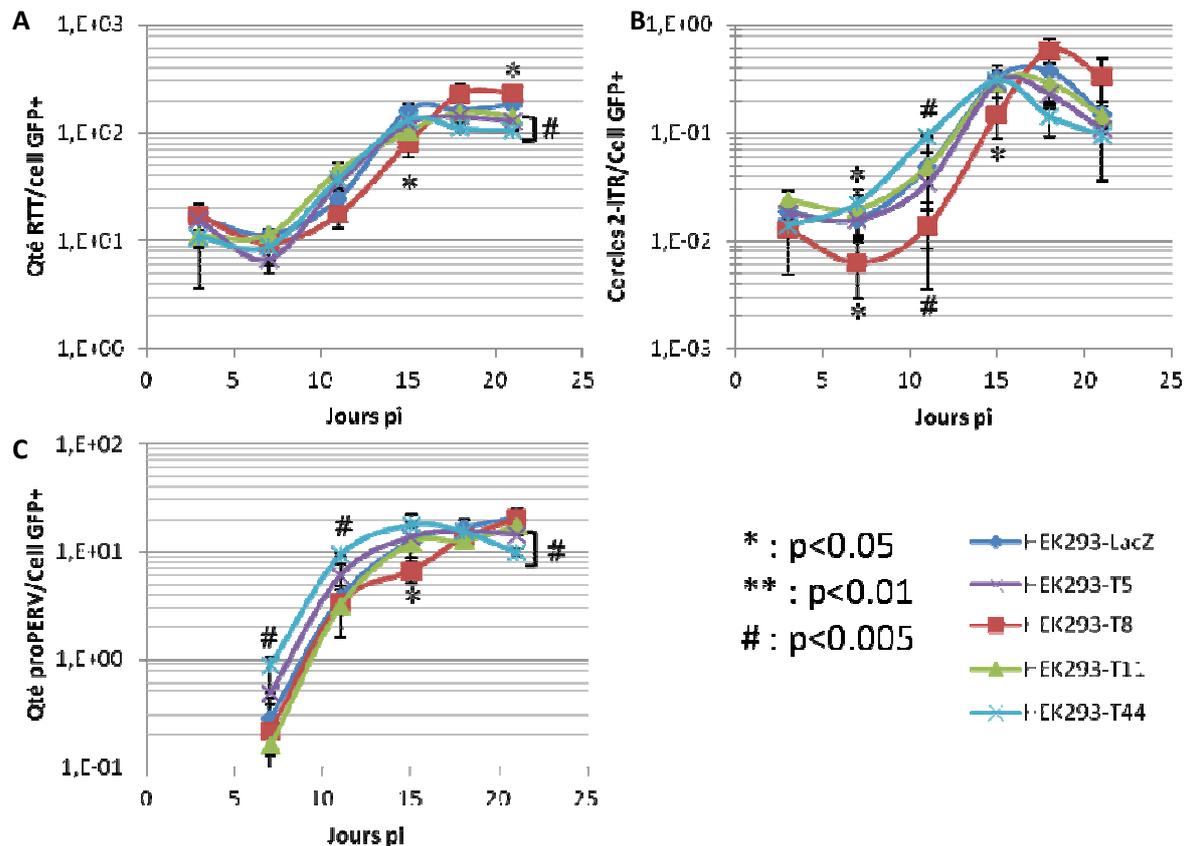


Figure 60 : Analyse q-PCR des étapes précoces de l'infection par le PERV.

L'ADN total est extrait des lignées cellulaires poTRIM, récoltées tous les 3-4 jours durant la cinétique d'infection par le PERV. Les résultats sont calculés par la méthode relative réalisée à l'aide d'une gamme standard de 10^2 à 10^8 copies d'un vecteur contenant les 2-LTR du PERV et ces séquences non codantes adjacentes. Les résultats des quantifications sont rapportés à la quantité de cellules GFP+ de l'échantillon considéré. (A) Analyse de la quantité des retro-transcrits tardifs (RTT) du PERV par cellule GFP+. Le couple d'amorce spécifique (oGVB3276-F & oGVB3237-R) génère un amplicon au niveau de la séquence PBS du PERV. (B) Analyse de la quantité des cercles à 2-LTR du PERV par cellules GFP+. Le couple d'amorce spécifique (oGVB3276-F & oGVB3238-R) génère un amplicon spécifique recouvrant la jointure des 2-LTR. (C) Analyse des provirus PERV intégrés par cellules GFP+. Le couple d'amorce PERV-Alu (oGVB3276-F et oGVB3610) ne génère que des amplicon à partir d'un provirus suffisamment proche d'une séquence Alu. La quantité de provirus ainsi dosée est obtenue par rapport à une gamme de quantité de provirus intégrée par cellules.

3.2.2. Analyse des étapes tardives du cycle infectieux du PERV

Après intégration du provirus dans le génome de l'hôte, le génome et les gènes du PERV sont transcrits pour générer les différents éléments nécessaires à la constitution de particules virales

infectieuses. La réalisation de cette étapes peut être la cible de certains facteurs de restrictions (Jeong et al., 2010; Wolf and Goff, 2009; Zhu and Gao, 2008). Le dosage de ces transcrits est donc réalisé afin d'évaluer l'efficacité de la transcription dans nos lignées cellulaires HEK293-poTRIM.

Ces molécules sont quantifiées à l'aide d'amorces ciblant spécifiquement la séquence codante du gène *env-A/C*. Les fluctuations observées pour les différentes lignées TRIM sont comparées à la lignée contrôle lacZ.

Le dosage de la quantité de transcrit du PERV des lignées poTRIM5 et 11 n'affichent aucune différence significative par rapport au témoin lacZ (Figure 61). De plus, les deux premiers points de cinétique ne présentent pas de variations significatives pour ces lignées. Par la suite, la quantité de transcrits augmente de façon exponentielle (+1,4 log jusqu'à J+18pi), toutefois cette augmentation ne s'atténue pas à J+15pi et continue d'augmenter jusqu'au dernier point analysé de l'expérience (Figure 61). Ce qui reflète davantage l'augmentation de l'expression du PERV observée par cytométrie de flux (paramètre de la MIF).

La lignée cellulaire poTRIM8 présente, quant à elle, une diminution significative de la transcription du gène *env* par rapport au contrôle lacZ. Cet effet est observé dès le 3^{ème} jour pi (-38%) et se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 61). La quantité de transcrits dosés ne progresse toutefois pas de façon significative dans les deux premiers points de la cinétique, comme cela a pu être observé pour les autres lignées, et l'augmentation qui suit est constante entre le 7^{ème} et le 18^{ème} jour pi. Cependant, les différences observées entre la lignée poTRIM8 et la lignée contrôle lacZ, sont plus intenses à J+7pi et J+15pi, avec des diminutions respectives de 50% et 60% de la quantité des transcrits Env de la lignée lacZ (Figure 61). Enfin, à J+18pi, cette différence s'atténue (-33.7%) Figures 60 & 61).

Dans la condition de la lignée poTRIM44, aucune différence significative par rapport au témoin lacZ n'est observée au cours de la cinétique, excepté au 11^{ème} jour pi. A ce point de cinétique, la quantité d'ARNm Env dosée est en effet supérieure de 80% à celle de la condition lacZ (Figure 60). Puis, de façon identique à ce qui est observé pour le dosage des cercle à 2-LTR, la différence disparaît progressivement jusqu'à la fin de l'expérience (Figures 60 & 61).

oGVB3279 (Env-A/C)

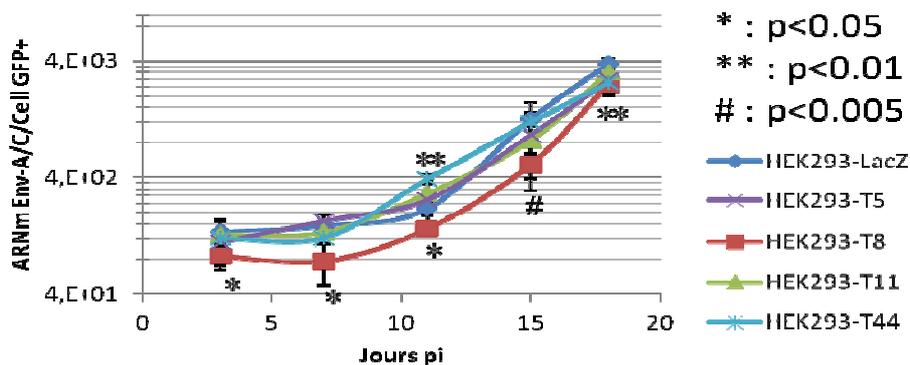


Figure 61 : Analyse de la transcription du gène *env* du PERV lors de la cinétique d'infection des différentes lignées poTRIM.

L'ARN total extrait de ces cellules est analysé par RTq-PCR en utilisant un couple d'amorce spécifique du gène *env-A/C* (oGVB3279-F & R). Les résultats sont calculés par la méthode relative en utilisant une gamme standard de 10^2 à 10^8 copies du vecteur PERV-EGFP. La quantité d'ARNm est rapportée à la quantité de cellules GFP+ dans l'échantillon considéré.

3.2.3. Bilan des étapes précoces et tardives du cycle infectieux du PERV

Les analyses fines des étapes du cycle répliatif du PERV ont pu être menées correctement sur les étapes précoces essentielles ainsi que sur l'expression des gènes du PERV. Cependant les analyses de la formation des particules virales et de leur libération dans le milieu extracellulaire n'ont pu être menées à bien dans le cadre de la présente étude. Toutefois, ces techniques d'études nous ont permis de préciser l'action des différentes protéines poTRIM sélectionnées sur le cycle infectieux du PERV.

poTRIM5 α

Les observations réalisées concernant poTRIM5 α , confirment l'insensibilité des PERV vis-à-vis de ce facteur porcin. TRIM5 α présente l'essentiel de son activité lors de l'étape de la transcription inverse, en entraînant la dégradation des particules virales dans le protéasome (Lukic et al., 2011; Nakayama and Shioda, 2012). Un tel effet aurait pour conséquence de diminuer la quantité de génome PERV présent dans la cellule et donc la quantité provirus intégrés. Or aucune diminution de ces molécules n'est observée au niveau des étapes précoces du cycle infectieux du PERV (Figure 60).

poTRIM8

Nos résultats montrent par ailleurs, pour la condition de la lignée poTRIM8, une diminution de la quantité des trois marqueurs moléculaires caractéristiques des étapes précoces du cycle infectieux du PERV par rapport à la lignée lacZ (Figure 60). Cependant, les différences en quantité de transcrits Env

entre les lignées poTRIM8 et lacZ sont observées dès le 3^{ème} jour pi (Figure 61), alors qu'elles n'apparaissent qu'à partir du 7^{ème} jour pi pour le dosage des cercles à 2-LTR et du 11^{ème} jour pi, de façon non significative en ce qui concerne le dosage des transcrits tardifs (Figure 60A et B). Ainsi poTRIM8 semble-t-il agir en priorité sur la transcription du PERV.

poTRIM11

L'évaluation des différentes étapes du cycle infectieux du PERV dans la lignée HEK293-poTRIM11 ne montrent pas plus de différences que lors des analyses par cytométrie de flux des cinétiques sur le long terme (Figures 55, 60 et 61). Les seuls effets observés pour cette lignée ont lieu dans les premiers jours de l'infection et l'évaluation de ces étapes débute au 3^{ème} jour pi, il est donc possible que l'effet potentiel de TRIM11 sur les étapes du cycle infectieux du PERV ne puissent être mesurés que dans les premiers jours de l'infection. Toutefois, les étapes de néo-synthèse et de relargage des particules virales n'ont pas été évaluées, la possibilité que poTRIM11 puisse agir dans les étapes très tardives du cycle de réplication du rétrovirus ne peut être exclue.

poTRIM44

Au contraire de poTRIM8, pour la lignée poTRIM44, on observe une augmentation de la quantité des cercles à 2-LTR dès le 7^{ème} jour pi, mais celle-ci n'est pas liée à une inhibition de l'étape d'intégration car dans le même temps, on observe une augmentation des provirus PERV et du taux de ces molécules intégrées (Figure 60B et C). L'évolution de ces deux paramètres s'achève dans les derniers points de la cinétique par une diminution de la quantité de molécules dosées (Figure 60B et C). Par ailleurs, le dosage de la quantité des transcrits *env* de la lignée poTRIM44 permet d'observer une augmentation significative de ces molécules par rapport à la lignée contrôle lacZ, un point de cinétique après l'augmentation observé pour les cercles à 2-LTR (Figure 61). Comme pour les autres marqueurs évalués cette différence disparaît au point de cinétique suivant. Ainsi cette augmentation des transcrits pourrait résulter de l'augmentation de la quantité de provirus intégrés. Ces résultats suggèrent que ces protéines TRIM pourraient être impliquées dans la phase précoce de l'infection par le PERV. La possibilité que notre observation découle d'un effet indirect d'une autre étape ne peut cependant pas être exclue.

Discussions et Conclusion

Le travail réalisé dans le cadre de la présente étude visait à approfondir les connaissances sur les facteurs porcins impliqués dans la régulation de l'infection des PERV répliatifs. Dans le génome du porc, ces rétrovirus d'origine endogène, ne possèdent pas les éléments intègres nécessaires à leur réplication (Groenen et al., 2012). Cependant, ces rétrovirus sont capables de recombinaison entre eux (Kuddus et al., 2003; Lee et al., 2002; Machnik et al., 2005), il est donc probable qu'ils aient acquis une mobilité suite à des événements de recombinaison dans leurs cellules hôtes, leur permettant de devenir répliatifs (Krach et al., 2001; Machnik et al., 2005; Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 1998). Or, cette mobilité est connue chez certains organismes (souris, humains) pour être responsable de pathologies telles que des leucémies ou des immunodéficiences (Kaulitz et al., 2013; Pothlichet et al., 2006; Stoye and Coffin, 1987; Weiss, 2013). C'est le cas essentiellement du MLV qui, en s'intégrant à proximité d'un oncogène, peut en modifier l'expression et entraîner la transformation de la cellule hôte en cellule tumorale (Nienhuis et al., 2006; Weiss, 2013). Chez l'homme, les HERV ne sont plus mobiles. Parmi ceux-ci, les HERV-K(HML2) sont les plus récemment endogénéisés et qui ont présenté une activité (Turner et al., 2001). Des analyses des mutations des séquences de ces HERV ont montré que ces rétrovirus ont envahi le génome par réinfection, permettant leur insertion en de multiples endroits dans le génome hôte (Belshaw et al., 2004). De nombreuses études suggèrent que les séquences LTR et LTR solo des ces HERV, insérées à proximité d'oncogènes, sont impliquées par leur capacité promotrice, dans l'apparition de cancers, tels que des cancers du poumon liés à l'âge (Gimenez et al., 2010; Hohn et al., 2013; Kahyo et al., 2013). En revanche chez le porc, s'il existe de telles pathologies, une quelconque corrélation de leur apparition avec la mobilité des PERV répliatifs n'a jamais pu être mise en évidence, contrairement à la souris par exemple (Dieckhoff et al., 2007; Frazier, 1985; Suzuka et al., 1985; Suzuka et al., 1986). Il a été mis en évidence que les PERV possèdent un profil d'intégration similaire à celui du MLV (Moalic et al., 2009).

Des études, notamment réalisées dans les modèles humains et murins sur le VIH et le MLV, ont permis de mettre en évidence l'implication de facteurs de restriction dans l'immunité innée participant au contrôle du cycle infectieux de ces rétrovirus (pour revue (Zheng et al., 2012)). Ces études ont en particulier montré l'implication de nombreux membres de la famille des protéines TRIM dans la voie de signalisation de l'immunité innée (McNab et al., 2011; Rajsbaum et al., 2008; Uchil et al., 2013; Uchil et al., 2008). Ainsi, nous sommes nous focalisés, dans le cadre de cette étude, sur la famille des protéines TRIM et avons-nous cherché à déterminer si les orthologues porcins de ces protéines sont impliqués dans la restriction des PERV répliatifs.

A cette fin, nous avons développé une série d'outils moléculaires permettant d'évaluer le potentiel de ces protéines face à l'infection par un PERV répliatif. Ces outils ont été développés dans le cadre d'une stratégie déclinée en deux étapes : dans un premier temps les effets d'une série de protéines TRIM porcines, sur l'infection par un outil PERV-GFP ont été mis en évidence. Dans un second temps, les protéines, qui ont présenté des effets sur le PERV ont été soumises à une batterie de tests permettant d'évaluer finement les étapes du cycle infectieux pouvant être affectées.

Stratégie d'évaluation de l'infection par le PERV sur des cinétiques courtes

Dans la première partie de la stratégie mise en œuvre, les infections PERV ont été réalisées dans le modèle humain HEK293. Ces cellules sont connues pour être permissives à l'infection par les PERV (Bartosch et al., 2004; Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 1998). Les protéines TRIM de l'étude sur le cycle infectieux du PERV ont présenté des effets dans les trois premiers jours des infections réalisées (Figures 54). Cependant, dans ce modèle d'étude, toutes les protéines TRIM n'ont pas présenté d'effet. Les protéines poTRIM1 α et β ainsi que poTRIM27 ne présentent aucun effet significatif (Figure 54). Dans le cas de ces protéines il a pu être constaté qu'elles sont impliquées dans la régulation de l'immunité innée (McNab et al., 2011; Uchil et al., 2013).

En effet, il a été montré que la protéine TRIM1 inhibe l'expression du MLV par la voie NF- κ B et AP-1 (Uchil et al., 2013). Toutefois, la sensibilité du MLV à cette restriction dépend de ses promoteurs LTR et plus particulièrement de la région U3 (Uchil et al., 2013). En revanche, la région U3 du PERV est peu conservée par rapport aux séquences des autres rétrovirus de type C (Scheef et al., 2001) et pourrait donc être insensible à cette action de TRIM1. Une étude de la sensibilité des régions U3 du PERV et du MLV à l'action des protéines poTRIM1 α et β pourrait permettre d'approfondir cette question.

Par contre, il a été montré que les protéines TRIM27 humaines et murines inhibent l'expression du MLV dans un contexte HEK293 (Uchil et al., 2008). Il a aussi été montré que la protéine humaine TRIM27 régule la voie de signalisation des PRR, par l'inhibition des facteurs IKK mais aussi par l'inhibition de NOD2 (Zha et al., 2006; Zurek et al., 2012). Ces observations semblent se contredire, dans la mesure où lors de la surexpression de TRIM27 une inhibition de la signalisation de la voie de l'immunité innée par NF- κ B et par IRF3 est attendue. Ce qui aurait pour conséquence de favoriser l'infection. L'inhibition de l'expression du MLV par TRIM27 illustre la complexité de la voie de signalisation des PRR. Contrairement à celui de TRIM1 le mécanisme de TRIM27 reste équivoque.

Cependant, ces protéines TRIM1 et TRIM27 sont très conservées entre l'homme, la souris et le porc (>99% d'identités). Il est donc très probable qu'elles retrouvent leurs partenaires dans les cellules

humaines HEK293. De ce fait, l'absence d'effets observés mène à penser qu'elles n'interviennent pas sur le cycle infectieux du PERV ou que celui-ci est résistant à leur action.

Dans la perspective de notre stratégie et afin de confirmer l'insensibilité du PERV vis-à-vis de poTRIM1 et 27, l'étude de leurs effets sur l'infection PERV, doit être complétée par l'utilisation du système shRNA d'atténuation de l'expression de leurs gènes dans les lignées porcines où elles sont exprimées naturellement, tel que les ST-IOWA.

