

L'intégrase de VIH - 1: structure, fonction et cible de médicaments anti SIDA

S. Fermandjian, H. Merad, Z. Hobaika, M. Benleulmi, H. Porumb, L. Zargarian

Département de Biologie et Pharmacologie Structurales, UMR 8113, IGR, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France; e-mail: sfermand@igr.fr

Résumé

L'intégrase de VIH-1 (288 résidus, 32 kDa) catalyse l'interaction du génome viral dans l'ADN de la cellule infectée. L'enzyme comporte trois domaines distincts: N-terminal (résidus 1-50), C-terminal (résidus 212-288) et Central ou "cœur" catalytique (CC, résidus 50-212). La structure tertiaire de CC est formée de 5 feuillets β et de 6 hélices α ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) et porte la triade catalytique D₆₄, D₁₁₆ et E₁₅₂, (D, D-35, E) caractéristique des polynucléotidyl transférases. Si les études de RX et RMN montrent que les trois domaines pris séparément ou bien couplés en bi-domaines (N_{term}-CC et CC-C_{term}) forment des dimères stables, on ne connaît toujours pas, ni le degré d'oligomérisation fonctionnelle (tétramère? octamère?), ni l'agencement des domaines et ni, à fortiori, le mode de fixation de l'enzyme aux ADN viral et cellulaire. Notre laboratoire a adopté une démarche basée sur l'étude de sous-domaines de l'enzyme et d'oligonucléotides reproduisant l'extrémité du LTR (Répétition terminale longue). Un motif hélice tour hélice ($\alpha 4$ et $\alpha 5$) inversé (HTHi) a pu ainsi être identifié à la surface de l'intégrase. Ce motif intervient dans la formation des dimères et tétramères, ainsi que dans la reconnaissance des ADN viral et cellulaire. HTHi constitue une cible et une source d'inhibiteurs de l'intégrase: plusieurs molécules ciblant HTHi sont en cours d'homologation comme médicaments anti-SIDA ; les peptides synthétiques mimant l'hélice $\alpha 5$ agissant à l'interface protéine-protéine et entravant son oligomérisation fonctionnelle inhibent l'intégrase. La partie centrale de HTHi est un épitope très réactif, l'intégrase étant fortement inhibée par les anticorps correspondants. Elle est aussi le site de fixation du cofacteur de transcription p75 (LEDGF/p75) qui semble intervenir dans le choix du site d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire.

Mots clés : VIH-1, intégrase, motif HTHi, interactions, inhibiteurs.

Introduction

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est l'agent causal du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) (Barré-Sinoussi et coll., 1983). Le VIH-1 pénètre dans la cellule hôte en se liant à deux types de récepteurs membranaires. Une fois dans le cytoplasme l'ARN viral est transcrit en un ADN double brin de 9000 pb. La réaction est catalysée par la reverse transcriptase virale. L'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire se déroule en deux étapes: la maturation de l'ADN viral à ses deux extrémités et le transfert de brins (Coffin et coll., 1997). La maturation a lieu dans le cytoplasme. Un di-nucléotide GT est éliminé à chaque extrémité 3' des LTR (répétition terminale longue), faisant apparaître une extrémité saillante CA 3'OH. L'ADN mûri est alors transporté dans le noyau sous forme d'un complexe de préintégration. Lors de l'intégration, une liaison covalente est formée entre les extrémités CA 3' de l'ADN viral et les phosphates 5' des brins d'ADN cellulaire coupés avec un décalage de 5pb. Cette réaction est concertée

(Brown, 1989), les deux extrémités de l'ADN rétroviral étant maintenues à proximité l'une de l'autre par IN durant l'intégration (Miller et coll., 1997). Si l'intégration ne semble pas s'effectuer tout à fait au hasard dans le génome de la cellule infectée, elle ne présente cependant pas de spécificité de séquence (Pryciak et coll., 1992). L'ADN chromosomique distordu, et les séquences palindromiques, semblent favoriser l'insertion (Engelman, 2005 ; Grandgenett, 2005). Une fois intégré, l'ADN viral utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer et donner naissance à de nouvelles particules infectieuses.

