HAL
open science

Caractérisation de l'interaction entre Gag(NCp7) et la protéine cellulaire RPL7 : aspects moléculaire et fonctionnel

Hala El Mekdad

To cite this version:

Hala El Mekdad. Caractérisation de l'interaction entre Gag(NCp7) et la protéine cellulaire RPL7 : aspects moléculaire et fonctionnel. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ054 . tel-01228117

HAL Id: tel-01228117

https://theses.hal.science/tel-01228117v1

Submitted on 12 Nov 2015

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

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

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Hala EL MEKDAD

Caractérisation de l'interaction entre Gag(NCp7) et la protéine cellulaire RPL7 : aspects moléculaire et fonctionnel

Soutenue le 11 avril 2014 devant la commission d'examen :

Dr. Théophile OHLMANN	**Rapporteur externe**
Dr. Serge BOUAZIZ	**Rapporteur externe**
Dr. Christian SCHWARTZ	**Rapporteur interne**
Dr. Hugues DE ROCQUIGNY	**Directeur de thèse**

UMR CNRS 7213, Faculté de Pharmacie, ILLKIRCH

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Hala EL MEKDAD

Caractérisation de l'interaction entre Gag(NCp7) et la protéine cellulaire RPL7 : aspects moléculaire et fonctionnel

Soutenue le 11 avril 2014 devant la commission d'examen :

Dr. Théophile OHLMANN	**Rapporteur externe**
Dr. Serge BOUAZIZ	**Rapporteur externe**
Dr. Christian SCHWARTZ	**Rapporteur interne**
Dr. Hugues DE ROCQUIGNY	**Directeur de thèse**

UMR CNRS 7213, Faculté de Pharmacie, ILLKIRCH

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le Pr. Yves MELY, directeur du Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, CNRS UMR 7213 de la Faculté de Pharmacie de STRASBOURG de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie également les membres de mon jury, Dr.Théophile OHLMANN, Dr.Serge BOUAZIZ, Dr.Christian SCHWARTZ et Dr.Christiane MOOG d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon directeur de thèse, le Dr. Hugues DE ROCQUIGNY, qui m'a permis d'entrer dans le monde de la recherche. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur, la confiance que tu as en moi et ta grande disponibilité, et surtout merci pour avoir partagé ton expérience et ta rigueur scientifique avec moi.

Je tiens également à remercier le Dr. Emmanuel BOUTANT pour son aide dans ce projet, sa disponibilité et ses réponses à toutes mes questions.

Merci au Dr.Marina Biedma pur m'avoir aidé dans le projet, pour sa disponibilité, pour ses discussions et ses conseils scientifiques.

J'exprime ma gratitude aux Dr. Ludovic RICHERT et Dr. Pascal DIDIER ainsi qu'à Romain VAUCHELLES pour leurs assistances sur la plateforme d'imagerie PIQ, et à Mme Claudine EBEL (IGBMC) pour l'aide apportée lors des expériences de cytométrie. Merci au Dr. Eleonore REAL pour ses commentaires et ses conseils scientifiques rigoureux.

Je remercie vivement Marlyse Wernert et Ingrid Barthel pour leur grande disponibilité et leur aide sur le plan administratif.

Un grand merci au Dr. Kamal KANT SHARMA qui m'a encouragé tout le long de la rédaction de ma thèse pour son aide précieuse, son soutien et sa bonne humeur.

Je remercie très chaleureusement toute l'équipe « biophotonique » et plus particulièrement : Salah EL MESHRI, Noemie KEMPF, Manuel PIRES, Sarwat ZGHEIB, Nedal TAHA, Nicolas CHAVONAND, Francois BAPTISTE, Cindy WEIDMANN et Jéromine KLINGER.

Remerciements

A mes parents qui m'ont toujours soutenu pour aller jusqu'au bout de mes ambitions, qui m'ont fait confiance et m'ont donné confiance. A mon frère Hassan et mes sœurs, Rima, Rola, Khouzam, Nedal, et Sirine pour leurs encouragements, leur amour et leur soutien au quotidien.

