

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE

PAR  
BENOIT OCHIETTI

CLONAGE ET EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉASE DU VIH-1  
DANS UN SYSTÈME BACTÉRIEN

FÉVRIER 1996

*À ma grand-mère Madeleine,*

*ses dernières années de souffrance n'ont pas terni  
son courage et son amour pour la famille*



## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
SOMMAIRE.....	xii
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. SIDA.....	5
1.1 Caractéristiques générales de la maladie.....	5
1.2 Identification de l'agent étiologique.....	5
1.3 Réponse immunitaire et développement de la maladie.....	7
2. VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH).....	9
2.1 Caractéristiques générales des rétrovirus.....	9
2.2 Structure du virion.....	10
2.3 Cycle de réplication viral.....	13
2.3.1 Adsorption du virion sur le récepteur CD4.....	13
2.3.2 Rétrotranscription et intégration du génome viral.....	16
2.3.3 Transcription et traduction des gènes viraux.....	16
2.3.4 Assemblage et libération du virion.....	17
2.3.5 Maturation du virion.....	20
2.4 Gènes de régulation précoces.....	21

2.5 Gènes de régulation tardifs.....	22
3. STRATÉGIES ANTI-VIH.....	23
3.1 Mise au point de vaccins.....	23
3.2 Chimiothérapie.....	24
3.2.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	24
3.2.2 Inhibiteurs d'autres enzymes du VIH-1.....	25
3.2.3 Autres types d'inhibiteurs.....	26
4. PROTÉASE DU VIH-1.....	27
4.1 Caractéristiques générales.....	27
4.2 Rôle de la protéase dans le cycle de réplication.....	31
4.3 Spécificité de la protéase.....	34
4.4 Mécanisme enzymatique de la protéolyse.....	35
5. AGENTS ANTI-PROTÉASE.....	35
5.1 Stratégies pour la mise au point d'inhibiteurs.....	38
5.2 Essais cliniques à ce jour.....	38
6. MÉTHODES DE PRODUCTION DE LA PROTÉASE DU VIH-1.....	40
6.1 Protéase extraite de virions.....	40
6.2 Synthèse complète à l'aide d'un synthétiseur de peptides.....	40
6.3 Expression par des cellules eucaryotes.....	41
6.4 Expression par des cellules procaryotes.....	42
7. CONCLUSION ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	42

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
1. MATÉRIEL.....	45
2. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES.....	48
3. RÉSUMÉ DES PRINCIPALES ÉTAPES.....	48
4. CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION.....	52
4.1 Modification et amplification par RPC du gène de la protéase..	52
4.1.1 Amplification PRO-1.....	52
4.1.2 Amplification PRO-2.....	53
4.1.3 Amplifications FRA-50 et FRA-77.....	54
4.2 Sous-clonage dans le plasmide pT7T3 $\alpha$ 18 des produits d'amplification .....	54
4.3 Transformation dans <i>Escherichia coli</i> .....	57
4.4 Mini-extraction d'ADN plasmidique.....	58
4.5 Maxi-préparation d'ADN plasmidique.....	59
4.6 Extraction de la bande d'ADN d'un gel de polyacrylamide.....	60
4.7 Sous-clonage dans le vecteur d'expression pET-16b.....	61
5. INDUCTION DES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES.....	61
6. IMMUNOBUVARDAGE.....	65
7. PURIFICATION DES PRODUITS D'EXPRESSION.....	65
7.1 Purification des corps d'inclusion.....	65
7.2 Purification par chromatographie sur colonne de nickel-Sépharose.....	66

7.3 Purification par filtration sur gel de Séphadex G-75.....	67
7.4 Purification par affinité sur colonne de pepstatine A-agarose....	68
8. RENATURATION DE LA PROTÉASE.....	69
9. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	70
RÉSULTATS.....	71
1. Modification et amplification par RPC du gène de la protéase.....	72
2. Sous-clonage dans pT7T3 $\alpha$ 18.....	73
3. Sous-clonage dans pET-16b.....	79
4. Induction.....	87
5. Immunobuvardage.....	92
6. Purifications.....	93
7. Activité enzymatique.....	99
DISCUSSION.....	100
CONCLUSION.....	113
REMERCIEMENTS.....	115
BIBLIOGRAPHIE.....	117
ANNEXE I: Séquence nucléotidique de la protéase du VIH-1.....	126

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1	Données sur le criblage des différentes constructions dans le vecteur d'expression pET-16b.....	86
Figure 1	Schéma représentant le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (tiré de Arnold et Arnold, 1991).....	11
Figure 2	Schéma représentant le cycle réplcatif du VIH-1 dans les lymphocytes T (tiré de Vella, 1994).....	14
Figure 3	Schéma représentant l'organisation génomique du VIH-1 (tiré de Darlix, 1989).....	18
Figure 4	Schéma représentant la chaîne principale de la protéase du VIH-1 sous sa forme dimérique (tiré de Wlodawer et Erickson, 1993).....	29
Figure 5	Schéma représentant les interactions entre un substrat peptidique et les principaux résidus de la protéase du VIH-1 (tiré de Wlodawer et Erickson, 1993).....	32
Figure 6	Schéma illustrant le mécanisme du clivage protéolytique d'un substrat par la protéase du VIH-1 (tiré de Katz et Skalka, 1994).....	36
Figure 7	Amorces utilisées pour les amplifications par RPC.....	46
Figure 8	Schéma illustrant le produit d'expression des constructions plasmidiques effectuées.....	50
Figure 9	Carte représentant le vecteur multifonctionnel pT7T3 $\alpha$ 18....	55
Figure 10	Carte représentant le vecteur d'expression pET-16b.....	62
Figure 11	Produits d'amplification par RPC visualisés sur gel d'agarose.....	74
Figure 12	Profils de restriction obtenus après le sous-clonage des produits RPC dans le vecteur pT7T3 $\alpha$ 18.....	77

Figure 13	Profils de restriction obtenus après le sous-clonage des inserts dans le vecteur pET-16b.....	80
Figure 14	Exemple de criblage de la construction pU18.....	83
Figure 15	Expression des gènes d'intérêt par les constructions plasmidiques.....	88
Figure 16	Bactéries induites visualisées par microscopie électronique.	90
Figure 17	Analyse sur gel de polyacrylamide du produit de pPR3 purifié par chélation métallique.....	94
Figure 18	Analyse sur gel de polyacrylamide du produit de pPR3 purifié par filtration sur Séphadex G-75.....	97

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

3TC	3'-thiacytidine
ADCC	<i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
Ala	alanine (A)
Arg	arginine (R)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt <sup>lys</sup>	acide ribonucléique de transfert de la lysine
ARRRP	<i>AIDS Research and Reference Reagents Program</i>
ARV	<i>AIDS-associated retrovirus</i>
Asn	asparagine (N)
Asp	acide aspartique (D)
AZT	3'-azido-3'-déoxythymidine
CA	capside
Cys	cystéine (C)
D4T	2',3'-didéhydro-3'-déoxythymidine
DDC	2',3'-didéoxycytidine
DDI	2',3'-didéoxyinosine
ENV	enveloppe
FIC	facteur d'infectivité cellulaire

GAG	<i>group-specific antigen</i>
GP	glycoprotéine
Gly	glycine (G)
Gln	glutamine (Q)
HTLV	<i>human T-cell lymphotropic virus</i>
IgG	immunoglobuline de type G
Ile	isoleucine (I)
IN	intégrase
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>
Leu	leucine (L)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lys	lysine (K)
MA	matrice
Met	méthionine (M)
NC	nucléocapside
NEF	<i>negative regulatory factor</i>
NRE	<i>negative regulatory element</i>
Phe	phénylalanine (F)
POL	polymérase
Pro	proline (P)

PR	protéase
REV	<i>regulator of virion protein expression</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
Rnase H	ribonucléase H
RPC	réaction de polymérisation en chaîne
RRE	<i>rev responsive element</i>
RT	<i>reverse transcriptase</i>
Ser	sérine (S)
SIDA	syndrome de l'immunodéficience humaine
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SU	surface
TAR	<i>trans-activation responsive region</i>
TAT	<i>trans-activating transcriptional regulator</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
Thr	thréonine (T)
TM	transmembranaire
Tyr	tyrosine (Y)
Val	valine (V)
VIF	<i>virion infectivity factor</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VPR	<i>viral protein R</i>
VPU	<i>viral protein U</i>

## SOMMAIRE

La protéase joue un rôle primordial dans la maturation du virus de l'immunodéficience humaine, l'agent étiologique du SIDA. Cette enzyme est impliquée dans le clivage protéolytique des précurseurs polyprotéiques exprimés des gènes GAG et POL du VIH. L'inhibition de la protéase aboutirait à la formation de virions immatures non infectieux, donc incapables de compléter un nouveau cycle répliatif. Depuis quelques années, notre laboratoire a développé une expertise dans la synthèse d'inhibiteurs spécifiques à la protéase du VIH-1. De plus, le laboratoire s'intéresse également à l'étude des interactions protéase-inhibiteur par RMN. Cette technique nécessite d'importantes quantités de l'enzyme. Ces études portent également sur des fragments de la protéase. Bien que la protéase du VIH soit disponible commercialement, son coût très élevé justifie la mise au point d'un protocole de production et de purification efficace. De plus, les fragments de l'enzyme ne sont pas disponibles commercialement.

Le vecteur bactérien pET-16b de la compagnie Novagen a été utilisé pour l'expression de la protéase du VIH-1 sous forme de précurseurs polyprotéiques. Le gène de la protéase obtenu du NIH a d'abord été modifié par RPC puis sous-cloné dans le vecteur de propagation pT7T3 $\alpha$ 18 et enfin dans le vecteur pET-16b. La forme précurseur comporte une queue d'histidine en position N-terminale permettant sa purification en une seule étape par chromatographie par chélation métallique.

L'enzyme a également été purifiée par filtration sur gel Séphadex G-75.

Une des protéases exprimées possède un site d'autoclivage en position N-terminale éliminant la queue d'histidine. L'enzyme sous cette forme a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne pepstatine A-agarose. Ces différentes méthodes ont permis l'obtention de protéases partiellement purifiées. Par contre, les constructions pour les deux fragments de la protéase seront à préparer de nouveau à cause de problèmes avec les amorces utilisées pour l'amplification des séquences correspondantes.

Ce projet de recherche met en évidence l'efficacité de la technique de RPC combinée au clonage dans un vecteur multifonctionnel de type pT7T3 $\alpha$ 18. Par ailleurs, nos résultats soulignent les difficultés liées à l'expression et à la purification d'une protéine toxique dans un système bactérien, et montrent l'importance du choix du vecteur d'expression et de la souche bactérienne dans de telles conditions.

## **INTRODUCTION**

Le SIDA ou syndrome d'immunodéficience acquise est une maladie grave qui rend inopérant le système immunitaire de l'individu, le rendant susceptible à toutes sortes d'infections opportunistes habituellement non mortelles. Cette maladie est causée par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), un virus de la famille *Retroviridae*. À ce jour, la maladie est toujours incurable mais la recherche pour combattre le virus va bon train.

Cette famille de virus offre de nombreuses cibles potentielles dans son cycle réplicatif qui peuvent être exploitées pour ralentir ou bloquer la réplication virale. L'AZT, le DDI, le DDC et le 3TC, tous des analogues de nucléosides inhibant l'activité de la transcriptase inverse virale, sont les principaux agents thérapeutiques approuvés à ce jour pour soigner les sidéens. Bien que ces médicaments montrent une efficacité certaine à inhiber la réplication virale, leur efficacité est rapidement confrontée à l'émergence de variants viraux présentant une baisse de sensibilité à leur action. Ces agents présentent également une toxicité significative chez les patients ce qui empêche une utilisation prolongée ou à des concentrations optimales pour inhiber totalement la réplication virale.

La protéase du VIH est la seconde enzyme virale ciblée pour la mise au point d'agents thérapeutiques. Certains de ces agents sont en phase clinique avancée. Présentement, un seul agent anti-protéase, le Saquinavir, est approuvé pour usage clinique. Cependant, ces inhibiteurs sont également confrontés à l'émergence de souches virales résistantes surtout lorsqu'utilisés seuls. De plus, ces inhibiteurs ont

généralement une structure complexe, une faible biodisponibilité et un temps de demi-vie très court. Le développement de nouveaux types d'inhibiteurs plus simples et efficaces est donc important pour arriver à combattre efficacement l'infection virale. Notre laboratoire s'intéresse à ce domaine depuis quelques années et les recherches qui y sont effectuées exigent une source fiable d'approvisionnement en enzyme du VIH.

Dans ce mémoire, je présente un tour d'horizon sur ce que l'on sait du virus VIH et plus particulièrement sur la protéase virale, ainsi que d'une méthodologie expérimentale permettant d'obtenir la protéase du VIH-1 complète ou en fragments sous différentes formes, en utilisant un vecteur d'expression bactérien. L'enzyme obtenue servira aux tests enzymatiques des inhibiteurs développés au laboratoire et à des études d'analyse conformationnelle par résonance magnétique nucléaire de complexes enzyme-inhibiteurs.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. SIDA

### 1.1 Caractéristiques générales de la maladie

Le SIDA ou syndrome d'immunodéficience acquise est une maladie grave entraînant un effondrement majeur du système immunitaire. La maladie comme telle n'est pas mortelle mais laisse l'organisme vulnérable à toutes sortes d'infections par des microorganismes opportunistes comme le bacille de la tuberculose, le cytomégalovirus ou le parasite *Pneumocystis carinii* responsable de pneumonies graves. De plus, l'affaiblissement du système immunitaire s'accompagne souvent de sarcome de Kaposi ainsi que de divers lymphomes et d'autres formes de cancer (Rane *et al.*, 1994). Depuis les premiers signalements de cas d'immunodéficience au début des années 80, le nombre n'a cessé d'augmenter dangereusement et d'après certaines estimations, pourrait atteindre les 40 millions d'ici l'an 2000 au niveau mondial (Prusoff *et al.*, 1993). À ce jour, la maladie est toujours incurable et le patient atteint du SIDA survit rarement plus de deux ans après l'apparition des symptômes (Nowak et McMichael, 1995).

### 1.2 Identification de l'agent étiologique

Très rapidement après l'apparition des premiers cas, les milieux scientifiques et médicaux se sont mis à la recherche de l'agent étiologique du SIDA et dès le

début, une origine virale fut soupçonnée. En 1983, un premier rétrovirus a été isolé chez un patient atteint du SIDA, il fut nommé LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Au même moment, Gallo et collaborateurs ont isolé un virus chez un patient atteint d'immunodéficience qu'ils ont dénommé HTLV-III (*human T-cell leukemia virus*) d'une part pour son tropisme pour les lymphocytes T et d'autre part par analogie avec d'autres rétrovirus connus (Gallo *et al.*, 1983). Une autre équipe a isolé un virus dans des conditions similaires et qu'ils ont dénommé ARV (*AIDS-associated retrovirus*) (Levy *et al.*, 1984). Le nom de HIV ou en français de VIH (virus d'immunodéficience humaine) a été adopté officiellement en 1986 une fois que l'on a démontré qu'il s'agissait dans tous les cas du même virus (Coffin *et al.*, 1986). Au début de l'épidémie, le virus était d'abord localisé chez les populations homosexuelles, mais il s'est rapidement propagé par la suite dans tous les milieux urbains. Ce mouvement fut accéléré par les transfusions de sang contaminé, les contacts sexuels par les personnes à risque, l'immigration et par la transmission verticale mère-enfant (Hirsch et Curran, 1990). Deux familles de VIH ont été identifiées à ce jour soit le VIH-1 qui est le plus répandu dans les pays industrialisés et le VIH-2 détecté en 1986 et qui se localise principalement en Afrique de l'ouest (Clavel *et al.*, 1986). Ce dernier n'a que 50% d'homologie dans sa séquence nucléotidique avec le VIH-1 contre environ 80% avec le SIV, virus similaire affectant certains singes comme le *Sooty mangabey* et le singe vert (Tomasselli *et al.*, 1991). Bien que ces deux familles du VIH causent une immunodéficience, les pathologies causées par le VIH-2 sont moins nombreuses et de moindre intensité en plus de

s'accompagner d'une virémie plus faible (revues dans Levy, 1993).

Une fois l'agent étiologique identifié, beaucoup d'efforts furent mis de l'avant pour la lutte contre la propagation du virus tant au niveau du développement de vaccins et la prise de mesures publiques adéquates, que dans la mise au point de chimiothérapies antivirales (Hirsch et Curran, 1990).

### 1.3 Réponse immunitaire et développement de la maladie

Le système immunitaire répond normalement à la présence du VIH par l'apparition très tôt après l'infection d'une réponse humorale par des anticorps spécifiques à une variété de protéines virales et le développement d'une réponse cellulaire de type LTC (lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au VIH) ou de type ADCC (*antibody dependent cell mediated cytotoxicity*) dirigée contre les lymphocytes T et les macrophages infectés (Pantaleo et Fauci, 1995). Il s'en suit une lutte acharnée entre le virus et le système immunitaire qui peut durer des années (Koup et Ho, 1994, Nowak et McMichael, 1995), bien que l'expression virale d'une certaine proportion des cellules infectées demeure latente (Pantaleo et Fauci, 1995).

Pourtant l'organisme ne vient jamais à bout de l'infection, une des raisons majeures étant la déplétion des lymphocytes T CD4 auxiliaires. Ces derniers jouent un rôle direct ou indirect dans toutes les fonctions immunitaires et leur disparition entraîne l'état d'immunodéficience chez le sujet atteint (Fauci, 1988), et c'est cette

perte de compétence immunitaire de l'organisme qui l'expose à des infections opportunistes par des microorganismes, bactéries ou champignons (Nowak et McMichael, 1995). Par convention, le patient est atteint du SIDA lorsque son nombre de lymphocytes T CD4 tombe en dessous de 200 cellules par microlitre de sang contre environ 1000 chez un individu en santé (Nowak et McMichael, 1995).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la déplétion de cette population cellulaire. En premier lieu, la destruction directe des cellules infectées par lyse induite par le virus même, par apoptose (mort cellulaire programmée) ou par le système immunitaire par les réponses de type cellulaire ou humorale. En second lieu par la formation de syncytia (cellules géantes multinucléées) qui proviennent de l'agglomération des lymphocytes T causée par de multiples interactions entre les molécules CD4 et GP120 exprimées en grand nombre à la surface cellulaire (Fauci, 1988).

Une autre raison majeure de la défaite de l'organisme dans sa lutte contre le VIH est que le virus a une capacité exceptionnelle de muter ce qui entraîne une très grande variabilité dans la séquence nucléotidique du génome viral à l'intérieur d'un même individu (Saag *et al.*, 1988). En effet, la transcriptase inverse, l'enzyme virale responsable de la conversion de l'ARN viral en ADN, ne possède pas d'activité exonucléase capable de corriger ses erreurs de réplication. Ces modifications se manifestent principalement au niveau de la glycoprotéine de surface GP120 (Ratner, 1993). L'hétérogénéité dans la séquence nucléotidique entraîne une altération dans plusieurs activités biologiques du virus telles que son tropisme cellulaire, son taux de

réplication, sa cytopathogénicité ainsi que sa réponse aux anticorps neutralisants et aux thérapies antivirales (Ratner, 1993).

L'émergence de souches virales résistantes, d'abord observée chez les patients traités à l'AZT, a été retrouvée avec pratiquement tous les inhibiteurs de la réplication du VIH utilisés en clinique ou en cours d'étude (De Clercq, 1995). Ces médicaments perdent donc avec le temps leur efficacité à empêcher la réplication du virus.

## 2. VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH)

### 2.1 Caractéristiques générales des rétrovirus

Le VIH fait partie du genre *Lentivirinae* de la famille *Retroviridae*. Cette dernière se caractérise entre autres par l'utilisation d'une enzyme appelée transcriptase inverse qui a pour fonction de "rétrotranscrire" l'ARN viral en ADN pour permettre son incorporation dans le génome cellulaire. Le genre *Lentivirinae* inclut également les virus d'immunodéficience féline, bovine et simienne mais aussi des virus ovins ou caprins causant des encéphalites ou de l'arthrite chez ces animaux. Ce genre est caractérisé par une progression lente vers la maladie après l'infection (*lenti* signifie lent en latin).

Le génome du VIH partage plusieurs points communs à tous les rétrovirus. Ainsi, il est composé de deux copies d'ARN simple brin à polarité positive qui sont

flanquées par deux LTR (*long terminal repeat*) identiques à chaque extrémité. Ces LTR se divisent en trois parties: la région U3 porte la séquence promoteur reconnue par l'ARN polymérase II cellulaire ainsi que des séquences activateurs et répresseurs de la transcription (Haseltine, 1992), une région R codant pour le site de fixation TAR (*TAT binding region*) de la protéine TAT et une région U5 (Ratner, 1993). Les protéines structurales (gènes GAG et ENV) et enzymes virales (gène POL) sont codées sous forme de précurseurs polyprotéiques. Le génome code également pour plusieurs protéines accessoires ou de régulation (6 pour le VIH-1) dont nous verrons le rôle dans la prochaine section.

## 2.2 Structure du virion

La figure 1 est un schéma représentant le virus VIH-1. Le virion du VIH est une particule sphérique d'environ 80 à 100 nm de diamètre enveloppée d'une couche bilipidique acquise au moment du bourgeonnement à la surface cellulaire. Sous l'enveloppe se trouve la matrice composée de la protéine virale P17 (MA), produit du gène GAG. Une capsidie en forme de cylindre tronqué et composée de la protéine P24 (CA), également un produit du gène GAG, renferme le génome viral composé de deux brins d'ARN d'environ 9,7 kb (revues de Ratner, 1993 et Kraiselburd, 1994). Le gène GAG code également pour deux protéines nucléocapsidiques P7 et P9 (NC) qui sont associées aux deux copies d'ARN viraux. Les enzymes virales soit la protéase (P11), la transcriptase inverse-RNase H (P66 et P51) et l'intégrase (P32)

Figure 1: Schéma représentant le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (tiré d'Arnold et Arnold, 1991).