Au total, l'intégration constitue une étape majeure du cycle viral du VIH à partir de laquelle le virus peut commencer à proliférer. Elle met en jeu essentiellement trois partenaires : l'ADN viral, l'ADN cellulaire et IN. IN régit les principales étapes de l'intégration (Figure 1). N'ayant pas de contrepartie cellulaire, elle constitue donc une cible potentielle privilégiée pour le traitement et la prévention du SIDA. En fait, de nombreux inhibiteurs de IN ont été

identifiés et parmi eux certains commencent déjà à être utilisés en clinique (Pommier et coll. 2005).

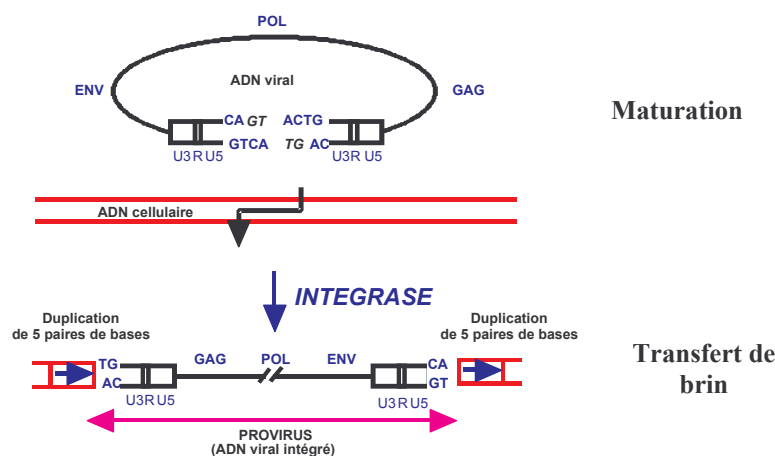


Fig. 1: Représentation schématique du mécanisme d'intégration

Matériel et Méthodes

IN est codée par l'extrémité 3' du gène pol viral dont le produit est la polyprotéine POL. Environ 40 à 100 molécules d'IN sont empaquetées dans chaque particule virale. De nombreuses études biophysiques, génétiques, enzymatiques, de cristallographie et de modélisation suggèrent que la forme active de l'IN est oligomérique bien que le degré d'oligomérisation (2, 4 ou 8) correspondant à la forme physiologique ne soit pas définitivement établi (Jenkins et coll., 1996 ; Pemberton et coll., 1996 ; Podtelezhnikov et coll., 2003). L'oligomérisation semble concerner toutes les intégrases rétrovirales. Par exemple IN de ASV (virus du sarcome aviaire) est multimérique sous sa forme active (Jones et coll., 1992). Il n'est pas étonnant que les virus vu la petite taille de leur génome aient recours à l'oligomérisation pour générer des enzymes plus performantes, capables de catalyser des réactions aussi différentes que la maturation et le transfert (Figure 1).

L'enzyme est constituée de trois domaines fonctionnels bien distincts (Andrake et Skalka, 1995; Jenkins et coll., 1996):

- le domaine N-terminal (résidus 1-50) impliqué dans le clivage en 3' (maturation), le transfert de brin (Bushman et coll., 1993) et l'infectivité du virus (Engelman et coll., 1995). Il contient des acides aminés conservés (H, H, C, C) qui lient le zinc et qui jouent un rôle important dans la fixation de la protéine à l'ADN viral (Mazumder et coll., 1996). Sa structure montre la présence d'un motif similaire aux motifs hélice-tour-hélice (HTH) qu'on trouve dans les protéines se liant à l'ADN (Eijkelenboom, 1997). Il intervient dans la formation de dimères et il pourrait

être impliqué dans la tétramérisation de la protéine (Lee et coll., 1997).

- le domaine C-terminal (résidus 220-288) présente un groupe d'acides aminés basiques et se fixe à l'ADN d'une manière non-spécifique (Lodi et coll., 1995). Il est impliqué dans la maturation et le transfert de brin (Vink et coll., 1993). La structure RMN de ce domaine montre qu'il forme des dimères avec des domaines SH3-"like" (Src-homology 3) comprenant 5 feuillets β .