Table des matières

Abréviations **5**

Avant-propos **11**

Chapitre I : Les rétrovirus **13**

A Historique, caractéristiques et classification **13**

A.1. Définition et découverte 13

A.2. Caractéristiques générales 14

A.3. Classification 15

Chapitre II : le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) **17**

A Le genre Lentivirus de la famille des rétrovirus : le VIH-1 ..... **17**

A.1. Caractéristiques biologiques et cliniques 17

A.2. Origine et évolution phylogénétique 19

B Organisation génétique **20**

B.1. Les régions non-codantes 21

B.1.1 La région R 22

B.1.2 La région U5 23

B.1.3 Le domaine Psi d'encapsidation et de dimérisation 23

B.1.4 La région U3 24

B.2. Les régions codantes 24

B.2.1 Les protéines d'enveloppe, de structure, et à activité enzymatique 24

B.2.1.1. Les protéines d'enveloppe 24

B.2.1.2. Les polyprotéines de structure Gag et Gag-Pol 27

B.2.1.2.1. La matrice (MA) 27

B.2.1.2.2. La capside (CA) 29

B.2.1.2.3. La nucléocapside (NC) 31

B.2.1.2.4. La protéine p6 33

B.2.1.2.5. Les peptides SP1 et SP2 35

B.2.1.2.6. Les protéines enzymatiques 39

La protéase (PR) 39

La réverse transcriptase (RT) 40

L'intégrase (IN) 41

B.2.1.3. Les protéines régulatrices 43

B.2.1.3.1. Tat (Transactivator of transcription) 43

B.2.1.3.2. Rev (Regulatory of Virion Expression) 45

B.2.1.3.3. Nef (Negative Regulatory Factor) 46

B.2.1.3.4. Vif (Virion infectivity factor) 48

B.2.1.3.5. VpU (Viral protein U) 50

B.2.1.3.6. Vpr (Viral protein R) 51

C La structure de la particule virale 53

D Cycle réplicatif du VIH-1 55

D.1. Les phases précoces de la réplication du VIH-1 55

D.1.1 Reconnaissance, fusion et entrée 55

D.1.2 La transcription inverse 57

D.1.3 Import nucléaire et intégration 59

D.2. Les phases tardives (post-intégratives) de la réplication du VIH-1 60

D.2.1 Transcription de l'ADN proviral 60

D.2.1.1. Epissage du transcrit primaire 61

D.2.1.2. Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique 62

D.3. Traduction des ARN messagers 63

D.4. Assemblage 64

D.5. Bourgeonnement 67

D.6. Maturation de la particule virale 67

Chapitre III : Régulation de la traduction chez les eucaryotes et les rétrovirus 70

A La traduction chez les eucaryotes 70

B Les étapes de la traduction 71

C L'initiation de la traduction 73

C.1. L'initiation coiffe-dépendante de la traduction 73

C.2. L'initiation IRES-dépendante de la traduction 75

C.2.1 La traduction IRES dépendante chez VIH-1 77

C.3. Utilisation alternative du mécanisme coiffe et IRES dépendant 79

D Traduction et encapsidation 79

Chapitre VI : La protéine ribosomique humaine RPL7 82

A Structure protéique de la RPL7 82

B Localisation cellulaire de la RPL7 85

C Fonctions de la RPL7 86

C.1. La RPL7 possède une propriété de liaison au réticulum endoplasmique (RE) et est impliquée dans l'association du ribosome au RE 86

C.2. La RPL7 inhibe la traduction dans un système acellulaire 87

Problématiques et objectifs du travail de thèse 90

Chapitre III : Matériels et méthodes 92

A Matériels 92

A.1. Lignée cellulaire 92

A.2. Plasmides 92

A.3. Anticorps primaires et secondaires 93

A.4. Oligonucléotides 94

A.5. Bactéries compétentes 94

B Méthodes 95

B.1. Transformation des bactéries compétentes et purification de l'ADN plasmidique 95