MA: matrice

CA: capsid

NC: nuclécapsid

SU: glycoprotéine de surface (GP120)

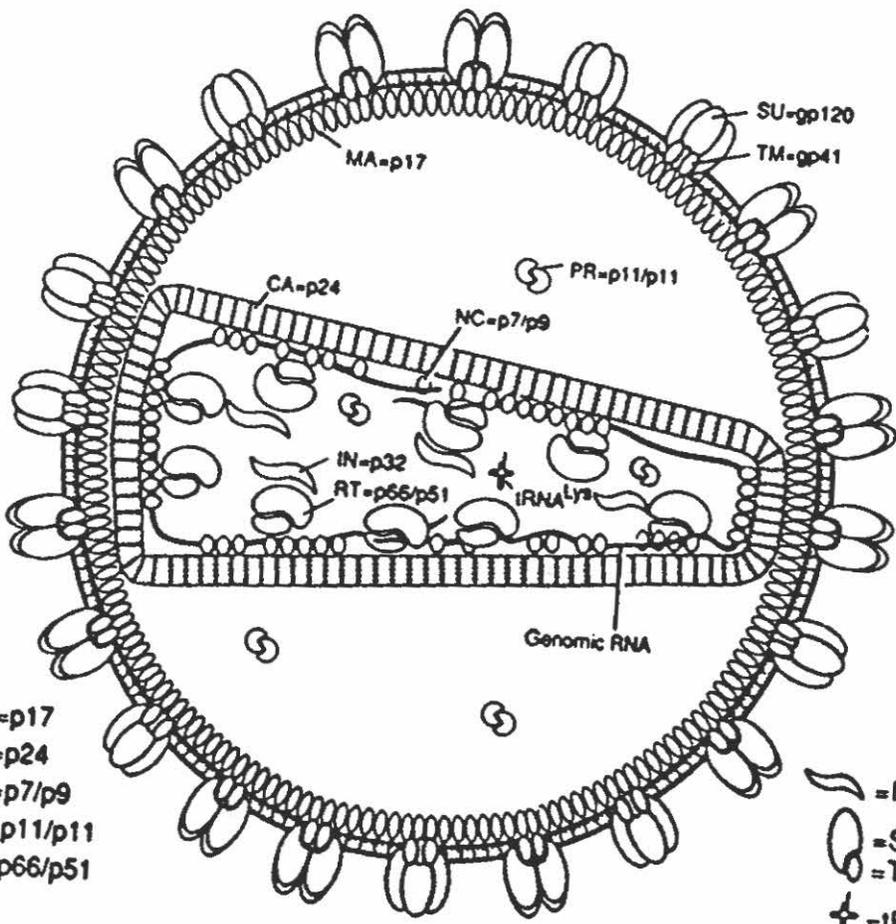
TM: glycoprotéine transmembranaire (GP41)

PR: protéase

RT: transcriptase inverse

IN: intégrase

*Genomic RNA*: ARN viral



-  = MA=p17
-  = CA=p24
-  = NC=p7/p9
-  = PR=p11/p11
-  = RT=p66/p51

-  = IN=p32
-  = SU=gp120
-  = TM=gp41
-  = IRNA Lys

provenant toutes du gène POL se trouvent dans la capsid virale. Le gène ENV code pour deux protéines associées à l'enveloppe soit une protéine transmembranaire GP41 (TM) à laquelle est associée de façon non covalente la GP120 qui sert de ligand au récepteur CD4. Des protéines HLA-Dr de classes I et II (CD44 ou LFA1) d'origine cellulaire sont également présentes sur l'enveloppe (Orentas et Hildreth, 1993). La particule infectieuse contient également la protéine VPR qui est impliquée dans la réplication virale.

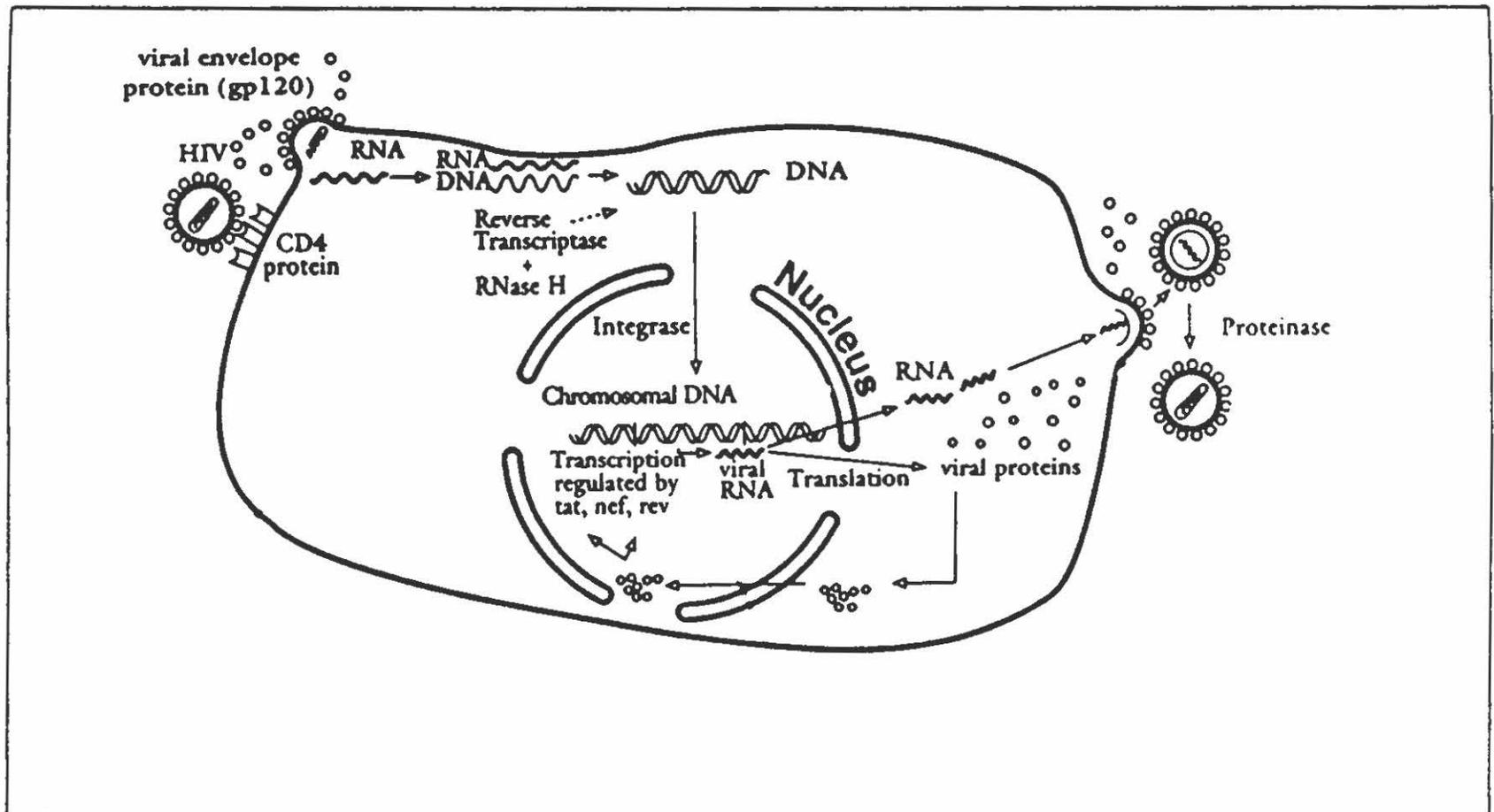
## 2.3 Cycle de réplication viral

### 2.3.1 Adsorption du virion sur le récepteur CD4

La figure 2 représente de façon simplifiée le cycle répliatif du VIH. La première étape est l'attachement avec une très haute affinité de la protéine de surface GP120 au récepteur CD4 présent principalement sur les lymphocytes T auxiliaires mais également sur les macrophages, monocytes et les cellules dendritiques (Hirsch et Curran, 1990). Cette étape d'attachement entraîne un changement conformationnel dans la GP120, clivage de celle-ci au niveau de la boucle V3 par des protéases de type trypsine exprimées au niveau de la membrane cellulaire ce qui entraîne l'internalisation de la nucléocapside par fusion membranaire de l'enveloppe (Levy *et al.*, 1993). Il est à noter que la présence d'un facteur d'infectivité cellulaire (FIC) encore inconnu est également nécessaire car il a été

Figure 2: Schéma représentant le cycle répliatif du VIH-1 dans les lymphocytes T (tiré de Vella, 1994).

## CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH-1



démontré que la molécule CD4 seule n'est pas suffisante pour l'internalisation du virion (Haseltine, 1992).

### 2.3.2 Rétrotranscription et intégration du génome viral

Après digestion partielle de la capside possiblement par la protéase virale, l'ARN du virus est par la suite "rétrotranscrit" en ADN par la transcriptase inverse-RNase H. Un ARN de transfert, l'ARNt<sup>lys</sup>, est présent dans le virion et sert d'amorce pour la transcription (Darlix, 1989). Le lymphocyte T doit être en état activé pour que la rétrotranscription puisse être complète. La molécule d'ADN double brin nouvellement synthétisée se complexe avec l'intégrase et migre au noyau pour être intégrée au hasard dans un chromosome cellulaire par l'intégrase. On appelle provirus le génome viral intégré.

### 2.3.3 Transcription et traduction des gènes viraux

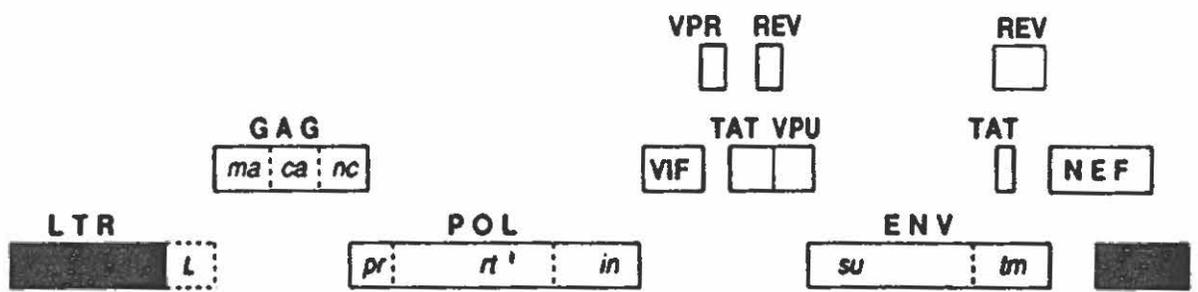
L'expression des gènes viraux se fait sous forme de trois groupes d'ARN messagers différents: un groupe d'ARNm précoces de 1,8 kb codant pour les protéines de régulation TAT, REV et NEF, un ARNm épissé une fois de 4,3 kb codant pour le gène ENV et un ARNm non épissé d'environ 9-10 kb codant pour les gènes GAG et POL. Ces messagers sont traduits sous forme de précurseurs polyprotéiques soit Pr160<sup>env</sup>, Pr55<sup>gag</sup> et Pr160<sup>gag-pol</sup> correspondant aux gènes ENV, GAG et GAG-

POL respectivement. Le précurseur GAG-POL de 160 kD se forme à la suite d'un changement de cadre de lecture des ribosomes cellulaires qui se produit sur un triplet spécifique en amont du gène POL dans environ 5 à 10 % des traductions du messager (Jacks *et al.*, 1988). Tous les ARNm transcrits possèdent la séquence TAR du LTR reconnue par la protéine TAT et dont nous reparlerons dans une prochaine section. La figure 3 représente l'organisation génomique du VIH-1.

#### 2.3.4 Assemblage et libération du virion

Des enzymes cellulaires effectuent les transformations post-traductionnelles telles que la méristylation pour les précurseurs des gènes GAG et GAG-POL et la glycosylation du précurseur provenant du gène ENV. Les précurseurs Pr160<sup>env</sup> sont glycosylés en GP160 puis clivés en GP120 et GP41 par la protéase cellulaire furine (Hallenberger *et al.*, 1992), et ces dernières sont ensuite transportées au niveau de la membrane cytoplasmique (Ratner, 1993). L'ARNm viral non épissé correspondant au génome complet contient une séquence Psi (*packaging sequence*) importante pour son incorporation dans le virion bourgeonnant. Cette séquence Psi est localisée sur l'ARN viral à proximité du site d'initiation de la traduction du précurseur de la capsid (Haseltine, 1992). Cette séquence est enlevée lors de l'épissage des autres ARNm ce qui explique l'absence

Figure 3: Schéma représentant l'organisation génomique du VIH-1 (tiré de Darlix, 1989).



des autres précurseurs dans les virions (Haseltine, 1992). Cette séquence est aussi impliquée dans la dimérisation du génome (Ratner, 1993).

Les précurseurs polyprotéiques Pr55<sup>gag</sup> et Pr160<sup>gag-pol</sup> méristylés ainsi que deux copies d'ARNm viraux non épissés se rassemblent à la surface cellulaire en se fixant probablement sur un récepteur de haute affinité pour la queue méristylée ce qui entraîne, avec la participation de la protéine VIF, le bourgeonnement de la membrane et le relâchement de la particule virale dans le milieu (Ratner, 1993).

### 2.3.5 Maturation du virion

La maturation du virion s'effectue au moment même et/ou après le bourgeonnement (Kaplan *et al.*, 1994) par la protéase virale qui s'autoclive du précurseur Pr160<sup>gag-pol</sup> en formant un dimère actif avant de cliver les autres précurseurs en reconnaissant des séquences spécifiques au niveau des acides aminés. Les observations par microscopie électronique du bourgeonnement viral ont démontré que l'assemblage final du virion s'effectue après le relâchement de la particule (Gonda *et al.*, 1985). Le virion mature est prêt à infecter d'autres cellules et à compléter un nouveau cycle de réplication.

## 2.4 Gènes de régulation précoces

La protéine TAT (*trans-activating transcriptional regulator*) de 15-16 kD est exprimée dès le début de l'expression virale et son rôle consiste à stimuler la transcription de tous les ARNm viraux en se fixant sur la séquence TAR (*trans-activation responsive element*) des ARNm (Kraiselburd, 1995). TAT réprime également l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ce qui pourrait permettre à la cellule infectée d'échapper aux mécanismes de défense du système immunitaire de type cellulaire (Trono, 1995).

La protéine REV (*regulator of virion protein expression*) de 20 kD est concentrée dans le noyau et favorise le transport des ARNm non épissés ou épissés une seule fois du noyau au cytoplasme en se liant à une séquence appelée RRE (*REV responsive element*) présente dans le gène ENV (Kraiselburd, 1995). Elle est également responsable du passage de la phase précoce à la phase tardive de l'expression virale et contrôle l'accumulation d'ARNm épissés dans le cytoplasme (Kraiselburd, 1995).

NEF (*negative factor*), une protéine de 25-27 kD, est associée à la membrane cytoplasmique et elle a pour effet de stimuler l'internalisation et la dégradation des molécules CD4 (régulation négative). Elle altère également l'activation des lymphocytes T en bloquant les signaux intracellulaires du TCR (Trono, 1995). Elle peut également stimuler l'infektivité virale au niveau de la synthèse de l'ADN proviral en agissant possiblement sur la transcriptase inverse (Trono, 1995).

Son rôle dans la régulation négative de la réplication est encore controversé.

## 2.5 Gènes de régulation tardifs

La protéine membranaire VPU (*viral protein U*) de 15 kD exprimée seulement chez le VIH-1 est également impliquée dans la régulation négative du récepteur CD4 ce qui permet d'éviter la surinfection virale mais aussi l'initiation de l'apoptose où le récepteur CD4 joue un rôle important (Kraiselburd, 1995). De plus, elle stimule le transport cellulaire et la maturation du précurseur Pr160<sup>env</sup>. Enfin, elle favorise aussi le relâchement des virions à la surface des cellules en agissant sur le transport cellulaire des précurseurs (Trono, 1995).

VIF (*viral infectivity factor*) est une protéine de 23 kD qui agit au niveau de l'assemblage du virion au niveau de la membrane cytoplasmique pour permettre la formation de particules complètes (Trono, 1995). Elle jouerait également un rôle très tôt dans la réplication virale par un mécanisme encore inconnu.

La protéine VPR de 15 kD (*viral protein R*), est présente dans le virion et joue un rôle fondamental en liant le complexe intégrase-ADN viral aux voies de transport nucléaire (Kraiselburd, 1995). Sa présence dans le virion semble indiquer qu'elle serait impliquée dans les premières étapes de la réplication virale en stimulant la rétrotranscription ou en stabilisant les complexes ARN-ADN et ADN-ADN (Subbramanian et Cohen, 1994). La protéine VPX, codée seulement chez le VIH-2 est une protéine très semblable à VPR et joue les mêmes rôles (Kraiselburd, 1995).

Enfin, TEV, un produit de fusion des gènes TAT et REV, est une protéine virale mais son rôle est inconnu.

### 3. STRATÉGIES ANTI-VIH

#### 3.1 Mise au point de vaccins

La vaccination est un moyen de prévention important pour éviter la propagation d'un virus dans la population. Dans le cas du VIH, la mise au point d'un vaccin efficace exige le développement de nouvelles stratégies d'approche (revue dans Lévy, 1995). En effet, contrairement à d'autres vaccins connus et mis au point contre certains virus comme l'influenza, le VIH ne peut être utilisé sous sa forme atténuée. On ne peut pas non plus garantir l'inactivation complète de tous les virions dans une préparation, ce qui complique l'élaboration d'un vaccin de type inactivé. En outre, le virus est capable d'infecter certaines cellules du système nerveux central difficilement accessibles par les mécanismes de la défense immunitaire, en plus de s'intégrer dans le génome cellulaire des cellules infectées. Finalement, la très grande variabilité du virus rend très complexe la mise au point d'un vaccin efficace contre tous les variants possibles (Lévy, 1995).

#### 3.2 Chimiothérapie

Tel que mentionné précédemment, le cycle répliatif du VIH offre de nombreuses cibles potentielles pour la mise au point d'agents antiviraux. Une revue des cibles et des stratégies employées dans la lutte contre le virus du SIDA est présentée dans cette section.

### 3.2.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse

Après l'observation de la présence de la transcriptase inverse dans tous les rétrovirus et son absence dans la cellule eucaryote, cette enzyme a été la première cible logique pour le développement d'inhibiteurs. L'AZT (zidovudine), un analogue de nucléoside de la thymidine, a été le premier inhibiteur employé dans la thérapie anti-VIH en 1987. Par la suite, d'autres inhibiteurs tels que le ddl (didanosine), le ddC (zalcitabine) et le D4T (stavudine), tous des analogues de nucléosides anti-transcriptase inverse ont été développés et sont utilisés en thérapie (Neuzil, 1994). D'autres analogues, comme le 3TC (3'-thiacytidine) développé par Biochem Pharma en collaboration avec Glaxo-Wellcome a reçu tout récemment l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) pour l'utilisation en clinique.

Cependant l'efficacité de tous ces analogues, dont certains sont toxiques pour l'hôte en inhibant probablement des polymérase cellulaires est confrontée à l'apparition de souches résistantes quelques mois seulement après le début du traitement. Les études ont démontré la présence de mutations dans la transcriptase inverse bien identifiées et qui apparaissent dans un ordre déterminé (revues dans

Mellors *et al.*, 1994). La toxicité représente aussi un problème important et a été bien étudiée dans le cas des traitements avec l'AZT (Larder *et al.*, 1989; Larder et Kemp, 1989).

Des recherches sont également en cours sur la mise au point d'inhibiteurs non nucléosides qui bloqueraient directement l'enzyme (revues dans De Clerck, 1995).

### 3.2.2 Inhibiteurs d'autres enzymes du VIH-1

L'intégrase est une autre cible de choix car le génome viral doit absolument être intégré dans le génome du lymphocyte T pour être exprimé. La structure du domaine catalytique de l'intégrase du VIH en trois dimensions vient d'être élucidée par cristallographie à rayons X (Dyda *et al.*, 1994) et des inhibiteurs sont en développement (Burke *et al.*, 1994, Lee-Huang *et al.*, 1995).

Le développement d'inhibiteurs de la RNase H du VIH est problématique car il existe des ribonucléases H importantes d'origine cellulaire. Par conséquent, peu d'études sont effectuées dans le cas de cette enzyme.

La protéase du VIH est particulièrement intéressante et prometteuse pour la thérapie antivirale. De nombreux inhibiteurs de la protéase du VIH sont présentement en essai clinique et seront discutés en détails dans la section 5. C'est sur cette dernière enzyme que notre laboratoire se concentre dans le développement de nouvelles drogues pouvant bloquer son activité.

### 3.2.3 Autres types d'inhibiteurs

Une autre cible intéressante pour la thérapie anti-VIH est la protéine TAT. Certains dérivés benzodiazépines ont démontré un potentiel inhibiteur de la réplication virale. Néanmoins les premiers tests cliniques ont été décevants; la recherche continue sur d'autres classes de molécules (revue de Rane *et al.*, 1994).

Des molécules CD4 solubles seules ou couplées à différents types de toxines ont démontré un potentiel anti-VIH prometteur. En effet, le CD4 inhibe par compétition la liaison entre la GP120 et le CD4 présent à la surface cellulaire (Chamow *et al.*, 1992).

Des segments d'ADN ou d'ARN antisens ou des oligonucléotides chimiquement modifiés ont été produits pour inhiber la traduction des ARNm viraux (Bodao, 1995). Ces molécules ont été dirigées contre le site d'épissage de l'ARNm codant pour la protéine TAT, la protéine REV ou contre le gène GAG et beaucoup d'autres sites (Zelphati *et al.*, 1994).

