

TITRE (Français)	ETUDE DES PARAMETRES STRUCTURAUX ET CINETIQUES CARACTERISANT LES INTERACTIONS INTEGRASES RETROVIRALES / ADN ET L'ETAPE DE 3'-PROCESSING
TITRE (English)	<i>STUDY OF STRUCTURAL AND KINETIC PARAMETERS INVOLVED IN THE RETROVIRAL INTEGRASES / DNA RECOGNITION MECHANISM AND 3'-PROCESSING REACTION</i>
AUTEUR	CARAYON Kévin
UNIVERSITE	ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN
DATE	04/12/2008
LABORATOIRE	Laboratoire de Biotechnologies et de Pharmacologie Appliquée
DIRECTION DE THESE	Eric DEPRez
PARRAINAGE	André LOPEZ

Résumé en français :

L'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules hôtes est une étape obligatoire du cycle de réplication des rétrovirus. L'intégrase (IN) catalyse le processus global d'intégration en deux étapes distinctes et consécutives. La première des deux réactions, le 3'-processing, consiste en une coupure spécifique d'un dinucléotide au niveau des deux extrémités 3'-OH de l'ADN viral. L'IN transfère ensuite de manière concertée ces deux extrémités au sein de l'ADN cible. Nous avons, par des techniques basées sur l'anisotropie de fluorescence, caractérisé les paramètres structuraux et cinétiques du 3'-processing catalysé par l'IN du VIH-1. Nous avons montré d'une part que cette activité dépend de la taille des complexes IN / ADN. Nous avons trouvé que le dimère d'IN est la forme multimérique la plus active tandis que les complexes de haut poids moléculaire sont relativement peu efficaces. D'autre part, la structuration du domaine N-ter joue un rôle clé dans l'assemblage coopératif de ce dimère en présence de Mg²⁺ comme cofacteur cationique. Ce rôle n'est pas essentiel en présence de Mn²⁺. L'étude de l'IN de PFV-1, un spumavirus, plus soluble, nous a permis de mettre en évidence une reconnaissance préférentielle de l'extrémité processée de l'ADN viral par cette IN, cette propriété n'avait jamais été observée pour l'IN du VIH-1 car elle était masquée par sa propension à l'agrégation. Nous avons également montré que ces deux IN rétrovirales réalisent le 3'-processing suivant un mécanisme catalytique lent de type « single turn-over ».

Résumé en anglais :

The integration of the retroviral DNA into the host genome is a key process in the retroviruses life cycle. Integrase (IN) catalyzes two distinct and consecutive steps that constitute the overall integration process. The first of these two reactions is 3'-processing which corresponds to the specific cleavage of two nucleotides from each 3'OH-end of the linear viral DNA. Then, IN transfers both extremities into the target DNA, resulting in full-site integration. Using fluorescence anisotropy based assay, structural and kinetic parameters of the 3'-processing reaction catalysed by HIV-1 IN were characterized. We found that the activity was dependent on the molecular size of IN / DNA complexes. Large complexes were found to be relatively inefficient while the IN dimer was found to be the most active multimeric form. Moreover we found that the structural N-terminal domain rearrangement plays a key role for the cooperative DNA-binding mode of the IN dimer with Mg²⁺ as the cationic cofactor, but not with Mn²⁺. In addition, a preferential interaction of IN with processed extremity of viral DNA interaction was clearly demonstrated for spumavirus PFV-1 IN, a more soluble IN; this property has never been observed for HIV-1 retroviral IN because of its aggregation propensity. For both retroviral IN, the 3'-processing reaction corresponds to a slow "single turn-over" mechanism.

* L'ensemble ne doit pas dépasser le bas de cete page.