B.2. Culture cellulaire : Passage des cellules HeLa, 293T et CEM-SS 95

B.3. Transfection cellulaire 97

B.4. Fixation des cellules HeLa et CEM-SS au PFA (paraformaldéhyde) 99

B.5. Immunofluorescence des cellules HeLa et/ou CEM-SS 100

B.6. Microscopie confocale 101

B.7. FRET (Förster/fluorescence Resonance Energy Transfer) 102

B.8. Dosage des protéines 104

B.9. Co-immunoprécipitation 105

B.10. Western blot 106

B.11. Cytométrie en flux (FACS) 107

B.12. Double hybride 108

B.13. Clonage Gateway 109

B.14. Mutagenèse 110

Résultats 112

Discussions et perspectives 178

Références Bibliographiques 184

Abréviations

aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APOBEC	APOlipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNi ou siRNA	ARN interférant, silencing RNA
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ARNv	ARN viral
ATP	adénosine 5'-triphosphate
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
CA	Protéine de Capside
CCR5	Chemokine CC motif Receptor 5
CD	Cluster of Differentiation
co-IP	co-immunoprécipitation
CTD	C-terminal Domain
CXCR4	Chemokine CXC motif receptor 4
CypA	Cyclophiline A
DIS	Dimerisation Initiation Site
DLS	Dimer Linkage Structure
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
E. coli	Escherichia coli
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein

env	Gène codant les protéines d'enveloppe
Env ou gp120	Protéines de l'enveloppe virale
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCCS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FDA	Food and Drug Administration
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
gag	Group-specific antigen, gène codant les proteins de structure
Gag	Polyprotéine de structure
Gag-Pol	Polyprotéine de structure et enzymatique
GTP/GDP	guanosine 5'-triphosphate/diphosphate
Hsp	Heat shock protein
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kb	kilobase
K_d	constante d'équilibre de dissociation
LE	Late Endosome
LTR	Long terminal repeat
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Protéine de Matrice
MHR	Major/main Homology Region
min	minute
MVB	MultiVesicular bodies
NC	Protéine de Nucléocapside
Nef	Negative Regulatory Factor

nef	Gène codant pour la proteine Nef
NES	Nuclear Export Signal
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localization Signal
nt	Nucléotide
NTD	N-terminal Domain
p6	Protéine au niveau C-terminale de $Pr55^{Gag}$
PBS	Primer Binding Site
PDB	Protein Data Bank
PI (4, 5) P_2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIC	Preintegration complex
PPi	Pyrophosphate inorganique
PPT	Polypurine Tract
PPTc	PolyPurine Tract central
PR	Protéase
PS	Phosphatiyl Sérine
Psi	Packaging Signal
RE	Réticulum Endoplasmique
Rev	Regulator of Virion Expression
rev	Gène codant pour la potéine Rev
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase H	Ribonucléase H
RPL26	Ribosomal Protein L26
RPL7	Ribosomal Protein L7
RPS14	Ribosomal Protein S14
RPS7	Ribosomal Protein S7
RRE	Rev Responsive Element

RT	Transcriptase Inverse ou RétroTranscriptase ou Réverse Transcriptase
SD	Splicing Domain
SIDA	Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise
SL	Stem Loop
TAR	Trans-Acting Responsive element
Tat	TransActivator of Transcription
tat	Gène codant pour la proteine Tat
TC	TétraCystéine
TMgp41	Protéine transmembranaire
TRIM	TRIpartite Motif
U3	Séquence unique en 3' de l'ARN génomique
U5	Séquence unique en 5' de l'ARN génomique
UNAIDS	the United Nations Joint Programme on HIV/AIDS
UTR	Untranslated Region
Vif	Viral Infectivity Factor
vif	Gène codant pour la proteine Vif
VLP	Virus Like Particles
Vpr	Viral Protein R
vpr	Gène codant pour la protéine Vpr
Vpu	Viral Protein U
vpu	Gène codant pour la protéine Vpu
Vpx	Viral protein X
vpx	Gène codant pour la protéine Vpx
WHO	World Health Organization

Nom des retrovirus

ALV	Virus de la Leucémie Aviaire
BIV	Virus de l'Immunodéficience Bovine
BLV	Virus de la Leucémie Bovine
EIAV	Virus de l'Anémie Infectieuse Equine
HTLV	Virus T-Lymphotropique
MLV	Virus de la Leucémie Murine
MMTV	Virus de la Tumeur Mammaire de Souris
RSV	Virus du Sarcome de Rous
SIV	Virus de l'Immunodéficience Simienne
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Avant-propos

Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH est responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise plus communément appelé SIDA. Depuis les premiers cas recensés d'infection par le VIH en 1981, l'épidémie est devenue mondiale. On parlait alors de 'gay syndrome' car il fut identifié chez des homosexuels. Selon la dernière estimation de l'Organisation Mondiale de la Santé (décembre 2011), plus de 34 millions de personnes vivent aujourd'hui avec le VIH/SIDA dans le monde (Figure 1), dont 3,3 millions d'enfants de moins de 15 ans. Bien que les circonstances de l'épidémie qui pèse sur les pays et les régions continuent de varier considérablement, l'**Afrique subsaharienne** rassemble à elle seule 69 % des cas. On compte environ 2,5 millions de nouvelles contaminations chaque année, et 1,7 millions de décès en 2011.