- le domaine central CC (résidus 50-212) contient trois acides aminés acides formant la triade catalytique (D, D, E) très largement conservée chez les intégrases rétrovirales (Kulkosky et coll., 1992). Ce domaine fixe le métal divalent Mg^{2+} ou Mn^{2+} qui agit comme cofacteur catalytique. Certains auteurs associent le résidu K159 lui aussi très conservé, à la triade catalytique. La mutation de ces acides aminés supprime l'infectivité du virus (Coffin et coll., 1997).

Résultats et discussion

La structure cristallographique du domaine central de IN fournit une bonne base pour l'identification des sous-domaines et motifs structuraux fonctionnels de l'enzyme et la conception d'inhibiteurs interagissant avec ceux-ci (Figure 2). Celui-ci cristallise sous forme d'un dimère (Dyda et coll., 1994; Goldgur et coll., 1998). Le monomère, de forme globulaire, comprend 6 hélices α (de $\alpha 1$ à $\alpha 6$) et 5 feuillets β et ressemble aux monomères des autres intégrases rétrovirales (MLV : virus de la leucémie murine; ASV), aux transposases Tn5 et mu, à la RNaseH, à la recombinase Ruv de la jonction Holiday (Yang et Steitz, 1995), au domaine PIWI de Argonaute (Rice et Baker, 2001). Toute cette famille de polynucléotides transférase contient le motif

Quelle est alors l'hélice du motif $\alpha 4\alpha 5$ intervenant dans la reconnaissance de l'ADN ? Un grand nombre d'expériences plaident maintenant en faveur de l'hélice $\alpha 4$ (Figure 2). Au vu des spectres de dichroïsme circulaire (Figure 3 à gauche), le peptide synthétique correspondant est pratiquement dépourvu d'hélicité ce qui le rend inutilisable dans une étude de reconnaissance spécifique de l'ADN. C'est par le biais d'un certain nombre de substitutions hélicogènes (Figure 3 à droite) que nous avons obtenu un analogue, K156, stable, mimant la structure de

l'hélice $\alpha 4$ dans la protéine cristallisée (Krebs et coll., 1998).

En anisotropie de fluorescence les profils du titrage de l'ADN viral (LTR34fm porteur d'un fluorophore fluorescéine) par les peptides $\alpha 4$ et K156 indiquent que seul le peptide K156, doté d'une bonne stabilité en hélice α , est capable de se fixer à l'ADN viral avec une bonne affinité ($K_d \approx 2 \times 10^{-9} M$) (Figure 4). En fait nos résultats de fluorescence (Zargarian et coll., 2003) permettent de conclure que la reconnaissance spécifique de l'extrémité de l'ADN viral par IN repose sur l'hélice $\alpha 4$.