Des études ont également porté sur des substances pouvant affecter le transport au noyau du complexe intégrase-ADN viral en interférant dans l'interaction entre la protéine VPR et son site de reconnaissance présent dans la protéine de la matrice virale (MA) (Dubrovsky *et al.*, 1995). On a aussi identifié des composés pouvant bloquer l'interaction entre la protéine REV et son site d'action RRE présent sur les ARNm viraux (Rane *et al.*, 1994).

Il existe plusieurs autres stratégies anti-VIH telles que des inhibiteurs de 1)

l'adsorption virale au niveau de la membrane cellulaire au moment de l'infection par des composés polyanioniques; 2) de la fusion cellule-virus par des lectines, polypeptides et dérivés d'acides bétuliniques, et 3) de la fusion/décapsidation virale par des dérivés bicyclamés (revues dans De Clerck, 1995). Des inhibiteurs de la méristylation ou de la glycosylation, notamment contre la glucosidase I responsable de la glycosylation des précurseurs viraux, ont également été étudiés mais étant donné leur non spécificité contre le virus, ces derniers n'ont pas un avenir très prometteur (De Clerck, 1995).

#### 4. PROTÉASE DU VIH-1

##### 4.1 Caractéristiques générales

La protéase du VIH-1 fait partie, comme la pepsine et la rénine, de la classe des protéases à acide aspartique qui sont caractérisées par la présence d'un triplet conservé au site actif soit l'Asp-Thr-Gly et par la susceptibilité à l'inhibiteur pepstatine (Katz et Skalka, 1994). Les protéases du VIH-1 et du VIH-2 sont formées toutes les deux de 99 acides aminés mais ne partagent que 47,5% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés (Sánchez-Pescador *et al.*, 1985 Guyader *et al.*, 1987). La protéase du VIH-1, sous sa forme active, se caractérise par:

- la formation d'un homodimère de deux fois 99 acides aminés, présentant un axe de symétrie d'ordre 2 ( $C_2$ ), et où chaque sous-unité de 11 kDa fournit

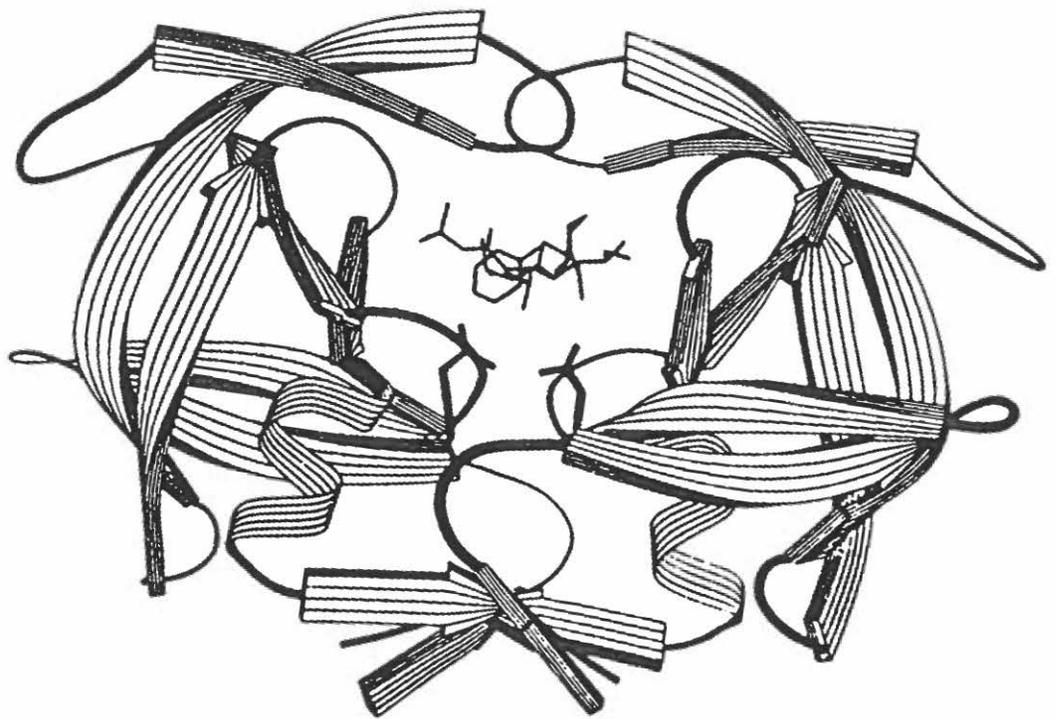
- un acide aspartique au site actif;
- la juxtaposition des extrémités N- et C-terminales des deux monomères, permettant la liaison des deux sous-unités;
- la présence d'un repliement peptidique mobile et symétrique pour chaque sous-unité qui se rabat sur le substrat pour assurer une meilleure interaction et une plus grande stabilité du complexe protéase-substrat;
- l'interaction avec un minimum de 7 acides aminés pour assurer le clivage du lien peptidique du substrat;
- une activité protéolytique optimale à un pH de 5 à 6 mais réduite à pH 7 (Grinde *et al.*, 1992).

La figure 4 présente une visualisation de la chaîne principale de la protéase du VIH-1 complexée avec un inhibiteur dans son site actif. Plusieurs analyses de structures tridimensionnelles de la protéase du VIH-1 ont été effectuées grâce à plus de 350 études de cristallographie aux rayons X de l'enzyme seule ou complexée avec un inhibiteur (revue de Wlodawer et Herickson, 1993). Ces analyses structurales ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction protéase-inhibiteur au site actif en vue de préparer de puissants inhibiteurs de petite taille. Le remplacement par mutagenèse dirigée de l'acide aspartique en position 25 (Asp<sup>25</sup>) par un autre acide aminé abolit totalement l'activité enzymatique (Volker, 1993). La mutagenèse complète des 99 acides aminés de la protéase a d'ailleurs été effectuée ce qui a

Figure 4: Schéma représentant la chaîne principale de la protéase du VIH-1 sous sa forme dimérique (tiré de Wlodawer et Erickson, 1993).

L'enzyme représentée est complexée avec un inhibiteur dans son site actif. Le schéma montre aussi:

- dans la partie du bas: les régions N- et C-terminales responsables de la dimérisation;
- dans la cavité centrale: le site actif de l'enzyme;
- dans la partie supérieure: les repliements qui se rabattent pour favoriser les interactions substrat-protéase.



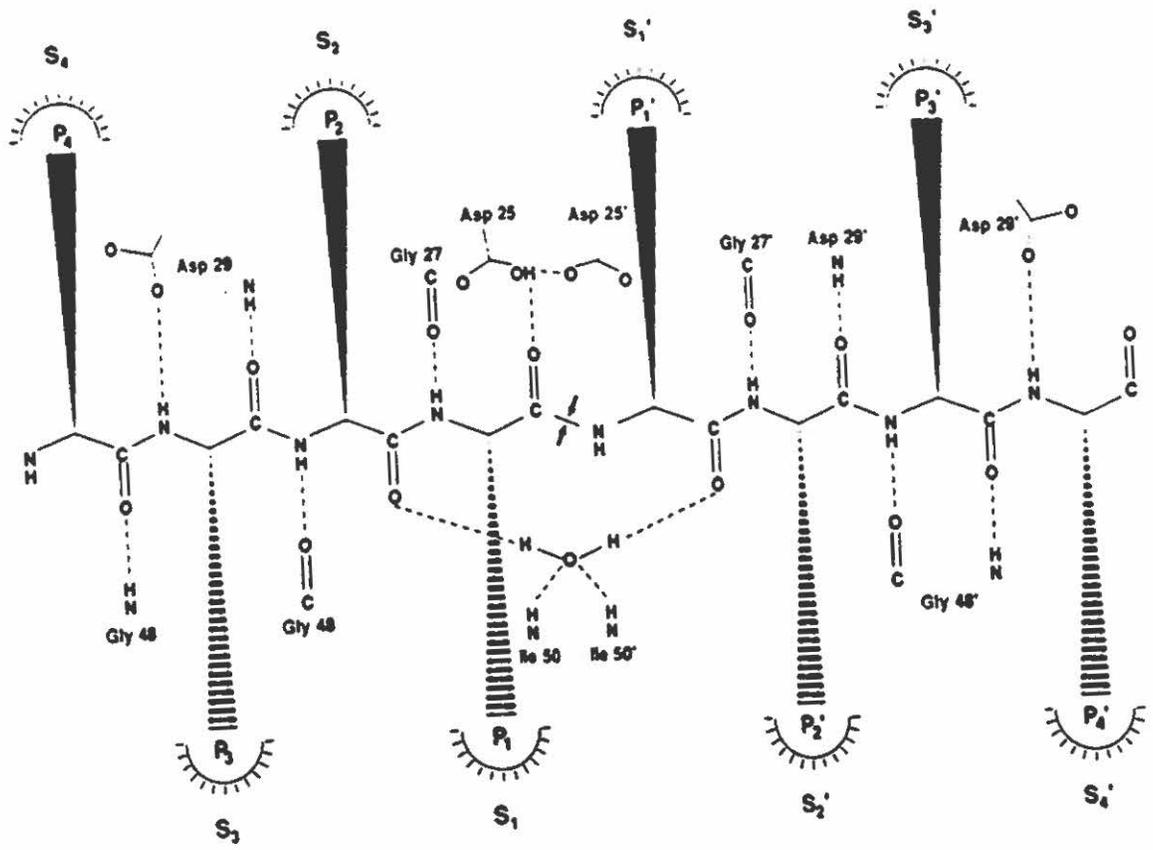
permis d'identifier les résidus importants pour l'activité catalytique et pour l'interaction avec le substrat (Loeb *et al.*, 1989a). Les auteurs ont observé que trois régions sont très sensibles à la mutation, soit les résidus 22 à 33 se trouvant dans ou à proximité du site actif de l'enzyme, les résidus 48 à 53 correspondant au repliement, et les résidus 75 à 90 qui interagissent avec le substrat.

#### 4.2 Rôle de la protéase dans le cycle de réplication

Tel qu'énoncé précédemment, la protéase est responsable de la maturation des précurseurs Pr<sup>55gag</sup> et Pr160<sup>gag-pol</sup> en protéines fonctionnelles au moment du bourgeonnement ou peu après. En effet, le clivage protéolytique des précurseurs avant le bourgeonnement pourrait entraîner la diffusion des protéines virales dans le cytoplasme et la formation de virions incomplets. De plus, la protéase du VIH exprimée à l'aide de constructions dans la cellule entraîne la mort de celle-ci, présumément par dégradation protéolytique de diverses protéines cellulaires (Poorman *et al.*, 1991). L'activation de la protéase se ferait par l'aggrégation des précurseurs Pr160<sup>gag-pol</sup> au site de bourgeonnement ce qui conduirait à la formation de dimères des précurseurs protéolytiques suivie d'un clivage intramoléculaire libérant l'enzyme (Grasberg *et al.*, 1986, Navia et McKeever, 1990). Aucune protéase cellulaire clivant les précurseurs peptidiques du VIH n'a été rapportée.

Figure 5: Schéma représentant les interactions entre un substrat peptidique et les principaux résidus au site actif de la protéase du VIH-1 (tiré de Wlodawer et Erickson, 1993).

Le substrat est représenté par la chaîne peptidique au centre du site actif de l'enzyme. Les flèches indiquent le lieu du clivage protéolytique du substrat à proximité de l'Asp<sup>25</sup>. Les lettres P1, P1', P2, etc., représentent les chaînes latérales des résidus du substrat. Les lettres S1, S1', S2, etc., représentent les cavités dans le site actif de l'enzyme. Les pointillés représentent les interactions (ponts hydrogène) entre les résidus de la protéase et ceux du substrats.



### 4.3 Spécificité de la protéase

La protéase reconnaît avec une grande affinité des séquences de 7 à 10 acides aminés présentes dans les précurseurs (Pettit *et al.*, 1993). La spécificité dépend des acides aminés généralement hydrophobes présents ainsi que de leur position désignée P1 à P4 en partant du point de clivage vers la partie N-terminale, et P1' à P4' en allant vers l'extrémité C-terminale. Les cavités occupées par les chaînes latérales sont désignées par S et S' de la même façon. La figure 5 illustre les interactions entre un substrat peptidique et la protéase. On remarque une nette préférence pour des acides aminés hydrophobes en P1 (tels que Phe ou Pro) et la présence presque systématique de Glu ou Gln en P2'. Globalement, ce sont les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés du substrat et les cavités dans le site actif de l'enzyme qui déterminent la spécificité de l'enzyme (revue dans Pettit *et al.*, 1993). La protéase reconnaît donc huit sites de clivage avec une affinité élevée pour permettre la maturation rapide du virion mais peut cliver à d'autres endroits avec moins d'affinité. L'enzyme pourrait par exemple être impliquée dans une digestion partielle de la capsidie pour libérer le matériel génétique viral dans le cytoplasme cellulaire (Roberts *et al.*, 1991). La protéase est aussi susceptible à l'autodigestion en trois sites majeurs soit entre Leu<sup>5</sup> et Trp<sup>6</sup>, Leu<sup>33</sup> et Glu<sup>34</sup>, et Leu<sup>63</sup> et Ile<sup>64</sup> ou Pro<sup>63</sup> et Val<sup>64</sup> (Mildner *et al.*, 1994). La protéase, sous sa forme dimérique, est relativement résistante à l'autolyse mais elle se trouve en équilibre avec sa forme monomérique ou non repliée qui est plus susceptible à l'autodégradation (Mildner *et*

*al.*, 1994). Des protéases mutantes pourraient avoir une spécificité altérée par rapport à l'enzyme sauvage (Pettit *et al.*, 1993).

#### 4.4 Mécanisme enzymatique de la protéolyse

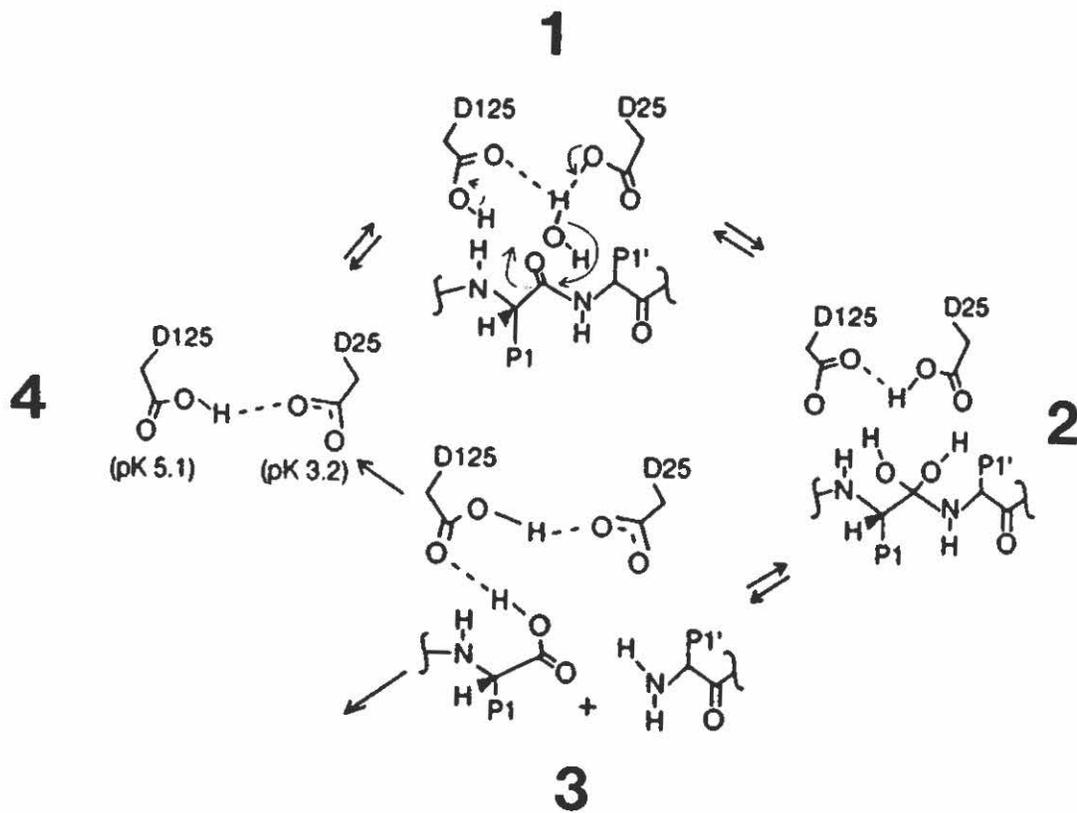
La figure 6 illustre le mécanisme enzymatique du clivage protéolytique impliquant le résidu aspartique Asp<sup>25</sup> de chacune des deux sous-unités de la protéase. Une fois que le polypeptide s'est inséré dans le site actif de l'enzyme, le repliement de chaque sous-unité se referme sur le substrat pour stabiliser le complexe catalytique. Le clivage au niveau de la liaison peptidique se fait par l'interaction simultanée d'un acide aspartique au site actif avec une molécule d'eau et le substrat (figure 6, étape 1). Ceci conduit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique de type amide hydratée lequel se décompose en entraînant le clivage du lien carbone-azote (figure 6, étape 2) (Katz et Skalka, 1994). Chaque moitié des produits formés reste attachée de façon transitoire à un monomère de l'enzyme et la souplesse de la structure enzymatique facilite ensuite la libération des produits (figure 6, étape 3). L'enzyme retourne à son état initial (figure 6, étape 4).

## 5. AGENTS ANTI-PROTÉASE

Sans l'intervention de cette activité protéolytique, des particules virales non infectieuses sont produites. Par conséquent, la protéase du VIH est une cible

Figure 6: Schéma illustrant le mécanisme du clivage protéolytique d'un substrat peptidique par la protéase du VIH-1 (tirée de Katz et Skalka, 1994). D25 et D125 représentent les résidus Asp<sup>25</sup> de chacune des deux sous-unités de la protéase, responsables de l'activité catalytique.

- 1) Interaction simultanée d'un acide aspartique au site actif avec une molécule d'eau et le substrat.
- 2) Formation d'un intermédiaire tétraédrique.
- 3) Libération des produits.
- 4) Retour à l'état initial de l'enzyme.



attractive pour la chimiothérapie antivirale.

### 5.1 Stratégies dans la mise au point d'inhibiteurs

D'abord inspirée des travaux sur la rénine et la pepsine, la recherche s'est rapidement orientée vers la synthèse d'analogues du substrat peptidique de la protéase du VIH où le lien peptidique P1-P1' est remplacé par un lien non hydrolysable. Cependant, ces premiers inhibiteurs, de par leur taille relativement importante ou par leur complexité certaine, nécessitent de nombreuses étapes de synthèses qui affectent le rendement et le coût de production de façon significative. De plus, ces inhibiteurs ont jusqu'à maintenant démontré une faible biodisponibilité due à la taille élevée des molécules et un temps de demi-vie très court dans la circulation sanguine présumément à cause de leur susceptibilité à des peptidases de l'organisme. En conséquence, la recherche sur la mise au point d'inhibiteurs non-peptidique ou peptido-mimétiques est cruciale pour le développement de drogues potentielles et efficaces (Rane *et al.*, 1994). Des études sur des molécules dites peptido-mimétiques ont démontré que des tri- et térapeptides mimétiques sont suffisants pour bloquer efficacement l'activité enzymatique.

### 5.2 Essais cliniques à ce jour

Depuis la démonstration du rôle essentiel que joue la protéase dans le cycle

réplicatif du virus VIH, beaucoup d'efforts ont été mis de l'avant pour la mise au point d'inhibiteurs efficaces. Étant donné que la protéase du VIH est très différente des protéases cellulaires, des inhibiteurs spécifiques à l'enzyme virale devraient causer peu d'effets toxiques, et même être dépourvus d'effets secondaires (Stone, 1995). Au moins sept compagnies pharmaceutiques conduisent des essais cliniques avec des inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Le plus avancé est l'Invirase (ou Saquinavir) développé par Hoffmann-La Roche qui a été récemment approuvé par la FDA. Vertex, en collaboration avec Glaxo-Wellcome, a développé le VX-478, un nouveau type d'inhibiteur non peptidique qui a montré des résultats cliniques en phase I encourageants et vient d'entrer en phase II (Borman, 1995). Selon les premiers résultats, l'émergence de souches résistantes serait retardée par rapport aux autres inhibiteurs. Le Crixivan (Indinavir) de Merck, l'ABT-538 (Ritonavir) de Abbott et l'AG1343 de Agouron sont aussi actuellement en essais cliniques. Malgré une baisse initiale significative de la virémie par le traitement avec la plupart de ces inhibiteurs, les patients sont rapidement confrontés à l'émergence de souches résistantes du virus. Plusieurs cas de résistance en clinique et *in vitro* ont été rapportés seulement quelques semaines après le début du traitement. Les études ont démontré la présence de mutations au niveau de la séquence en acides aminés de la protéase (revues dans Winslow *et al.*, 1995; Mellors *et al.*, 1994). Leur utilisation est plutôt envisagée dans une thérapie multiple en combinant ces composés ou en présence d'autres médicaments anti-VIH. D'ailleurs, le Saquinavir a été approuvé pour l'utilisation combinée avec l'AZT. C'est aussi vers l'utilisation de combinaisons ou

“cocktails” d’inhibiteurs que le traitement des patients se dirige actuellement.

## 6. MÉTHODES DE PRODUCTION DE LA PROTÉASE DU VIH-1

La mise au point d'agents anti-protéase, de même que les études structurales et enzymatiques nécessitent de l'enzyme en qualité et en quantité suffisante. Bien que la protéase du VIH-1 soit disponible commercialement, son coût prohibitif empêche les études d'envergure. La littérature fait mention de plusieurs procédés pour l'obtention de la protéase.