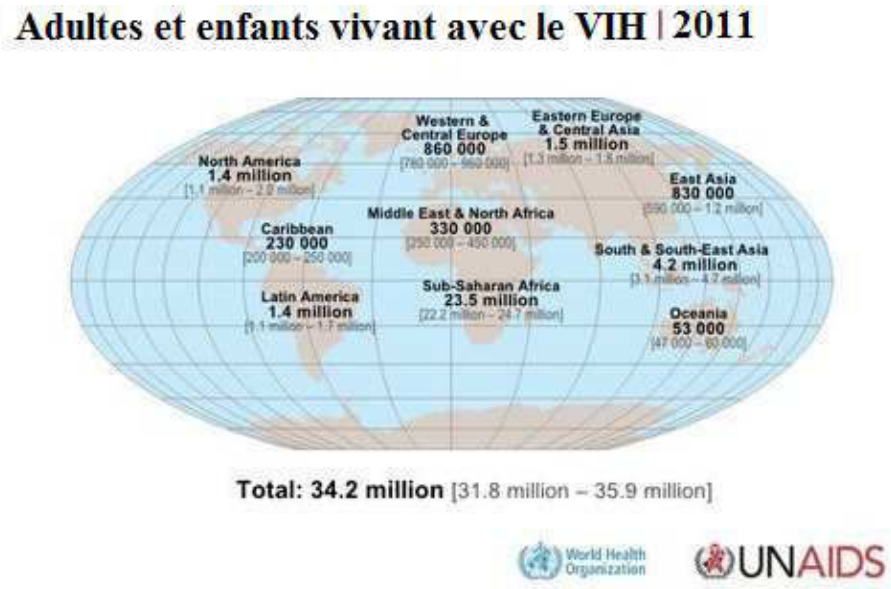

Figure 1 : Estimations mondiales fin 2011 par l'ONUSIDA et l'OMS, du nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA ainsi que du nombre de personnes infectées et décédées durant l'année 2011.

Le seul traitement disponible à ce jour est la trithérapie antirétrovirale qui consiste en l'utilisation combinée d'au moins trois antirétroviraux visant différentes protéines virales. Il est aussi parfois appelé polythérapie car s'ajoutent deux autres inhibiteurs, l'azidovudine et la saquinavir. Ce traitement permet d'empêcher le virus de progresser en diminuant la charge virale, de restaurer le

système immunitaire et diminuer la mortalité de l'infection par le VIH. En plus, il permet d'allonger l'espérance de vie et d'améliorer la qualité de vie des personnes infectées. Cependant, le problème majeur de ce traitement est son coût ce qui le rend inaccessible pour une grande majorité des personnes atteintes ainsi qu'aux pays en voie de développement. De plus, l'apparition de souches résistantes et les effets secondaires dus à ces drogues (lipodystrophie, nausées, allergies, toxicités hépatiques…) compliquent l'observance du traitement et nécessitent la recherche de nouveaux inhibiteurs ((1) ; site de l'OMS). (2)

Chapitre I : Les rétrovirus

A Historique, caractéristiques et classification

A.1. Définition et découverte

C'est en 1898 que Dimitri Iwanoski a découvert le virus et depuis cette date de nombreux autres virus infectant différents hôtes ont été découverts. En 1953, André Lwoff a décrit le concept de virus. Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire de nature corpusculaire ne pouvant se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte, capable de détourner à son profit la machinerie cellulaire pour la réalisation de son cycle de réplication. On peut classer les virus selon la nature ADN ou ARN de leur génome, simple ou double brin, de polarité positive ou négative.