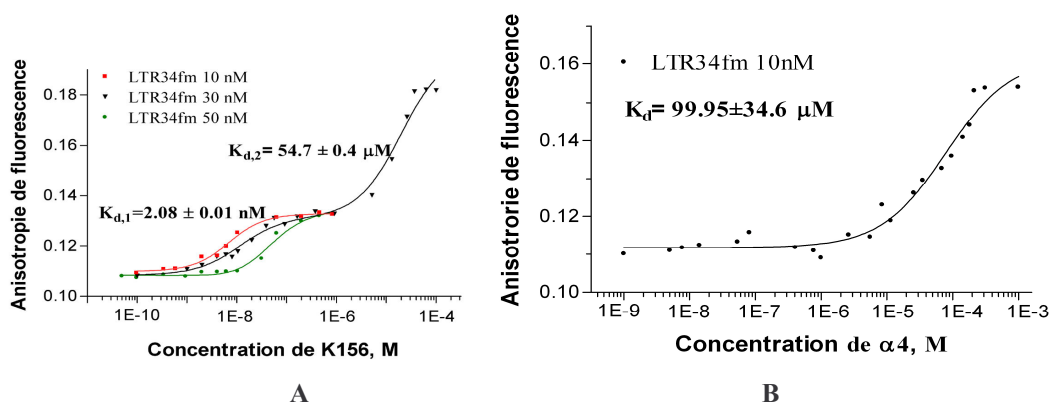


Fig. 4 : Expériences d'anisotropie de fluorescence : (A) complexe K156-LTR34fm ; (B) complexe $\alpha 4$ -LTR34fm. K156 est un analogue de l'hélice $\alpha 4$. LTR-34fm est un oligonucléotide de 17 pb reproduisant la séquence de l'extrémité de l'ADN viral.

Dans le motif bi-hélice $\alpha 4\alpha 5$ de IN, à l'inverse du motif HTH classique, c'est l'hélice N-terminale et non l'hélice C-terminale qui est l'hélice de reconnaissance de l'ADN. De ce fait le motif $\alpha 4\alpha 5$ a été baptisé HTHi (hélice tour hélice inversé). Notre motif correspond à un domaine très réactif de IN. Il constitue la cible et la source de nombreux inhibiteurs de IN. D'une part, l'hélice $\alpha 4$ reconnaissant l'ADN est ciblée par les agents antiviraux de la famille des DKA (diketoacids) : ce sont les mêmes chaînes latérales de l'hélice $\alpha 4$ qui contactent l'ADN viral et le 5CITEP (l'un des membres les plus connus de la famille d'inhibiteurs DKA) (Figures 5A et B), ce qui suggère au passage que les molécules DKA sont des inhibiteurs compétitifs de IN, même si leur mécanisme d'action est loin d'être totalement établi. D'autre part, le peptide INH5, englobant l'hélice $\alpha 5$ (intervenant dans la dimérisation), le tour et une partie de l'hélice $\alpha 4$ du motif HTHi (Figure 2) est un

puissant inhibiteur de IN, agissant sur l'enzyme en entravant son oligomérisation fonctionnelle.

Enfin, la région centrale de HTHi (résidus 163 à 175) est un épitope extrêmement réactif. Les anticorps monospécifiques correspondants inhibent fortement la réaction d'intégration catalysée par IN (Maroun et coll. 1999). Cette même région centrale semble être aussi le siège d'un motif NLS (Signal de Localisation Nucléaire) intervenant dans le transport actif de IN dans le noyau (Armon-Omer et coll., 2004). Autre coïncidence, le site de liaison du facteur cellulaire LFDGF à IN se situe lui aussi dans la région de l'épitope (résidus 165 à 173) (Cherapanov et coll. 2005). Ce facteur intervient dans le choix des sites d'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cible cellulaire. Des expériences de déplétion ont montré qu'en absence de LEDGF on observait une diminution de la fréquence d'intégration dans les unités transcriptionnelles et les gènes de régulation du LEDGF (Ciuffi et coll. 2005).

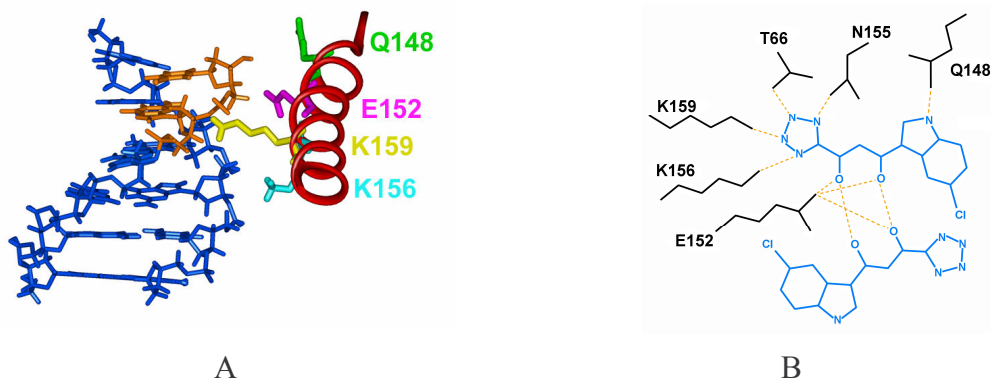


Fig. 5 : A : Complexes de l'hélice $\alpha 4$ du motif HTHi de IN avec : (A) l'extrémité de l'ADN viral ; (B) le 5CITEP (Goldgur et coll.,1998). Ce sont les mêmes résidus de l'hélice $\alpha 4$ (Q148, K156 et K159 et E152) qui interagissent avec l'ADN et le 5CITEP.