### 6.1 Protéase extraite de virions

Lillehoj et coll. (1988) ont purifié de petites quantités de protéase en récoltant les virions produits par une culture cellulaire infectée par le virus VIH. Bien que cette méthode donne la protéase la plus naturelle possible, son très faible rendement et les dangers occasionnés par la manipulation de matériel hautement infectieux rendent cette méthode inappropriée. De plus, la protéase obtenue par les auteurs était inactive.

### 6.2 Synthèse complète à l'aide d'un synthétiseur de peptides

La protéase du VIH-1, avec ses 99 acides aminés, est parmi les plus petites

enzymes connues et du fait qu'elle n'est pas glycosylée ou modifiée de façon post-traductionnelle, elle peut être synthétisée en phase solide. Au moins quatre laboratoires ont rapporté la synthèse complète de la protéase effectuée à l'aide d'un synthétiseur de peptides (Louis *et al.*, 1989, Schneider et Kent, 1988, Nutt *et al.*, 1988, Copeland et Oroszlan, 1988). L'enzyme obtenue possède une activité identique à la protéase naturelle pouvant convenir pour les tests enzymatiques d'inhibiteurs ou pour des études cristallographiques. Néanmoins les coûts de production en terme de réactifs, solvants ultra-purs, produits de départ activés, etc., s'élèvent très rapidement et l'efficacité globale est limitée par le rendement de couplage des acides aminés individuels qui, malgré qu'il soit voisin de 99 %, entraîne un rendement global d'environ 1% sur une centaine d'acides aminés.

### 6.3 Expression par des cellules eucaryotes

Les systèmes d'expression utilisant des cellules eucaryotes présentent l'avantage d'effectuer les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation ou la méristylation. Bien que la protéase du VIH n'a pas besoin de telles modifications, un laboratoire a utilisé des vecteurs d'expression dans des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Pichuantes *et al.*, 1989 et 1990). Ces systèmes ont permis d'obtenir l'expression intracellulaire et extracellulaire de la protéase.

#### 6.4 Expression par des cellules procaryotes

La grande majorité des laboratoires ont opté pour l'expression de la protéase du VIH par des systèmes procaryotiques utilisant la bactérie *Escherichia coli*. Malgré la toxicité de la protéase pour la bactérie, la simplicité et le faible coût ont favorisé le développement de nombreuses stratégies d'expression et de purification optimisées (Graves *et al.*, 1988, Debouck *et al.*, 1987, Kräusslich *et al.*, 1989, Strickler *et al.*, 1989).

### 7. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Cette brève revue de littérature nous a permis de mettre en évidence le rôle essentiel joué par la protéase du VIH dans la réplication virale et son importance comme cible pour des agents thérapeutiques.

Dans ce contexte, notre projet de recherche consistait donc à préparer une série de constructions plasmidiques permettant d'exprimer la protéase du VIH-1 dans des bactéries. D'autres constructions ont été préparées pour l'obtention de fragments de la protéase pour les analyses structurales. Un autre objectif consistait à transformer des bactéries et à vérifier l'expression des protéines après induction, en plus de procéder à leur purification préliminaire. Enfin, nous voulions évaluer l'activité de la protéase ainsi produite à partir de différents extraits. L'enzyme sera testée sur des inhibiteurs développés au laboratoire. Ces inhibiteurs sont non peptidiques et de

petite taille comportant des groupements fonctionnels originaux pouvant être préparés en peu d'étapes chimiques et à très faible coût.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. MATÉRIEL

Le plasmide pProtéase (Cat. no. 828) portant le gène de la protéase du VIH-1 souche HTLV-III<sub>B</sub> nous a été fourni par le *AIDS Research and Reference Reagents Program* (ARRRP) du *National Institutes of Health* (NIH). Le plasmide pProtéase est un dérivé de pUC18 et ne permet pas l'expression de la protéase. Le plasmide pT7T3 $\alpha$ 18 (un dérivé de pUC18, figure 9) provenait de la compagnie Gibco Brl (Burlington, Canada). Le vecteur d'expression pET-16b a été acheté de la compagnie Novagen (Madison, WI, USA). Le plasmide pET24a-Protéase exprimant la protéase du VIH-1 et servant de contrôle positif d'expression a été obtenu du laboratoire du D<sup>r</sup> Ronald Swanstrom (Chapel Hill, NC, USA). Ce plasmide permet d'obtenir la protéase active mais sa purification est complexe et les rendements sont faibles. Les amorces utilisées pour la RPC ont été synthétisées par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier; la liste apparaît sur la figure 7.

Les milieux de culture LB Broth et LB-agar provenaient de la compagnie Gibco Brl. Les antibiotiques ampicilline, kanamycine, chloramphénicol et tétracycline ont été achetés de la compagnie Boehringer Mannheim (Laval, Canada).

Les endonucléases de restriction, la ligase T4, la phosphatase alcaline, les marqueurs de poids moléculaire 100 pb, *NHind* III et les marqueurs de protéines provenaient de la compagnie Gibco Brl. L'ADN polymérase Taq a été obtenue de Bio/Can Scientific (Mississauga, Canada). Toutes les endonucléases de restriction ainsi que les enzymes de modification moléculaire ont été utilisées selon les

Figure 7: Amorces utilisées pour les amplifications par RPC.

Les nucléotides codant pour les acides aminés de la protéase sont indiqués en caractère gras.

Pre-1: *EcoRI* *NheI* M T V S F N F P  
5' AT GAATTC GCTAGC ATG ACT GTA TCC TTT AAC TCC CCG

Q I T L  
CAA ATC ACT CTG 3'

Prt-1: *Hind III* *NdeI* P Q  
5' TG CCAAGCTTA CCT CATATG CCG CAA A 3'

Prt-2: *EcoRI* *BamHI* \* \*  
5' T TAC GAATTC GGATCC TTA CTA G 3'

Prt-4: *Hind III* *NdeI* I E G R P  
5' TG CCAAGCTTA CCT CATATG ATC GAA GGT CGG CCG

Q I T L  
CAA ATC ACT CTG 3'

Prt-5: *BamHI* *NheI* M D R Q G T V  
5' TAT GGATCC GCTAGC ATG GAT AGA CAA GGA ACT GTA

S F  
TCC TTT 3'

Prt-6: *BamHI* I E G R L L D I G  
5' C AGT GGATCC ATC GAA GGT CGT CTG CTG GAC ACT GGT 3'

Prt-7: *BamHI* I E G R I G G F I  
5' C AGT GGATCC ATC GAA GGT CGT ATT GGT GGT TTC ATC 3'

conditions décrites par la compagnie d'achat.

La résine Séphadex G-75 a été achetée de la compagnie Pharmacia LKB (Baie d'Urfé, Canada). La résine pepstatine A-agarose a été obtenue de la compagnie Sigma Chemical Company (St-Louis, MO, USA). La résine Nickel-sépharose a été achetée de la compagnie Novagen (Madison, WI, USA). Les colonnes Centriprep 10 provenaient de la compagnie Amicon (Oakville, Canada). La trousse Gene Clean II a été achetée de la compagnie Bio101 (La Jolla, CA, USA).

## 2. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

Les souches *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Gibco Brl), HB101 et XL-1 blue ont été utilisées pour la propagation et la multiplication des plasmides. Les souches BI21 (DE3) et BI21 (DE3) pLysS utilisées pour l'expression des protéines ont été obtenues de Novagen.

## 3. RÉSUMÉ DES PRINCIPALES ÉTAPES

Plusieurs clonages ont été effectués pour l'expression de la protéase du VIH-1 complète ou sous forme de fragments de 50 et 77 acides aminés. Ces clonages furent nécessaires car la protéase et ses fragments ne peuvent être exprimés à partir du plasmide pProtéase reçu du NIH.

La méthode de la réaction de polymérisation en chaîne (RPC) a été utilisée

pour obtenir les séquences nucléotidiques appropriées à l'expression des différentes formes désirées. La figure 8 illustre le produit d'expression des constructions plasmidiques effectuées. Par la suite, les produits de RPC ont d'abord été sous-clonés dans le vecteur de propagation pT7T3 $\alpha$ 18. Ce sous-clonage n'est pas obligatoire mais offre plusieurs avantages. Il permet d'avoir une bonne source du gène protéase (et de fragments du gène) pour sous-cloner dans d'autres vecteurs comme pET-16b sans avoir à refaire les RPC. Ce plasmide se travaille facilement et donne un grand nombre de copies. De plus, un des projets futurs du laboratoire est de produire par mutagenèse des mutants de protéase ce qui se ferait plus facilement avec ce vecteur. Quatre produits de RPC désignés PRO-1, PRO-1, FRA-50 et FRA-77 ont donc été clonés dans pT7T3 $\alpha$ 18.

Les fragments d'ADN clonés dans pT7T3 $\alpha$ 18 ont été repris pour être sous-clonés dans le vecteur d'expression pET-16b et être finalement induits pour obtenir les protéines correspondantes. La première construction appelée pPR3 a permis l'expression de la protéase du VIH-1 possédant une queue de 10 histidines à l'extrémité N-terminale permettant la purification en une seule étape de chromatographie par chélation métallique sur résine nickel-sépharose. Cette protéase a également été purifiée par filtration sur gel de type Séphadex G-75. La deuxième construction appelée pG71 possède un site d'autoclivage en position N-terminale qui permet d'éliminer la queue d'histidine par la protéase même. Cette

Figure 8: Schéma illustrant le produit d'expression des constructions plasmidiques effectuées.

- 1- Protéase sous forme d'un précurseur (construction pPR3)  
Amplification PRO-1

**Facteur Xa**



- 2- Protéase avec un site d'autoclivage (construction pG71)  
Amplification PRO-2

**Site d'autoclivage**



- 3- Fragment de 50 acides aminés (construction pU18)  
Amplification FRA-50

**Facteur Xa**



- 4- Fragment de 77 acides aminés (construction pM14)  
Amplification FRA-77

**Facteur Xa**



forme de protéase a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne pepstatine A-agarose. Enfin, deux vecteurs permettant la production des fragments de 50 et de 77 acides aminés correspondant aux résidus Ile<sup>50</sup> à Phe<sup>99</sup> et Leu<sup>3</sup> à Phe respectivement ont été construits.

#### 4. CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION

##### 4.1 Modification et amplification par RPC du gène de la protéase

###### 4.1.1 Amplification PRO-1

Cette amplification permet de produire le gène de la protéase pour la construction pPR3 de façon à ajouter les sites de restriction *Hind* III et *Nde* I en position N-terminale et un site *Bam*H I en position C-terminale. Le gène de la protéase a été amplifié par RPC avec les amorces prt-1 et prt-2 (figure 7). Le milieu réactionnel contenait 10 à 50 nanogrammes du plasmide pProtéase (NIH), les amorces prt-1 et prt-2 à des concentrations finales de 75 µM, les nucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP à des concentrations finales de 250 mM chacun, le tampon d'amplification avec MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) et 2,5 unités d'ADN polymérase Taq pour un volume final de 100 µl. Le milieu réactionnel a été recouvert de trois gouttes d'huile minérale pour éviter l'évaporation. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur de Perkin Elmer (Montréal, Canada) avec la programmation suivante:

30 cycles de une minute de dénaturation à 94°C, deux minutes d'appariement à 57°C et deux minutes de polymérisation à 72°C. La réaction s'est terminée par un cycle de 10 minutes à 72°C. Le produit d'amplification a été extrait au chloroforme-alcool isoamyl (24:1) puis un échantillon est analysé sur gel d'agarose 1% préparé dans le TBE (Tris-borate 90 mM pH 8, EDTA 2 mM). Pour les analyses sur gel d'agarose, un voltage de 125 volts a été appliqué de façon continue pendant environ une heure à travers le gel placé dans un Minisub DNA Cell de Bio-Rad (Mississauga, Canada). Le gel a été coloré par immersion dans un bain de bromure d'éthidium à une concentration de 10 µg/ml pendant 15 minutes. L'ADN a été visualisé par exposition du gel à la lumière UV émise par un transilluminateur Bio/Can Trueview 300. Les photos ont été prises sur un film Polaroid de type 667 ISO 3000. Les produits RPC ont été précipités en ajoutant du NaCl à une concentration finale de 250 mM et deux volumes d'éthanol 100%. Le mélange a été laissé dans la glace pour 15 minutes puis centrifugé 30 minutes à 12000 rpm dans une microcentrifugeuse de table Canlab Biofuge A. Les culots d'ADN ont été lavés à l'éthanol 70% puis séchés. L'ADN a été resuspendu dans de l'eau stérile.

#### 4.1.2 Amplification PRO-2

Pour ajouter un site d'autoclivage protéolytique après la queue d'histidine en position N-terminale de la protéase, le gène de la protéase a été amplifié par RPC à l'aide des amorces prt-2 et prt-5 (figure 7) avec comme cible une amplification du

laboratoire appelée FER-1 qui correspond au gène protéase portant en 5' les codons Met, Thr, Val, Ser, Phe, Asn et Phe, en plus des sites *Nhe* I et *EcoR* I. Cette amplification a également ajouté un site *BamH* I en positions N- et C-terminales. Les conditions d'amplification étaient les mêmes que celles décrites précédemment.

#### 4.1.3 Amplifications FRA-50 et FRA-77

Un premier fragment de 50 acides aminés (FRA-50) a été amplifié avec les amorces prt-7 et prt-2 (figure 7). Un second fragment de 77 acides aminés (FRA-77) de la protéase a été amplifié par RPC à l'aide des amorces prt-6 et prt-2 (figure 7) selon les conditions de réaction décrites pour l'amplification de PRO-1.

#### 4.2 Sous-clonage dans le plasmide pT7T3 $\alpha$ 18 des produits d'amplification

Les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le plasmide pT7T3 $\alpha$ 18, utilisé comme vecteur multifonctionnel (figure 9). Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection et possède également le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase qui peut être utilisé pour le criblage rapide des colonies positives. En effet, le site de clonage multiple se retrouve à l'intérieur du gène de la  $\beta$ -galactosidase et la présence d'un insert empêche la transcription de l'enzyme fonctionnelle. La présence de l'enzyme dégradera le X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, Gibco Brl) présent dans le milieu et donnera une coloration

Figure 9: Carte représentant le vecteur multifonctionnel pT7T3 $\alpha$ 18.

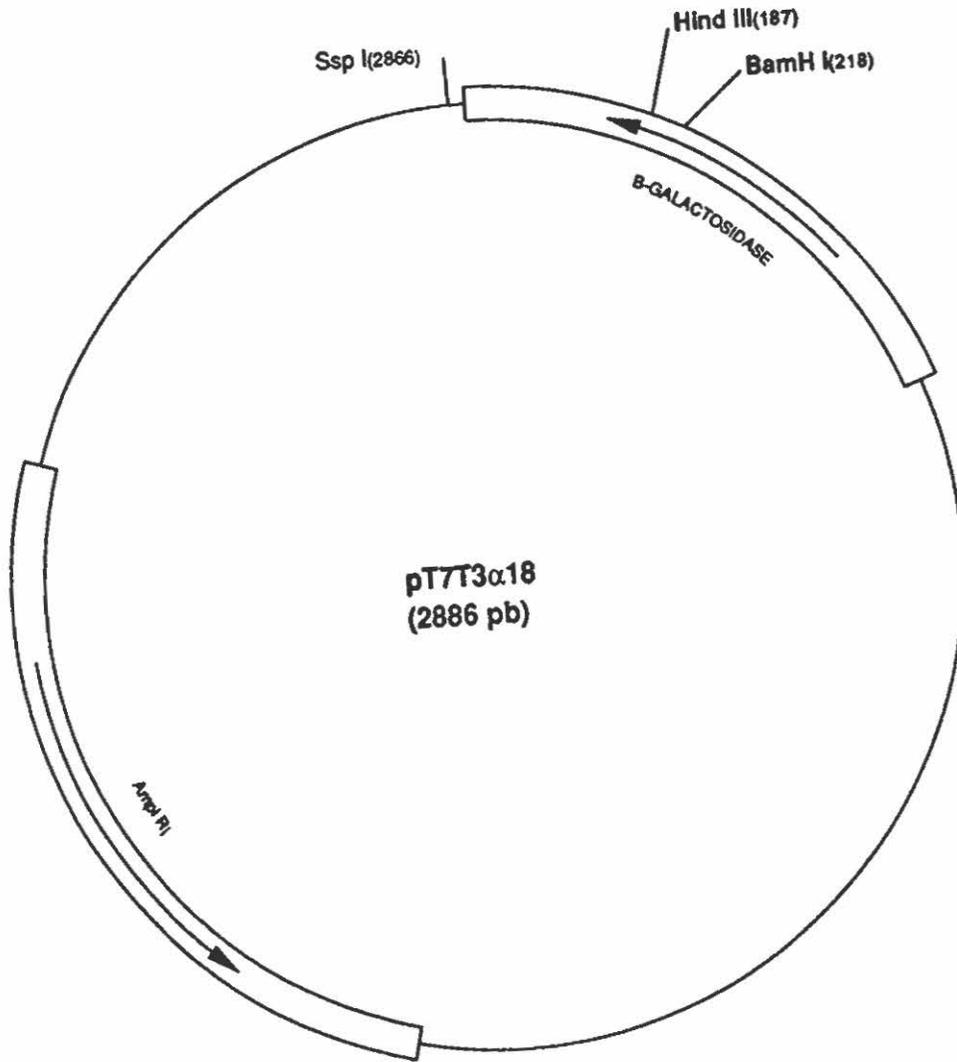
Sites de clonage utilisés:

Amplification PRO-1: *Hind* III et *Bam*H I

Amplification PRO-2: *Bam*H I

Amplification FRA-50: *Bam*H I

Amplification FRA-77: *Bam*H I



bleutée à la colonie; l'absence de coloration révélera une colonie possédant un plasmide recombinant (avec insert).

Le vecteur pT7T3 $\alpha$ 18 ainsi que les produits de RPC ont été digérés séparément par 10 unités/ $\mu$ g de *Bam*H I pendant trois heures à 37°C. Dans le cas du produit d'amplification PRO-1, la digestion a été faite avec les enzymes *Hind* III et *Bam*H I dans les mêmes conditions. Les produits de digestion ont été précipités puis resuspendus dans de l'eau distillée stérile. Pour empêcher que le plasmide se referme sur lui-même lors de la ligation, l'ADN pT7T3 $\alpha$ 18 digéré a été traité à la phosphatase alcaline (1 unité/ $\mu$ g d'ADN) pendant une heure à 37°C. Pour désactiver la phosphatase alcaline, l'ADN traité a été chauffé 10 minutes à 75°C puis précipité. Les produits de la RPC et de pT7T3 $\alpha$ 18 digérés ont été mélangés dans un rapport de 3:1 puis on ajoute une unité d'ADN ligase T4 par  $\mu$ g d'ADN. Le mélange a été incubé trois heures à 37°C puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 4.3 Transformation dans *Escherichia coli*

Les souches *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  et XL-1 blue ont été utilisées pour la transformation des produits de ligation. La souche XL-1 blue étant résistante à la tétracycline, cet antibiotique a été employé à une concentration de 10  $\mu$ g/ml dans tous les milieux de culture utilisés avec cette souche. D'abord les bactéries ont été perméabilisées au CaCl<sub>2</sub> et MnCl<sub>2</sub> pour les rendre compétentes. Pour ce faire, une culture de 50 ml de LB Broth a été inoculée avec *Escherichia coli* puis incubée à 37°C

sous agitation jusqu'à une densité optique à 600 nm ( $D.O_{600}$ ) de 0,3-0,5 (environ trois heures). Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 2000 rpm pendant 20 minutes dans une centrifugeuse IEC modèle PR-2 puis resuspendues dans 15 ml de TFB1 (acétate de sodium 30 mM pH 7,0,  $MnCl_2$  10 mM, KCl 100 mM,  $CaCl_2$  10 mM, glycérol 15%) froid. Après recentrifugation, le culot de bactéries a été resuspendu doucement dans 2 ml de TFB2 (Mops 10 mM pH 7,5, KCl 10 mM,  $CaCl_2$  75 mM, glycérol 15%) froid et aliquoté par portion de 200  $\mu$ l. Les bactéries compétentes ont été conservées à  $-70^\circ C$  jusqu'à utilisation. Une aliquote de bactéries compétentes a été mélangée avec le produit de ligation (100 ng d'ADN est suffisant) puis laissée sur glace pendant 30 minutes en agitant occasionnellement. Le mélange a ensuite été mis dans un bain à  $37^\circ C$  pendant cinq minutes (choc thermique) puis remis sur la glace pour deux minutes. Quatre volumes de LB Broth ont été ajoutés aux bactéries et le mélange a été incubé pendant une heure à  $37^\circ C$  sous agitation. Les bactéries ont été étalées à plusieurs concentrations sur pétris de LB-agar contenant 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline et 50  $\mu$ g/ml de X-GAL. Les pétris ont été incubés 16 heures à  $37^\circ C$  puis conservés à  $4^\circ C$ .

#### 4.4 Mini-extraction de plasmides

La méthode utilisée provient du laboratoire du D<sup>r</sup> Claude Hamelin (IAF). L'ADN plasmidique a été extrait à partir d'une culture de 1 à 2 ml provenant d'une colonie en ajoutant un volume égal de solution A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, saccharose 25%) et

de solution B (EDTA 100 mM, Triton X-100 0,1%, lysozyme 1 mg/ml, ribonucléase 10 µg/ml) préparée fraîchement, suivi d'une incubation de 10 minutes à la température de la pièce. Le mélange a été mis dans un bain d'eau bouillante pendant exactement 45 secondes puis centrifugé 15 minutes à 12000 rpm dans une microcentrifugeuse pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été précipité selon la méthode décrite précédemment. Les clones positifs ont été identifiés par analyse des profils de restriction sur gel d'agarose obtenus par digestion enzymatique soit par *BamH* I et *Hind* III pour la construction pPR3, ou par *BamH* I pour les constructions pG71, pM14 et pU18.