Stratégie d'évaluation de l'infection par le PERV sur des cinétiques longues

Les variations observées sur les autres protéines de l'étude, bien que significatives, restent cependant faibles, notamment dans le cas de TRIM8 qui ne présente qu'une diminution de 5% de l'infection et 10% de la MIF (Figure 54). Dans la mesure où le PERV-GFP utilisé est répliatif et dans l'hypothèse où les effets observés proviennent d'une stimulation ou d'une inhibition du cycle infectieux, ces effets sur une plus longue période d'infection devraient s'accroître.

Le suivi de l'infection sur le long terme a permis d'observer une évolution de l'infection par paliers. La population cellulaire infectée présente en effet trois phases : l'infection se développe lentement au cours d'une première phase, vient ensuite une phase exponentielle, enfin l'infection atteint un état stationnaire (Figure 55). La phase exponentielle de l'infection permet d'accroître les effets observés entre les protéines TRIM étudiées et le contrôle lacZ. Ce phénomène confirme l'intérêt d'explorer l'évolution de l'infection au cours du temps.

Ainsi, avons-nous pu mettre en évidence des effets sur le cycle infectieux du PERV, pour les protéines poTRIM8 et poTRIM11 et, de façon inattendue, pour poTRIM44. La caractérisation de ces effets a pu être approfondie par la mise en œuvre de techniques fines permettant la quantification des différentes molécules clés du cycle répliatif du rétrovirus.

Stratégie de caractérisation des effets

La seconde partie de l'étude a permis de développer dans notre laboratoire une méthode d'évaluation fine des étapes du cycle infectieux et, plus particulièrement, lors de la phase précoce (Butler et al., 2001) et des étapes tardives.

Ainsi avons nous pu remarquer que l'augmentation des différents marqueurs moléculaires de la phase précoce commence et se termine à un point de cinétique antérieur à celle observée par cytométrie de flux pour les niveaux d'infection et d'expression du PERV (Figure 55 et 60). Alors que l'évolution de la quantité de transcrits dosés correspond davantage à ce qui est observé pour les paramètres évalués en cytométrie de flux. On remarque une augmentation significative des transcrits

entre les jours 7 et 11 pi qui coïncide avec l'augmentation significative de l'expression des gènes du PERV (Figure 60C et 61). Les résultats de l'analyse quantitative lors de la phase précoce traduisent l'entrée du PERV dans les cellules tandis que le dosage des transcrits et la cytométrie en flux mesurent les cellules dans lesquelles le PERV est exprimé. Ceci expliquerait les raisons pour lesquelles la hausse de la cinétique semble prématurée pour les dosages des étapes précoces en comparaison à ces dernières méthodes d'analyses. Ainsi l'augmentation de l'infection observée en cytométrie en flux après le 11^{ème} jour pi, est-elle liée à une augmentation de la quantité de provirus et donc de l'expression du PERV. Les cellules ainsi infectées deviennent positives dans les jours qui suivent.

Lors de l'évaluation de l'efficacité de ces méthodes pour détecter une altération survenue au cours de ces étapes, nous avons pu mettre en évidence une sensibilité du PERV à l'effet du Raltégravir (Figure 58B). Cette drogue est connue pour inhiber l'activité de transfert de brin de nombreuses intégrases, dont celle du MLV (Koh et al., 2011; Summa et al., 2008). Bien que les identités de séquence des intégrases de ces deux rétrovirus permet de supposer que leur intégrase possède la même sensibilité au RAL (Figure 58A), aucune étude n'avait montré *in vitro* son efficacité sur le PERV. L'analyse du nombre de cercles à 2-LTR mène à penser, suite à leur accumulation dans les cellules traitées au RAL (Figure 59), que cette drogue agit de même sur l'intégrase du PERV.

Le facteur de restriction TRIM5 α et les PERV répliatifs

La comparaison de séquences et l'analyse phylogénétique montre que les orthologues TRIM5 α présentent la divergence la plus grande par rapport aux protéines TRIM étudiées (Tableau 12, partie résultats). Une telle variabilité de gènes inter espèces est souvent associée à une évolution adaptative du gène concerné (Liu et al., 2005; Newman et al., 2006; Song et al., 2005), ce qui peut s'expliquer par le fait que TRIM5 α est un important facteur de restriction virale spécifique d'espèce (Sawyer S.L. et al., 2005) pouvant agir comme un facteur PRR (Pattern Recognition Receptor) (Grutter and Luban, 2012). Ainsi cette protéine a co-évolué positivement avec différents virus et rétrovirus exogènes (Sawyer et al., 2007), tels que le VIH-1 et le SIV (Liu et al., 2005) et endogènes, tel que les RELIK (Yap and Stoye, 2013) pour inhiber directement leur infection.

Toutefois, en dépit de ces observations, la protéine TRIM5 α porcine n'influence pas l'infection par le B-PERV des cellules HEK293 en comparaison à la lignée contrôle lacZ (Figures 54, 55, 60 et 61). Ces résultats confirment l'hypothèse initiale, par homologie avec les résultats obtenus avec d'autres espèces, et complètent une précédente étude ayant montré l'insensibilité des PERV répliatifs au cours de l'étape d'entrée aux TRIM5 α de plusieurs autres mammifères (Wood et al., 2009). Cette résistance est due au tropisme de type B que présentent tous les PERV répliatifs (Lee et al., 2011;

Wood et al., 2009). En effet, les tropismes N et B ont initialement été découverts par l'étude des MLV et leur inhibition par les différents facteurs de restriction Fv1. Il s'est avéré par la suite que le B-MLV échappe à la restriction par TRIM5 α (Hatzioannou et al., 2004; Hilditch et al., 2011). Cette protéine cible le même déterminant de la capsidie responsable des différents tropismes que les facteurs Fv1. La substitution d'un seul acide aminé en position 110 de la capsidie du MLV qui se trouve dans une boucle externe (Ohkura and Stoye, 2013; Stevens et al., 2004), affecte le tropisme rétroviral. En effet, la présence d'un résidu glutamate (E) est caractéristique du tropisme de type B, alors qu'un résidu arginine (R) est responsable du tropisme de type N, qui permet la détection par TRIM5 α . Le déterminant des PERV trouvé dans la même boucle externe en position 117 de la capsidie est un résidu glutamate (Wood et al., 2009). Cela explique l'insensibilité du PERV-A/C à la protéine poTRIM5 α et justifie notre choix d'utiliser cette protéine comme un contrôle négatif de la restriction des PERV.

Les PERV ont conservé un système de mobilité et présentent tous cette insensibilité à l'action de TRIM5 α lors de l'entrée des particules dans les cellules. Ce caractère semble être acquis de longue date et pourrait être lié à leur évation du contrôle de leur réplication par la cellule hôte. Toutefois, il est probable que TRIM5 α ait préférentiellement évolué en fonction d'autres pathogènes et n'ait eu aucun avantage évolutif vers une restriction de ces PERV.

L'inhibition de la transcription des gènes du PERV par poTRIM8

TRIM8 présente une inhibition modérée mais significative de la réplication des PERV. L'analyse par cytométrie de flux révèle en effet une réduction de l'expression du PERV, caractérisée par la diminution de la MIF et par la quantité de cellules GFP positives (%GFP+). De plus l'analyse q-PCR des différentes étapes du cycle infectieux montre, par rapport à la lignée contrôle (lacZ) mais aussi aux lignées poTRIM1 α et β , 5 et 27, une réduction de 38% de la transcription du PERV à partir du jour 3 pi qui se poursuit et s'intensifie au cours de la phase exponentielle avec une réduction d'un facteur 2,5 au 15^{ème} jour pi (Figures 61).

Cependant, un impact sur les étapes précoces du cycle infectieux n'est visible qu'à partir du 7^{ème} jour pi. Il est d'abord observé sur la quantité de cercles à 2-LTR qui présentent une diminution d'un facteur 2,5 par rapport au contrôle lacZ (Figure 60B). Puis au jour 15 pi concernant les paramètres de quantité de transcrits tardifs et de provirus qui diminuent d'un facteur 2 (Figure 60A et C). Cette diminution n'a toutefois pas d'impact sur l'efficacité de l'intégration au cours de la phase exponentielle. En effet la diminution de progénomes intégrés s'accroît proportionnellement à la quantité totale de génomes PERV entrant dans la cellule au cours de ces événements. Ce rapport reste le même comparé à la lignée contrôle (lacZ) (Figure 60D).

En revanche, l'entrée dans la phase exponentielle et l'atteinte de l'état stationnaire des paramètres présentent un retard par rapport aux cellules contrôle lacZ. Ce décalage est dû à l'accumulation des effets de poTRIM8 aux cours des cycles infectieux successifs (Figure 55). Ces résultats suggèrent une inhibition de la transcription des gènes du PERV par la protéine poTRIM8, laquelle affecte ensuite les étapes suivantes du cycle infectieux.

La diminution de la transcription peut être menée, soit par une atténuation des promoteurs LTR du PERV, comme c'est le cas pour muTRIM28 par l'intermédiaire de ZFP809 (Wolf and Goff, 2009), soit en affectant la stabilité des ARNm transcrits comme peuvent le faire les protéines ZAP (Guo et al., 2004). Et ceci nécessite une interaction directe avec l'ADN/ARN ciblé par l'intermédiaire d'un motif d'interaction avec l'ADN, ou une interaction indirecte par l'intermédiaire d'un facteur fixant les molécules d'acides nucléiques.

Cependant TRIM8 ne possède pas de motif de fixation à l'ADN/ARN et, contrairement à TRIM5 α , est une protéine hautement conservée (>98% d'identité entre les espèces). Si une interaction directe avec une molécule d'un pathogène mène à une évolution rapide, comme c'est le cas pour TRIM5 α concernant son interaction avec la capsid, il semble plus probable que les effets de TRIM8 contre l'infection du PERV soient indirects.

Le domaine C-terminal de TRIM8 est impliqué dans la localisation nucléaire de la protéine et contiendrait un domaine ING (Inhibitor of Growth proteins N-terminal histone-binding motif) connu, chez d'autres protéines, pour être impliqué dans l'interaction avec les histones H3 (Culurgioni et al., 2012; Tomar et al., 2012). TRIM8 pourrait donc de cette façon se lier à un ADN cible. Cependant, une telle activité de TRIM8 par l'intermédiaire de ce domaine putatif n'a encore jamais été mise en évidence. Au contraire, les interactions de TRIM8 jusqu'alors identifiées dépendent de ses domaines RBCC. Il a été montré que TRIM8 était impliquée dans plusieurs étapes de régulation de la voie de signalisation PRR, menant à l'induction des IFN de type I et II et de la stimulation de l'activité de NF- κ B (McNab et al., 2011; Ozato et al., 2008).

D'une part TRIM8 active TAK1 par une action de polyubiquitination de type K63 (Li et al., 2011a). D'autre part, elle est un inhibiteur du facteur de transcription SOCS-1 (Ozato et al., 2008; Toniato et al., 2002) et de l'inhibiteur de la fixation à l'ADN de STAT3, PIAS3 (Okumura et al., 2010; Tomar et al., 2012). Concernant ce premier facteur, TRIM8 cible directement SOCS-1 et entraîne sa déstabilisation par sa fonction d'ubiquitination. Alors que dans le cas de PIAS3, TRIM8 est responsable de sa translocation du noyau vers le cytoplasme.

Ainsi, la protéine TRIM8 porcine pourrait-elle stimuler la voie de l'immunité innée, menant à l'activité de restriction observée sur le PERV. La raison pour laquelle seule serait affectée l'activité de transcription au cours du cycle de réplication du PERV par l'intermédiaire de cette voie, n'a cependant pas été élucidée. TRIM8 étant capable de moduler l'activité de facteurs de transcription, tels que SOCS-1 et STAT3, il est toutefois raisonnable d'émettre l'hypothèse d'une action de cette protéine sur un facteur de transcription ciblant les LTR d'un gammarétrovirus tel que le PERV. Un tel lien pourrait être fait dans la mesure où il a été montré que le MLV pourrait être associé au facteur de transcription STAT1 (Santoni et al., 2010).

Les effets amplificateurs et inhibiteurs de poTRIM11

Dans notre modèle expérimental, la protéine poTRIM11 augmente de 40% le niveau de l'infection du PERV par comparaison au contrôle lacZ. Elle ne le fait cependant que durant le premier jour après l'infection (Figure 54) et ne montre pas de différences significatives plus tard au cours de l'infection (Figure 55). Uchil et al. observent un phénomène similaire de muTRIM11 sur le N-MLV, phénomène qu'ils expliquent par une déstabilisation de la huTRIM5 α endogène par la muTRIM11 (Uchil et al., 2008). Or, le PERV possède un tropisme de type B. Il est de ce fait insensible aux TRIM5 α humaine et porcine (Wood et al., 2009). L'hypothèse posée par Uchil et al. n'est par conséquent pas applicable à ce cas de figure. Une explication alternative est potentiellement apportée par une étude récente ayant révélé une inhibition des IFN β par la muTRIM11 (Lee et al., 2013). Ces interférons peuvent être stimulés dans les cellules HEK293 par les voies classiques de l'immunité innée (Zha et al., 2006). Si cet effet peut permettre d'expliquer nos observations au début de l'infection, seul il ne permet pas d'expliquer la disparition de l'action de poTRIM11 sur le cycle infectieux du PERV par la suite.

Un effet inhibiteur de la part de TRIM11 a précédemment été démontré sur l'expression du MLV et du VIH-1 (Uchil et al., 2008). De ce fait, nous avons évalué la phase tardive du cycle infectieux par transfection du vecteur PERV. Cette expérience permet d'observer une inhibition de l'expression du PERV 36h après la transfection, alors que la condition dans laquelle l'expression de poTRIM11 est atténuée par un système de shRNA, lève partiellement cet effet inhibiteur (Figure 56).

La protéine TRIM11 aurait un mécanisme d'action complexe sur l'infection par le rétrovirus, agissant à la fois comme un amplificateur des étapes précoces du cycle infectieux et comme un facteur de restriction des étapes tardives de l'expression du rétrovirus (Lee et al., 2013; Saraiva Raposo et al., 2013; Uchil et al., 2008). Ces deux effets pourraient ainsi se neutraliser au cours des premiers jours de l'infection.

L'effet activateur de poTRIM44

Notre étude a également permis de mettre en évidence le rôle d'activateur de la protéine poTRIM44 sur l'infection par le PERV. Aucun effet de ce type n'a été à ce jour décrit dans les études réalisées (Uchil et al., 2008; Yang et al., 2013). En présence de poTRIM44, une amplification significative de l'infection virale est enregistrée au début de la phase exponentielle (Figure 55A). Les résultats suggèrent que poTRIM44 agirait sur le niveau de l'expression du PERV plutôt que sur les étapes précoces du cycle infectieux. D'une part, l'expression du PERV est significativement favorisée dès 48h pi (Figure 54B), d'autre part, les analyses fines par q-PCR des étapes précoces du cycle infectieux montrent que ces étapes ne sont pas affectées jusqu'à 72h pi (Figure 60). Toutefois, poTRIM44 ne semble pas agir sur la transcription des gènes du PERV (Figure 61). De ce fait cette protéine pourrait agir tardivement, au niveau de la post-traduction des protéines virales, et favoriser la formation des particules et leur relargage lesquelles, à leur tour, augmentent l'infection.

TRIM44 est une protéine peu étudiée. Elle fait partie des protéines RBCC ne possédant pas de domaine RING et n'ayant donc pas d'activité E3 ubiquitine ligase. Au contraire, elle possède une fonction de dé-ubiquitination qui stabilise ses cibles comme il l'a été montré pour TRIM17/terf (Urano et al., 2009). Seules deux études sur l'implication de TRIM44 au cours d'un processus infectieux existent. La première étude concerne une infection par le VIH-1 et le MLV sur une cinétique courte : elle ne montre aucun effet significatif jusqu'à 36hpi (Uchil et al., 2008). Dans notre étude en revanche, poTRIM44 ne présente des effets importants et significatifs qu'à partir de 48h après l'infection. Il est donc possible qu'aucun effet n'ait été visible dans le cadre de cette étude en raison de la courte durée d'infection réalisée. La seconde étude montre que la protéine huTRIM44 favorise une réponse antivirale contre les virus NDV (Newcastle Disease Virus), VSV (Vesicular Stomatitis Virus) et le SeV (Sendai Virus) au travers de la voie de signalisation des IFN et de NF- κ B en stabilisant le complexe VISA (aussi appelé Cardif, IPS-1 ou MAVS) (Yang et al., 2013). Cependant on peut remarquer que les effets observés dans notre étude semblent être similaires à ceux obtenus par l'atténuation de l'expression de la huTRIM44 durant l'infection par le VSV dans des cellules HEK293 (Yang et al., 2013). Par conséquent, la possibilité que l'amélioration observée passe par un effet dominant négatif entre la TRIM44 porcine et la TRIM44 endogène humaine doit être envisagée.

Conclusion

En conclusion, nous avons pu confirmer l'insensibilité du PERV vis-à-vis de la protéine TRIM5 α porcine. Tous les PERV répliquatifs ont un tropisme de type B et possèdent le même déterminant responsable de la résistance à TRIM5 α (Wood et al., 2009). Ce facteur n'est donc pas impliqué dans le contrôle exercé par l'hôte au cours de l'évolution sur l'infection par les PERV.

Dans notre étude d'infection sur du long terme, nous avons également pu identifier des effets différents induits par les protéines poTRIM8, 11 et 44, dans un modèle HEK293. La famille des protéines TRIM est hautement impliquée dans l'immunité innée. Plus particulièrement, de nombreux membres de cette famille régulent, à différentes étapes, la voie de signalisation PRR dans les modèles humain et murin (McNab et al., 2011). Ainsi, il a été montré que TRIM8, 11 et 44 font partie de ces membres qui participent à la régulation de cette voie (Lee et al., 2013; Li et al., 2011a; Okumura et al., 2010; Toniato et al., 2002; Yang et al., 2013). Afin d'approfondir leur rôle joué lors de l'infection par le PERV, il sera nécessaire d'étudier leur relation avec cette voie de signalisation des PRR.

Concernant les effets de restriction menés par TRIM8, il sera nécessaire d'identifier si cette protéine agit sur le PERV par l'intermédiaire de la voie de signalisation des PRR ou par l'inhibition de facteurs de transcription. Pour répondre à cette question il est essentiel, d'une part, de mener une étude sur l'état de la voie de l'immunité innée mais aussi de rechercher des facteurs exprimés par cette voie qui pourraient être impliqués dans l'inhibition de la transcription du PERV, notamment concernant l'activation de facteurs de restriction tels que les protéines ZAP. Par ailleurs, des techniques par CHIP-seq pourraient permettre d'identifier les promoteurs du PERV qui pourraient dans ces conditions être ciblés par TRIM8.

TRIM11 présente un effet singulier. Elle agit en effet comme un activateur des étapes précoces et comme un inhibiteur des étapes tardives de l'infection. Ainsi, il sera nécessaire d'évaluer l'état de la voie signalisation des PRR, lors de l'entrée du PERV et plus particulièrement concernant les IFN de type I. Il sera également intéressant d'explorer l'expression du PERV (transcription et traduction) et le relargage des particules virales lors de la phase tardive dans les premiers jours de l'infection ou au cours de la transfection.