Conclusion

Dans cette présentation nous nous sommes focalisés sur des modèles simples permettant d'analyser des propriétés de IN difficilement explorables avec la protéine entière. IN comme beaucoup d'autres protéines de liaison à l'ADN utilise un motif HTH (HTHi dans notre cas) pour la reconnaissance sélective des extrémités LTR de l'ADN viral. Une telle reconnaissance assurée principalement par l'hélice $\alpha 4$, est nécessaire pour le bon déroulement de la réaction de maturation et de transfert de brins car elle amène la triade DDE à distance catalytique du point de clivage de l'ADN. Il n'est donc pas étonnant que les composés tels que les DKA qui interagissent avec l'hélice $\alpha 4$ à l'interface ADN-protéine soient d'excellents inhibiteurs de IN. Nous avons également constaté qu'un peptide INH5 incorporant l'hélice $\alpha 5$ du motif HTHi était un inhibiteur de IN. Agissant à l'interface protéine-protéine, ce type d'inhibiteur contrarie l'oligomérisation fonctionnelle de l'enzyme. Enfin, le domaine central du motif HTHi qui possède des propriétés d'épitope est reconnu spécifiquement par le facteur cellulaire LEDGF/p75, ce dernier semblant jouer un rôle efficace dans le choix des sites d'intégration sur l'ADN cellulaire.

Le motif HTHi de IN du VIH-1 est donc le siège d'interactions multiples (protéines-protéine, protéine-ADN, protéine-inhibiteurs) les unes plus importantes que les autres pour la survie du virus. Son étude ouvre d'excellentes perspectives dans une recherche détaillée des divers mécanismes d'interaction (protéine-protéine, protéine-ADN...) intervenant dans l'infection et la découverte de nouveaux agents antiviraux.

Bibliographie

Andrake M.D. et Skalka A.M. 1995. Multimerization determinants reside in both the catalytic core and C

terminus of avian sarcoma virus integrase. *J. Biol. Chem.* 270: 29299-29306.

Armon-Omer A, Graessmann A et Loyter A. 2004. A synthetic peptide bearing the HIV-1 integrase 161-173 amino acid residues mediates active nuclear import and binding to importin alpha: characterization of a functional nuclear localization signal. *J.Mol.Biol.* 336:1117-1128.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W et Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-871.

Brown, P.O. 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the IN protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2525-2529

Bushman, F.D., Engelman, A., Palmer, I., Wingfield, P., et Craigie, R. 1993. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3428-3432.

Cherepanov P, Sun ZY, Rahman S, Maertens G, Wagner G et Engelman A. 2005. Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12:526-532.

Coffin JM, Huges SH et Varmus HE. 1997. *Retroviruses. Edited by the Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Ciuffi A, Llano M, Poeschla E, Hoffmann C, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman F. 2005. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med.* 11:1287-1289.

Dyda F., Hickman A. B., Jenkins T. M., Engelman A., Craigie R., et Davies D. R. 1994. *Science.*, 266: 1981-1986.

Eijkelenboom A. P., Van den Ent F. M., Vos A., Doreleijers J.F., Hard K., Tullius T. D., Plasterk R. H., Kaptein R., Boelens R. 1997. The solution structure of the amino-terminal HHCC domain of