#### 4.5 Maxi-préparation d'ADN plasmidique

Pour obtenir une grande quantité du gène de la protéase, la colonie positive a été inoculée dans une culture de 50 ml de LB Broth contenant 50 µg/ml d'ampicilline suivi d'une incubation de 16 heures à 37°C. La méthode de maxi-préparation a été adaptée de la lyse alcaline décrite dans Sambrook et coll. (1989). Les bactéries ont d'abord été récoltées par centrifugation pendant 20 minutes à 2000 rpm et le culot a été resuspendu dans 500 µl de GTE (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glucose 50 mM, EDTA 10 mM). Par la suite, 1 ml de la solution de lyse contenant 0,2 M de NaOH et 1% de SDS (sulfate de sodium et de dodécyle) a été ajouté et le tube a été mélangé par inversion trois ou quatre fois. Le tube a été laissé 10 minutes sur la glace. Le mélange a été neutralisé en ajoutant 750 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 puis agité par

inversion et laissé sur glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 20 minutes à 12000 rpm, le surnageant a été extrait par un volume de phénol suivi d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN présent dans la phase supérieure aqueuse a été récolté et précipité.

#### 4.6 Extraction de la bande d'ADN d'un gel de polyacrylamide

Pour isoler le gène d'intérêt du vecteur de propagation pT7T3 $\alpha$ 18, plusieurs microgrammes du plasmide provenant d'une maxi-préparation ont été digérés successivement par *Bam*H I et *Nde* I pour la construction pPR3 ou par *Bam*H I pour les constructions pG71, pM14 et pU18, pendant trois heures à 37°C. Le produit de digestion a été chargé sur un gel d'acrylamide-bisacrylamide 5% préparé dans le TBE. Après migration de l'ADN pendant 30 minutes à 150 volts dans un système MiniProtean II de Bio-Rad, le gel a été coloré dans un bain de bromure d'éthidium 5 minutes et la bande correspondant au gène de la protéase ou des fragments a été excisée puis mise dans un tampon d'extraction (acétate d'ammonium 0,5 M, acétate de magnésium 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1%) et laissée 3-4 jours à 4°C. L'ADN présent dans le surnageant a été extrait au chloroforme-alcool isoamylique (24:1) puis précipité. Une méthode alternative consiste à utiliser la trousse Gene Clean II de la compagnie Bio101.

#### 4.7 Sous-clonage dans le vecteur d'expression pET-16b

Le plasmide d'expression pET-16b (5711 pb) fait partie d'un ensemble de vecteurs d'expression développé par la compagnie Novagen (figure 10). Le pET-16b porte un gène de résistance à l'ampicilline, il permet l'expression d'un gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7 et code pour le répresseur I du promoteur Lac. Ce plasmide permet également l'ajout d'une série de 10 histidines en position N-terminale qui servira à la purification par chélation métallique et que l'on peut enlever par digestion par le facteur Xa, une protéase d'origine cellulaire.

Plusieurs microgrammes du plasmide pET16-b obtenus par une maxi-préparation ont été digérés successivement par *Bam*H I et *Nde* I pour pPR3, ou par *Bam*H I pour pG71, pM14 et pU18, suivi d'un traitement à la phosphatase alcaline. L'ADN a été précipité puis mélangé dans un rapport molaire 3:1 avec l'ADN extrait du gel de polyacrylamide et la ligation a été effectuée comme précédemment. Le criblage et l'amplification des clones ont été effectués dans la souche *Escherichia coli* XL1-blue ou DH5 $\alpha$  comme précédemment. Le X-GAL a été omis des milieux de culture pour ce sous-clonage.

### 5. INDUCTION DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS

Pour l'expression de la protéase et de ses deux fragments, deux souches *Escherichia coli* portant une copie du gène de l'ARN polymérase T7 intégrée dans

Figure 10: Carte représentant le vecteur d'expression pET-16b.

Sites de clonage utilisés:

Amplification PRO-1: *Nde* I et *Bam*H I

Amplification PRO-2: *Bam*H I

Amplification FRA-50: *Bam*H I

Amplification FRA-77: *Bam*H I



leur génome ont été utilisées, soit BI21 (DE3) et BI21 (DE3) pLysS. Ce gène est sous le contrôle du promoteur inducible lacUV5. La souche BI21 (DE3) pLysS diffère de la souche BI21 (DE3) par le fait qu'elle porte un plasmide conférant la résistance au chloramphénicol et code de façon constitutive pour le lysozyme qui est produit en petite quantité dans ces bactéries. Cette enzyme (EC 3.2.1.17) favorise la lyse des bactéries ce qui facilite l'extraction et la purification de la protéine d'intérêt en plus d'inhiber l'ARN polymérase T7. En effet, même en absence de l'inducteur, il y a un niveau basal d'expression de la polymérase suffisant pour que les effets toxiques de la protéase puissent se produire et limiter l'obtention de la protéase. D'où l'utilité d'exprimer la protéase du VIH sous forme d'un précurseur inactif jusqu'à son activation après les étapes de purification. La présence de l'inducteur dans le milieu surpasse l'effet d'inhibition du lysozyme et permet donc l'expression du gène cloné.

Les souches *Escherichia coli* BI21 (DE3) et BI21 (DE3) pLysS ont été préparées et utilisées comme précédemment, sauf que le milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM) a remplacé dans le cas de BI21 (DE3) pLysS les 4 volumes de LB Broth utilisés avec les autres souches. De plus, du chloramphénicol à 34 µg/ml a été ajouté dans les milieux de culture utilisés avec cette dernière bactérie.

L'induction a été faite de la façon suivante: une culture de bactéries a été incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,3-0,4. L'IPTG (isopropylthio-β-galactoside, Boehringer Mannheim) à une concentration finale de 1 mM a alors été ajouté au milieu. La culture a été induite pour une période de trois heures toujours à

37°C. Les résultats d'induction ont été analysés par migration des protéines bactériennes totales sur gel de tricine-SDS-PAGE de 16,5% préparé selon Schagger et Von Jagow (1987).

## 6. IMMUNOBUVARDAGE

Pour confirmer l'expression de la protéase pour les constructions pPR3 et pET-24a-protéase, un immunobuvardage de type Western (Western Blot) a été effectué sur les protéines des bactéries induites. L'anticorps primaire anti-protéase provenant du NIH (ARRRP, Cat. No. 226) est un anticorps polyclonal de lapin produit après immunisation de l'animal avec un peptide synthétique correspondant aux 25 derniers acides aminés de la protéase du VIH-1. La révélation a été faite par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase obtenu de la compagnie Bio-Rad en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'immunobuvardage de type Western a été effectué selon les recommandations de Bio-Rad. L'anticorps anti-protéase a été utilisé à des dilutions de 1/800 à 1/10000.

## 7. PURIFICATION DES PRODUITS D'EXPRESSION

### 7.1 Purification des corps d'inclusion

Le protocole de purification des corps d'inclusion est adapté d'une méthode

fournie par le laboratoire du D<sup>r</sup> Ronald Swanstrom (Chapel Hill, USA) ainsi que d'une publication (Leuthardt et Roesel, 1993). Le culot de bactéries provenant d'une induction de 500 ml a été lavé 2 fois avec du PBS puis resuspendu dans 8 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 2 mM, DTT 2 mM et Triton X-100 0,5%. La suspension a été soniquée 5 fois une minute à l'aide d'un sonicateur Ultrasonic Processor XL de Heat Systems en prenant soin de garder la solution dans la glace, puis centrifugée 45 minutes à 16500 rpm à 0°C dans une centrifugeuse Beckman modèle J2-21M munie d'un rotor JA-21 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Le culot obtenu a été récupéré et le cycle sonication/centrifugation a été répété trois fois. Le culot de corps d'inclusion a été conservé à -70°C jusqu'à utilisation.

## 7.2 Purification par chromatographie sur colonne de nickel-Sépharose

Le principe de purification est assez simple: l'atome de nickel se lie par des liens de coordinance avec l'extrémité de la chaîne carbonée de la matrice (Sépharose ou NTA-Sépharose). Le noyau imidazole des résidus histidines de la protéine à purifier interagissent avec les orbitales libres de l'atome de nickel et s'y accrochent. L'élution de la protéine se fait par gradient de pH ou par gradient d'imidazole. Le gradient est nécessaire si la colonne retient des protéines de façon non spécifique.

Une minicolonne de 10 cm de résine nickel-Sépharose de la compagnie Novagen ou la résine nickel-NTA-Sépharose de la compagnie Qiagen a été équilibrée avec le tampon NI (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, NaCl 1M, éthanol 10%, Triton X-100 1%).

Les corps d'inclusion obtenus à partir des inductions ont été solubilisés en les resuspendant dans 5 ml de tampon NI contenant 6 M d'urée suivi d'une incubation d'une à deux heures à 0°C sous légère agitation. La solution a été ramenée à la température de la pièce puis versée sur la colonne. Le premier éluat a été rechargé une autre fois sur la colonne et celle-ci a été lavée avec 5 volumes de tampon NI 6 M urée. La protéine d'intérêt a été éluée en passant 2 volumes de tampon NI 6 M urée ajusté à pH 5,0 dans la colonne, tout en récoltant des fractions de 0,5 ml. L'analyse des fractions a été faite sur gel de tricine-SDS-PAGE en présence d'urée. Une méthode alternative consistait à éliminer progressivement l'urée de la colonne en effectuant un gradient décroissant d'urée de 6 à 0 M puis à éluer la protéine avec le tampon NI pH 5,0.

### 7.3 Purification par filtration sur gel de Séphadex G-75

La résine Séphadex est composée de polymères de chaînes glycosylées. La rétention des protéines se fait en fonction de la grosseur et de la densité des billes du gel. La résine G-75 retient les protéines allant de 5 à 50 kDa et les protéines hors de ces limites s'écouleront dans le volume mort lors de l'élution. L'éluant utilisé est composé d'acide acétique 50% ajusté à un pH de 2,5 avec de l'acétate d'ammonium. L'acide acétique a été utilisé comme agent dénaturant pour solubiliser les corps d'inclusion et comporte l'énorme avantage de s'éliminer facilement par évaporation. Pour ce qui est de l'élimination de l'acétate d'ammonium, ce sel, une fois solubilisé,

peut se volatiliser lors de la lyophilisation des fractions recueillies et ce, contrairement à l'acétate de sodium souvent utilisé dans les tampons en biochimie.

La méthode de purification est inspirée de Hui et coll. (1993). Tout d'abord, l'hydratation de 100 grammes de Séphadex G-75 a été effectuée dans 3 volumes d'acide acétique 50% à un pH de 2,5 pendant 3 jours à la température de la pièce. La résine hydratée a été dégazée sous vide pendant au moins une heure avant d'être versée rapidement dans une colonne en verre de un mètre de long par 2,5 cm de diamètre. Les corps d'inclusion ont été solubilisés dans au plus 10 ml d'acide acétique 50% pH 2,5 dégazé. Pour éliminer les débris cellulaires, la solution obtenue a été centrifugée 30 minutes à 12000 rpm et le surnageant a été chargé sur la colonne. L'échantillon a été élué à un débit de 10 ml/heure avec l'acide acétique 50% pH 2,5. Des fractions de 4 ml ont été recueillies puis congelées à -70°C pour être ensuite lyophilisées à l'aide du lyophilisateur LYPH LOCK 4,5 de Labconco. L'analyse des fractions a été faite sur gel de tricine-SDS-PAGE.

#### 7.4 Purification par affinité sur colonne de pepstatine A-agarose

La pepstatine est un inhibiteur spécifique aux protéases aspartiques. En couplant l'inhibiteur à une matrice, la protéase du VIH peut être purifiée par affinité. La protéine a été éluee par une variation de pH de 6,8 à 8,2 qui entraîne un changement de conformation du site actif de la protéase et le décrochement de l'enzyme.

Les conditions utilisées sont décrites dans Wondrak et coll. (1991). En résumé, les bactéries induites des constructions pG71 et pET-24a-protéase ont été lysées par 5 cycles de sonication de une minute chacun dans le tampon PA (Pipes 50 mM pH 6,8, NaCl 1 M, sulfate d'ammonium 1 M, EDTA 1 mM, tartrate de Na/K 1 mM, glycérol 10%). Après centrifugation 20 minutes à 12000 rpm, le surnageant a été clarifié par filtration sur membrane 0,45  $\mu$ m puis chargé sur une minicolonne de 5 ml de pepstatine A-agarose préalablement équilibrée avec le tampon PA. La colonne a été lavée avec cinq volumes de tampon PA et l'élution de la protéase a été effectuée à l'aide du tampon PB (Tris-HCl 100 mM pH 8,2, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, tartrate de Na/K 1 mM, glycérol 10%, éthylène glycol 5%). Des fractions de 0,5 ml ont été récoltées puis analysées sur gel de tricine-SDS-PAGE.

## 8. RENATURATION DE LA PROTÉASE

Pour le repliement de la protéase, 1 volume de l'enzyme solubilisée dans l'urée a été dilué dans 20 volumes de tampon UFC (acétate de sodium 50 mM pH 5,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, glycérol 10%). La solution a été concentrée à environ 1 ml à l'aide d'une colonne Centriprep 10 (Amicon) et centrifugée selon les directives de la compagnie. La solution de protéase concentrée a été rediluée dans 10 ml de tampon UFC puis reconcentrée de la même façon jusqu'à un volume final d'environ 0,5 ml. La protéase a été aliquotée puis congelée à -70°C.

## 9. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

L'activité enzymatique de la protéase a été analysée en évaluant le taux d'hydrolyse du peptide modifié Arg-Glu (EDANS)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Lys (DABCYL)-Arg (no. H-2930, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) correspondant au site de clivage P17/P24 reconnu par la protéase du VIH-1. Après excitation à 340 nm, l'EDANS (5'-(2-aminoethylamino) -1-naphtalene sulfonic acid) fluoresce en émettant de la lumière à 490 nm qui est absorbée (effet RET: *resonance energy transfer*) par le groupement DABCYL (4'-dimethyl-aminoazobenzene-4-carboxylate) de façon intramoléculaire. La fluorescence est mesurable une fois que le substrat est clivé par l'enzyme. Le test enzymatique utilisé au laboratoire provient du groupe de Matayoshi et coll. (1990).

L'activité enzymatique a été évaluée sur des extraits bruts de bactéries induites après sonication de celles-ci, ainsi que sur le produit de pPR3 purifié par chromatographie sur colonne de nickel-Sépharose.

## RÉSULTATS

Le but du projet consistait premièrement à construire un vecteur d'expression bactérien exprimant la protéase du VIH-1 complète ou en fragment. La technique de PCR a été utilisée pour la préparation d'un gène codant pour la protéase sous deux formes (constructions pPR3 et pG71) ainsi que pour des fragments de 50 et de 77 acides aminés (constructions pM14 et pU18, voir figure 8). Par la suite, différentes stratégies de purification ont été évaluées pour l'obtention de la protéase purifiée et active. La protéase est nécessaire pour effectuer l'évaluation des inhibiteurs par un test enzymatique. Elle servira également, comme dans le cas des fragments, à effectuer des analyses conformationnelles.

#### 1. Modification et amplification par RPC du gène de la protéase

La première étape du travail a consisté à modifier par RPC le gène de la protéase de façon à permettre son insertion dans le vecteur multifonctionnel pT7T3 $\alpha$ 18 ou dans le vecteur d'expression pET-16b. Pour la construction pPR3, l'amplification PRO-1 de 337 pb du gène par les amorces prt-1 et prt-2 a permis d'ajouter des sites de restriction *Hind* III et *Nde* I en position N-terminale du gène et un site *Bam*H I en position C-terminale, nécessaires au clonage dans les vecteurs pT7T3 $\alpha$ 18 et pET-16b. Dans le cas de la construction pG71, l'amplification PRO-2 de 360 pb du gène par les amorces prt-5 et prt-2 a permis d'ajouter un site de restriction *Bam*H I en positions N- et C-terminales du gène de la protéase, et également un site d'autoclivage de l'enzyme (SFNF-PQIT) en position N-terminale. Cette dernière

amplification a été effectuée sur une construction avec le produit RPC FER-1 déjà disponible au laboratoire. Pour la construction pU18, l'amplification FRA-50 de 190 pb par les amorces prt-7 et prt-2 a permis l'obtention de la séquence codant pour les résidus Phe<sup>50</sup> à Phe<sup>99</sup> de la protéase. Enfin, pour la construction pM14, l'amplification FRA-77 de 271 pb par les amorces prt-6 et prt-2 a permis l'obtention de la séquence codant pour les résidus Ile<sup>23</sup> à Phe<sup>99</sup> de la protéase. Ces deux dernières amplifications ont également ajouté un site *BamH I* en positions N- et C-terminales des fragments.

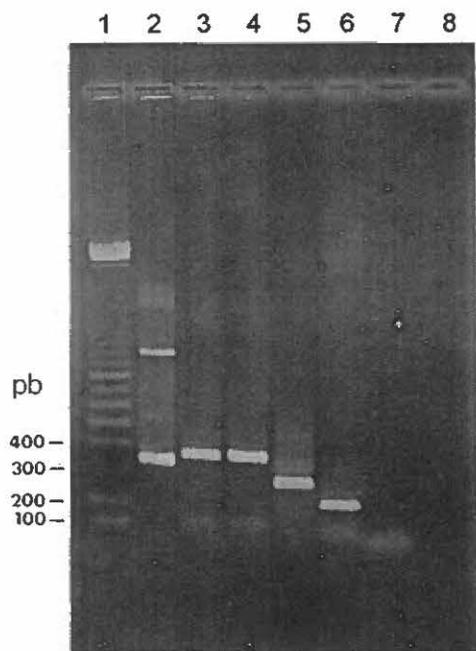
Les produits des RPC sont présentés sur gel d'agarose à la figure 11. Environ 10% du produit des RPC a été mis sur gel. Les bandes obtenues après coloration au bromure d'éthidium correspondent aux poids attendus; en général, une seule bande d'amplification a été obtenue sauf dans le cas de l'amplification PRO-1 (figure 11, puits 2) où une seconde bande d'amplification à environ 1000 pb est aussi visible. Dans le contrôle négatif, on a omis l'enzyme polymérase Taq (figure 11, puits 7).

## 2. Sous-clonage dans pT7T3α18

Lors d'une première série d'expériences, toutes les tentatives de clonage direct des produits RPC dans le vecteur d'expression pET-16b ont échoué. Pour éviter de refaire les RPC à plusieurs reprises, les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le vecteur multifonctionnel pT7T3α18. Le traitement par la phosphatase alcaline du plasmide pT7T3α18 préalablement digéré par les enzymes

Figure 11: Produits d'amplification par RPC visualisés sur gel d'agarose.

- Puits:
- 1: marqueur 100 pb
  - 2: amplification PRO-1
  - 3: amplification FER-1
  - 4: amplification PRO-2
  - 5: amplification FRA-77
  - 6: amplification FRA-50
  - 7: contrôle négatif, sans polymérase Taq



de restriction a augmenté dramatiquement le taux d'insertion du gène d'intérêt. Lors du criblage, plus de 95% des colonies ne présentaient pas de coloration, donc portaient un plasmide recombinant.

Le clonage du produit d'amplification PRO-1 pour la construction pPR3 a été effectué aux sites *Hind* III et *Bam*H I. Le clonage des gènes pour les autres constructions, soit l'amplification PRO-2 du gène de la protéase avec le site d'autoclivage pour la construction pG71 et les amplifications FRA-77 et FRA-50 pour les constructions pM14 et pU18 respectivement, a été effectué au site *Bam*H I.

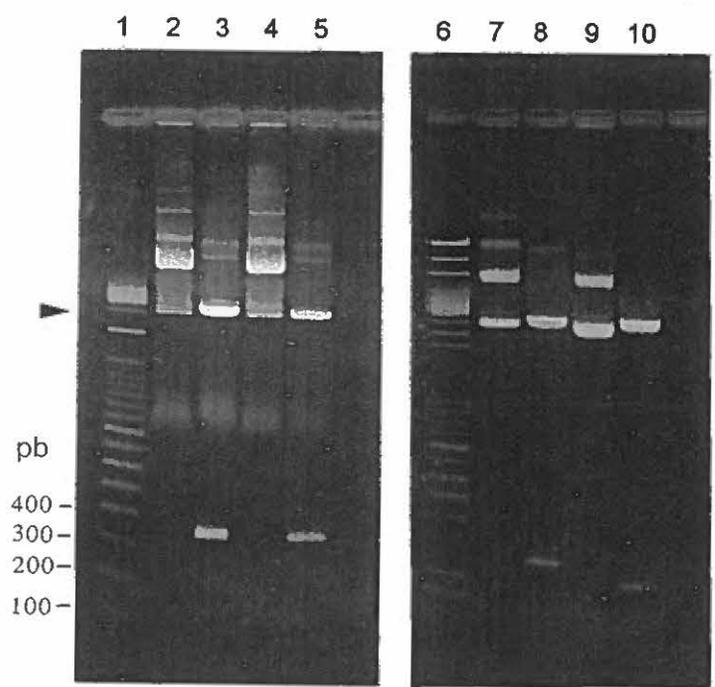
Le résultat des sous-clonages est présenté à la figure 12. La bande à environ 2900 pb correspond au plasmide pT7T3 $\alpha$ 18 linéarisé et les bandes correspondant aux inserts, soit 327 pb pour la construction pPR3, 345 pb pour pG71, 255 pb pour pM14 et 174 pb pour pU18, sont également observées sur gel d'agarose après digestion des plasmides par les enzymes de restriction: *Bam*HI et *Hind* III pour PRO-1, *Bam*H I pour PRO-2, FRA-50 et FRA-77.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les souches *E. coli* DH5 $\alpha$  et XL1-blue. Des maxi-préparations de chacun des plasmides recombinants ont été réalisées pour l'étape suivante de sous-clonage dans pET-16b.