Enfin, nous avons identifié que TRIM44 est un activateur de l'infection par le PERV. Cet effet peut être dû à un effet dominant négatif. Ainsi, il sera nécessaire d'élucider l'état d'ubiquitination du complexe VISA, si la fonction de dé-ubiquitination de TRIM44 peut être impliquée dans le processus et d'identifier les cibles poTRIM44. En parallèle, les effets de cette protéine sur le PERV peuvent être approfondis et confirmés par l'atténuation de l'expression de la poTRIM44 endogène dans les lignées ST-IOWA qui sont sensibles à l'infection par le PERV (Oldmixon et al., 2002; Takeuchi et al., 1998).

Bibliographie

- Akiyoshi, D.E., M. Denaro, H. Zhu, J.L. Greenstein, P. Banerjee, and J.A. Fishman. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol.* 72:4503-7.
- Alimonti, J.B., T.B. Ball, and K.R. Fowke. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol.* 84:1649-61.
- Alves, V.S., D.C. Pimenta, E. Sattlegger, and B.A. Castilho. 2004. Biophysical characterization of Gir2, a highly acidic protein of *Saccharomyces cerevisiae* with anomalous electrophoretic behavior. *Biochem Biophys Res Commun.* 314:229-34.
- Anai, Y., H. Ochi, S. Watanabe, S. Nakagawa, M. Kawamura, T. Gojobori, and K. Nishigaki. 2012. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *J Virol.* 86:8634-44.
- Ankar, J., and L. Sistonen. 2007. SUMO: getting it on. *Biochem Soc Trans.* 35:1409-13.
- Anderson, C.L., and C.J. Brown. 2005. Epigenetic predisposition to expression of TIMP1 from the human inactive X chromosome. *BMC Genet.* 6:48.
- Anderson, J.L., E.M. Campbell, X. Wu, N. Vandegraaff, A. Engelman, and T.J. Hope. 2006. Proteasome Inhibition Reveals that a Functional Preintegration Complex Intermediate Can Be Generated during Restriction by Diverse TRIM5 Proteins. *J Virol.* 80:9754-60.
- Anderson, J.L., and T.J. Hope. 2005. Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances. *Gene Ther.* 12:1667-78.
- Archibald, A.L., L. Bolund, C. Churcher, M. Fredholm, M.A. Groenen, B. Harlizius, K.T. Lee, D. Milan, J. Rogers, M.F. Rothschild, H. Uenishi, J. Wang, and L.B. Schook. 2010. Pig genome sequence--analysis and publication strategy. *BMC Genomics.* 11:438.
- Argaw, T., and C.A. Wilson. 2012. Detailed Mapping of Determinants within the Porcine Endogenous Retrovirus Envelope Surface Unit Identifies Critical Residues for Human Cell Infection within the Proline-Rich Region. *J Virol.* 86:9096-104.
- Arhel, N. 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology.* 7:96.
- Arnaud, F., M. Varela, T.E. Spencer, and M. Palmarini. 2008. Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host. *Cell Mol Life Sci.* 65:3422-32.
- Assil, S., P.-A. Bolze, M. Boukhali, C. Cariou, L. Chauveau, N. Chuvin, K. Dhondt, A. Ducuing, J.-B. Dupont, C. Grandin, G. Jarre, J. Le Douce, D. Lebrun, F.-X. Lechenet, N. Luther, M. Milivojevic, E. Pérès, E. Plantamura, A. Sanlaville, A. Schwob, M. Seggio, J.-E. Serre, P.-A. Thiébaud, S. Tirmarche, K.-T. Tshilenge, C. Vandamme, P. Verlhac, J. Vinera, R. Mahieux, and C. Journo. 2011. Rétrovirus humain XMRV : la fin d'une histoire séduisante? *Virologie.* 15:222-34.
- Avila-Arcos, M.C., S.Y. Ho, Y. Ishida, N. Nikolaidis, K. Tsangaras, K. Honig, R. Medina, M. Rasmussen, S.L. Fordyce, S. Calvignac-Spencer, E. Willerslev, M.T. Gilbert, K.M. Helgen, A.L. Roca, and A.D. Greenwood. 2013. One hundred twenty years of koala retrovirus evolution determined from museum skins. *Mol Biol Evol.* 30:299-304.
- Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, and M. Aboud. 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology.* 1:20.
- Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 226:1209-11.
- Baltimore, D. 1975. Tumor viruses: 1974. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 39 Pt 2:1187-200.
- Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-71.

- Bartosch, B., D. Stefanidis, R. Myers, R. Weiss, C. Patience, and Y. Takeuchi. 2004. Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol.* 78:13880-90.
- Basyuk, E., S. Boulon, F. Skou Pedersen, E. Bertrand, and S. Vestergaard Rasmussen. 2005. The packaging signal of MLV is an integrated module that mediates intracellular transport of genomic RNAs. *J Mol Biol.* 354:330-9.
- Beauclair, G., A. Tchalikian-Cosson, A. Bridier-Nahmias, A. Zamborlini, P. Lesage, and A. Saïb. 2012. Ancrage chromatinien et intégration rétrovirale : implication des protéines IN et Gag. *Virologie.* 16:73-84.
- Beck-Engeser, G.B., D. Eilat, and M. Wabl. 2011. An autoimmune disease prevented by anti-retroviral drugs. *Retrovirology.* 8:91.
- Bekpen, C., T. Marques-Bonet, C. Alkan, F. Antonacci, M.B. Leogrande, M. Ventura, J.M. Kidd, P. Siswara, J.C. Howard, and E.E. Eichler. 2009. Death and resurrection of the human IRGM gene. *PLoS Genet.* 5:e1000403.
- Beljanski, M. 1972. [Synthesis in vitro of DNA on an RNA matrix by a transcriptase from *Escherichia coli*]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 274:2801-4.
- Bell, J.L., A. Malyukova, J.K. Holien, J. Koach, M.W. Parker, M. Kavallaris, G.M. Marshall, and B.B. Cheung. 2012. TRIM16 acts as an E3 ubiquitin ligase and can heterodimerize with other TRIM family members. *PLoS One.* 7:e37470.
- Belshaw, R., V. Pereira, A. Katzourakis, G. Talbot, J. Paces, A. Burt, and M. Tristem. 2004. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4894-9.
- Benit, L., N. De Parseval, J.F. Casella, I. Callebaut, A. Cordonnier, and T. Heidmann. 1997. Cloning of a new murine endogenous retrovirus, MuERV-L, with strong similarity to the human HERV-L element and with a gag coding sequence closely related to the Fv1 restriction gene. *J Virol.* 71:5652-7.
- Benveniste, R.E., M.M. Lieber, D.M. Livingston, C.J. Sherr, G.J. Todaro, and S.S. Kalter. 1974. Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta. *Nature.* 248:17-20.
- Benveniste, R.E., and G.J. Todaro. 1974. Multiple divergent copies of endogenous C-type virogenes in mammalian cells. *Nature.* 252:170-3.
- Bernardi, R., and P.P. Pandolfi. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:1006-16.
- Beyer, U., J. Moll-Rocek, U.M. Moll, and M. Döbelstein. 2011. Endogenous retrovirus drives hitherto unknown proapoptotic p63 isoforms in the male germ line of humans and great apes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:3624-9.
- Bieniasz, P.D. 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol.* 5:1109-15.
- Bittmann, I., D. Mihica, R. Plesker, and J. Denner. 2012. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERV) in different organs of a pig. *Virology.* 433:329-336.
- Blond, J.L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, and F. Mallet. 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol.* 73:1175-85.
- Bosch, S., C. Arnauld, and A. Jestin. 2000. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J Virol.* 74:8575-81.
- Boudinot, P., L.M. van der Aa, L. Jouneau, L. Du Pasquier, P. Pontarotti, V. Briolat, A. Benmansour, and J.P. LeVraud. 2011. Origin and evolution of TRIM proteins: new insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish. *PLoS One.* 6:e22022.
- Bouyac-Bertoia, M., J.D. Dvorin, R.A. Fouchier, Y. Jenkins, B.E. Meyer, L.I. Wu, M. Emerman, and M.H. Malim. 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell.* 7:1025-35.
- Brandariz-Nunez, A., A. Roa, J.C. Valle-Casuso, N. Biris, D. Ivanov, and F. Diaz-Griffero. 2013. Contribution of SUMO-interacting motifs and SUMOylation to the antiretroviral properties of TRIM5alpha. *Virology.* 435:463-71.

- Brody, B.A., S.S. Rhee, M.A. Sommerfelt, and E. Hunter. 1992. A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3443-7.
- Bukrinskaya, A., B. Brichacek, A. Mann, and M. Stevenson. 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med.* 188:2113-25.
- Butler, S.L., M.S. Hansen, and F.D. Bushman. 2001. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med.* 7:631-4.
- Camus, G., C. Segura-Morales, D. Molle, S. Lopez-Verges, C. Begon-Pescia, C. Cazevieuille, P. Schu, E. Bertrand, C. Berlioz-Torrent, and E. Basyuk. 2007. The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. *Mol Biol Cell.* 18:3193-203.
- Carthagen, L., A. Bergamaschi, J.M. Luna, A. David, P.D. Uchil, F. Margottin-Goguet, W. Mothes, U. Hazan, C. Transy, G. Pancino, and S. Nisole. 2009. Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One.* 4:e4894.
- Chang, Y.F., S.M. Wang, K.J. Huang, and C.T. Wang. 2007. Mutations in capsid major homology region affect assembly and membrane affinity of HIV-1 Gag. *J Mol Biol.* 370:585-97.
- Cherepanov, P., G.N. Maertens, and S. Hare. 2011. Structural insights into the retroviral DNA integration apparatus. *Curr Opin Struct Biol.* 21:249-56.
- Chu, Y., and X. Yang. 2011. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene.* 30:1108-16.
- Ciuffi, A., T.L. Diamond, Y. Hwang, H.M. Marshall, and F.D. Bushman. 2006. Modulating Target Site Selection During Human Immunodeficiency Virus DNA Integration In Vitro with an Engineered Tethering Factor. *Hum Gene Ther.* 17:960-7.
- Coffin, J.M. 2004. Evolution of retroviruses: fossils in our DNA. *Proc Am Philos Soc.* 148:264-80.
- Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus. 1997. Retroviruses. Cold Spring Harbor Press, New York. 843p. NBK19376.
- Cohen, C.J., W.M. Lock, and D.L. Mager. 2009. Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. *Gene.* 448:105-14.
- Cohen, P. 2005. Guardian of the genome. Research into a different kind of viral defense system may yield powerful treatments and solve some mysteries about HIV. *IAVI Rep.* 9:1-5.
- Coiffic, A., G. Beauclair, A. Zambrolini, and A. Saïb. 2010. SUMO dans le monde viral. *Virologie.* 14:349-61.
- Corish, P., and C. Tyler-Smith. 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 12:1035-40.
- Culurgioni, S., I.G. Munoz, A. Moreno, A. Palacios, M. Villate, I. Palmero, G. Montoya, and F.J. Blanco. 2012. Crystal structure of inhibitor of growth 4 (ING4) dimerization domain reveals functional organization of ING family of chromatin-binding proteins. *J Biol Chem.* 287:10876-84.
- Delelis, O., K. Carayon, A. Saib, E. Deprez, and J.F. Mouscadet. 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology.* 5:114.
- Delelis, O., C. Petit, H. Leh, G. Mbemba, J.F. Mouscadet, and P. Sonigo. 2005. A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. *Retrovirology.* 2:31.
- Delelis, O., A. Saib, and P. Sonigo. 2003. Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J Virol.* 77:8141-6.
- Demirov, D.G., and E.O. Freed. 2004. Retrovirus budding. *Virus Res.* 106:87-102.
- Denner, J., V. Specke, U. Thiesen, A. Karlas, and R. Kurth. 2003. Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology.* 314:125-33.
- Denner, J., and R.R. Tonjes. 2012. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev.* 25:318-43.
- Dewannieux, M., F. Harper, A. Richaud, C. Letzelter, D. Ribet, G. Pierron, and T. Heidmann. 2006. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 16:1548-56.

- Diaz-Griffero, F., X. Li, H. Javanbakht, B. Song, S. Welikala, M. Stremmler, and J. Sodroski. 2006. Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology*. 349:300-15.
- Dieckhoff, B., B. Petersen, W.A. Kues, R. Kurth, H. Niemann, and J. Denner. 2008. Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation*. 15:36-45.
- Dieckhoff, B., J. Puhmann, K. Buscher, A. Hafner-Marx, N. Herbach, N. Bannert, M. Buttner, R. Wanke, R. Kurth, and J. Denner. 2007. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) TROLL. *Vet Microbiol*. 123:53-68.
- Dorrschuck, E., N. Fischer, I.G. Bravo, K.M. Hanschmann, H. Kuiper, A. Spotter, R. Moller, K. Cichutek, C. Munk, and R.R. Tonjes. 2011. Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases. *J Virol*. 85:3842-57.
- Doxiadis, G.G., N. de Groot, and R.E. Bontrop. 2008. Impact of endogenous intronic retroviruses on major histocompatibility complex class II diversity and stability. *J Virol*. 82:6667-77.
- Dupressoir, A., C. Lavalie, and T. Heidmann. 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*. 33:663-71.
- Dupressoir, A., G. Marceau, C. Vernochet, L. Benit, C. Kanellopoulos, V. Sapin, and T. Heidmann. 2005. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:725-30.
- Ehrlich, P. 1954. [The partial function of cells. (Nobel Prize address given on 11 December 1908 at Stockholm)]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 5:67-86.
- Ellerman, V., and O. Bang. 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I*:495-609.
- Emerman, M. 2006. How TRIM5alpha defends against retroviral invasions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5249-50.
- Ericsson, T.A., Y. Takeuchi, C. Templin, G. Quinn, S.F. Farhadian, J.C. Wood, B.A. Oldmixon, K.M. Suling, J.K. Ishii, Y. Kitagawa, T. Miyazawa, D.R. Salomon, R.A. Weiss, and C. Patience. 2003. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6759-64.
- Esnault, C., J. Maestre, and T. Heidmann. 2000. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*. 24:363-7.
- Fassati, A., and S.P. Goff. 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 75:3626-35.
- Feuchter-Murthy, A.E., J.D. Freeman, and D.L. Mager. 1993. Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucleic Acids Res*. 21:135-43.
- Fiebig, U., M.G. Hartmann, N. Bannert, R. Kurth, and J. Denner. 2006. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol*. 80:5651-4.
- Fletcher, A.J., and G.J. Towers. 2013. Inhibition of retroviral replication by members of the TRIM protein family. *Curr Top Microbiol Immunol*. 371:29-66.
- Frazier, M.E. 1985. Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch Virol*. 83:83-97.
- Freemont, P.S. 2000. RING for destruction? *Curr Biol*. 10:R84-7.
- Friedrich, B., G. Li, N. Dziuba, and M.R. Ferguson. 2010. Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line. *Virology*. 407:354-61.
- Gack, M.U., Y.C. Shin, C.H. Joo, T. Urano, C. Liang, L. Sun, O. Takeuchi, S. Akira, Z. Chen, S. Inoue, and J.U. Jung. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 446:916-920.
- Gallo, R.C. 2005. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. 24:5926-30.

- Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224:500-3.
- Gao, G., X. Guo, and S.P. Goff. 2002. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science*. 297:1703-6.
- Garcia-Etxebarria, K., and B.M. Jugo. 2010. Genome-wide detection and characterization of endogenous retroviruses in *Bos taurus*. *J Virol*. 84:10852-62.
- Garcia-Ortega, L., V. De los Rios, A. Martinez-Ruiz, M. Onaderra, J. Lacadena, A. Martinez del Pozo, and J.G. Gavilanes. 2005. Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2. *Electrophoresis*. 26:3407-13.
- Garoff, H., R. Hewson, and D.J. Opstelten. 1998. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:1171-90.
- Gemeniano, M., O. Mpanju, D.R. Salomon, M.V. Eiden, and C.A. Wilson. 2006. The infectivity and host range of the ecotropic porcine endogenous retrovirus, PERV-C, is modulated by residues in the C-terminal region of its surface envelope protein. *Virology*. 346:108-17.
- Gherghe, C., C.W. Leonard, R.J. Gorelick, and K.M. Weeks. 2010. Secondary structure of the mature ex virio Moloney murine leukemia virus genomic RNA dimerization domain. *J Virol*. 84:898-906.
- Gifford, R., P. Kabat, J. Martin, C. Lynch, and M. Tristem. 2005. Evolution and distribution of class II-related endogenous retroviruses. *J Virol*. 79:6478-86.
- Gimenez, J., C. Montgiraud, J.P. Pichon, B. Bonnaud, M. Arsac, K. Ruel, O. Bouton, and F. Mallet. 2010. Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res*. 38:2229-46.
- Goff, S.P. 2004. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell*. 16:849-59.
- Goila-Gaur, R., and K. Strebel. 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*. 5:51.
- Goni, R., P. Garcia, and S. Foissac. 2009. The qPCR data statistical analysis. In *Intergromics White Paper*. Integromics SL, Madrid. pp 1-9.
- Groenen, M.A., A.L. Archibald, H. Uenishi, C.K. Tuggle, Y. Takeuchi, M.F. Rothschild, C. Rogel-Gaillard, C. Park, D. Milan, H.J. Megens, S. Li, D.M. Larkin, H. Kim, L.A. Frantz, M. Caccamo, H. Ahn, B.L. Aken, A. Anselmo, C. Anthon, L. Auvil, B. Badaoui, C.W. Beattie, C. Bendixen, D. Berman, F. Blecha, J. Blomberg, L. Bolund, M. Bosse, S. Botti, Z. Bujie, M. Bystrom, B. Capitanu, D. Carvalho-Silva, P. Chardon, C. Chen, R. Cheng, S.H. Choi, W. Chow, R.C. Clark, C. Clee, R.P. Crooijmans, H.D. Dawson, P. Dehais, F. De Sapio, B. Dibbits, N. Drou, Z.Q. Du, K. Eversole, J. Fadista, S. Fairley, T. Faraut, G.J. Faulkner, K.E. Fowler, M. Fredholm, E. Fritz, J.G. Gilbert, E. Giuffra, J. Gorodkin, D.K. Griffin, J.L. Harrow, A. Hayward, K. Howe, Z.L. Hu, S.J. Humphray, T. Hunt, H. Hornshoj, J.T. Jeon, P. Jern, M. Jones, J. Jurka, H. Kanamori, R. Kapetanovic, J. Kim, J.H. Kim, K.W. Kim, T.H. Kim, G. Larson, K. Lee, K.T. Lee, R. Leggett, H.A. Lewin, Y. Li, W. Liu, J.E. Loveland, Y. Lu, J.K. Lunney, J. Ma, O. Madsen, K. Mann, L. Matthews, S. McLaren, T. Morozumi, M.P. Murtaugh, J. Narayan, D.T. Nguyen, P. Ni, S.J. Oh, S. Onteru, F. Panitz, E.W. Park, et al. 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 491:393-8.
- Groudine, M., R. Eisenman, and H. Weintraub. 1981. Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. *Nature*. 292:311-7.
- Grutter, C., C. Briand, G. Capitani, P.R. Mittl, S. Papin, J. Tschopp, and M.G. Grutter. 2006. Structure of the PRYSPRY-domain: implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Lett*. 580:99-106.
- Grutter, M.G., and J. Luban. 2012. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr Opin Virol*. 2:142-50.
- Guo, X., J.W. Carroll, M.R. Macdonald, S.P. Goff, and G. Gao. 2004. The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J Virol*. 78:12781-7.
- Haaf, T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 310:13-22.