- HIV-2 integrase: a three-helix bundle stabilized by zinc. *Curr Biol.*, 7: 739-46.
- Engelman A, Englund G, Orenstein JM, Martin MA et Craigie R 1995. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J.Virol.* 69:2729-2736.
- Engelman A. 2005. The ups and downs of gene expression and retroviral DNA integration *Proc Natl Acad Sci* 102:1275-1276.
- Goldgur Y, Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Craigie R, et Davies DR. 1998. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc Natl Acad Sci.*, 95 : 9150-9154.
- Grandgenett D. P. 2005. Symmetrical recognition of cellular DNA target sequences during retroviral integration ; *Proc Natl Acad Sci*, 102: 5903-5904
- Jenkins TM, Engelman A, Ghirlando R et Craigie R. 1996. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J.Biol.Chem.* 271:7712-7718.
- Jones K.S., Coleman J., Merkel G.W., Laue T.M., et Skalka A.M. 1992. Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J. Biol. Chem.* 267: 160376-160400.
- Krebs D, Maroun RG, Sourgen F, Troalen F, Davoust D et Femandjian S. 1998. Helical and coiled-coil-forming properties of peptides derived from and inhibiting human immunodeficiency virus type 1 integrase assessed by 1H-NMR--use of NH temperature coefficients to probe coiled-coil structures. *Eur.J.Biochem.* 253:236-244.
- Kulkosky J., Jones K.S., Katz R.A., Mack J.P., Skalka A.M. 1992. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases *Mol Cell Biol.* 12: 2331-2338.
- Lee S.P., Xiao, J., Knuston, J.R., Lewis, M.S., et Han, M.K. 1997. Zn²⁺ promotes the self association of human immunodeficiency virus type 1 integrase in vitro. *Biochemistry* 36: 173-180.
- Lodi P.J., Ernst J.A., Kuszewski J., Hickman A.B., Engelman A., Craigie R., Clore G.M., et Gronenborn A.M. 1995. Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry.* 34: 9826-9833.
- Maroun R.G., Krebs D., Roshani M., Porumb H., Auclair C., Troalen F., et Femandjian S. 1999. Conformational aspects of HIV-1 integrase inhibition by a peptide derived from the enzyme central domain and by antibodies raised against this peptide *Eur.J.Biochem.* 260 : 145-155.
- Maroun RG, Gayet S, Benleulmi MS, Porumb H, Zargarian L, Merad H, Leh H, Mouscadet JF, Troalen F et Femandjian S. 2001. Peptide inhibitors of HIV-1 integrase dissociate the enzyme oligomers. *Biochemistry.* 40:13840-13848.
- Mazumder A., Neamati N., Pilon A., Sunder S., et Pommier Y. 1996. Chemical trapping of ternary complexes of human immunodeficiency virus type one integrase, divalent metal, and DNA substrates containing an abasic site. *J. Biol. Chem.* 271: 27330-27338.
- Miller MD, Farnet CM et Bushman FD. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J.Virol.* 71:5382-5390.
- Pemberton I. K., Buckle M. et Buc H. 1996. The metal ion induced cooperative binding of HIV-1 integrase to DNA exhibits a marked preference for Mn (II) rather than Mg (II). *J. Biol. Chem.* 271: 1498-1506.
- Podtelezhnikov A.A., Gao, K., Bushman, F.D., et McCammon, J.A. 2003. Modeling HIV-1 integrase complexes based on their hydrodynamic properties. *Biopolymers.* 68: 110-120.
- Pommier Y, Johnson AA et Marchand C. 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat.Rev.Drug Discov.* 4:236-248.
- Pryciak PM et Varmus HE. 1992. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell.* 69:769-780.
- Rice P.A., Baker T. 2001. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nature Structural Biology*, 8: 302-307.
- Vink C., Oude Groeneger, A.M.M., Plasterk R.H.A. 1993. Identification of the catalytic and DNA binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *Nucleic acids Res* 12:433-8.
- Yang W., et Steitz T.A., 1995 Crystal structure of the site-specific recombinase gamma delta resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell.* 82:193-207.
- Zargarian L., Benleulmi M.S., Renisio J.G., Merad H., Maroun R.G., Wieber F., Mauffret O., Porumb H., Troalen F., et Femandjian S. 2003 Strategy to discriminate between high and low affinity bindings of HIV-1 integrase to viral DNA. *J. Biol. Chem.*, 278 :19966-19973.