Figure 12: Profils de restriction obtenus après le sous-clonage des produits RPC dans le vecteur pT7T3 $\alpha$ 18.

- Puits:
- 1: marqueur 100 pb
  - 2: PRO-1 non digéré
  - 3: PRO-1 digéré par *Hind* III et *Bam*H I
  - 4: PRO-2 non digéré
  - 5: PRO-2 digéré par *Bam*H I
  - 6: marqueur 100 pb + *NHind* III
  - 7: FRA-77 non digéré
  - 8: FRA-77 digéré par *Bam*H I
  - 9: FRA-50 non digéré
  - 10: FRA-50 digéré par *Bam*H I

Le pointeur indique la position du vecteur pT7T3 $\alpha$ 18 à environ 2900 pb.



### 3. Sous-clonage dans pET-16b

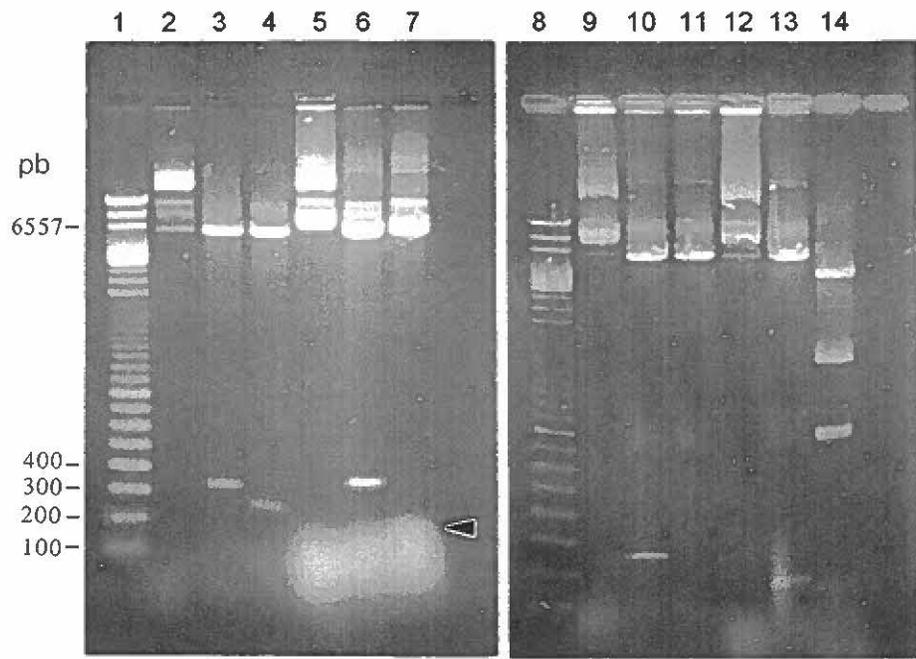
Les inserts clonés dans pT7T3 $\alpha$ 18 ont ensuite été excisés avec les enzymes appropriées pour le sous-clonage dans pET-16b. Le clonage du gène de la protéase (amplification PRO-1) pour la construction pPR3 a été effectué aux sites *Nde* I et *Bam*H I du vecteur d'expression pET-16b. Le clonage pour les constructions pG71 (amplification PRO-2), pM14 et pU18 (amplifications FRA-77 et FRA-50 respectivement) a été effectué au site *Bam*H I. Le résultat des clonages est présenté à la figure 13. La bande à environ 5700 pb correspond au plasmide pET-16b linéarisé et les bandes correspondant aux inserts, soit 310 pb pour la construction pPR3, 345 pb pour pG71, 255 pb pour pM14 et 174 pb pour pU18, sont également observées sur gel d'agarose après digestion par les enzymes de restriction (figure 13).

Puisque le clonage pour les constructions pG71, pM14 et pU18 a été effectué en un site unique, soit *Bam*H I, un criblage supplémentaire pour déterminer la polarité du gène a été effectué sur les colonies positives. Le gène de la protéase porte un site *Xho* I à la position Leu<sup>33</sup>-Glu<sup>34</sup> et un site *Hinc* II à la position Leu<sup>89</sup>-Leu<sup>90</sup>-Thr<sup>91</sup> (voir Annexe I: séquence nucléotidique de la protéase du VIH-1). Bien que le gène de la protéase dans pPR3 n'a qu'une orientation possible à cause du clonage dans *Nde* I et *Bam*H I, l'intégrité du gène a également été confirmée. La polarité du gène de la protéase dans la construction pPR3 a été vérifiée par digestion par *Bam*H I et *Xho* I. Une polarité positive donne une bande à 209 pb contre environ 100 pb pour un

Figure 13: Profils de restriction obtenus après le sous-clonage des inserts dans le vecteur pET-16b.

- Puits:            1: marqueur 100 pb +  $\lambda$ Hind III  
                     2: pPR3 non digéré  
                     3: pPR3 digéré par *Nde* I et *Bam*H I  
                     4: pPR3 digéré par *Xho* I et *Bam*H I  
                     5: pG71 non digéré  
                     6: pG71 digéré par *Bam*H I  
                     7: pG71 digéré par *Xho* I  
                     8: marqueur 100 pb +  $\lambda$ Hind III  
                     9: FRA-77 non digéré  
                     10: FRA-77 digéré par *Bam*H I  
                     11: FRA-77 digéré par *Xho* I  
                     12: FRA-50 non digéré 1  
                     13: FRA-50 digéré par *Bam*H I  
                     14: FRA-50 digéré par *Xho* I et *Hinc* II

Le pointeur indique la position de la bande de 141 pb obtenue après digestion par *Xho* I du plasmide pG71.



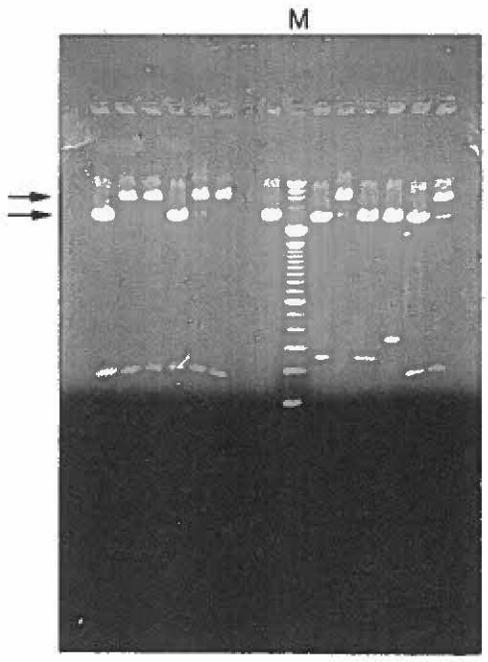
gène dans la mauvaise orientation ou modifié. Pour la construction pG71, la bonne orientation du gène est révélée par une digestion simple par *Xho* I qui donne une bande de 141 pb contre 204 pb pour une polarité négative. Pour la construction pU18, la polarité positive du gène est révélée par une digestion double par *Xho* I et *Hinc* II qui libère un fragment de 157 pb contre 39 pb pour une polarité négative. Cette double digestion génère également trois autres fragments de 3532 pb, 1399 pb et 900 pb. Après digestion avec *Xho* I, la construction pM14 donne une bande à 53 pb pour une polarité positive contre 207 pb pour une polarité négative. Les résultats de clonage et de la détermination de la polarité de l'insert sont présentés à la figure 13.

La construction pPR3 a nécessité le criblage de plus de 400 colonies pour l'obtention de deux colonies positives. Un très haut taux de troncation, c'est-à-dire de délétion d'une portion du vecteur d'expression pET-16b, a été observé lors de tous les criblages effectués. Ce phénomène n'a pas été observé lors du criblage des sous-clonages dans pT7T3 $\alpha$ 18. Le fragment supprimé d'environ 2700 pb correspond à la séquence entre le site de clonage multiple et la fin du gène du répresseur Lac I (figure 10). La figure 14 présente un gel d'agarose d'un criblage de colonies pour la construction pU18 après digestion par *Bam*H I. La bande à environ 3000 pb correspond à la forme tronquée de pET-16b que l'on peut comparer à la bande d'environ 5800 pb correspondant au plasmide normal.

Pour éviter le problème de troncation ou simplement augmenter les chances d'obtenir des colonies positives pour les autres constructions, d'autres souches *E.*

Figure 14: Exemple de criblage de la construction pU18.

La bande à environ 3000 pb (flèche du bas) correspond à la forme tronquée du vecteur pET-16b. La bande supérieure à environ 5700 pb (flèche du haut) correspond au plasmide pET-16b de taille normale. Lorsque présente, la bande au bas du gel correspond à l'insert libéré par la digestion avec *Bam*H I. Le puits M représente le marqueur de poids moléculaire 100 pb et *NHind* III.



*coli* ont été testées à la place de DH5 $\alpha$  soit les souches HB101 et XL1-blue. Bien que la souche HB101 soit *recA13* et par conséquent recommandée pour le criblage de constructions instables, son utilisation n'a pas amélioré le rendement de colonies positives, le taux de troncation étant de 100% pour les 50 colonies criblées pour les constructions pG71, pM14 et pU18. Par contre, la souche XL1-blue a amélioré sensiblement le rendement de clones positifs. Ainsi moins d'une centaine de colonies par construction ont été criblées pour l'obtention de deux à quatre colonies positives et de bonne polarité pour chacune des constructions (voir tableau 1).

Les résultats de séquençage effectués par le service de séquençage de l'IAF ont confirmé l'intégrité et le bon cadre de lecture de l'insert des constructions pPR3 et pG71. Cependant le séquençage de la construction pM14 a révélé la délétion d'une base au niveau de la séquence amorce prt-6 en position N-terminale. Le séquençage de pU18 a aussi révélé l'insertion d'une base au niveau de la séquence amorce prt-7 en position N-terminale.

TABLEAU 1: Données sur le criblage des différentes constructions du vecteur  
d'expression pET-16b.

Constructions	souches <i>E. coli</i>	colonies criblées	colonies positives	insert de bonne polarité	pourcentage de troncation
pPR3	DH5 $\alpha$	400	2	2	>99%
pG71	DH5 $\alpha$	136	0	0	100%
	HB101	50	0	0	100%
	XL1-blue	80	8	3	90%
pM14	DH5 $\alpha$	93	1	0	>99%
	HB101	50	0	0	100%
	XL1-blue	32	7	3	78%
pU18	DH5 $\alpha$	117	0	0	100%
	HB101	50	0	0	100%
	XL1-blue	87	7	2	91%

#### 4. Induction

Pour l'expression de la protéase et de ses deux fragments, deux souches *E. coli* portant une copie du gène de l'ARN polymérase T7 intégrée dans leur génome ont été utilisées, soit BI21 (DE3) et BI21 (DE3) pLysS.

Les deux souches ont été testées pour l'induction des quatre constructions. La construction pPR3 a donné un niveau d'induction important et une bande de protéines visible sur gel de polyacrylamide tricine-SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie (figure 15 A, puits 4,5) où l'on voit clairement la bande induite à environ 14 kDa. Un niveau d'induction similaire a été obtenu pour les deux souches. Cette bande est absente dans le contrôle négatif. La visualisation des bactéries induites par microscopie électronique à transmission (MET) a confirmé la formation de corps d'inclusion dans les bactéries (figure 16). L'expression de la construction pG71 n'a pas donné de bandes visibles d'induction à 11 kDa sur gel d'acrylamide et ce, dans les deux souches *E. coli* (figure 15 A, puits 7,8). La plasmide pET-24a-protéase qui exprime sous sa forme naturelle la protéase du VIH-1 et qui a servi comme contrôle positif d'induction dans nos expériences a donné ce même résultat (puits 2,3). L'induction des deux fragments (constructions pM14 et pU18) dans les deux souches de *E. coli* n'a pas révélé de bande induite (puits 9,10).

Figure 15: Expression des gènes d'intérêt par les constructions plasmidiques.

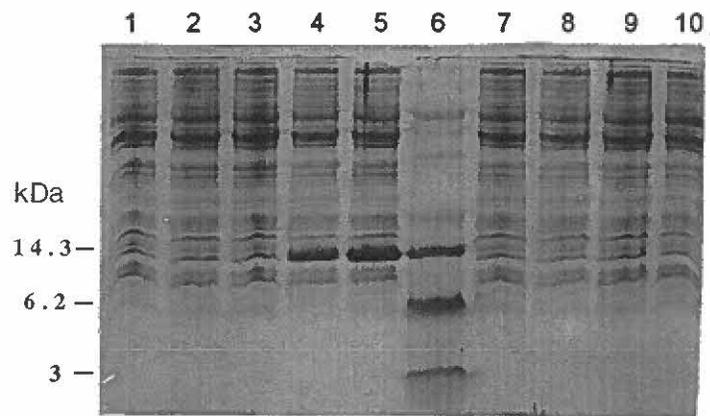
A) Gel de polyacrylamide montrant l'induction des constructions plasmidiques utilisées. Les puits 2, 4, 7, 9 et 10 correspondent à l'induction dans BI21 (DE3) alors que les puits 3, 5 et 8 correspondent à BI21 (DE3) pLysS.

Puits            1:        contrôle négatif  
                  2 et 3: inductions pET-24a-protéase  
                  4 et 5: inductions pPR3  
                  6:        marqueur de poids moléculaire de protéines  
                  7 et 8: inductions pG71  
                  9:        induction pM14  
                  10:      induction pU18

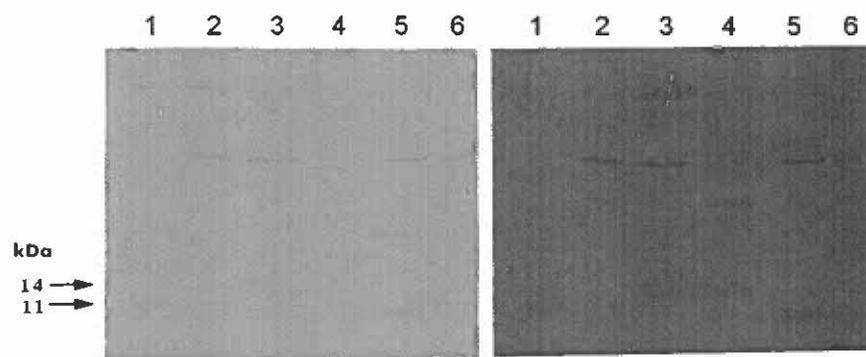
B) Immunobuvardage de type Western. Deux temps d'exposition du même immunobuvardage sont présentés.

Puits:            1: contrôle positif (protéase du VIH-1 commerciale)  
                  2: contrôle négatif (pPR3 sans IPTG)  
                  3: induction de pPR3, fraction insoluble  
                  4: induction de pPR3, fraction soluble  
                  5: induction de pET-24a-protéase, fraction insoluble  
                  6: induction de pET-24a-protéase, fraction soluble

A)

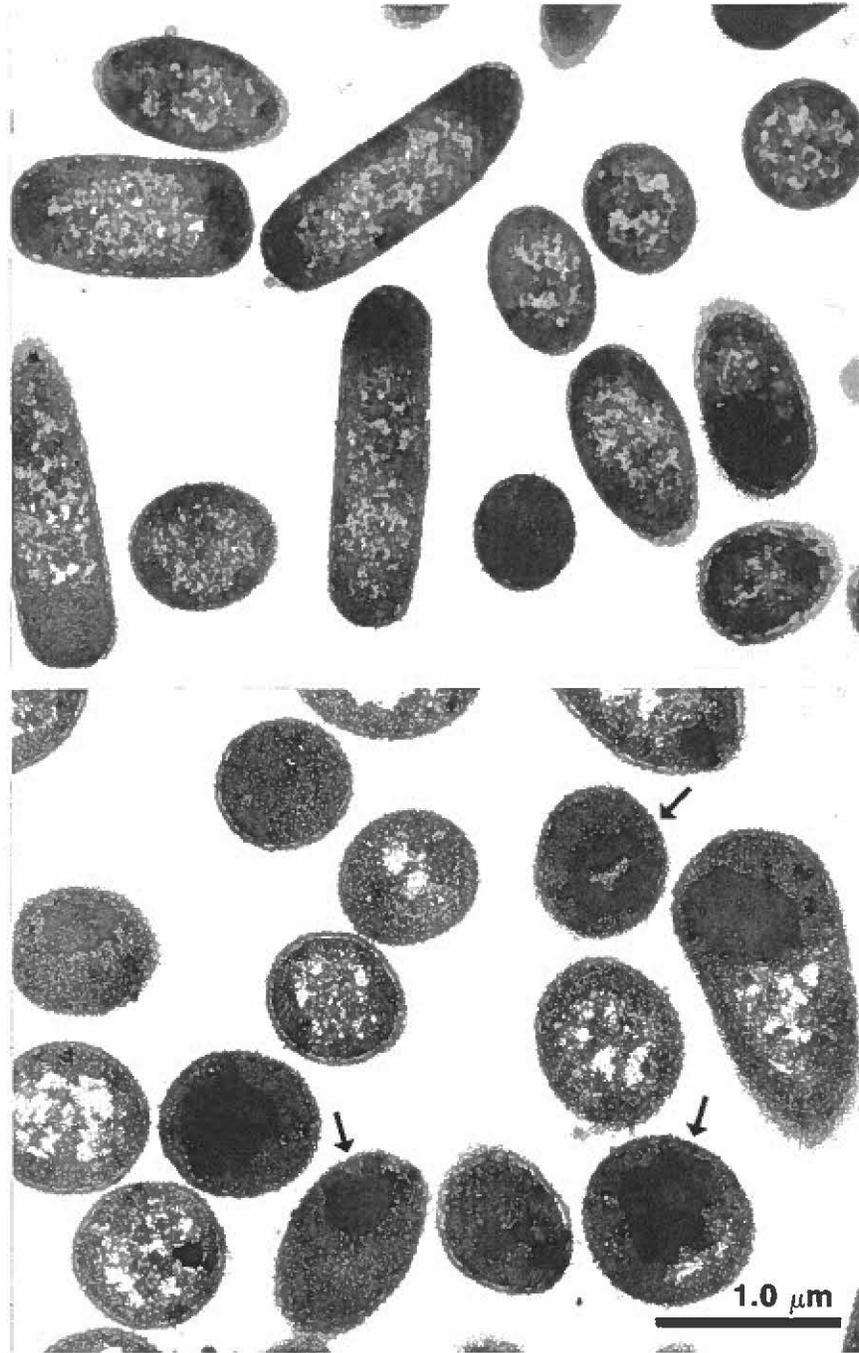


B)



**Figure 16: Bactéries induites visualisées par microscopie électronique**

Les bactéries BI21 (DE3) pLysS portant la construction pPR3 ont été induites en présence d'IPTG. La photo du haut montre des bactéries non induites. Les flèches dans la photo du bas indiquent la présence de corps d'inclusion après induction.



## 5. Immunobuvardage

Pour confirmer l'expression et surtout l'identité de la protéase induite pour les constructions pPR3 et pET-24a-protéase, un immunobuvardage de type Western (Western Blot) a été effectué sur les protéines des bactéries induites.

Les immunobuvardages effectués à de nombreuses reprises n'ont jamais donné les résultats escomptés en terme de spécificité de l'anticorps. Un exemple de résultat est présenté à la figure 15 B. L'anticorps anti-protéase a réagi avec plusieurs protéines bactériennes et avec une très faible intensité même à des concentrations relativement élevées d'anticorps soit jusqu'à une dilution de 1:800 (la concentration recommandée étant de 1:10000). Néanmoins, le contrôle positif composé de quelques nanogrammes de la protéase commerciale a réagi avec l'anticorps (figure 15 B, puits 1, flèche) révélant une bande à 11 kDa. La présence d'une bande de protéine du même poids moléculaire dans le puits 5 de la construction pET24a-protéase induite peut suggérer une induction de la protéase. Ce dernier puits correspond à la partie insoluble des bactéries induites et obtenue après la lyse par sonication des bactéries et centrifugation. La fraction soluble a été chargée au puits 6. La construction pPR3 induite donne également une bande relativement intense à environ 14 kDa soit le poids attendu du précurseur (puits 3, flèche). La protéine est détectable également dans la fraction soluble (puits 4). Dans le cas de pG71, la construction n'a pas été testée par immunobuvardage dans l'attente d'un anticorps anti-protéase plus spécifique et plus réactif.

## 6. Purification

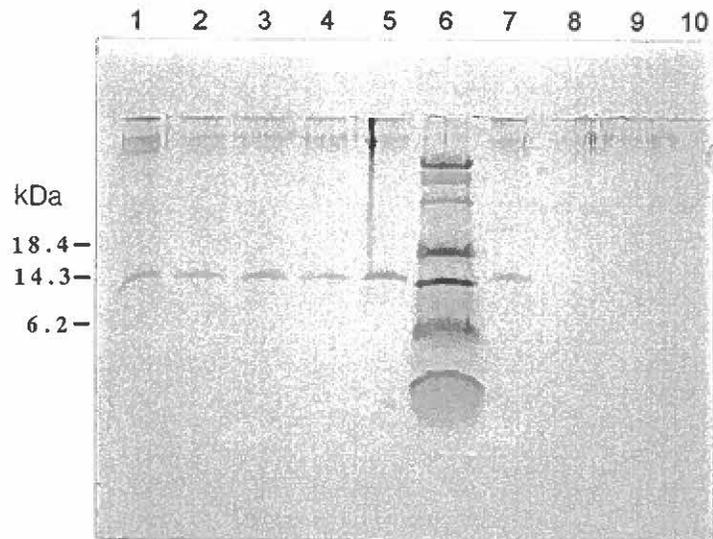
La purification des corps d'inclusion a permis d'éliminer une grande partie des protéines contaminantes. La figure 15 B confirme également que la grande majorité de la protéase exprimée se retrouve sous forme insoluble (puits 3 et 5) par rapport au surnageant (puits 4 et 6). Cette étape donne donc un premier niveau de purification et le matériel est ensuite utilisé pour les autres types de purification.