- Hahn, B.H., G.M. Shaw, K.M. De Cock, and P.M. Sharp. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287:607-14.
- Hammarstedt, M., and H. Garoff. 2004. Passive and active inclusion of host proteins in human immunodeficiency virus type 1 gag particles during budding at the plasma membrane. *J Virol*. 78:5686-97.
- Han, X., H. Du, and M.A. Massiah. 2011. Detection and characterization of the in vitro e3 ligase activity of the human MID1 protein. *J Mol Biol*. 407:505-20.
- Hanger, J.J., L.D. Bromham, J.J. McKee, T.M. O'Brien, and W.F. Robinson. 2000. The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. *J Virol*. 74:4264-72.
- Harrison, I., Y. Takeuchi, B. Bartosch, and J.P. Stoye. 2004. Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J Virol*. 78:13871-9.
- Hartmann, K. 2012. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 4:2684-710.
- Hasan, M., J. Koch, D. Rakheja, A.K. Pattnaik, J. Brugarolas, I. Dozmorov, B. Levine, E.K. Wakeland, M.A. Lee-Kirsch, and N. Yan. 2013. Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. *Nat Immunol*. 14:61-71.
- Hatzioannou, T., D. Perez-Caballero, A. Yang, S. Cowan, and P.D. Bieniasz. 2004. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10774-9.
- Hayakawa, S., S. Shiratori, H. Yamato, T. Kameyama, C. Kitatsuji, F. Kashigi, S. Goto, S. Kameoka, D. Fujikura, T. Yamada, T. Mizutani, M. Kazumata, M. Sato, J. Tanaka, M. Asaka, Y. Ohba, T. Miyazaki, M. Imamura, and A. Takaoka. 2011. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol*. 12:37-44.
- Hayward, W.S., B.G. Neel, and S.M. Astrin. 1981. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature*. 290:475-80.
- Hazuda, D.J. 2010. Resistance to inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 integration. *Braz J Infect Dis*. 14:513-8.
- Hazuda, D.J., P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J.A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau, and M.D. Miller. 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*. 287:646-50.
- Heidmann, O., C. Vernochet, A. Dupressoir, and T. Heidmann. 2009. Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology*. 6:107.
- Heidmann, T., O. Heidmann, and J.F. Nicolas. 1988. An indicator gene to demonstrate intracellular transposition of defective retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:2219-23.
- Hendrix, J., R. Gijbbers, J. De Rijck, A. Voet, J. Hotta, M. McNeely, J. Hofkens, Z. Debyser, and Y. Engelborghs. 2011. The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. *Nucleic Acids Res*. 39:1310-25.
- Henzy, J.E., and W.E. Johnson. 2013. Pushing the endogenous envelope. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368:20120506.
- Herring, C., G. Quinn, R. Bower, N. Parsons, N.A. Logan, A. Brawley, K. Elsome, A. Whittam, X.M. Fernandez-Suarez, D. Cunningham, D. Onions, G. Langford, and L. Scobie. 2001. Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig. *J Virol*. 75:12252-65.
- Hilditch, L., R. Matadeen, D.C. Goldstone, P.B. Rosenthal, I.A. Taylor, and J.P. Stoye. 2011. Ordered assembly of murine leukemia virus capsid protein on lipid nanotubes directs specific binding by the restriction factor, Fv1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:5771-6.
- Hogue, I.B., A. Hoppe, and A. Ono. 2009. Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J Virol*. 83:7322-36.
- Hohenadl, C., H. Germaier, M. Walchner, M. Hagenhofer, M. Herrmann, M. Sturzl, P. Kind, R. Hehlmann, V. Erfle, and C. Leib-Mosch. 1999. Transcriptional activation of endogenous

- retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol.* 113:587-94.
- Hohn, O., K. Hanke, and N. Bannert. 2013. HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. *Front Oncol.* 3:246.
- Horie-Inoue, K. 2013. TRIM proteins as trim tabs for the homeostasis. *J Biochem.*
- Horie, M., T. Honda, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Daito, T. Oshida, K. Ikuta, P. Jern, T. Gojobori, J.M. Coffin, and K. Tomonaga. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature.* 463:84-7.
- Hsieh, L.L., and I.B. Weinstein. 1990. Factors influencing the expression of endogenous retrovirus-like sequences in Rat 6 cells. *Mol Carcinog.* 3:344-9.
- Hughes, J.F., and J.M. Coffin. 2001. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet.* 29:487-9.
- Hulme, A.E., O. Perez, and T.J. Hope. 2011. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:9975-80.
- Huthoff, H., and G.J. Towers. 2008. Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5alpha. *Trends Microbiol.* 16:612-9.
- Ikeda, H., and H. Sugimura. 1989. Fv-4 resistance gene: a truncated endogenous murine leukemia virus with ecotropic interference properties. *J Virol.* 63:5405-12.
- Isel, C., C. Ehresmann, and R. Marquet. 2010. Initiation of HIV Reverse Transcription. *Viruses.* 2:213-43.
- Ito, K., R. Bernardi, A. Morotti, S. Matsuoka, G. Saglio, Y. Ikeda, J. Rosenblatt, D.E. Avigan, J. Teruya-Feldstein, and P.P. Pandolfi. 2008. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature.* 453:1072-8.
- Ivanov, A.V., H. Peng, V. Yurchenko, K.L. Yap, D.G. Negorev, D.C. Schultz, E. Psulkowski, W.J. Fredericks, D.E. White, G.G. Maul, M.J. Sadofsky, M.M. Zhou, and F.J. Rauscher, 3rd. 2007. PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell.* 28:823-37.
- James, L.C., A.H. Keeble, Z. Khan, D.A. Rhodes, and J. Trowsdale. 2007. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6200-5.
- Jefferies, C., C. Wynne, and R. Higgs. 2011. Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? *Nat Rev Immunol.* 11:617-25.
- Jensen, K., C. Shiels, and P.S. Freemont. 2001. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene.* 20:7223-33.
- Jeong, M.S., E.J. Kim, and S.B. Jang. 2010. Expression and RNA-binding of human zinc-finger antiviral protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 396:696-702.
- Jern, P., and J.M. Coffin. 2008. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet.* 42:709-32.
- Jern, P., G.O. Sperber, and J. Blomberg. 2005. Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology.* 2:50.
- Jonsson, S.R., G. Hache, M.D. Stenglein, S.C. Fahrenkrug, V. Andresdottir, and R.S. Harris. 2006. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res.* 34:pp 5683-94.
- Jonsson, S.R., R.S. LaRue, M.D. Stenglein, S.C. Fahrenkrug, V. Andresdottir, and R.S. Harris. 2007. The restriction of zoonotic PERV transmission by human APOBEC3G. *PLoS ONE.* 2:e893.
- Kahyo, T., H. Tao, K. Shinmura, H. Yamada, H. Mori, K. Funai, N. Kurabe, M. Suzuki, M. Tanahashi, H. Niwa, H. Ogawa, F. Tanioka, G. Yin, M. Morita, K. Matsuo, S. Kono, and H. Sugimura. 2013. Identification and association study with lung cancer for novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus. *Carcinogenesis.* 34:2531-8.
- Kalyanaraman, V.S., M.G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Miyoshi, D. Golde, and R.C. Gallo. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 218:571-3.

- Katsounas, A., J.J. Hubbard, C.H. Wang, X. Zhang, D. Dou, B. Shivakumar, S. Winter, J.F. Schlaak, R.A. Lempicki, H. Masur, M. Polis, S. Kottlilil, and A. Osinusi. 2013. High interferon-stimulated gene ISG-15 expression affects HCV treatment outcome in patients co-infected with HIV and HCV. *J Med Virol.* 85:959-63.
- Katzourakis, A., R.J. Gifford, M. Tristem, M.T. Gilbert, and O.G. Pybus. 2009. Macroevolution of complex retroviruses. *Science.* 325:1512.
- Katzourakis, A., M. Tristem, O.G. Pybus, and R.J. Gifford. 2007. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6261-5.
- Kaufmann, S., M. Sauter, M. Schmitt, B. Baumert, B. Best, A. Boese, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch. 2010. Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *J Gen Virol.* 91:1494-502.
- Kaulitz, D., D. Mihica, C. Adlhoch, M. Semaan, and J. Denner. 2013. Improved pig donor screening including newly identified variants of porcine endogenous retrovirus-C (PERV-C). *Arch Virol.* 158:341-8.
- Koba, R., C. Kokaji, G. Fujisaki, K. Oguma, and H. Sentsui. 2013. Characterization of feline TRIM genes: molecular cloning, expression in tissues, and response to type I interferon. *Vet Immunol Immunopathol.* 153:91-8.
- Koh, Y., K.A. Matreyek, and A. Engelman. 2011. Differential sensitivities of retroviruses to integrase strand transfer inhibitors. *J Virol.* 85:3677-82.
- Kozak, C.A. 2010. The mouse "xenotropic" gammaretroviruses and their XPR1 receptor. *Retrovirology.* 7:101.
- Krach, U., N. Fischer, F. Czuderna, and R.R. Tonjes. 2001. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J Virol.* 75:5465-72.
- Kubo, Y., H. Hayashi, T. Matsuyama, H. Sato, and N. Yamamoto. 2012. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol.* 2012:640894.
- Kuddus, R.H., C.R. Gandhi, K.K. Rehman, F. Guo, S.C. Watkins, L.A. Valdivia, and J.J. Fung. 2003. Some morphological, growth, and genomic properties of human cells chronically infected with porcine endogenous retrovirus (PERV). *Genome.* 46:858-69.
- Lampel, A., O. Yaniv, O. Berger, E. Bacharach, E. Gazit, and F. Frolow. 2013. A triclinic crystal structure of the carboxy-terminal domain of HIV-1 capsid protein with four molecules in the asymmetric unit reveals a novel packing interface. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 69:602-6.
- Lamprecht, B., K. Walter, S. Kreher, R. Kumar, M. Hummel, D. Lenze, K. Kochert, M.A. Bouhrel, J. Richter, E. Soler, R. Stadhouders, K. Johrens, K.D. Wurster, D.F. Callen, M.F. Harte, M. Giefing, R. Barlow, H. Stein, I. Anagnostopoulos, M. Janz, P.N. Cockerill, R. Siebert, B. Dorken, C. Bonifer, and S. Mathas. 2010. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med.* 16:571-9, 1p following 579.
- LaRue, R.S., V. Andresdottir, Y. Blanchard, S.G. Conticello, D. Derse, M. Emerman, W.C. Greene, S.R. Jonsson, N.R. Landau, M. Lochelt, H.S. Malik, M.H. Malim, C. Munk, S.J. O'Brien, V.K. Pathak, K. Strebel, S. Wain-Hobson, X.F. Yu, N. Yuhki, and R.S. Harris. 2009. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J Virol.* 83:494-7.
- LaRue, R.S., S.R. Jonsson, K.A. Silverstein, M. Lajoie, D. Bertrand, N. El-Mabrouk, I. Hotzel, V. Andresdottir, T.P. Smith, and R.S. Harris. 2008. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol.* 9:104.
- Lavie, L., M. Kitova, E. Maldener, E. Meese, and J. Mayer. 2005. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol.* 79:876-83.
- Lavillette, D., and D. Kabat. 2004. Porcine endogenous retroviruses infect cells lacking cognate receptors by an alternative pathway: implications for retrovirus evolution and xenotransplantation. *J Virol.* 78:8868-77.

- Le Tissier, P., J.P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R.A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*. 389:681-2.
- Lee, J., Y.D. Cho, Y.K. Heo, Y. Kwon, D.G. Kim, B.S. Choi, S.S. Kim, and Y.B. Kim. 2011. Reduction of N-tropic mutant porcine endogenous retrovirus infectivity by human tripartite motif-containing 5-isoform alpha. *Transplant Proc*. 43:2774-8.
- Lee, J.H., G.C. Webb, R.D. Allen, and C. Moran. 2002. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Western pigs. *J Virol*. 76:5548-56.
- Lee, Y., B. Song, C. Park, and K.S. Kwon. 2013. TRIM11 negatively regulates IFNbeta production and antiviral activity by targeting TBK1. *PLoS One*. 8:e63255.
- Lesage, P., and A.L. Todeschini. 2005. Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet Genome Res*. 110:70-90.
- Leung, D.C., and M.C. Lorincz. 2012. Silencing of endogenous retroviruses: when and why do histone marks predominate? *Trends Biochem Sci*. 37:127-33.
- Lewis, P.F., and M. Emerman. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol*. 68:510-6.
- Li, Q., J. Yan, A.P. Mao, C. Li, Y. Ran, H.B. Shu, and Y.Y. Wang. 2011a. Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNFalpha- and IL-1beta-triggered NF-kappaB activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:19341-6.
- Li, X., D.F. Yeung, A.M. Fiegen, and J. Sodroski. 2011b. Determinants of the higher order association of the restriction factor TRIM5alpha and other tripartite motif (TRIM) proteins. *J Biol Chem*. 286:27959-70.
- Lin, Y., and A.S. Waldman. 2001. Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics*. 158:1665-74.
- Liu, G., Z. Li, M. Pan, M. Ge, Y. Wang, and Y. Gao. 2011a. Genetic prevalence of porcine endogenous retrovirus in Chinese experimental miniature pigs. *Transplant Proc*. 43:2762-9.
- Liu, H.L., Y.Q. Wang, C.H. Liao, Y.Q. Kuang, Y.T. Zheng, and B. Su. 2005. Adaptive evolution of primate TRIM5alpha, a gene restricting HIV-1 infection. *Gene*. 362:109-16.
- Liu, X.H., W. Xu, J. Russ, L.E. Eiden, and M.V. Eiden. 2011b. The host range of gammaretroviruses and gammaretroviral vectors includes post-mitotic neural cells. *PLoS One*. 6:e18072.
- Liu, Y., and C. Soper. 2009. The Natural History of Retroviruses : Exogenization vs Endogenization. *Answers Research Journal*. 2:97-106.
- Logue, E.C., K.T. Taylor, P.H. Goff, and N.R. Landau. 2011. The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. *J Virol*. 85:12950-61.
- Lowy, D.R., W.P. Rowe, N. Teich, and J.W. Hartley. 1971. Murine leukemia virus: high-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science*. 174:155-6.
- Lukic, Z., S. Hausmann, S. Sebastian, J. Rucci, J. Sastri, S.L. Robia, J. Luban, and E.M. Campbell. 2011. TRIM5alpha associates with proteasomal subunits in cells while in complex with HIV-1 virions. *Retrovirology*. 8:93.
- Macfarlane, C., and P. Simmonds. 2004. Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. *J Mol Evol*. 59:642-56.
- Machnik, G., D. Sypniewski, Z. Wydmuch, K. Cholewa, U. Mazurek, T. Wilczok, Z. Smorag, and J. Pacha. 2005. Sequence analysis of proviral DNA of porcine endogenous retroviruses. *Transplant Proc*. 37:4610-4.
- Maksakova, I.A., M.T. Romanish, L. Gagnier, C.A. Dunn, L.N. van de Lagemaat, and D.L. Mager. 2006. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS Genet*. 2:e2.
- Malik, H.S., and T.H. Eickbush. 2001. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res*. 11:1187-97.
- Malik, H.S., S. Henikoff, and T.H. Eickbush. 2000. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res*. 10:1307-18.

- Mang, R., J. Maas, X. Chen, J. Goudsmit, and A.C. van Der Kuyl. 2001. Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J Gen Virol.* 82:1829-34.
- Mang, R., J. Maas, A.C. van Der Kuyl, and J. Goudsmit. 2000. Papio cynocephalus endogenous retrovirus among old world monkeys: evidence for coevolution and ancient cross-species transmissions. *J Virol.* 74:1578-86.
- Marcucci, K.T., Y. Martina, F. Harrison, C.A. Wilson, and D.R. Salomon. 2008. Functional hierarchy of two L domains in porcine endogenous retrovirus (PERV) that influence release and infectivity. *Virology.* 375:637-45.
- Marin, I. 2012. Origin and diversification of TRIM ubiquitin ligases. *PLoS One.* 7:e50030.
- Massiah, M.A., B.N. Simmons, K.M. Short, and T.C. Cox. 2006. Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol.* 358:532-45.
- Masson, C., S. Bury-Mone, E. Guiot, A. Saez-Cirion, D. Schoevaert-Brossault, C. Brachet-Ducos, O. Delelis, F. Subra, L. Jeanson-Leh, and J.F. Mouscadet. 2007. Ku80 participates in the targeting of retroviral transgenes to the chromatin of CHO cells. *J Virol.* 81:7924-32.
- Matouskova, M., P. Vesely, P. Daniel, G. Mattiuzzo, R. Hector, L. Scobie, Y. Takeuchi, and J. Hejnar. 2013. The Role of DNA Methylation in Expression and Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus. *J Virol.* 87:12110-20.
- Matsui, T., D. Leung, H. Miyashita, I.A. Maksakova, H. Miyachi, H. Kimura, M. Tachibana, M.C. Lorincz, and Y. Shinkai. 2010. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature.* 464:927-31.
- Mattiuzzo, G., S. Ivól, and Y. Takeuchi. 2010. Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. *J Virol.* 84:2618-22.
- Mattiuzzo, G., M. Matouskova, and Y. Takeuchi. 2007. Differential resistance to cell entry by porcine endogenous retrovirus subgroup A in rodent species. *Retrovirology.* 4:93.
- Mazari, P.M., T. Argaw, L. Valdivieso, X. Zhang, K.T. Marcucci, D.R. Salomon, C.A. Wilson, and M.J. Roth. 2012. Comparison of the convergent receptor utilization of a retargeted feline leukemia virus envelope with a naturally-occurring porcine endogenous retrovirus A. *Virology.* 427:118-26.
- Mazurek, U., M.C. Kimsa, B. Strzalka-Mrozik, M.W. Kimsa, J. Adamska, D. Lipinski, J. Zeyland, M. Szalata, R. Slomski, J. Jura, Z. Smorag, R. Nowak, and J. Gola. 2013. Quantitative analysis of porcine endogenous retroviruses in different organs of transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Curr Microbiol.* 67:505-14.
- McDonald, D., M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, and T.J. Hope. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol.* 159:441-52.
- McNab, F.W., R. Rajsbaum, J.P. Stoye, and A. O'Garra. 2011. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol.* 23:46-56.
- Meisler, M.H., and C.N. Ting. 1993. The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4:503-9.
- Meroni, G., and G. Diez-Roux. 2005. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays.* 27:1147-57.
- Mi, S., X. Lee, X. Li, G.M. Veldman, H. Finnerty, L. Racie, E. LaVallie, X.Y. Tang, P. Edouard, S. Howes, J.C. Keith, Jr., and J.M. McCoy. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 403:785-9.
- Moalic, Y., H. Felix, Y. Takeuchi, A. Jestin, and Y. Blanchard. 2009. Genome areas with high gene density and CpG island neighborhood strongly attract porcine endogenous retrovirus for integration and favor the formation of hot spots. *J Virol.* 83:1920-9.
- Mukhopadhyay, D., and H. Riezman. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 315:201-5.
- Mura, M., P. Murcia, M. Caporale, T.E. Spencer, K. Nagashima, A. Rein, and M. Palmarini. 2004. Late viral interference induced by transdominant Gag of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11117-22.