Parmi les virus à ARN, il existe la famille des *Retroviridae* ou rétrovirus. Les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant un génome diploïde de type ARN simple brin de polarité positive de 7000 à 12000 nucléotides à partir duquel ils peuvent se répliquer. Le nom rétrovirus provient de l'enzyme qu'ils possèdent, appelée rétrotranscriptase, reverse transcriptase ou transcriptase inverse, découverte conjointement en 1970 par H. Temin chez RSV (3) et par David Baltimore chez MLV et RSV (4). Elle permet la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN bicaténaire.

En 1908, le premier rétrovirus fut découvert par Bang et Ellerman (5), il sera nommé ALV ou virus de la leucose aviaire. Quelques années plus tard, Peyton Rous identifia le virus du sarcome de Rous (RSV) responsable de tumeurs chez le poulet (6). Par la suite, d'autres rétrovirus associés à différentes formes de cancers furent découverts, tels que le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) en 1936, le virus du sarcome simien (SSV), en 1971, les virus de la leucémie féline (FeLV), ou bovine (BLV) respectivement en 1964 et 1972, et la liste ne cesse d'augmenter.

En 1981, le CDC (Center for Disease Control) d'Atlanta, qui centralise les informations sur les situations des maladies infectieuses, a annoncé un accroissement anormal de deux maladies connues mais très rares, la Pneumonie à Pneumocystis carinii (un champignon) et le sarcome de Kaposi, chez de jeunes malades homosexuels. Tous les malades souffraient d'un effondrement de leurs lymphocytes T CD4+. En 1982, le CDC baptisa cette nouvelle pathologie du nom de

« *Acquired Immune Deficiency Syndrome* » (AIDS). En 1983, le Pr. Montagnier de l'institut Pasteur de Paris a mis en évidence une activité rétrotranscriptase dans des cellules isolées à partir de ganglions d'un patient présentant les signes précoces du SIDA. L'agent pathogène est alors nommé le LAV (lymphadeno associated virus) (7,8). Ce virus présente un tropisme pour les lymphocytes T mais se révèle être distinct du HTLV1 (pour human T cell leukemia/lymphoma virus) premier rétrovirus humain découvert en 1980 par l'équipe du Pr. Gallo (9). En 1984, il a aussi isolé le virus HTLV-3 (Human T-cell lymphotropic virus type III) qui s'avéra être identique au LAV (10). En 1986, le comité international de taxonomie des virus adopta le nom de VIH (Virus de l'Immunidéficience Humaine) à la place de LAV et de HTLV-3. Au cours de cette même année Luc Montagnier découvre chez des malades d'origine africaine un second type de virus maintenant appelé VIH-2. Il a une structure identique à celle du VIH-1, mais son code génétique est très proche du virus de l'immunodéficience humaine (SIV) qui infecte particulièrement un singe africain, le mangabey (11) (Figure 2).

En 1987, il y a eu la découverte de la première molécule contre le VIH/SIDA : l'Azidothymidine (AZT), un inhibiteur de la transcriptase inverse.

De 1990 à 1995, c'est le passage de la monothérapie à la bithérapie : zidovudine + saquinavir. Le saquinavir est la première molécule découverte qui inhibe l'enzyme protéase du VIH.

En 1996, ce fut le commencement de la trithérapie avec le nouveau protocole : HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy).

A.2. Caractéristiques générales

Les rétrovirus possèdent des propriétés structurales, morphologiques et fonctionnelles communes :

- Sont des virus enveloppés produits par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule hôte.
- Taille des particules virales produites par ces rétrovirus varie entre 80 à 120 nm de diamètre.

- Leur génome est composé de deux copies d'ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 7 à 11 kb pour chaque brin.
- Possèdent une réverse transcriptase leur permettant de convertir leur ARN génomique en ADN double brin.
- L'intégration de leur génome sous forme d'ADN double brin dans celui de la cellule hôte.
- Variabilité génétique expliquant en partie l'absence d'activité correctrice de la reverse transcriptase et le mécanisme de recombinaison génétique lors du cycle réplicatif.
- Organisation génomique similaire contenant les gènes *gag, pol et env*.