### Purification par chélation métallique

Deux résines ont été utilisées pour la purification par chélation métallique, soit la résine Nickel-Sépharose de la compagnie Novagen et la résine Nickel-NTA-Sépharose de la compagnie Qiagen. L'élution de la protéine se fait par gradient de pH ou par gradient d'imidazole. Le gradient n'a pas été nécessaire car la colonne n'a pas retenu de protéines non spécifiques dans le cas de la purification du produit de pPR3. La figure 18 montre une purification typique sur résine Nickel-Sépharose (Novagen) du produit de pPR3 (14-15 kDa) après lavage de la colonne et élution à pH 5,0. La résine Nickel-NTA-Sépharose (Qiagen) a donné un niveau de purification semblable mais avec un rendement plus faible (résultats non montrés). L'élution par l'imidazole a très bien fonctionné également et a donné des résultats comparables. L'élimination de l'urée au cours du lavage de la colonne n'a pas interféré avec le rendement de purification.

Figure 17: Analyse sur gel de polyacrylamide du produit de pPR3 purifié par chélation métallique.

La bande présente à 14 kDa correspond à la protéase sous sa forme de précurseur. Les puits 1 à 5 et 7 correspondent à différentes fractions d'élution de la colonne ( $\sim 1\mu\text{g/ml}$ ). Le puits 6 contient le marqueur de faible poids moléculaire de Biorad ( $2\mu\text{g/ml}$ ).



### Purification par filtration sur gel de Séphadex G-75

Pour la séparation des différents produits, la résine de Séphadex choisie couvre toutes les tailles de protéines induites au laboratoire. L'éluant utilisé est composé d'acide acétique 50% ajusté à un pH de 2,5 avec de l'acétate d'ammonium. Les corps d'inclusion sont solubilisés dans le même solvant acide et sont chargés sur la colonne.

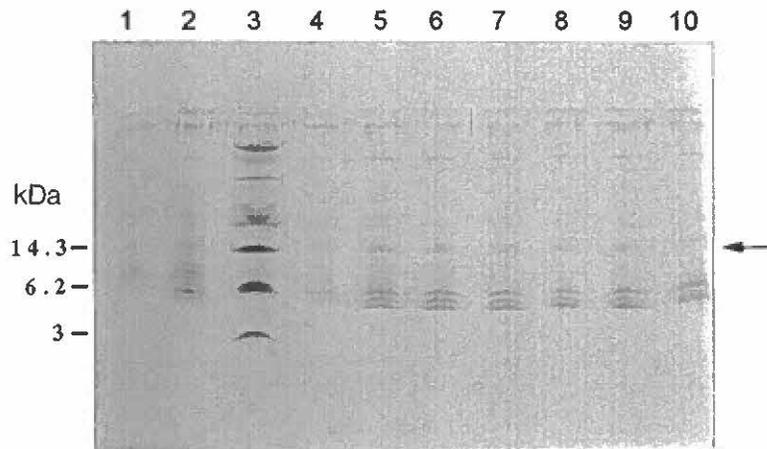
Jusqu'à maintenant, seul le produit d'expression de la construction pPR3 a été purifié par chromatographie de filtration sur Séphadex G-75. Les purifications ont été effectuées à partir des corps d'inclusion ce qui a permis d'éliminer une bonne partie des protéines contaminantes. La figure 18 montre les fractions retenues par la colonne. Une bande d'environ 14 kDa est présente dans ces fractions et qui correspond vraisemblablement au précurseur de la protéase. On observe également la présence de quelques protéines contaminantes entre environ 8 et 10 kDa. Une purification dans les mêmes conditions à partir des protéines totales de bactéries entraîne la présence de nombreuses autres protéines contaminantes.

### Purification sur colonne pepstatine A-agarose

La pepstatine est un inhibiteur spécifique aux protéases aspartiques. En couplant l'inhibiteur à une matrice, la protéase du VIH peut être purifiée par affinité.

Figure 18: Analyse sur gel de polyacrylamide du produit de pPR3 purifié par filtration sur Séphadex G-75.

La flèche indique la position de la protéase (14 kDa) présente dans les fractions de purification. Les puits 1, 2 et 4 à 10 correspondent à différentes fractions d'élution de la colonne ( $\sim 1\mu\text{g/ml}$ ). Le puits 3 contient le marqueur de faible poids moléculaire de Biorad ( $2\mu\text{g/ml}$ ).



Nous avons utilisé cette résine pour purifier la protéase à partir d'extraits bruts de bactéries induites pour minimiser les manipulations de l'enzyme. L'utilisation par cette colonne n'a pas permis la séparation de la protéase des autres protéines bactériennes malgré un lavage intensif de la colonne avant l'élution. De plus, la très grande majorité des protéines bactériennes a été éluée lors du passage du tampon d'élution.

## 7. Activité enzymatique

L'activité enzymatique a été évaluée sur l'extrait brut de bactéries induites lysées par sonication. Aucune activité enzymatique n'a été observée pour les inductions de pPR3 et pG71. Même avec le contrôle positif pET-24a-protéase utilisé dans les mêmes conditions, aucune activité protéolytique n'a pu être obtenue. Un même résultat négatif a aussi été observé dans des fractions purifiées de pPR3.

## **DISCUSSION**

De nombreux protocoles ont été publiés pour permettre l'expression et la purification de la protéase du VIH-1 dans un système bactérien. Ces méthodes nécessitent en général plusieurs étapes de purification et/ou donnent des rendements de purification insuffisants pour nos besoins. Nous nous sommes donc intéressés à la mise au point d'un protocole simple, rapide et donnant une protéase de qualité et en quantité suffisante. La mise au point de constructions permettant l'expression de fragments de la protéase devait également être faite.

#### Modification et amplification du gène de la protéase

L'utilisation de la RPC nous a permis d'obtenir rapidement tous les inserts voulus pour les différentes constructions (voir figure 8). Malgré la grande variation dans la séquence nucléotidique des amorces utilisées, la température d'appariement de 57 °C a été appropriée pour toutes les RPC effectuées (figure 11). De plus, nous n'avons obtenu en général qu'une bande amplifiée, ce qui montre la spécificité de la réaction.

Bien que la séquence des amorces prt-6 et prt-7 soit correcte sur papier, une erreur s'est glissée lors de la synthèse des oligonucléotides au service de synthèse d'oligonucléotides à l'IAF. Le séquençage a permis d'observer la délétion d'une base dans l'amorce prt-6 et l'insertion d'une base pour l'amorce prt-7. Ces erreurs n'ont pu être détectées avant le séquençage. Par conséquent, les constructions originant des amplifications FRA-50 et FRA-77 doivent être préparés de nouveau à partir de

nouvelles amorces. Par contre la séquence des autres amorces a pu être confirmée.

Le produit de la construction pPR3 porte deux acides aminés en position N-terminale absents dans la protéase normale du virus, après le clivage de la queue d'histidine par le facteur Xa. Pour obtenir la protéase naturelle sous forme de précurseur, nous avons effectué une autre amplification non décrite ici avec les amorces prt-2 et prt-4 qui ajoutait un site de clivage du facteur Xa au début de la protéase. Malheureusement, un examen attentif de la littérature nous a appris que le facteur Xa clive après la séquence Ile-Glu-Gly-Arg sauf si le résidu suivant est une proline, ce qui est le cas de la protéase du VIH-1 (Nagai et Thøgersen, 1984).

Une construction similaire qui ajoute, avant la proline (Pro<sup>1</sup>) de la protéase, le site Asp-Asp-Asp-Lys reconnu par une entérokinase est en cours de réalisation.

#### Sous-clonages des produits d'amplification

Les nombreuses tentatives (plus de 40 ligations) pour insérer directement le produit des RPC dans le vecteur d'expression pET-16b ayant échoué, le gène a d'abord été sous-cloné dans le vecteur pT7T3 $\alpha$ 18. Ce vecteur a l'avantage de permettre la sélection rapide des plasmides recombinants, c'est-à-dire portant un insert, en présence de X-GAL. Cette étape a permis de produire en grande quantité le produit des RPC. Autant que possible, il est préférable d'éviter la RPC parce que l'ADN polymérase Taq utilisée dans cette réaction ne comporte pas d'activité

correctrice d'erreurs. Le sous-clonage des différents produits de la RPC dans pT7T3 $\alpha$ 18 a été effectué sans difficulté et réussi dès la première tentative. La figure 12 présente les résultats du sous-clonage des produits de RPC. Dans tous les cas, y compris pour le clonage de PRO-1 aux sites *Bam*H I et *Hind* III, la déphosphorylation du vecteur avant la ligation a augmenté dramatiquement le nombre de colonies positives. En effet, cette étape permet d'éliminer la fermeture sur lui-même du plasmide digéré éliminant ainsi la présence de colonies négatives sur le pétri.

Pour isoler l'insert du vecteur de propagation pT7T3 $\alpha$ 18, nous avons utilisé deux techniques. La première consistait à faire migrer le vecteur digéré sur un gel d'acrylamide faiblement concentré (5%) et à exciser la bande d'ADN. L'ADN est alors élué par simple diffusion de l'acrylamide à un taux d'environ 25% par jour. Il faut donc environ quatre jours pour récupérer la maximum d'ADN. La seconde méthode consiste à utiliser la trousse Gene Clean II de Bio 101 qui permet d'isoler la bande d'ADN d'une migration sur gel d'agarose classique. L'avantage de cette trousse réside dans sa simplicité d'emploi et sa rapidité: moins de 20 minutes excluant la migration du gel. Cependant cette trousse perd son efficacité pour l'isolation de bandes d'ADN de moins de 300 pb. L'utilisation de la première méthode était donc de mise pour l'isolation des inserts de 190 et 271 pb correspondant aux fragments de la protéase (constructions pM14 et pU18).

La figure 13 présente les produits de clonage des RPC dans le vecteur d'expression pET-16b ainsi que la détermination de l'orientation des inserts. Tel que mentionné précédemment, nous avons éprouvé de grandes difficultés à cloner directement le gène d'intérêt dans pET-16b à partir du produit de la RPC. À notre connaissance, cette difficulté n'a pas été rapportée par d'autres groupes. Plusieurs rapports vecteur:insert allant de 1:3 à 3:1 ont été testés mais sans succès.

Nous avons observé que la réussite de la ligation dans ce vecteur était directement liée à la pureté des ADN utilisés. L'utilisation du vecteur commercial au lieu du plasmide provenant d'une maxi-préparation a grandement amélioré le rendement de ligation. La même observation a été faite lorsque l'on effectuait la ligation à partir d'un insert purifié par le Gene Clean II par rapport au gel d'acrylamide. Une autre façon de purifier l'ADN consisterait à la dialyser.

Nous avons été confrontés à un deuxième problème majeur lors du criblage des colonies, soit la troncation du plasmide c'est-à-dire la délétion d'une portion d'ADN. Le produit de la ligation visualisé sur gel d'agarose avant la transformation n'indiquait pas de troncation. La délétion d'environ 2700 pb correspond au segment se trouvant entre le site de clonage multiple et le gène du répresseur lac I. Cette délétion a été observée lors de tous les criblages effectués. Nous avons d'abord soupçonné la présence d'une séquence homologue entre le vecteur pET-16b et le gène de la protéase mais le phénomène de troncation a été observé même en absence d'insert. L'utilisation de la souche *E. coli* HB101 portant une mutation au niveau du gène *recA13* (souvent responsable des recombinaisons au niveau des

plasmides) n'a pas permis d'éviter ce phénomène, du moins dans la cinquantaine de colonies criblées par construction. Cette souche a été mise de côté rapidement à cause des problèmes qu'elle occasionne lors du criblage. En effet, la méthode par ébullition pour extraire les plasmides (mini-préparation) donne un niveau de pureté insuffisant pour permettre la digestion du plasmide. Cette souche oblige donc à recourir à la lyse alcaline plus longue avec davantage d'étapes de purification. Par contre, la même méthode par ébullition permet facilement le criblage d'une centaine de colonies DH5 $\alpha$  ou XL1-blue par jour. Une nette amélioration par rapport à DH5 $\alpha$  a été observée avec l'utilisation de la souche XL1-blue où l'on a pu obtenir environ 5% de colonies positives non-tronquées contre 0 à 1% avec DH5 $\alpha$  (voir tableau 1).

Par ailleurs, nous avons éprouvé des problèmes à obtenir des résultats de séquençage avec le plasmide pET-16b. Pour expliquer ces difficultés, le service de séquençage de l'IAF a mentionné comme causes possibles l'impureté de l'ADN, le taux élevé de plasmides superenroulés, le manque de matériel et la faible qualité des amorces utilisées pour la réaction de Sanger.

## Induction

Pour l'induction des différentes constructions, deux souches bactériennes, soit *E. coli* BI21 (DE3) et BI21 (DE3) pLysS, ont été utilisées. La construction pPR3 exprime la protéase sous forme d'un précurseur inactif qui a pu être visualisé sur gel

d'acrylamide tricine SDS-PAGE pour les deux souches utilisées (bandes à 14 kDa, figure 15). Nous évaluons que la bande de protéase correspond à environ 5% des protéines totales de la bactérie. L'utilisation d'un système d'expression similaire de la protéase a donné 6% des protéines totales (Hirel *et al.*, 1990). La tricine remplace la glycine dans la préparation des gels d'acrylamide car cette dernière ne permet pas d'obtenir une bonne résolution des bandes de protéines de 15 kDa et moins. La tricine, comme transporteur ionique, nous permettait d'obtenir une bonne résolution jusqu'à environ 5 kDa et jusqu'à 3 kDa pour des fractions de protéines purifiées et lyophilisées. Cette résolution est indispensable pour la visualisation des fragments de la protéase.

Le plasmide pET-24a-protéase codant pour la protéase sous sa forme naturelle a servi de contrôle positif d'induction. Cependant, la très grande toxicité de la protéase empêche un niveau d'expression suffisant pour sa visualisation sur gel d'acrylamide. Il a été rapporté que la souche BI21 (DE3) est incapable de porter un plasmide codant pour la protéase sous sa forme naturelle car le niveau d'expression basal de l'enzyme, c'est-à-dire en absence d'inducteur, est suffisant pour empêcher la propagation de la bactérie. L'expression de protéases mutantes inactives était par contre possible dans cette souche (Baum *et al.*, 1990, Cheng *et al.*, 1990). En accord avec ces observations, nous n'avons pas réussi à détecter la protéase dans cette souche pour les constructions pPR3 et pET-24a-protéase (figure 15 B). La souche BI21 (DE3) pLysS par contre a donné un faible signal d'expression par immunobuvardage bien que la protéase ne soit pas visible sur gel d'acrylamide. Le

rendement d'expression rapporté pour ce plasmide est d'environ 5 à 10  $\mu\text{g}$  par litre de culture bactérienne (laboratoire du D' Swanstrom, communication personnelle).

Bien que la construction pG71, confirmée par séquençage, n'a pas encore été testée par immunobuvardage, l'absence de bandes d'induction visibles pour les deux souches nous permet de nous attendre à des résultats similaires à ceux de pET-24a-protéase. L'absence de bandes d'induction semble également confirmer que la protéase dans la cellule *E. coli*, s'active en clivant la queue d'histidine. L'activité intracellulaire de la protéase a été observée et exploitée à maintes reprises pour la formation de précurseurs autoclivables (Debouck *et al.*, 1987, Strickler, *et al.*, 1989, Valverde *et al.*, 1992).

Pour ce qui est des fragments (constructions pM14 et pU18) l'absence d'induction est expliquée par l'erreur dans la séquence nucléotidique des amorces de RPC. Bien que seuls les clones M14 et U18 aient été séquencés, l'absence d'induction dans tous les autres clones positifs obtenus pour ces deux constructions nous porte à croire que la mutation se retrouve dans tous ces clones. Ce serait d'ailleurs logique si on considère que les amorces portant ces erreurs se retrouvent sur chaque segment d'ADN amplifié.

## Purification

La chélation métallique a déjà été utilisée pour la purification de la protéase du VIH-1 (Leuthardt et Roesel, 1993). La protéase purifiée contenait trois histidines en

positions N- et C-terminales de l'enzyme. La protéase, bien que sous une forme non naturelle, possédait une activité enzymatique normale. Le niveau de pureté d'environ 95% obtenu par ce groupe est comparable au nôtre (figure 17). Comme dans notre cas, la très grande majorité de la protéase se trouvait sous forme de corps d'inclusion.

Une modification majeure dans le protocole proposé par la compagnie Novagen a été apportée pour la purification du produit de pPR3. Après l'application de l'échantillon sur la colonne de nickel-Sépharose, la compagnie suggérait de laver la colonne avec un tampon contenant 60 mM d'imidazole puis d'éluer la protéine avec un gradient d'imidazole de 100 à 1000 mM. Nos essais préliminaires ont démontré que la protéase se détachait de la colonne à une concentration d'imidazole d'environ 5 mM soit 12 fois moindre que celle se trouvant dans le tampon de lavage. L'imidazole a donc été supprimé du tampon de lavage. L'élution du produit de pPR3 ne nécessitait pas non plus de gradient car la colonne est très spécifique pour la queue de 10 histidines.

Par la suite, l'élution par un changement de pH de 7,9 à 5,0 a été préférée à l'imidazole. De cette façon, la colonne peut être réutilisée immédiatement en la rééquilibrant à un pH de 7,9. L'élimination de l'urée au cours du lavage n'a pas interféré avec le rendement de purification mais elle a facilité les manipulations subséquentes des fractions purifiées.

Nous avons obtenu un meilleur rendement de purification avec la résine de Novagen par rapport à la résine de Qiagen. Il est difficile pour l'instant d'expliquer

cette observation.

Les conditions de purification utilisées avec la colonne de Séphadex G-75 proviennent de l'article de Hui et coll. (1993). Fait remarquable, cette équipe de chercheurs rapporte la purification de 85 mg de protéase sous sa forme naturelle par litre de milieu de culture soit environ 500 à 1000 fois plus que les autres équipes avec des constructions similaires. Tel que mentionné précédemment, l'acide acétique est utilisé comme agent dénaturant qui est éliminé lors de la lyophilisation des fractions. Dans leur publication, les auteurs ont omis de mentionner d'ajuster la solution d'acide acétique 50% à un pH supérieur à 2,0. En effet, le Séphadex se dégrade à un pH inférieur à cette valeur. Une solution d'acide acétique à 50% donne un pH d'environ 1,6, d'où la nécessité d'ajuster l'éluant à un pH supérieur. Cheng et coll. (1990a) ont également utilisé cet agent dénaturant pour la filtration sur Séphadex G-75 de la protéase du VIH-1 exprimée dans *E. coli*.

À partir d'une préparation de corps d'inclusion, la colonne a séparé efficacement la protéase du plasmide pPR3 des principales protéines contaminantes (figure 18). Quelques protéines de faible poids moléculaire subsistent dans les fractions purifiées. Une meilleure technique de lavage des corps d'inclusion serait à envisager pour permettre une purification plus efficace. Pour l'instant, la colonne de Séphadex G-75 est utilisée comme étape de purification préliminaire.

Le protocole de purification utilisé avec la colonne de pepstatine A-agarose

provient d'une publication de Wondrak et coll. (1991). La purification de la protéase par cette colonne est confrontée à plusieurs problèmes. D'abord, cette technique de purification nous oblige à manipuler la protéase sous sa forme repliée, donc active. Bien que les pH de manipulation (6,8 et 8,2) ne sont pas optimaux pour l'activité enzymatique de la protéase, elle demeure néanmoins suffisamment active pour se dégrader en un temps relativement court. Nous avons par exemple observé que la protéase commerciale laissée à -20°C dans 50% de glycérol perd totalement son activité en près de trois heures. Ensuite, les auteurs n'ont tenté de purifier que la protéase soluble dans le cytoplasme cellulaire alors que la majorité de l'enzyme se retrouve en corps d'inclusion, ce qui explique en partie leur faible rendement de 20% obtenu avec un niveau de pureté de 20 à 30% seulement.

L'utilisation de la pepstatine A-agarose n'a pas du tout donné les résultats escomptés. La presque totalité des protéines bactériennes ont été éluées en même temps que la protéase et ce, malgré un lavage intensif de la colonne. Hansen et coll. (1988) n'ont pas observé d'amélioration de pureté de la protéase par l'utilisation de cette colonne. Par contre, Rittenhouse et coll. (1990) ont obtenu une bonne purification avec un rendement d'environ 50%. Cette équipe a par contre utilisé une étape de purification supplémentaire pour arriver à ce niveau de pureté.

D'autres essais seront à effectuer par exemple en ajoutant un gradient de pH pour tenter d'éliminer les protéines contaminantes. La colonne pourrait être utilisée à partir de corps d'inclusion solubilisés puis lyophilisés ou débarrassés des sels dénaturants.

## Activité

Nos résultats montrent que la protéase sous forme de précurseur exprimée par pPR3 n'est pas active aussi bien à partir d'une fraction brute que d'une fraction purifiée. Les mêmes résultats ont été obtenus indépendamment du clivage par le facteur Xa pour éliminer la queue d'histidines. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'acides aminés ajoutés en position N-terminale par notre stratégie d'expression et qui restent même après le clivage par le facteur Xa (voir la figure 8). Ces acides aminés supplémentaires pourraient vraisemblablement interférer avec la dimérisation de l'enzyme qui fait intervenir les régions N- et C-terminales (Loeb *et al.*, 1989a). Louis *et coll.* (1991) ont exprimé la protéase du VIH fusionnée au gène de la transcriptase inverse. Dans leur construction, une mutation empêchait l'autoclivage du précurseur. Ces auteurs n'ont pas observé d'activité enzymatique de leur précurseur entier. La même observation a été rapportée par Loeb *et coll.* (1989) qui ont exprimé la protéase fusionnée à la *maltose binding protein* dans le plasmide pMAL. Par contre, Kotler *et coll.* (1992) ont observé que la protéase fusionnée au gène GAG possédait une activité enzymatique. Ce groupe attribue cette différence d'observation à la variation de taille de la protéine fusionnée à la protéase.