- Nakayama, E.E., and T. Shioda. 2012. Role of Human TRIM5alpha in Intrinsic Immunity. *Front Microbiol.* 3:97.
- Napolitano, L.M., and G. Meroni. 2012. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life.* 64:64-71.
- Nascimento, F.F., J. Gongora, M. Charleston, M. Tristem, S. Lowden, and C. Moran. 2011. Evolution of endogenous retroviruses in the Suidae: evidence for different viral subpopulations in African and Eurasian host species. *BMC Evol Biol.* 11:139.
- Newman, R.M., L. Hall, M. Connole, G.L. Chen, S. Sato, E. Yuste, W. Diehl, E. Hunter, A. Kaur, G.M. Miller, and W.E. Johnson. 2006. Balancing selection and the evolution of functional polymorphism in Old World monkey TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:19134-9.
- Niebert, M., and R.R. Tonjes. 2005. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J Virol.* 79:649-54.
- Nienhuis, A.W., C.E. Dunbar, and B.P. Sorrentino. 2006. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther.* 13:1031-49.
- Nisole, S., and A. Saib. 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* 1:9.
- Nisole, S., J.P. Stoye, and A. Saib. 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol.* 3:799-808.
- Ohkura, S., and J.P. Stoye. 2013. A COMPARISON OF MURINE LEUKEMIA VIRUSES THAT ESCAPE FROM HUMAN AND RHESUS MACAQUE TRIM5alphas. *J Virol.* 87:6455-68.
- Okumura, F., Y. Matsunaga, Y. Katayama, K.I. Nakayama, and S. Hatakeyama. 2010. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J Cell Sci.* 123:2238-45.
- Oldmixon, B.A., J.C. Wood, T.A. Ericsson, C.A. Wilson, M.E. White-Scharf, G. Andersson, J.L. Greenstein, H.J. Schuurman, and C. Patience. 2002. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol.* 76:3045-8.
- Oliveira, N.M., H. Satija, I.A. Kouwenhoven, and M.V. Eiden. 2007. Changes in viral protein function that accompany retroviral endogenization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:17506-11.
- Oliver, K.R., and W.K. Greene. 2011. Mobile DNA and the TE-Thrust hypothesis: supporting evidence from the primates. *Mob DNA.* 2:8.
- Oshima, M., D. Muriaux, J. Mirro, K. Nagashima, K. Dryden, M. Yeager, and A. Rein. 2004. Effects of blocking individual maturation cleavages in murine leukemia virus gag. *J Virol.* 78:1411-20.
- Ozato, K., D.M. Shin, T.H. Chang, and H.C. Morse, 3rd. 2008. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 8:849-60.
- Paillart, J.C., M. Shehu-Xhilaga, R. Marquet, and J. Mak. 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol.* 2:461-72.
- Pal, N., R. Baker, S. Schalk, L. Scobie, A.W. Tucker, and T. Opriessnig. 2011. Detection of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Viremia in Diseased Versus Healthy US Pigs by Qualitative and Quantitative Real-Time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 58:344-51.
- Park, S.H., E.H. Bae, Y.J. Lee, K.J. Lee, J.H. Lim, S.R. Kim, E.Y. Kwon, and Y.T. Jung. 2010. The rapid production of high-titer porcine endogenous retrovirus(PERV)-B env pseudotype and construction of an EGFP-expressing replication competent PERV-A vector. *J Virol Methods.* 171:61-6.
- Passerini, L.D., Z. Keckesova, and G.J. Towers. 2006. Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5alpha act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription. *J Virol.* 80:2100-5.
- Patience, C., W.M. Switzer, Y. Takeuchi, D.J. Griffiths, M.E. Goward, W. Heneine, J.P. Stoye, and R.A. Weiss. 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol.* 75:2771-5.
- Pavlicek, A., J. Paces, D. Elleder, and J. Hejnar. 2002. Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution. *Genome Res.* 12:391-9.
- Pellett, P.E., D.V. Ablashi, P.F. Ambros, H. Agut, M.T. Caserta, V. Descamps, L. Flamand, A. Gautheret-Dejean, C.B. Hall, R.T. Kamble, U. Kuehl, D. Lassner, I. Lautenschlager, K.S. Loomis, M. Luppi,

- P. Lusso, P.G. Medveczky, J.G. Montoya, Y. Mori, M. Ogata, J.C. Pritchett, S. Rogez, E. Seto, K.N. Ward, T. Yoshikawa, and R.R. Razonable. 2012. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol.* 22:144-55.
- Perfettini, J.L., M. Castedo, T. Roumier, K. Andreau, R. Nardacci, M. Piacentini, and G. Kroemer. 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:916-23.
- Perron, M.J., M. Stremlau, B. Song, W. Ulm, R.C. Mulligan, and J. Sodroski. 2004. TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11827-32.
- Pertel, T., S. Hausmann, D. Morger, S. Zuger, J. Guerra, J. Lascano, C. Reinhard, F.A. Santoni, P.D. Uchil, L. Chatel, A. Bisiaux, M.L. Albert, C. Strambio-De-Castillia, W. Mothes, M. Pizzato, M.G. Grutter, and J. Luban. 2011. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature.* 472:361-5.
- Petit, C., M.L. Giron, J. Tobaly-Tapiero, P. Bittoun, E. Real, Y. Jacob, N. Tordo, H. De The, and A. Saib. 2003. Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci.* 116:3433-42.
- Pizzato, M. 2010. MLV glycosylated-Gag is an infectivity factor that rescues Nef-deficient HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:9364-9.
- Pizzato, M., S.A. Marlow, E.D. Blair, and Y. Takeuchi. 1999. Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol.* 73:8599-611.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.D. Minna, and R.C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7415-9.
- Pothlichet, J., T. Heidmann, and M. Mangeney. 2006. A recombinant endogenous retrovirus amplified in a mouse neuroblastoma is involved in tumor growth in vivo. *Int J Cancer.* 119:815-22.
- Qari, S.H., S. Magre, J.G. Garcia-Lerma, A.I. Hussain, Y. Takeuchi, C. Patience, R.A. Weiss, and W. Heneine. 2001. Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Virol.* 75:1048-53.
- Rajsbaum, R., J.P. Stoye, and A. O'Garra. 2008. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur J Immunol.* 38:619-30.
- Reymond, A., G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P.G. Pelicci, and A. Ballabio. 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20:2140-51.
- Rhodes, D.A., B. de Bono, and J. Trowsdale. 2005. Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology.* 116:411-7.
- Ribet, D., F. Harper, M. Dewannieux, G. Pierron, and T. Heidmann. 2007. Murine MusD Retrotransposon: Structure and Molecular Evolution of an "Intracellularized" Retrovirus. *J Virol.* 81:1888-98.
- Ribet, D., F. Harper, A. Dupressoir, M. Dewannieux, G. Pierron, and T. Heidmann. 2008a. An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus. *Genome Res.* 18:597-609.
- Ribet, D., F. Harper, C. Esnault, G. Pierron, and T. Heidmann. 2008b. The GLN family of murine endogenous retroviruses contains an element competent for infectious viral particle formation. *J Virol.* 82:4413-9.
- Ribet, D., and T. Heidmann. 2010. Formation et évolution des rétrovirus endogènes. *Virologie.* 14:141-50.
- Risco, C., L. Menendez-Arias, T.D. Copeland, P. Pinto da Silva, and S. Oroszlan. 1995. Intracellular transport of the murine leukemia virus during acute infection of NIH 3T3 cells: nuclear import of nucleocapsid protein and integrase. *J Cell Sci.* 108 (Pt 9):3039-50.
- Rodrigues, A.F., P.M. Alves, and A.S. Coroadinha. 2011. Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors : Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. InTech, Lisbonne. 10.5772/18615.

- Roe, T., T.C. Reynolds, G. Yu, and P.O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12:2099-108.
- Rosenberg, N., and P. Jolicoeur. 1997. Retroviral Pathogenesis. *In* Retroviruses. J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY). NBK19378.
- Roth, S.L., N. Malani, and F.D. Bushman. 2011. Gammaretroviral integration into nucleosomal target DNA in vivo. *J Virol.* 85:7393-401.
- Rous, P. 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med.* 13:397-411.
- Rowe, H.M., J. Jakobsson, D. Mesnard, J. Rougemont, S. Reynard, T. Aktas, P.V. Maillard, H. Layard-Liesching, S. Verp, J. Marquis, F. Spitz, D.B. Constam, and D. Trono. 2010. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature.* 463:237-40.
- Rowe, H.M., and D. Trono. 2011. Dynamic control of endogenous retroviruses during development. *Virology.* 411:273-87.
- Rybicki, E. 1990. The classification of organisms at the edge of life or problems with virus systematics. *South African Journal of Science.* 01/1990:182-186.
- Sacco, M.A., K. Howes, L.P. Smith, and V.K. Nair. 2004. Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leukosis virus subgroup J emergence and tolerance. *J Virol.* 78:10525-35.
- Sadler, A.J., and B.R. Williams. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 8:559-68.
- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-5.
- Sandrin, V., and F.L. Cosset. 2006. Intracellular versus cell surface assembly of retroviral pseudotypes is determined by the cellular localization of the viral glycoprotein, its capacity to interact with Gag, and the expression of the Nef protein. *J Biol Chem.* 281:528-42.
- Santoni, F.A., O. Hartley, and J. Luban. 2010. Deciphering the code for retroviral integration target site selection. *PLoS Comput Biol.* 6:e1001008.
- Saraiva Raposo, R.A., M. Abdel-Mohsen, M. Bilska, D. Montefiori, D.F. Nixon, and S.K. Pillai. 2013. Effects of Cellular Activation on Anti-HIV-1 Restriction Factor Expression Profile in Primary Cells. *J Virol.* 87:11924-9.
- Sardiello, M., S. Cairo, B. Fontanella, A. Ballabio, and G. Meroni. 2008. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol Biol.* 8:225.
- Sauter, D., A. Specht, and F. Kirchhoff. 2010. Tetherin: holding on and letting go. *Cell.* 141:392-8.
- Sawyer, S.L., M. Emerman, and H.S. Malik. 2007. Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals. *PLoS Pathog.* 3:e197.
- Sayah, D.M., and J. Luban. 2004. Selection for loss of Ref1 activity in human cells releases human immunodeficiency virus type 1 from cyclophilin A dependence during infection. *J Virol.* 78:12066-70.
- Sayah, D.M., E. Sokolskaja, L. Berthoux, and J. Luban. 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature.* 430:569-73.
- Scheef, G., N. Fischer, E. Flory, I. Schmitt, and R.R. Tonjes. 2002. Transcriptional Regulation of Porcine Endogenous Retroviruses Released from Porcine and Infected Human Cells by Heterotrimeric Protein Complex NF-Y and Impact of Immunosuppressive Drugs. *J Virol.* 76:12553-63.
- Scheef, G., N. Fischer, U. Krach, and R.R. Tonjes. 2001. The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J Virol.* 75:6933-40.

- Schoggins, J.W., and C.M. Rice. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 1:519-25.
- Shen, Y., N.L. Li, J. Wang, B. Liu, S. Lester, and K. Li. 2012. TRIM56 is an Essential Component of the TLR3 Antiviral Signaling Pathway. *J Biol Chem.* 287:36404-13.
- Shi, Y., R.A. Mowery, J. Ashley, M. Hentz, A.J. Ramirez, B. Bilgicer, H. Slunt-Brown, D.R. Borchelt, and B.F. Shaw. 2012. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Sci.* 21:1197-209.
- Short, K.M., and T.C. Cox. 2006. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem.* 281:8970-80.
- Si, Z., N. Vandegraaff, C. O'Huigin, B. Song, W. Yuan, C. Xu, M. Perron, X. Li, W.A. Marasco, A. Engelman, M. Dean, and J. Sodroski. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7454-9.
- Simmons, G., P. Young, J. Hanger, K. Jones, D. Clarke, J. McKee, and J. Meers. 2012. Prevalence of koala retrovirus in geographically diverse populations in Australia. *Aust Vet J.* 90:404-9.
- Sjöstrand, M., S. Brauner, M. Kvarnström, M. Wahren-Herlenius, and A. Espinosa. 2012. TRIM genes are part of the interferon signature observed in patients with primary Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 71:A1-A93.
- Song, B., H. Javanbakht, M. Perron, H. Park do, M. Stremlau, and J. Sodroski. 2005. Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from old world and new world primates. *J Virol.* 79:3930-7.
- Spencer, T.E., M. Mura, C.A. Gray, P.J. Griebel, and M. Palmarini. 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. *J Virol.* 77:749-53.
- Spencer, T.E., and M. Palmarini. 2012. Endogenous retroviruses of sheep: a model system for understanding physiological adaptation to an evolving ruminant genome. *J Reprod Dev.* 58:33-7.
- Stavrou, S., T. Nitta, S. Kotla, D. Ha, K. Nagashima, A.R. Rein, H. Fan, and S.R. Ross. 2013. Murine leukemia virus glycosylated Gag blocks apolipoprotein B editing complex 3 and cytosolic sensor access to the reverse transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:9078-83.
- Stephan, O., J. Schwendemann, V. Specke, S.J. Tacke, K. Boller, and J. Denner. 2001. Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation.* 8:310-6.
- Stevens, A., M. Bock, S. Ellis, P. LeTissier, K.N. Bishop, M.W. Yap, W. Taylor, and J.P. Stoye. 2004. Retroviral capsid determinants of Fv1 NB and NR tropism. *J Virol.* 78:9592-8.
- Stoye, J.P. 2001. Endogenous retroviruses: still active after all these years? *Curr Biol.* 11:R914-6.
- Stoye, J.P. 2012. Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nat Rev Microbiol.* 10:395-406.
- Stoye, J.P., and J.M. Coffin. 1987. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J Virol.* 61:2659-69.
- Streich, F.C., Jr., V.P. Ronchi, J.P. Connick, and A.L. Haas. 2013. Tripartite motif ligases catalyze polyubiquitin chain formation through a cooperative allosteric mechanism. *J Biol Chem.* 288:8209-21.
- Stremlau, M., C.M. Owens, M.J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature.* 427:848-53.
- Subramanian, R.P., J.H. Wildschutte, C. Russo, and J.M. Coffin. 2011. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology.* 8:90.
- Suling, K., G. Quinn, J. Wood, and C. Patience. 2003. Packaging of human endogenous retrovirus sequences is undetectable in porcine endogenous retrovirus particles produced from human cells. *Virology.* 312:330-6.

- Summa, V., A. Petrocchi, F. Bonelli, B. Crescenzi, M. Donghi, M. Ferrara, F. Fiore, C. Gardelli, O. Gonzalez Paz, D.J. Hazuda, P. Jones, O. Kinzel, R. Laufer, E. Monteagudo, E. Muraglia, E. Nizi, F. Orvieto, P. Pace, G. Pescatore, R. Scarpelli, K. Stillmock, M.V. Witmer, and M. Rowley. 2008. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J Med Chem.* 51:5843-55.
- Sun, C., H. Skaletsky, S. Rozen, J. Gromoll, E. Nieschlag, R. Oates, and D.C. Page. 2000. Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet.* 9:2291-6.
- Suzuka, I., K. Sekiguchi, and M. Kodama. 1985. Some characteristics of a porcine retrovirus from a cell line derived from swine malignant lymphomas. *FEBS Lett.* 183:124-8.
- Suzuka, I., N. Shimizu, K. Sekiguchi, H. Hoshino, M. Kodama, and K. Shimotohno. 1986. Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus. *FEBS Lett.* 198:339-43.
- Sze, A., D. Olganier, R. Lin, J. van Grevenynghe, and J. Hiscott. 2013. SAMHD1 Host Restriction Factor: A Link with Innate Immune Sensing of Retrovirus Infection. *J Mol Biol.* 425:4981-94.
- Takeda, A., and T. Matano. 2007. Inhibition of infectious murine leukemia virus production by Fv-4 env gene products exerting dominant negative effect on viral envelope glycoprotein. *Microbes Infect.* 9:1590-6.
- Takeuchi, H., and T. Matano. 2008. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol.* 52:318-25.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140:805-20.
- Takeuchi, Y., C. Patience, S. Magre, R.A. Weiss, P.T. Banerjee, P. Le Tissier, and J.P. Stoye. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol.* 72:9986-91.
- Tao, H., B.N. Simmons, S. Singireddy, M. Jakkidi, K.M. Short, T.C. Cox, and M.A. Massiah. 2008. Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent of intermolecular ring heterodimers. *Biochemistry.* 47:2450-7.
- Tarlinton, R., J. Meers, and P. Young. 2008. Biology and evolution of the endogenous koala retrovirus. *Cell Mol Life Sci.* 65:3413-21.
- Tarlinton, R.E., J. Meers, and P.R. Young. 2006. Retroviral invasion of the koala genome. *Nature.* 442:79-81.
- Temin, H.M. 1963. The Effects of Actinomycin D on Growth of Rous Sarcoma Virus in Vitro. *Virology.* 20:577-82.
- Temin, H.M. 1964. The Participation of DNA in Rous Sarcoma Virus Production. *Virology.* 23:486-94.
- Temin, H.M. 1989. Reverse transcriptases. Retrons in bacteria. *Nature.* 339:254-5.
- Temin, H.M., and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 226:1211-3.
- Ting, C.N., M.P. Rosenberg, C.M. Snow, L.C. Samuelson, and M.H. Meisler. 1992. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 6:1457-65.
- Tomar, D., L. Sripada, P. Prajapati, R. Singh, and A.K. Singh. 2012. Nucleo-cytoplasmic trafficking of TRIM8, a novel oncogene, is involved in positive regulation of TNF induced NF-kappaB pathway. *PLoS One.* 7:e48662.
- Toniato, E., X.P. Chen, J. Losman, V. Flati, L. Donahue, and P. Rothman. 2002. TRIM8/GERP RING finger protein interacts with SOCS-1. *J Biol Chem.* 277:37315-22.
- Torrent, C., T. Bordet, and J.L. Darlix. 1994. Analytical study of rat retrotransposon VL30 RNA dimerization in vitro and packaging in murine leukemia virus. *J Mol Biol.* 240:434-44.
- Trockenbacher, A., V. Suckow, J. Foerster, J. Winter, S. Krauss, H.H. Ropers, R. Schneider, and S. Schweiger. 2001. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet.* 29:287-94.
- Turner, G., M. Barbulescu, M. Su, M.I. Jensen-Seaman, K.K. Kidd, and J. Lenz. 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol.* 11:1531-5.

- Uchil, P.D., A. Hinz, S. Siegel, A. Coenen-Stass, T. Pertel, J. Luban, and W. Mothes. 2013. TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *J Virol.* 87:257-72.
- Uchil, P.D., B.D. Quinlan, W.T. Chan, J.M. Luna, and W. Mothes. 2008. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog.* 4:e16.
- Uenishi, H., T. Eguchi-Ogawa, H. Shinkai, N. Okumura, K. Suzuki, D. Toki, N. Hamasima, and T. Awata. 2007. PEDE (Pig EST Data Explorer) has been expanded into Pig Expression Data Explorer, including 10 147 porcine full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 35:D650-3.
- Urano, T., T. Usui, S. Takeda, K. Ikeda, A. Okada, Y. Ishida, T. Iwayanagi, J. Otomo, Y. Ouchi, and S. Inoue. 2009. TRIM44 interacts with and stabilizes terf, a TRIM ubiquitin E3 ligase. *Biochem Biophys Res Commun.* 383:263-8.
- Valente, S.T., G.M. Gilmartin, C. Mott, B. Falkard, and S.P. Goff. 2009a. Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:4071-8.
- Valente, S.T., G.M. Gilmartin, K. Venkatarama, G. Arriagada, and S.P. Goff. 2009b. HIV-1 mRNA 3' end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. *Mol Cell.* 36:279-89.
- Valente, S.T., and S.P. Goff. 2006. Inhibition of HIV-1 gene expression by a fragment of hnRNP U. *Mol Cell.* 23:597-605.
- Valente, S.T., and S.P. Goff. 2009. Somatic cell genetic analyses to identify HIV-1 host restriction factors. *Methods Mol Biol.* 485:235-55.
- van de Lagemaat, L.N., P. Medstrand, and D.L. Mager. 2006. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns. *Genome Biol.* 7:R86.
- van Wijk, S.J., and H.T. Timmers. 2010. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* 24:981-93.
- Varmus, H.E. 1989. Retroviruses and oncogenes I. *Nobel lecture.*
- Weiss, R.A. 2013. On the concept and elucidation of endogenous retroviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368:20120494.
- Weiss, R.A., R.R. Friis, E. Katz, and P.K. Vogt. 1971. Induction of avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens. *Virology.* 46:920-38.
- Weiss, R.A., W.S. Mason, and P.K. Vogt. 1973. Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumor viruses. *Virology.* 52:535-52.
- Weiss, R.A., and J.P. Stoye. 2013. Virology. Our viral inheritance. *Science.* 340:820-1.
- Wertz, I.E., and V.M. Dixit. 2010. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a003350.
- Wilkinson, K.A., and J.M. Henley. 2010. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 428:133-45.
- Wilson, C.A., S. Laeeq, A. Ritzhaupt, W. Colon-Moran, and F.K. Yoshimura. 2003. Sequence Analysis of Porcine Endogenous Retrovirus Long Terminal Repeats and Identification of Transcriptional Regulatory Regions. *J Virol.* 77:142-149.
- Wilson, C.A., S. Wong, J. Muller, C.E. Davidson, T.M. Rose, and P. Burd. 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol.* 72:3082-7.
- Wilson, C.A., S. Wong, M. VanBrocklin, and M.J. Federspiel. 2000. Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol.* 74:49-56.
- Wolf, D., and S.P. Goff. 2008. Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annu Rev Genet.* 42:143-63.
- Wolf, D., and S.P. Goff. 2009. Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature.* 458:1201-4.
- Wolf, D., K. Hug, and S.P. Goff. 2008. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of Lys1,2 tRNA-utilizing retroviruses in embryonic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:12521-6.
- Wolf, G., A.L. Nielsen, J.G. Mikkelsen, and F.S. Pedersen. 2013. Epigenetic marking and repression of porcine endogenous retroviruses. *J Gen Virol.* 94:960-70.

- Wood, A., B.L. Webb, B. Bartosch, T. Schaller, Y. Takeuchi, and G.J. Towers. 2009. Porcine endogenous retroviruses PERV A and A/C recombinant are insensitive to a range of divergent mammalian TRIM5{alpha} proteins including human TRIM5{alpha}. *J Gen Virol.* 90:702-9.
- Xue, Q., Z. Zhou, X. Lei, X. Liu, B. He, J. Wang, and T. Hung. 2012. TRIM38 negatively regulates TLR3-mediated IFN-beta signaling by targeting TRIF for degradation. *PLoS One.* 7:e46825.
- Yamamoto, N., and S. Takase-Yoden. 2009. Analysis of cis-regulatory elements in the 5' untranslated region of murine leukemia virus controlling protein expression. *Microbiol Immunol.* 53:140-8.
- Yan, N., and Z.J. Chen. 2012. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol.* 13:214-22.
- Yang, B., J. Wang, Y. Wang, H. Zhou, X. Wu, Z. Tian, and B. Sun. 2013. Novel Function of Trim44 Promotes an Antiviral Response by Stabilizing VISA. *J Immunol.* 190:3613-9.
- Yang, F., O. Leon, N.J. Greenfield, and M.J. Roth. 1999. Functional interactions of the HHCC domain of moloney murine leukemia virus integrase revealed by nonoverlapping complementation and zinc-dependent dimerization. *J Virol.* 73:1809-17.
- Yap, M.W., and J.P. Stoye. 2013. Apparent effect of rabbit endogenous lentivirus type K acquisition on retrovirus restriction by lagomorph Trim5alphas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368:20120498.
- Young, G.R., U. Eksmond, R. Salcedo, L. Alexopoulou, J.P. Stoye, and G. Kassiotis. 2012. Resurrection of endogenous retroviruses in antibody-deficient mice. *Nature.* 491:774-8.
- Yuan, B., S. Campbell, E. Bacharach, A. Rein, and S.P. Goff. 2000. Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J Virol.* 74:7250-60.
- Zha, J., K.J. Han, L.G. Xu, W. He, Q. Zhou, D. Chen, Z. Zhai, and H.B. Shu. 2006. The Ret finger protein inhibits signaling mediated by the noncanonical and canonical I{kappa}B kinase family members. *J Immunol.* 176:1072-80.
- Zhang, F., T. Zang, S.J. Wilson, M.C. Johnson, and P.D. Bieniasz. 2011. Clathrin facilitates the morphogenesis of retrovirus particles. *PLoS Pathog.* 7:e1002119.
- Zheng, Y.H., K.T. Jeang, and K. Tokunaga. 2012. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology.* 9:112.
- Zhu, Y., and G. Gao. 2008. ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA Biol.* 5:65-7.
- Zou, W., J. Wang, and D.E. Zhang. 2007. Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 354:321-7.
- Zurek, B., I. Schoultz, A. Neerincx, L.M. Napolitano, K. Birkner, E. Bennek, G. Sellge, M. Lerm, G. Meroni, J.D. Soderholm, and T.A. Kufer. 2012. TRIM27 negatively regulates NOD2 by ubiquitination and proteasomal degradation. *PLoS One.* 7:e41255.

Annexes

Annexe I : Lettre d'acceptation d'utilisation d'OGM



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE



Direction générale pour la
recherche et l'innovation

Fait à Paris, le **26 07 10**

DECISION D'AGREMENT

La ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche,

Vu le code de l'environnement, notamment les chapitres Ier et II du titre III du livre V ;

Vu l'arrêté du 27 décembre 1994 relatif au dossier de demande d'agrément prévu au titre Ier du décret n° 93-773 du 27 mars 1993 ;

Vu le dossier de demande d'agrément déposé par l'AFSSA (**Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments**), exploitant représenté par Monsieur Gilles SALVAT et le directeur scientifique du projet, Monsieur **André JESTIN**, conformément à l'arrêté du 27 décembre 1994, et enregistré sous le n° **5556** ;

Vu l'avis du Haut Conseil des biotechnologies en date du **6 juillet 2010** ;

Décide :

Article 1

L'agrément de groupe II est accordé à l'utilisation comprenant les projets suivants pour une durée maximale de **5 ans**, à compter de la présente décision.

L'utilisation d'OGM mentionnée dans le dossier de demande d'agrément susmentionné fait l'objet du classement suivant :

Projet 1 : Etude *in vitro* des interactions d'un rétrovirus endogène avec son hôte: le rétrovirus endogène porcin

Classement de ce projet tel que décrit

Classe 2 – groupe II – confinement L3 puis L2

Notes :

Il est rappelé que le confinement L2 doit être conforme aux normes décrites dans l'arrêté du 16 juillet 2007 (code du travail).

Pour les installations assurant un confinement L3 l'exploitant doit établir un plan d'urgence (décret 2006-1346 du 7 novembre 2006, article 5).

sous réserve générale du respect des prescriptions générales en vigueur : dans le guide "Principes de classement et guides officiels de la Commission de génie génétique" et mises à jour, ainsi que les normes AFNOR en vigueur.

Article 2

Tout nouveau projet présentant une cohérence thématique avec l'utilisation agréée mentionnée à l'article 1 ci-dessus ainsi que toute mise en oeuvre d'un nouvel ensemble d'organismes génétiquement modifiés de même niveau de risque et nécessitant les mêmes prescriptions de confinement, caractérisé par un ensemble d'hôtes et/ou vecteurs et/ou inserts définis et décrits dans des projets de l'utilisation agréée mentionnée à l'article 1 doivent être portés à la connaissance du Haut Conseil des biotechnologies.

Pour la Ministre et par délégation
l'adjoint au directeur général pour la
recherche et l'innovation
Jean-Richard CYTERMANN

AFSSA
Laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Monsieur André JESTIN
Laboratoire d'étude et de recherche avicole, porcine et piscicole
41 rue de Beaucemaine
22440 PLOUFRAGAN



Vous avez la possibilité de contester la décision par deux voies distinctes :

- Un recours administratif exercé dans le délai de deux mois à compter de la réception de cette décision auprès de la ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche.
- Un recours contentieux exercé dans le délai de deux mois de cette décision ou à compter du rejet de votre recours administratif, auprès du tribunal administratif de Paris.

Annexe II : Plan Management Qualité



Plan de Management Qualité de Thèse

Antonin Demange

«Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc »

Anses – Laboratoire de PLOUFRAGAN-PLOUZANE
Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicole, Porcine et Piscicole
Unité Génétique Virale et Biosécurité (U GVB)

Directeur de thèse : **A. JESTIN**

Co-Directeur de thèse :

Y. Blanchard

Rév 01

Chef de Projet : **Y. Blanchard**

Date d'application :

Rédigé par : A.Demange Date : Visa :	Approuvé par : Y. Blanchard Date : Visa :	Validé par : M. Morin Date : Visa :
--	---	---

SOMMAIRE

I. Introduction	196
II. Le champ du plan qualité.....	196
III. La politique de management qualité du laboratoire et de l'unité	197
IV. Les acteurs du projet.....	197
V. La conduite du projet.....	199
VI. La gestion des ressources	202
VII. La gestion des écarts	204
VIII. La communication	205
ANNEXE 1 : Organigramme de thèse.....	207
ANNEXE 2 : Fiche de projet de thèse rév. 01	208
ANNEXE 3 : Listing de points critiques du projet de thèse de AD.....	212
ANNEXE 4 : Répartition des micropipettes et des manipulations dans les différentes salles de l'unité GVB.....	213

Introduction

L'assurance qualité est définie comme une partie du management visant à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites (norme ISO9000 version 2005).

L'assurance qualité permet de garantir au client que ces exigences sont respectées à tous les stades d'un processus.

La politique de management qualité de l'Anses, définie le 1^{er} Juillet 2010 par le directeur général, établit la finalité et les enjeux poursuivis par l'Anses en pérennisant l'ensemble de la démarche ainsi engagée. La politique de management qualité s'étend aujourd'hui aux thèses de doctorat, projets à part entière. Ainsi, depuis la décision prise à la revue de direction de février 2005, un plan management qualité est défini et appliqué pour chacun des projets de thèse réalisés sur le site de Ploufragan de l'ANSES.

Le présent document est le plan management qualité (PMQ) du projet de thèse intitulé: " Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc ". Ce projet a été défini par le directeur et le co-directeur de thèse, et sera réalisé et clôturé par moi-même. La gestion de ce projet sous assurance qualité permettra de s'assurer de son bon déroulement par la planification, l'organisation, le suivi, la maîtrise et les rapports des différents aspects du projet.

Le management qualité de ce projet de thèse s'appuiera sur les normes suivantes:

- ✓ ISO 10006: "Système de management de la qualité – Lignes directrices pour le management de la qualité des projets" pour l'établissement et la mise en œuvre du plan management qualité,
- ✓ ISO 17025: "Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais" pour la gestion des ressources.

Mots clés : confiance, traçabilité, gestion des écarts, révision.

Le champ du plan qualité

Ce plan management qualité englobe la totalité du projet de la thèse, qui se compose de trois parties :

- ✓ L'élaboration du projet scientifique,
- ✓ La conduite scientifique du projet,
- ✓ La valorisation des résultats obtenus et la clôture du projet.

Le plan management qualité concerne l'Unité de Génétique Virale et Biosécurité, laboratoire d'accueil pour la réalisation du projet, ayant un système de management qualité presque complet,

ainsi que tous les autres collaborateurs du site même de l'Anses et/ou de l'extérieur, inscrits dans une démarche qualité.

La politique de management qualité du laboratoire et de l'unité

La déclaration de politique qualité du directeur de l'Anses du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané confirme celle du directeur général, réaffirmant la volonté de formaliser les projets. Un Service de Management Qualité, le SMQ, s'est donc impliqué dans la démarche de management qualité en recherche afin de suivre ces engagements.

Le SMQ, en lien étroit avec le directeur du site et le COFRAC ou Comité Français d'ACcréditation, s'assure de la bonne application et du suivi de la politique de management qualité dans les unités et services. Il est composé de:

- ✓ Un responsable qualité,
- ✓ Un responsable qualité adjoint,
- ✓ Un responsable métrologie,
- ✓ Une secrétaire.

D'autre part, le Laboratoire de Ploufragan-Plouzané est composée de neuf Unités de Recherche et d'Appui Scientifique et Technique, dont 5 déjà accréditées par le COFRAC :

- ✓ Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (UHQ PAP),
- ✓ Virologie, Immunologie, Parasitologies Aviaires et Cunicoles (UVIPAC),
- ✓ Virologie, Immunologie Porcine (UVIP),
- ✓ Mycoplasmologie, Bactériologie (UMB),
- ✓ Pathologie Virale des Poissons (UPVP à Plouzané).

Afin d'assurer la fiabilité, la rigueur et la reconnaissance de ses travaux et résultats, l'Unité de Génétique Virale et Biosécurité ou UGVB s'est engagée dans la démarche qualité dès 2004. Pour cela, le chef d'unité a nommé un correspondant qualité afin d'élaborer et de réviser le Plan Qualité de l'unité ainsi que les procédures et modes opératoires spécifiques au fonctionnement de l'unité. La conduite de cette thèse sous assurance qualité fait partie intégrante de la démarche qualité développée par l'unité, se référant à son Plan Qualité ainsi qu'à certaines procédures et modes opératoires qui s'y rattachent.

Les documents qualité de l'unité et du projet de thèse sont inclus dans le système documentaire géré au sein du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané.

Les acteurs du projet

Il convient d'énumérer les acteurs du projet et de définir leur rôle respectif dans ce plan management qualité de thèse.

Le projet de thèse qui va être réalisé pendant ces trois prochaines années (2010-2012) est une thèse réalisée en co-tutelle. Le directeur et co-directeur de thèse encadrent le doctorant avec des rôles complémentaires.

Les relations entre les différents acteurs du projet sont définies dans l'organigramme de thèse (Annexe 1).

Le directeur de thèse

Le directeur de thèse est le chef de l'unité de Génétique Virale et Biosécurité, André Jestin. Son rôle de directeur de thèse est de s'assurer du bon déroulement de l'apprentissage du doctorant par la recherche et d'apprécier régulièrement la qualité des travaux conduits.

Le chef de projet

Le co-directeur de thèse, Yannick Blanchard, a le rôle de chef de projet. D'après la norme ISO10006, un chef de projet est une personne qui a des responsabilités et une autorité définies pour diriger le projet et assurer que le système de management de la qualité du projet est établi, mis en œuvre et entretenu.

Le comité de pilotage

- ✓ Mme Isabelle Le Huërou-Luron, tuteur désigné par le directeur de l'école doctorale Vie Agro Santé. Originaire du laboratoire de l'INRA-UMR 1079 SENAH à St Gilles
- ✓ Pr Jean Luc Darlix, Unité de Virologie Humaine INSERM 758, IFR 128, ENS de Lyon.
- ✓ Dr. Denis milan (pressenti)
- ✓ Dr André jestin (directeur de thèse)
- ✓ Dr Yannick Blanchard (chef de projet)

Le comité de thèse assure une analyse critique de l'avancée du projet et conseillera le directeur, le co-directeur de thèse et le doctorant sur la suite du projet. Le tuteur est un scientifique de l'école doctorale VAS de Rennes. Il est chargé de s'assurer du bon déroulement de la thèse, de faire le lien avec l'école doctorale et de guider le doctorant dans son parcours professionnel.

Le doctorant

Le doctorant, moi-même, a été recruté pour effectuer les activités liées à ce projet de thèse. Au départ, le doctorant va suivre les orientations et consignes de son directeur et de son co-directeur. Puis adoptera une position critique (au sens du débat constructif) et commencera à acquérir son indépendance pour devenir un chercheur opérationnel et autonome à la fin de sa thèse.

D'autre part, le doctorant s'engage à suivre certains enseignements, conférences et séminaires de l'école doctorale VAS en tant que formation, décrits par la Charte des thèses.

De plus, l'Anses s'engage, dans la limite de ses moyens financiers et priorités, à permettre au doctorant de suivre des formations dans le cadre du projet. Pour cela, le doctorant remplit une fiche de vœux qui permettra d'élaborer le programme de formation de l'année suivante.

Les ressources humaines du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

La norme ISO9000 et le troisième principe du management qualité définissent ainsi le rôle du personnel :

“Le personnel à tous les niveaux constitue l'essence même d'une organisation et une totale implication de leur part permet d'utiliser leurs aptitudes au profit de l'organisme.”

Le personnel du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, que ce soit celui de l'unité GVB ou de l'unité VIPAC, est sensibilisé à l'assurance qualité et reconnu compétent dans leurs activités.

Comme les doctorants, les agents remplissent tous les ans une fiche de formation. Une fiche personnelle, co-signée par l'intéressé et son supérieur hiérarchique, décrit les responsabilités et compétences de chacun, et est renseignée et actualisée régulièrement. Ceci implique chacun des agents dans le système qualité de l'unité.

Enfin, le directeur de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané a nommé Michel Morin responsable qualité, afin d'aider à la formalisation du plan de management qualité de la thèse et de vérifier l'application de ses dispositions.

Il est secondé au sein même de l'unité par une correspondante qualité, Hélène QUENAULT, ainsi que par un correspondant métrologie, Lionel BIGAULT, afin de veiller au respect des dispositions prises.

La conduite du projet

Un projet formalisé

Le projet scientifique est formalisé selon la fiche de définition de projet intitulé “Fiche de projet de thèse de Antonin Demange: Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc.”

L'objectif du projet est d'étudier les facteurs de la restriction rétrovirale du PERV chez le porc. Les facteurs précisément étudiés concernant la famille protéique des TRIM (TRIPartite Motif) porcine. Cette étude nécessite une étape de récupération de ces facteurs dans le génome du porc suivie d'une analyse précise de leurs effets à l'aide d'outils construits à partir du PERV A14/220 fourni par Y.Takeuchi.

Un planning pour définir les différentes phases du projet et leurs durées a été mis en place. Il s'appuie sur les étapes établies et est joint à la fiche de projet de thèse (Annexe 2).

Les trois étapes établies et révisables si besoin au cours du projet sont les suivantes :

1. Construction d'outils de mesure de l'infection PERV,
2. Mise en évidence d'une restriction à l'infection PERV
3. Caractérisation des mécanismes de restriction à l'infection PERV.

La documentation spécifique et technique du projet est disponible au laboratoire pour l'ensemble des acteurs du projet.