L'extrait brut de bactéries induites portant le plasmide pG71 ou pET-24a-protéase n'a pas démontré d'activité protéolytique spécifique et ce, malgré la présence de protéase sous sa forme naturelle. Cette observation peut s'expliquer par

la présence de composés bactériens inhibant l'activité de la protéase. Il est également possible que l'enzyme soit inactivée lors des manipulations car, comme il a été mentionné précédemment, la protéase est susceptible à l'autodégradation dans un court laps de temps. Davantage de précautions seront à prendre lors des manipulations de l'enzyme comme par exemple de minimiser les manipulations de l'enzyme et de la congeler le plus rapidement possible à  $-75^{\circ}\text{C}$ .

Une autre hypothèse pour expliquer l'absence d'activité est que le test enzymatique utilisé est très sensible aux impuretés présentes dans le milieu de réaction. L'utilisation de tests alternatifs serait à envisager comme par exemple mesurer le taux de clivage d'un peptide reconnu par la protéase par HPLC ou doser le clivage d'un précurseur GAG visualisé sur gel de polyacrylamide ou par immunobuvardage de type Western.

## **CONCLUSION**

Au cours de ce projet de recherche, nous avons effectué plusieurs constructions plasmidiques permettant l'expression de la protéase du VIH-1 sous différentes formes ainsi que des fragments de celle-ci dans un système bactérien. Nous avons pu confirmer l'expression de la protéase sous forme d'un précurseur avec la construction pPR3 ainsi que sous sa forme naturelle à l'aide d'une construction contrôle provenant d'un laboratoire de États-Unis. Ces produits ont également été partiellement purifiés.

Nous avons rencontré certains problèmes tant au niveau de la construction plasmidique que lors de la purification. Ces problèmes étaient associés à la stabilité des constructions et à la haute toxicité de la protéase pour la bactérie.

Ces travaux montrent l'importance de bien choisir le système bactérie/vecteur pour obtenir l'expression d'une protéine toxique. À partir de ces travaux de base, il sera possible dans un court délai d'obtenir suffisamment de protéase entière active et fragmentée pour accélérer nos travaux et augmenter nos chances de mettre au point de nouveaux inhibiteurs susceptibles de donner naissance éventuellement à des médicaments pour combattre le VIH.

## **REMERCIEMENTS**

Je veux remercier le D<sup>r</sup> Gilles Sauvé, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté comme étudiant dans son laboratoire de recherche ainsi que pour son soutien financier. Je remercie également mon co-directeur de recherche, le D<sup>r</sup> Jocelyn Yelle pour sa patience et sa très grande disponibilité.

Je remercie également Jeannot Lettre pour son aide précieuse dans les moments les plus durs et pour sa bonne humeur dans le laboratoire.

Je remercie Khampoune Sayasith pour son aide technique et pour son support moral quand j'en ai eu besoin.

Pour finir, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à rendre cette expérience enrichissante: Nicolas, Sanae, Rahim, Dorin, Karine, Abdallah, François, et j'en passe.

## **BIBLIOGRAPHIE**

ARNOLD, E., et G.F. ARNOLD. 1991. Human immunodeficiency virus structure: implications for antiviral design: *Adv. Virus Res.* 39: 1-87.

BARRÉ-SINOUSSE, F., J. C. CHERMANN, F. REY, M. T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VÉZINET-BRUN, C. ROUZIOUX, W. ROZENBAU et L. MONTAGNIER. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-870.

BAUM, E. Z., G. A. BEBERNITZ et Y. GLUZMAN. 1990. Isolation of mutants of human immunodeficiency virus protease based on the toxicity of the enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5573-5577.

BODAO, R. J. 1995. Antisense drug delivery through the blood-brain barrier. *Advan. Drug Delivery Rev.* 15: 73-107.

BORMAN, S. 1995. Clinical trials to begin on designed AIDS drug. *C&EN* (Feb 13): 39-40.

BURKE, T. R. Jr., M. R. FESEN, A. MAZUMDER, J. WANG, A. M. CAROTHERS, D. GRUNBERGER, J. DRISCOLL, K. KHON et Y. POMMIER. 1995. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J. Med. Chem* 38: 4171-4178.

CHAMOW, S. M., A.-M. DULIEGE, A. AMMANN, J. O. KAHN, J. D. ALLEN, J. W. EICHBERG, R. A. BYRN, D. J. CAPON, R. H. R. WARD et A. ASHKENAZI. 1992. CD4 Immunoadhesins in anti-HIV therapy: new developments. *Int. J. Cancer. supplément 7*: 69-72.

CHENG, Y.-S. E., M. H. MCGOWAN, C. A. KETTNER, J. V. SCHLOSS, S. ERICKSON-VIITANEN et F. H. YIN, 1990. High-level synthesis of recombinant HIV-1 protease and the recovery of active enzyme from inclusion bodies. *Gene* 87: 243-248.

CHENG, Y.-S. E., F. H. YIN, S. FOUNDLING, D. BLOMSTROM et C. A. KETTNER. 1990a. Stability and activity of human immunodeficiency virus protease: comparison of the natural dimer with a homologous, single-chain tethered dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9660-9664.

CLAVEL, F., D. GUETARD, F. BRUN-VEZINET, S. CHAMARET, M.-A. REY, M. O. SANTOS-FERREIRA, A. G. LAURENT, C. DAUGUET, C. KATLAMA, C. ROUZIOUX, D. KLATZMANN, J. L. CHAMPALIMAUD et L. MONTAGNIER. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346.

COFFIN, J., A. HAASE, J. A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZLAN, N. TEICH, H. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT et R. WEISS. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.

COPELAND, T. D. et S. OROSZLAN. 1988. Genetic locus, primary structure and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease. *Gene Anal. Techn.* 5: 109-115.

DARLIX, J.-L. 1989. Nouvelles perspectives en chimiothérapie anti-virale. *M/S* 5: 213-219.

DEBOUCK, C., J. G. GORNIK, J. E. STRICKLER, T. D. MEEK, B. W. METCALF et M. ROSENBERG. 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the *gag* precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8903-8906.

DE CLERCK, E. 1995. Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *J. Med. Chem.* 38: 2491-2517.

DUBROVSKY, L., P. ULRICH, G. J. NUOVO, K. R. MANOGUE, A. CERAMI et M. BUKRINSKY. 1995. Nuclear localization signal of HIV-1 as a novel target for therapeutic intervention. *Molec. Med.* 1: 217-230.

DYDA, F., A. B. HICKMAN, T. M. JENKINS, A. ENGELMAN, R. CRAIGIE et D. R. DAVIES. 1994. *Science* 266: 1981-1986.

FAUCY, A. S. 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239: 617-622.

GALLO, R. C., S. Z. SALAHUDDEN, M. POPOVIC, A. M. SHEARER, M. KAPLAN, B. F. HAYNES, T. J. PALKER, R. REDFIELD, J. OLESKA, B. SAFAI, G. WHITE, P. FOSTER et P. A. MARKHAM. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk of AIDS. *Science* 224: 500-503.

GONDA, M., F. WONG-STAAAL, R. C. GALLO, J. E. CLEMENTS, O. NARAYAN et R. V. GILDEN. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173-177.

GRASBERG, B., P., MINTON, C. DeLISI et H. METZGER. 1986. Interactions between proteins localized in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6258-6262.

GRAVES, M. C., J. J. LIM, E. P. HEIMER et R. A. KRAMER. 1988. An 11-kDa form of human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* is sufficient for enzymatic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2449-2453.

GRINDE, B., C. E. CAMERON, J. LEIS, I., T. WEBER, A. WLODAWER, H. BURSTEIN et A.M. SKALKA. 1992. Analysis of substrate interactions of the Rous sarcoma virus wild type and mutant proteases and human immunodeficiency virus 1 protease using a set of symetrically altered peptide substrates. J. Biol. Chem 267: 9491-9498.

GUYADER, M., M. EMERMAN, P. SONIGO, F. CLAVEL, L. MONTAGNIER et M. ALIZON. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature 326: 662-669.

HALLENBERGER, S., V. BOSCH, H. ANGLIKER, E. SHAW, H.-D. KLENK et W. GARTEN. 1992. Inhibition of furine-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. Nature 360: 358-361.

HANSEN, J., S. BILLICH, T. SCHULZE, S. SUKROW et K. MOELLING. 1988. Partial purification and substrate analysis of bacterially expressed HIV protease by means of monoclonal antibody. EMBO J. 7: 1785-1791.

HASELTINE, W. A. 1992. "The molecular biology of HIV-1". dans DeVita, V. T., Jr., S. Hellman et S. A. Rosenberg (éd.): AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention, 3<sup>e</sup> éd. Philadelphie: J. B. Lippencott Company: 39-59.

HIREL, P.-H., F. PARKER, J. BOIZIAU, G. JUNG, D. OUTEROVITCH, A. DUGUÉ, C. PELTIERS, C. GIULIACCI, R. BOULAY, Y. LELIÈVRE, B. CAMBOU, J.-F. MAYAUX et T. CARTWRIGHT. 1990. HIV-1 aspartic proteinase: high level production and automated fluorometric screening assay of inhibitors. Antiviral Chem. Chemother. 1: 9-15.

HIRSCH, M. S. et J. CURRAN. 1990. "Human immunodeficiency viruses". dans B. N. Fields, D. M. et al.(éd.): Virology. New York: Raven Press Ltd.: 1545-1570.

HUI, J. O., A. G. TOMASSELLI, I. M. REARDON, J. M. LULL, D. P. BRUNNER, C.-S. C. TOMICH et R. L. HEINRICKSON. 1993. Large scale purification and refolding of HIV-1 protease from *Escherichia coli* inclusion bodies. J. Protein Chem. 12: 323-327.

JACKS, T., M. D. POWER, F. R. MASIARZ, P. A. LUCIW, P. J. BARR et H. E. VARMUS. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 *gag-pol* expression. Nature 331: 280-283.

KAPLAN, A. H., M. MANCHESTER et R. SWANSTROM. 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J. Virol.* 68: 6782-6786.

KATZ, R. A. et A. M. SKALKA. 1994. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 133-173.

KOUP, R. A. et D. D. HO. 1994. Shutting down HIV. *Nature* 370: 416-417.

KOTLER, M., G. ARAD et S. H. HUGHES. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 gag-protease fusion proteins are enzymatically active. *J. Virol.* 66: 6781-6783.

KRAISELBURD, E. N. 1995. Biology of HIV replication. *Pediatric AIDS* 15: 181-191.

KRÄUSSLICH, H.-G., R. H. INGRAHAM, M. T. SKOOG, E. WIMMER, P. V. PALLAI et C. A. CARTER. 1989. Activity of purified biosynthetic proteinase of human immunodeficiency virus on natural substrates and synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 807-811.

LARDER, B. A., G. DARBY et D. D. RICHMAN. 1989. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243: 1731-1734.

LARDER, B. A. et S. KEMP. 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246: 1155-1158.

LEE-HUANG, S., P.L. HUANG, P. L. HUANG, A. S. BOURINBAIAR, H.-C. CHEN et H.-F. KUNG. 1995. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 92: 8818-8822.

LEUTHARDT, A. et J. L. ROESEL. 1993. Cloning, expression and purification of a recombinant poly-histidine-linked HIV-1 protease. *FEBS* 326: 275-280.

LEVY, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57: 183-287.

LEVY, J. A., A. D. HOFFMAN, S. M. KRAMER, J. A. LANDIS, J. M. SHIMABUKURO et L. S. OSHIRO. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.

LÉVY, J.-P. 1995. Le problème d'un vaccin contre le SIDA. *M/S* 11: 407-419.

LILLEHOJ, E. P., F. H. R. SALAZAR, R. J. MERVIS, M. G. RAUM, H. W. CHAN, N. AHMAD et S. VENKATESAN. 1988. Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 62: 3053-3058.

LOEB, D. D., C. A. HUTCHISON III, M. H. EDGELL, W. G. FARMERIE et R. SWANSTROM. 1989. Mutational analysis of human immunodeficiency type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. *J. Virol.* 63: 111-121.

LOEB, D. D., R. SWANSTROM, L. EVERITT, M. MANCHESTER, S. E. STAMPER et C. A. HUTCHISON III. 1989a. Complete mutagenesis of the HIV-1 protease. *Nature* 340: 397-400.

LOUIS, J. M., R. A. McDONALD, N. T. NASHED, E. M. WONDRAK, D. M. JERINA, S. OROSZLAN et P. T. MORA. 1991. Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 199: 361-369.

LOUIS, J. M., E. M. WONDRAK, T. D. COPELAND, C. A. D. SMITH, P. T. MORA et S. OROSZLAN. 1989. Chemical synthesis and expression of the HIV-1 protease gene in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 159: 87-94.

MATAYOSHI, E. D., G. T. WANG, G. A. KRAFFT et J. ERICKSON. 1990. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* 247: 954-958.

MELLORS, J. W., B. A. LARDER et R. F. SCHINAZI. 1994. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase and protease associated with drug resistance. dans G. Myers, B. Korber, S. Wain-Hobson, K.-T. Jeang, L. E. Henderson et G. N. Pavlakis (éd.): *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos: Theoretical biology and biophysics. III-93-III-106.

MILDNER, A. M., D. J. ROTHROCK, J. W. LEONE, C. A. BANNOW, J. M. LULL, I. M. REARDON, J. L. SARCICH, W. J. HOWE, C.-S. C. TOMICH, C. W. SMITH, R. L. HEINRICKSON et A. G. TOMASSELLI. 1994. The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. *Biochemistry* 33: 9405-9413.

NAGAI, K. et H. C. THØGERSEN. 1984. Generation of  $\beta$ -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309: 810-812.

NAVIA, M. A. et B. M. McKEEVER. 1990. A Role for the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in the orchestration of virus assembly. *Ann. N Y Acad. Sci.* 616: 73-85.

NEUZIL, K. M. 1994. Pharmacologic therapy for human immunodeficiency virus infection: a review. *Am. J. Med. Sciences* 307: 368-373.

NOWAK, M. A. et A. J. McMICHAEL. 1995. How HIV defeats the immune system. *Sci. Am.* 271: 58-65.

NUTT, R. F., S. F. BRADY, P. L. DARKE, T. M. CICCARONE, C. D. COLTON, E. K. NUTT, J. A. RODKEY, C. D. BENNETT, L. H. WAXMAN, I. S. SIGAL, P. S. ANDERSON et D. V. VERBER. 1988. Chemical synthesis and enzymatic activity of a 99-residue peptide with a sequence proposed for the human immunodeficiency virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7129-7133.

ORENTAS, R. J. et J. E. K. HILDRETH. 1993. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 9: 1157-1165.

PANTALEO, G et A. S. FAUCI. 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 487-512.

PETTIT, S. C., S. F. MICHAEL et R. SWANSTROM. 1993. The specificity of the HIV-1 protease. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1: 69-83.

PICHUANTES, S., L. M. BABÉ, P. J. BARR et C. S. CRAIK. 1989. Recombinant HIV-1 protease secreted by *Saccharomyces cerevisiae* correctly processes myristylated gag polyprotein. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 6:324-337.

PICHUANTES, S., L. M. BABÉ, P. J. BARR, D. L. DeCAMP et C. S. CRAIK. 1990. Recombinant HIV-2 protease processes HIV-1 pr53<sup>gag</sup> and analogous junction peptides *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 265: 13890-13898.

POORMAN, R. A., A. G. TOMASSELLI, R. L. HEINRIKSON et F. J. KÉZDY. 1991. A cumulative specificity model for proteases from human immunodeficiency virus type 1 and 2, inferred from statistical analysis of an extended substrate data base. *J. Biol. Chem* 266: 14554-14561.

PRUSOFF, W., T.-S. LIN, A. PIVAZYAN, A. S. SUN et E. BIRKS. 1994. Empirical and rational approaches for development of inhibitors of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Pharmacol. Ther.* 60: 315-329.

RANE, D. F., B. DASMAHAPATRA et J. SCHWARTZ. 1994. Recent advances in anti-HIV agents. *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**: 941-955.

RATNER, L. 1993. HIV life cycle and genetic approaches. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1**: 3-22.

RITTENHOUSE, J., M. C. TURON, R. J. HELFRICH, K. S. ALBRECHT, D. WEIGL, R. L. SIMMER, F. MORDINI, J. ERICKSON et W. E. KOHLBRENNER. 1990. Affinity purification of HIV-1 and HIV-2 proteases from recombinant *E. coli* strains using pepstatin-agarose. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171**: 60-66.

ROBERTS, M. M., T. D. COPELAND et S. OROSZLAN. 1991. *In situ* processing of a retroviral nucleocapsid protein by the viral proteinase. *Protein Eng.* **4**: 695-700.

ROBIN, T. et J. PLATTNER. 1993. HIV protease inhibitors: their anti-HIV activity and potential role in treatment. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**: 162-170.

SAAG, M. S., B. H. HAHN, J. GIBBONS, Y. LI, E. S. PARKS, W. P. PARKS et G. M. SHAW. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *Nature* **334**: 440-442.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SÁNCHEZ-PESCADOR, R., M. D. POWER, P. J. BARR, K. S. STEIMER, M. M. STEMPIEN, S. L. BROWN-SHIMER, W. W. GEE, A. RENARD, A. RANDOLPH, J. A. LEVY, D. DINA et P. A. LUCIW. 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus. *Science* **227**: 484-492.

SCHÄGGER, H. et von JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.

SCHNEIDER, J. et S. B. H. KENT. 1988. Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell* **54**: 363-368.

STONE, D. 1995. HIV protease inhibitors head to market. *Bio/Technology* **13**: 940-941.

STICKLER, J. E., J. GORNIK, B. DAYTON, T. MEEK, M. MOORE, V. MAGAARD, J. MALINOWSKI et C. DEBOUCK. 1989. Characterization and autoprocessing of precursor and mature forms of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease purified from *Escherichia coli*. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **6**: 139-154.

- SUBBRAMANIAN, R. A. et E. A. COHEN. 1994. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.* 68: 6831-6835.
- TOMASSELLI, A. G., W. J. HOWE, T. K. SAWYER, A. WLODAWER et R. L. HEINRIKSON. 1991. The complexities of AIDS: an assessment of the HIV protease as a therapeutic target. *Chimicaoggi* 9: 6-27.
- TRONO, D. 1995. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* 82: 189-192.
- VALVERDE V., P. LEMAY, J.-M. MASSON, B. GAY et P. BOULANGER. 1992. Autoprocessing of the human immunodeficiency virus type 1 protease precursor expressed in *Escherichia coli* from a synthetic gene. *J. Gen. Virol.* 73: 639-651.
- VELLA, S. 1994. Update on a proteinase inhibitor. *AIDS*. supplément 8: s25-s29.
- VOLKER, E. J. 1993. An attack on AIDS virus: inhibition of the HIV-1 protease. *J. Chem. Education* 70: 3-9.
- WINSLOW, D. L., S. STACK, R. KING, H. SCARNATI, A. BINCSIK et M. J. OTTO. 1995. Limited sequence diversity of the HIV type 1 protease gene from clinical isolates and *in vitro* susceptibility to HIV protease inhibitors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 107-113.
- WLODAWER, A. et J. W. ERICKSON. 1993. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 543-585.
- WONDRAK, E. M., J. M. LOUIS, P. T. MORA et S. OROSZLAN. 1991. Purification of wild-type HIV-1 protease and characterization of proteolytically inactive HIV-1 protease mutants by pepstatin A affinity chromatography. *FEBS* 280: 347-350.
- ZELPHATI, O., J.-L. IMBACH, N. SIGNORET, G. ZON, B. RAYNER et L. LESERMAN. 1994. Antisense oligonucleotides in solution or encapsulated in immunoliposomes inhibit replication of HIV-1 by several different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 22: 4307-4314.

**ANNEXE I: Séquence nucléotidique de la protéase du VIH-1**

(Clone obtenu du NIH)



<sup>1</sup>  
**CCG CAA ATC ACT CTG TGG CAG CGT CCA <sup>10</sup>CTG GTT ACC ATC AAA**  
 P Q I T L W Q R P L V T I K

**ATC GGT GGT CAA CTA <sup>20</sup>AAG GAA GCT CTG CTG GAC ACT GGT GCT**  
 I G G Q L K E A L L D T G A

<sup>30</sup>  
**GAT GAC ACC GTT CTC GAG <sup>Xho I</sup>GAA ATG TCT TTG CCA <sup>40</sup>GGT CGT TGG**  
 D D T V L E E M S L P G R W

**AAA CCG AAG ATG ATT GGT GGC <sup>50</sup>ATT GGT GGT TTC ATC AAA GTT**  
 K P K M I G G I G G F I K V

<sup>60</sup>  
**CGT CAG TAT GAT CAA ATC TTG ATT GAA ATC TGT GGT CAC <sup>70</sup>AAG**  
 R Q Y D Q I L I E I C G H K

**GCT ATT GGT ACC GTA CTA GTT GGT CCA <sup>80</sup>ACT CCT GTA AAC ATC**  
 A I G T V L V G P T P V N I

<sup>90</sup> <sup>Hinc II</sup>  
**ATT GGT CGT AAC CTG TTA ACT CAG ATC GGG TGC ACT TTA AAC**  
 I G R N L L T Q I G C T L N

<sup>99</sup>  
**TTC**  
 F