Les différentes méthodes utilisées au cours du projet, standardisées ou non, sont consignées dans les cahiers de laboratoire spécifiques au projet, cf. paragraphe V.c.

Des étapes de revues

Le planning de déroulement de la thèse, le contenu et/ou les objectifs scientifiques ainsi que le plan management qualité sont révisables si nécessaire. Le doctorant est source de propositions d'évolution du projet et ce rôle doit s'affirmer par des étapes de révision au cours de l'avancement de la thèse.

Deux étapes de révisions sont envisagées :

- ✓ Les audits internes de la thèse, à un an et deux ans après le début de cette thèse, permettront d'évaluer le respect des dispositions décrites dans le Plan Management Qualité. Si un écart existe avec ces dispositions, le projet pourra être révisé.
- ✓ Comme décrit dans le paragraphe VIII, les réunions de travail pourront donner lieu à des révisions du projet.

Des étapes de revues sont aussi déterminées au début du projet (Annexe 2) afin de discuter de l'avancement du projet et des directions à prendre concernant chaque étape du planning. Ces revus sont réalisées à la fin de chaque étapes scientifiques du projet et/ou au cours de deux réunions avec le comité de pilotage de thèse. A l'issue de chaque comité un compte-rendu sera réalisé par le doctorant. Il sera ensuite diffusé à chacun des acteurs et archivé.

Les propositions de modifications faites par le doctorant sont discutées avec le chef de projet et le directeur de thèse et vice-versa. En dernière instance, le chef de projet et le directeur de thèse se consultent et décident des modifications à apporter au projet. En cas de désaccord persistant, le comité de pilotage arbitrera la décision.

Traçabilité

La traçabilité des différents travaux réalisés tout au long du projet est assurée par le cahier de laboratoire tenu quotidiennement par le doctorant et est propriété de l'unité. Le cahier de laboratoire contient :

- ✓ Date et intitulé des travaux,
- ✓ Description précise des travaux, au fur et à mesure de leur avancement,
- ✓ Numéros de lots des consommables critiques, cf. paragraphe VI,
- ✓ Toute nouvelle hypothèse de travail,
- ✓ Interprétations, critiques et commentaires sur les manipulations effectuées et sur les résultats obtenus,
- ✓ Réflexions visant à modifier les manipulations et/ou à améliorer les résultats constatés,
- ✓ Référencement des documents associés qui ne peuvent être intégrés au cahier comme les données informatiques,
- ✓ Compte-rendus concis des réunions avec le co-directeur et/ou le directeur. La prise de note pendant toutes les réunions est réalisée sur un cahier de réunion personnel.

D'autre part, toutes les données sont enregistrées, dans la mesure du possible, dans une version informatique. Ainsi les informations sur les différentes constructions nucléotidiques, les oligonucléotides commandés et les produits PCR liés à la construction des plasmides du projet sont sauvegardés et référencés grâce au logiciel VNTI (chemin d'accès sur le réseau Anses Ploufragan: N:\VNTI Database Archives\).

Les documents informatiques obtenus lors de l'utilisation du microscope à fluorescence, de l'appareil de PCR quantitative, du lecteur de microplaques, du séquenceur et du système d'acquisition de gel d'électrophorèse sont archivés sous p:\Thèse PERV\RESULTATS\.

Les variables matériels, locaux et consommables sont maîtrisées, cf. paragraphe VI. Les équipements sont spécifiques d'une salle dont l'emplacement est spécifié dans le plan qualité de l'unité. Ainsi il n'est pas nécessaire d'indiquer le numéro d'inventaire de l'équipement utilisé sauf en cas de changement.

Dans le cas des micropipettes, elles sont présentes en un exemplaire unique par salle commune. Les micropipettes utilisées dans les pièces F06202, F06203, F06204 et F06205 sont répertoriées sur un plan de l'unité et ce document est associé au Plan Management Qualité en Annexe 4.

Revue du système management qualité

D'après la norme ISO/CEI 17000 de 2004, un audit est un processus systématique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des enregistrements, des énoncés de faits ou d'autres informations pertinentes, et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure les exigences sont respectées.

Un audit interne sur les engagements du présent Plan Management Qualité est réalisé par le Responsable Qualité. Cet audit réalisé selon la procédure du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, aura lieu après un an de travail, puis un second à l'issue de la deuxième année. Il est destiné à examiner les processus de management en lien avec les acteurs, vérifier leur efficacité et rechercher des améliorations potentielles. Il donne lieu à un rapport d'audit, communiqué aux membres du comité de thèse.

Contrôle pour la qualité du résultat final.

Le management de projet est destiné à obtenir des résultats fiables par le souci permanent de la qualité des résultats indiquée tout au long des processus par des témoins de contrôles. Ces derniers peuvent être négatifs et/ou positifs.

Processus de management des risques

D'après la norme ISO10006, le terme risque considère, comme le terme incertitude, les aspects tant positifs que négatifs.

La notion de point critique prend en compte les incertitudes, qu'elles soient scientifiques et/ou techniques, qui pourraient être rencontrées lors des étapes de validation d'une hypothèse scientifique.

Dans notre cas, la notion de point critique est spécifiquement appliquée au projet scientifique de la thèse.

Des points critiques ont été préalablement identifiés lors de la création du projet de recherche scientifique, cf. fiche de projet de thèse rév. 01 (Annexe 2). Des actions préventives adaptées ont été proposées.

Chaque nouveau point critique constaté est consigné dans une fiche de point critique donnant lieu à des actions curatives, correctives et/ou préventives, et récapitulant les intervenants impliqués et les éléments mis en jeu pour pallier ce point critique.

Un listing des points critiques sera établi, lorsque de nouveaux points critiques seront rencontrés (Annexe 3). Il sera classé avec les fiches de point critique et une copie sera jointe en annexe de la fiche de projet de recherche de thèse.

De plus, s'il s'avère qu'un point critique ne puisse être résolu, ceci pourra conduire à une revue du projet de thèse et à une réorientation du projet selon les besoins.

Ce dispositif permettra ainsi de suivre l'évolution du projet.

La clôture du projet

Lors de la clôture du projet, il sera entrepris une revue complète des résultats de celui-ci. Les différents acteurs du projet interviendront pour prendre en compte les enregistrements pertinents. Dans notre cas, le projet se clôture par la rédaction du manuscrit de thèse et par la soutenance devant un jury amené à valider les résultats et le manuscrit. Un bilan du management qualité de la thèse sera rédigé pour les membres du jury par le responsable qualité.

Les enregistrements préparés à partir de cette revue permettront de faire ressortir les expériences susceptibles d'être réutilisées pour d'autres projets et pour l'amélioration continue.

La gestion des ressources

Les équipements

Les équipements de l'unité sont gérés selon le plan qualité de l'unité en référence à la norme ISO 17025. L'inventaire et le suivi des équipements sont formalisés par une gestion planifiée et maîtrisée. Cette gestion comprend un inventaire, une identification, un dossier de vie et un responsable de matériel. La procédure P.PQ9.MAT.G1 détaille les dispositions spécifiques de la gestion des équipements dans l'unité GVB qui sont appliquées en complément des dispositions communes à l'Anses Ploufragan/Plouzané.

La fonction métrologie a pour but de maîtriser en permanence l'aptitude à l'emploi des moyens de mesure ou d'essais du laboratoire.

L'unité GVB a mis au point deux types de vérification périodique :

1. une de type interne,

2. une de type externe.

Dans le premier cas, les agents de l'unité effectuent les vérifications des matériels soumis à un contrôle métrologique (micropipettes, balances et pH-mètre), en collaboration avec le correspondant métrologie de l'unité (cf. Plan Qualité 9 de l'unité). Une centrale de mesure des températures enregistre les variations de température des enceintes thermostatées de l'Anses Ploufragan (étuves, réfrigérateurs, congélateurs et surgélateurs).

Dans le deuxième cas, certaines catégories de matériels font l'objet d'opérations de maintenance assurées par des prestataires de service (cf. procédure P.MAT.G16) ou de réparations nécessaires puis les vérifications métrologiques nécessaires dans le cas des micropipettes. Ces opérations généralement réalisées dans le cadre d'un contrat d'entretien, visent à prévenir tout dysfonctionnement.

Les consommables

Les consommables sont gérés selon le plan qualité de l'unité en référence à la norme ISO 17025. Il existe deux types de produits consommables : les produits acquis à l'extérieur (ex:antibiotiques, additifs, produits chimiques, colorants, milieux de culture, matériel plastique à usage unique, produits spécifiques à la biologie moléculaire, produits biologiques, kits, produits d'entretien, de désinfection, fluides...) et les produits fabriqués dans l'unité.

Les procédures P.PQ9.CON.G2 et P.PQ9.CON.G1 détaillent respectivement la gestion des consommables communs au sein de l'UGVB, qui ont été préalablement gérés par le magasin central, et la gestion des consommables spécifiques de l'UGVB.

La procédure P.PQ9.CON.G1 décrit les modalités de commande de réception, d'identification, de stockage et de gestion des consommables communs dans l'unité. La procédure P.PQ9.CON.G2 explique comment rechercher un consommable spécifique, les lieux de stockage, la gestion d'un article, la gestion des stocks, la gestion des consommables spécifiques préparés dans l'unité. La qualité des consommables est évaluée à leur arrivée par le personnel présent à la réception.

Les consommables sont tracés par des numéros de lot. Dans le cas du projet, seuls les consommables critiques sont tracés au fur et à mesure de leur utilisation sur le cahier de laboratoire. Les consommables critiques sont les consommables chimiques et/ou biologiques qui peuvent avoir une influence sur la qualité du résultat. Les contenants et accessoires ne sont pas tracés.

La procédure de P.MAT.G1, ou choix des fournisseurs de matériels, et la procédure P.CON.G3, choix des fournisseurs de consommable, indiquent les règles de mise en concurrence des fournisseurs qui ont été décidées dans le cadre de la délégation de responsabilité des marchés. Les prestations des fournisseurs de matériels et de consommables doivent être évaluées pour valider l'aptitude de ces derniers à fournir un matériel et/ou un produit conforme aux exigences de l'Anses. Les procédures P.MAT.G5, évaluation des fournisseurs de matériels, et P.CON.G5, évaluation des fournisseurs de consommable, expliquent l'organisation des évaluations. Le résultat de ces évaluations des fournisseurs de matériels et de consommables est utilisé comme critère pertinent pour la sélection de ces fournisseurs.

Les locaux

L'identification des bâtiments (F06 pour le bâtiment de l'UGVB) et les salles de l'UGVB est établies selon une numérotation commune de l'Anses site Ploufragan/Plouzané décrite dans le Manuel d'Assurance Qualité. L'accès aux bâtiments est contrôlé au moyen d'un digicode sur

les portes d'accès extérieures et un registre permet d'identifier les visiteurs autorisés à pénétrer dans les locaux.

L'accès aux laboratoires nécessite de retirer les vêtements et chaussures de l'extérieur dans un premier vestiaire. Les vêtements de travail sont récupérés dans un deuxième vestiaire après passage par un sas.

Le bâtiment est en dépression par rapport à l'extérieur et possède une climatisation ainsi qu'un système de filtration de l'air sur filtres à haute efficacité. L'unité est aménagée de manière à disposer de salles spécifiques à des activités qui sont soit en dépression soit en surpression par rapport au couloir.

Au cours de la thèse les manipulations sont réalisées majoritairement dans la salle F06203. Les techniques plus spécifiques sont réalisées dans les salles prévues à cet effet (cf. Annexe 4, Plan Qualité de l'Unité). Certains travaux devront être réalisés en laboratoire de niveau de sécurité 3 (L3) de l'unité VIPAC. Ces différentes orientations dépendent des besoins imposés par les protocoles techniques établies avant la réalisation des essais.

Le site de Ploufragan respecte l'environnement lors de l'élimination des déchets et des effluents. Chaque unité a formalisé cette gestion des déchets. Dans le cas de l'unité GVB, les déchets non biologiques sont conditionnés en sacs plastiques et placés dans la poubelle présente dans le SAS F06121a. Les déchets biologiques sont également conditionnés en sacs plastiques puis autoclavés au laboratoire avant incinération dans un centre agréé. Les déchets chimiques liquides sont placés dans un bidon présent dans le SAS F06121a (cf. procédure P.PQ9.SE.D1). L'ensemble des effluents est traité par la chaleur dans une station de traitement (cf. plan qualité spécifique).

La gestion des écarts

Les non-conformités

Une non-conformité est une non-satisfaction d'une exigence du Système Qualité et/ou d'exigences convenues avec le Client (norme ISO9000 de 2005).

La non-conformité constatée est consignée sur une fiche de progrès qui donne lieu à des actions curatives, correctives et/ou préventives et qui est gérée selon la procédure générale P.ACT.A1 qui spécifie la gestion des non-conformités détectées en rapport avec les consommables ou avec tout autre type de ressources.

Dans notre cas, les non-conformités regroupent surtout les problèmes techniques, comme le dysfonctionnement de matériel et/ou la mauvaise qualité des produits utilisés.

Les non-confirmations

Le terme de non-confirmation est spécifique à l'Anses. Les non-confirmations incluent les hypothèses invalidées et les résultats non confirmés par d'autres expériences, voire non reproductibles.

La gestion de ces cas est consignée dans le cahier de laboratoire et discutée avec le directeur de thèse et/ou le co-directeur.

Une non-confirmation peut provoquer une revue de projet suivant les besoins.

Les points critiques

Les points critiques ont été définis dans le paragraphe V.f..

C'est une notion complémentaire aux deux notions précédentes, et comme mentionné précédemment, un point critique non résolu pourra conduire à une révision du projet.

La communication

Réunions de travail

Ces réunions ont pour but d'informer du travail réalisé et de discuter de l'avancement du projet, des résultats, des hypothèses et des écarts s'il en existe.

Plusieurs réunions seront organisées pendant la durée de la thèse, et auront chacune un objectif prédéfini :

- Des réunions d'avancement entre le chef de projet, Yannick Blanchard, et le doctorant, moi-même, au cours desquelles un suivi des manipulations et des bilans préliminaires seront discutés. Ces réunions auront lieu en moyenne une fois toutes les deux semaines dans la mesure du possible, ou si l'une des personnes est absente, dès son retour. Elles se clôtureront par la signature du cahier de laboratoire par les deux acteurs du projet, ce qui se traduit par un accord des deux parties pour le bilan et les nouvelles hypothèses discutées. Des comptes rendus concis seront consignés à la suite dans le cahier de laboratoire.
- Les réunions qualité hebdomadaires sont organisées en présence de tous les membres de l'équipe afin de discuter de la gestion du système qualité et du bon fonctionnement du laboratoire.
- Des réunions occasionnelles avec le directeur du projet seront l'occasion de faire un bilan complet du projet.
- Les réunions scientifiques mensuelles de l'unité permettent au doctorant d'échanger de façon brève ou détaillée sur ses travaux de recherche avec tous les membres de l'unité.
- Les réunions scientifiques de site, mensuelles, sont organisées par roulement entre les équipes du site pour leur permettre de présenter leurs travaux et résultats, de s'informer sur les travaux en cours dans les autres équipes et d'obtenir un avis extérieur sur la conduite de son projet.
- Des réunions supplémentaires pourront être organisées entre le doctorant et les responsables du projet, chef de projet et/ou directeur de thèse, et/ou les membres du comité de pilotage si besoin est.

Toutes réflexions conduisant à de nouvelles hypothèses de travail ou réorientations du projet discutées lors d'une de ces réunions seront consignées par un compte-rendu concis dans le cahier de laboratoire.

Echange d'informations

La communication au sein de l'unité se fait par messagerie électronique, par téléphone et par réunion.

L'information entre les différentes parties impliquées est gérée par des échanges de mails qui sont archivés,

Un fichier d'archivage des documents qualité a été créé, dans la session du doctorant sous P:\. Il décrit les documents qualité, leurs codifications, la liste de diffusion, les rédacteurs, la date de mise en œuvre et le lieu d'archivage de chacun des documents qualité.

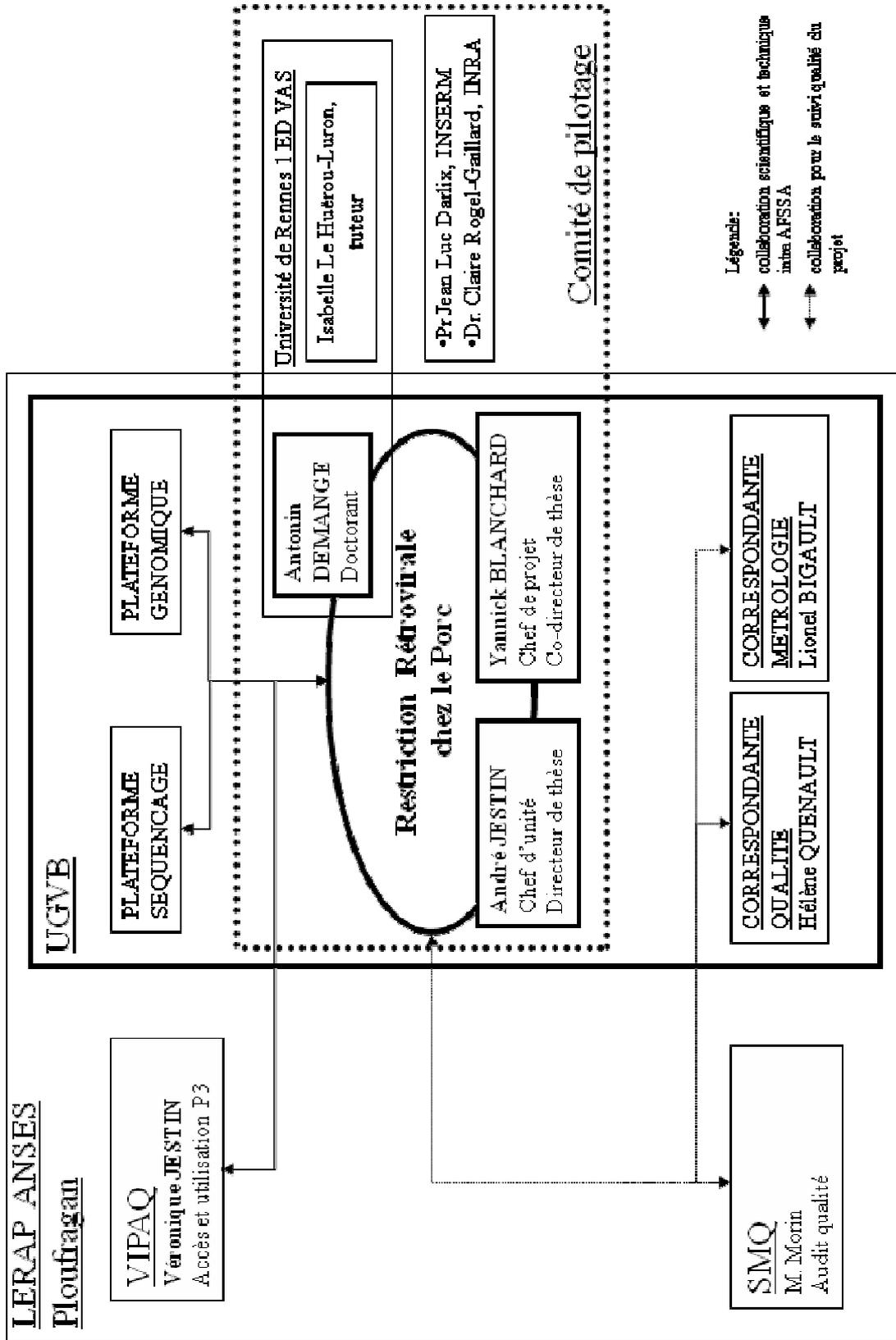
Diffusion des résultats

Dans un premier temps, le doctorant réalisera des synthèses bibliographiques partielles, sur les sujets de bibliographie qu'il aura étudiés.

Un échéancier a été mis en place: une première synthèse est attendue après la première année de thèse et de nouvelles synthèses, soient plus précises sur le premier thème de la bibliographie ou sur un autre point du sujet bibliographique, sont attendues après deux ans de thèse et avant la fin de la dernière année.

D'autre part, le projet de thèse aboutira à la réalisation de contributions scientifiques. Elles peuvent se faire de plusieurs manières : participations à des colloques, présentation de posters, une ou plusieurs publications, et le manuscrit de la thèse réalisé à la fin du projet. Pour tous travaux réalisés par le doctorant portant sur le projet de thèse, le nom du doctorant figurera en premier auteur.

ANNEXE 1 : Organigramme de thèse



30/11/ 2011 – Acteurs du Projet
 U GVB – Enregistrement – PMQ-AD – LISTE01 – R.év. 01 – Novembre 2011

VTSA

ANNEXE 2 : Fiche de projet de thèse rév. 01

Etude des Facteurs de la Restriction Rétrovirale Chez le Porc

1. Contexte socioéconomiques et scientifique

Le génome du porc, comme celui de la plupart des espèces animales ou végétales, contient un nombre important d'éléments transposables. Parmi ces éléments, les rétrovirus endogènes dont la majorité ne sont plus que la trace d'infections virales anciennes et sont maintenant défectueux. Cependant, contrairement à l'Homme, chez lequel il n'existe plus de forme active de rétrovirus endogènes, le génome du porc contient encore un nombre significatif (~50) de séquences rétrovirales endogènes fonctionnelles. Or, malgré la présence de particules virales PERV parfaitement fonctionnelles le porc ne souffre d'aucunes pathologies associées à ces rétrovirus. Cette situation peut s'expliquer par des mécanismes de restriction virale, que l'on définit comme l'ensemble des mécanismes non immunologiques qui confèrent à l'hôte une résistance à l'infection, particulièrement efficace chez le porc. Plusieurs mécanismes de restriction ont été décrits chez différentes espèces mais pratiquement aucun chez le porc.

Dans les années 80, un épisode de leucose aviaire a sévit dans les élevages. Il résultait d'un événement de recombinaison entre un rétrovirus exogènes (ALV) et un rétrovirus endogène aviaire. Ce phénomène de recombinaison qui a engendré un rétrovirus hautement pathogène chez le poulet pourrait, dans l'hypothèse d'une recombinaison entre deux PERVs, être chez le porc à l'origine d'un virus émergent susceptible d'échapper à la restriction virale.

Le porc, qui possède encore des séquences rétrovirales endogènes actives et fonctionnelles, peut produire des particules rétrovirales infectieuses. Cependant aucune pathologie majeure n'est associée à cette infection rétrovirale dans cette espèce. L'hypothèse émise est donc que le porc possède des mécanismes de contrôle de la sur infection par les PERV.

2. Le Sujet

a. Les Hypothèses et questions posées.

L'approfondissement des connaissances des interactions entre les virus et leur hôte a abouti à définir le concept de restriction rétrovirale. Cette restriction rétrovirale s'exerce à différentes étapes du cycle rétroviral, elle est médiée par un ensemble de macromolécules, appartenant à des familles diverses et présentes en nombre variable selon les espèces considérées. Certains de ces facteurs de restriction rétrovirales ont été mis en évidence dans l'ordre des artiodactyles (Si et al., 2006), (Sawyer et al., 2007), (Jonsson et al., 2006), (LaRue et al., 2008) et plus précisément, mais beaucoup moins étudié, chez le porc (Mattiuzzo et al., 2010), (Dorrschuck et al., 2011).

Les familles des protéines TRIMs (Tripartite Motif) bovines et plus exhaustivement humaine et murine ont été étudiées, dans le cadre de l'infection *in vitro* de cellules bovines ou humaines par le VIH et par le MLV (Si et al., 2006), (Uchil et al., 2008). Ces équipes ont démontré que les protéines TRIMs de ces organismes interviennent dans la modulation de la réplication de ces deux rétrovirus humains et murins dans les cellules bovines ou humaines. En effet certaines protéines de ces familles des TRIMs favorisent le cycle rétroviral alors que d'autres protéines de ces mêmes familles exercent une activité restrictive sur la réplication du VIH et du MLV.

Les protéines TRIMs bovines, humaines et murines qui jouent un rôle dans la restriction rétrovirale du MLV dans les cellules des deux premiers, ont été identifiées. Sachant que de nombreuses analogies existent entre le MLV-B et les PERVs réplicatifs (ce sont des gamma-rétrovirus qui ont un tropisme de type B), l'hypothèse est avancée que la restriction rétrovirale du PERV ferait intervenir des protéines de la famille des TRIMs.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets des protéines TRIMs porcines sur le cycle rétroviral des PERVs réplicatifs dans les cellules porcines ou humaines. Les protéines TRIMs porcines sélectionnées seront les équivalents des protéines TRIMs bovines, humaines et murines intervenant dans la restriction rétrovirale du MLV-B dans les cellules bovines et humaines. L'effet des protéines TRIMs porcines sur la réplication des rétrovirus porcins sera étudié en particulier sur les PERVs de classe A/C.

b. Les grandes étapes de la thèse et démarches.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse reposeront essentiellement sur des approches basées sur la culture cellulaire et les techniques de biologie moléculaire.

- Tâche 1 création d'un outil de mesure de l'infection PERV
 - T1.1 : Construction d'un plasmide PERV-A/C-GFP
 - T1.2 : Propriétés fonctionnelles du plasmide PERV A/C GFP
 - T1.3 : production d'un stock de virus PERV-A/C GFP

Livrable : Un clone viral PERV-A/C-GFP fonctionnel permettant d'évaluer facilement une infection expérimentale par le PERV en faisant appel à la cytométrie en flux.

- Tâche 2 : Mise en évidence d'une restriction à l'infection PERV

Livrable : Caractérisation de la permissivité à l'infection PERV de lignées porcines

- Tâche 3 caractérisation des mécanismes de restriction à l'infection PERV

- T3.1 : recherche de similarités
- T3.2 : validation des gènes de restriction candidats
- T3.3 : Confirmation des propriétés des protéines de restriction

Livrable : Caractérisation d'un ou plusieurs mécanismes de restriction rétrovirale chez le porc

Suivant l'organisation de ces tâches, le planning prévisionnel du projet de thèse est le suivant :

- 2^{ème} année :
 - Mois 9-12 :
 - Sélection de facteurs de restriction TRIMs d'intérêt.
 - Identification des homologues TRIMs porcines
 - Clonage des TRIMs porcines sélectionnées
- 3^{ème} année :
 - Mois 1-2 :
 - Construction de siRNA dirigés contre les facteurs TRIMs sélectionnés
 - Mise en évidence d'une restriction à l'infection PERV
 - **Revue de Projet**
 - Mois 3-6 :
 - Caractérisation des mécanismes de restriction à l'infection PERV

- Mois 7-10 :
 - Interprétation et mise en forme des résultats
 - Rédaction d'un article

Points critiques :

- i. La maîtrise du modèle in vitro de restriction virale est indispensable.
- ii. le génome du porc n'est pas entièrement séquencé, certaines cibles pourraient donc être absente des bases de données.
- iii. Récupération des facteurs TRIMs porcins

c. Approches méthodologiques et techniques envisagées

Ce travail fait appel aux techniques de bases de culture cellulaire et de biologie moléculaire appliquée à la virologie.

Les outils de génétique reverse, maîtrisés par l'unité, seront appliqués au PERV dans la première partie pour réaliser un clone PERV-GFP.

L'infection PERV sera évaluée et quantifiée par cytométrie de flux

La mise en évidence d'un éventuel rôle restrictif des protéines TRIMs sur le cycle du PERV-A/C sera objectivée au niveau des phases précoces et tardives du cycle des PERV répliatifs. Quatre étapes seront étudiées :

- 1) Etape de rétro-transcription du PERV-A/C : dosage de l'activité RT (cf.Reverse Transcriptase Assay, colorimetric, Roche) testée en présence d'AZT (AzidoThymidine, inhibiteur de la RT).
- 2) Etape de l'intégration du PERV A/C : dosage des cercles 2-LTR (Friedrich et al., 2010), (Delelis et al., 2005) testée en présence de RAL (Raltegravir, inhibiteur de l'intégrase).
- 3) Etape de transcription du PERV A/C : dosage des transcrits des PERV A/C répliatifs par RT-PCR.
- 4) Etape de la production de rétrovirions du PERV A/C : dosage semi quantitatif par Western Blot des particules virales intra ou extra cellulaires.

La spécificité de l'action des protéines TRIMs sur les PERVs sera confirmée par la modulation dirigée du niveau d'expression des protéines TRIMs. Pour cela sont mises en œuvre les techniques de sous expression par « Knockdown » des TRIM par la technique des shRNA (Invivogen) et les techniques de surexpression de ces facteurs par le système pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen).

Références

1. Si, Z., et al., *Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7454-9.
2. Sawyer, S.L., M. Emerman, and H.S. Malik, *Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals*. PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e197.
3. Jonsson, S.R., et al., *Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(19): p. pp 5683-94.

4. LaRue, R.S., et al., *The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals.* BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 104.
5. Mattiuzzo, G., S. Ivol, and Y. Takeuchi, *Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins.* J Virol, 2010. **84**(5): p. 2618-22.
6. Dorrschuck, E., et al., *Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases.* J Virol, 2011. **85**(8): p. 3842-57.
7. Uchil, P.D., et al., *TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle.* PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e16.
8. Friedrich, B., et al., *Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line.* Virol J, 2010. **7**: p. 354.
9. Delelis, O., et al., *A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles.* Retrovirology, 2005. **2**: p. 31.

ANNEXE 3 : Listing de points critiques du projet de thèse de AD

Points critiques détaillés	Date d'identification du point critique	Rencontre de point critique		Fiche de point critique			Référence du cahier de laboratoire
		Date prévisionnelle	Date réelle	Référence	date d'ouverture	date de cloture	
La maîtrise du modèle in vitro de restriction virale est indispensable	création du projet: 12/09	La durée de la thèse					
Le génome du porc n'est pas entièrement séquencé, ceraines cibles pourraient donc être absente des bases de données	création du projet: 12/09	La durée de la thèse					
Construction d'une banque de cDNA de facteurs de restriction PERV	préparation du comité de pilotage : 10/10	1ère année de thèse	oui le 10/2010				C019464 (CL/GVB/10/10) & C020628 (CL/GVB/11/03)
Récupération des facteurs TRIMs porcins	Revu de projet : 09-10/11	fin de 2ème année de thèse					

ANNEXE 4 : Répartition des micropipettes et des manipulations dans les différentes salles de l'unité GVB

Salle de Pré Mix PCR: F06101

Aliquotage des amorces de PCR et réalisation des mix

Pipettes num éro:

P1000 n° 22009/00/108

P200 n° 22009/00/106

P40 n°22009/00/07

P10 n°22009/00/105

Salle de séquençage: F06103

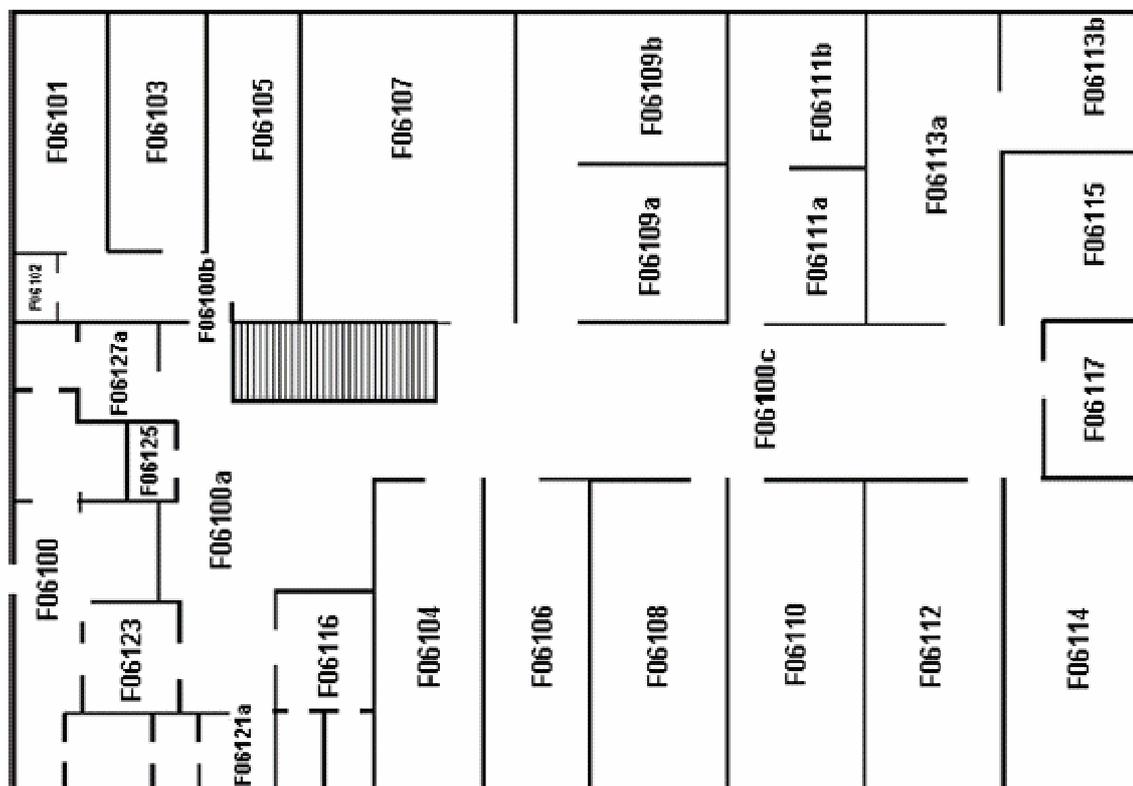
Pipettes num éro:

P1000 n° 22009/00/005

P200 n° 22009/00/121

P100 n°22009/00/124

P10 n°22009/00/119



Niveau 1

Salle de Bactériologie: F06110

Transformation et culture des bactéries.

Pipettes num éro:

P1000 n° 22009/00/088

P200 n° 22009/00/010

P10 n°22009/00/021

Laboratoire F06204

Toutes manipulations ne nécessitant pas d'être dans une salle spécifique

Pipettes num etc:

P1000 n° 22009/00/087

P200 n° 22009/00/033

P100 n° 22009/00/054

P20 n° 22009/00/035

P10 n° 22009/96/060

P3 n° 22009/00/010

Sous le FSM:

P1000 n° 22005/00/025

P200 n° 22009/00/055

P20 n° 22009/00/032

Salle de spectrométrie: F06215

Dosages ADN:

Salle post PCR: F06213

Electrophorèse des produits de PCR

P200 n° 22009/00/038

P40 n° 22009/00/059

P10 n° 22009/00/113

Salle PCR quantitative: F06211

Ajust des échantillons d'ADN: ou d'ARN dans les plaques PCR aliquotées.

P200 n° 22009/00/007

P20 n° 22009/00/064

P10 n° 22009/00/065

Salle des pesées: F06214

Pesés des constituants des solutions à préparer.

Salle de culture cellulaire saine: F06216

Maintien des cultures cellulaires non infectées, et préparation des plaques pour transfection.

P20C n° 22009/00/068

P10C n° 22009/00/032

P20 n° 22009/00/059

Laboratoire: F06205

Extractions ADN, électrophorèse des digestions enzymatiques.

Pipettes num etc:

P1000 n° 22009/00/017

P20C n° 22009/00/014

P40 n° 22009/96/051

P30 n° 22009/03/000

P10 n° 22009/00/517

Salle PCR: F06209

Ajust des échantillons d'ADN dans les plaques PCR aliquotées.

P10: 22009/00/046



Résumé

Les études des interactions entre cellules hôtes et rétrovirus ont conduit à définir le concept de restriction virale dont les facteurs constituent une part de l'immunité innée des cellules hôtes. Ces facteurs contribuent au contrôle des rétrovirus endogènes (ERV) dont l'émergence peut être associée à certaines pathologies telles que des leucémies ou des immunodéficiences. Chez le porc, certains ERV (PERV) sont répliatifs, pourtant aucune pathologie ne leur a, à ce jour, été associée. Les mécanismes de restriction virale impliqués dans ce phénomène ont fait l'objet de nombreuses études. Elles n'ont cependant concerné que certains facteurs. Les protéines porcines à motif tripartite (poTRIM) n'ont ainsi fait l'objet que de peu d'études. Pourtant, de nombreux membres de cette famille participent à la restriction virale chez d'autres organismes que le porc. La présente étude s'intéresse par conséquent aux orthologues porcins de ces protéines et à leur relation avec les PERV. L'élaboration d'une stratégie d'expression de ces protéines dans un modèle humain, sensible à l'infection par le PERV nous a permis d'évaluer et de caractériser les effets des TRIM sur le cycle infectieux du PERV. Cette stratégie a mis en évidence une activité de restriction par TRIM8 tandis que TRIM44 semble au contraire agir en faveur de la réplication virale. En ce qui concerne poTRIM11, elle favorise l'entrée du PERV tout en inhibant son expression. L'étude a également confirmé l'insensibilité du PERV vis-à-vis de poTRIM5 α . L'ensemble de ces résultats contribue à la compréhension de la relation entre la réplication des PERV et le contrôle mené par son hôte.

Mots-clés : Immunité intrinsèque, restriction virale, PERV, TRIM, cycle infectieux

Abstract

From studies of pathogens and their host interaction has emerged the concept of viral restriction considered to be part of an innate immune system. These factors contribute to the control of endogenous retroviruses (ERV) whose emergence may be associated with several diseases such as leukemia or immunodeficiency. Three subgroups of the porcine ERV- γ -1 group (PERV) are replicative. Nevertheless, these PERVs are not associated with any pathology in the pig. Several studies have been performed on viral restriction mechanism capabilities of the pig but these covered a very limited number of restriction factors. Regarding the porcine tripartite motif-containing (poTRIM) proteins, knowledge is weak although several members of this family have proved to be implicated in the viral restriction of other species. The purpose of this study is to investigate the relationship between these orthologous poTRIMs proteins and replicating PERVs. In order to explore this potential interaction, a TRIM protein expressing model in human cells, known to be sensitive to the PERV infection, has been developed. It has enabled us to assess and characterize potential TRIMs effects on the PERV infection cycle. We equally identified poTRIM8 as a restriction factor. Conversely, poTRIM44 seems to act as an enhancer of the PERV infection, while, TRIM11 displayed ambiguous effects including an enhancer effect of the early infectious stages and an inhibitor activity of the late infectious stages. In this study, we also confirmed the PERV insensitivity to the porcine TRIM5 α protein. Finally, this work aims at contributing to the understanding of the relationship between PERV replication and their control leading by the host cells.

Keywords : Intrinsic immunity, viral restriction, PERV, TRIM, infectious cycle