A.3. Classification

La taxonomie des rétrovirus est basée sur les homologies de séquences nucléotidiques du gène *pol* (12,13). Des comparaisons de séquences d'acides aminés de la rétrotranscriptase, la protéine virale la plus conservée de ces virus, a permis au Comité International de Taxonomie des Virus ou ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en 2002 de distinguer deux sous-familles chez les rétrovirus : la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et la sous-famille des *Spumaretrovirinae* et sept genres de ces rétrovirus (Tableau 1). Cette classification est basée sur des critères de pathogénicité, de morphologie, de structure du génome et des propriétés oncogéniques. Les alpharétrovirus, betarétrovirus et gammarétrovirus sont des rétrovirus simples possédant uniquement les gènes *gag, pol et env*. Les rétrovirus complexes : les deltarétrovirus, les epsilonrétrovirus, les lentivirus et les spumavirus, codent en plus pour des protéines régulatrices.

Les alpharétrovirus, betarétrovirus, gammarétrovirus, deltarétrovirus et epsilonrétrovirus sont oncogènes. Ils induisent des tumeurs variées, principalement des leucémies, mais aussi des sarcomes (tumeurs des tissus conjonctifs), des carcinomes (tumeurs des tissus épithéliaux) et des lymphomes.

Outre la taxonomie, des différences structurales (apparence du noyau, mode de bourgeonnement, apparence des protéines d'enveloppe) sont observées en microscopie électronique et permettant de classer les rétrovirus simples en 4 groupes (14).

- Les particules de type A, intracellulaires, non enveloppées et non infectieuses, qui représentent la forme immature des rétrovirus.

- Les particules de type B, enveloppées, extracellulaires avec un « core » excentré, caractérisant les Betarétrovirus.

- Les particules de type C, enveloppées, extracellulaires avec un « core » sphérique et centré, regroupant les Alpharétrovirus ainsi que les Gammarétrovirus.

- Les particules de type D, enveloppées, extracellulaires avec un « core » en forme de cylindre, caractérisant également certains Betarétrovirus

Figure 2 : Origine simienne du VIH (15)

A) Le VIH-1 provient d'un seul sous-type de chimpanzés, *Pan troglodytes.*
B) Le VIH-2 provient du sooty mangabey, *Cercocebus atys*
C) Le phénograme radial démontre l'étroite relation entre VIH et SIV. Les distances indiquent le degré relatif d'évolution

Genre	Espèces types	Génome	Cancer
Alpharétrovirus	Virus de la leucose aviaire, ALV	Simple	oui
Bétarétrovirus	Virus des tumeurs mammaires de souris, MMTV	Simple	oui
Gammarétrovirus	Virus de la leucémie murine, MLV Virus xénotropique apparenté au virus de la leucémie murine, XMRV	Simple	oui
Deltarétrovirus	Virus de la leucémie bovine, BLV Virus humain T-lyphotrophe, HTLV	Complexe	oui
Epsilonrétrovirus	Virus du sarcome du derme de la perche, WDSV	Complexe	oui
Lentivirus	Virus de l'immunodéficience humaine, HIV	Complexe	non
Spumavirus	Virus spumeux de primates, PFV	Complexe	non

Tableau 1: Classification des rétrovirus

Chapitre II : le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

A Le genre Lentivirus de la famille des rétrovirus : le VIH-1

A.1. Caractéristiques biologiques et cliniques

Les lentivirus (Latin : Lenti=lent), sont des rétrovirus complexes responsables d'infections virales à développement lent, non oncogènes mais cytotoxiques à la différence des maladies provoquées par les rétrovirus oncogènes. Toutefois, il existe une phase de latence relativement longue entre l'infection et les premiers symptômes de la maladie. Ces symptômes sont corrélés à un état d'immunodépression aigue favorisant le développement de maladies auto-immunes et l'apparition de maladies opportunistes. Les lentivirus infectent différentes espèces animales, par exemple les primates (VIH-1, VIH-2, SIV), les félins (FIV), les bovins (BIV). Le « core » de ces lentivirus est de forme conique. Ces lentivirus possèdent plusieurs protéines auxiliaires et régulatrices (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu dans le cas de VIH-1) qui contrôlent la transcription, l'assemblage des virions, l'expression des gènes de l'hôte et d'autres fonctions de la réplication. Ils sont les seuls rétrovirus capables de se répliquer dans des cellules quiescentes (cellules qui ne se divisent pas, elles sont maintenues en phase G0 du cycle cellulaire).

Les cellules cibles des lentivirus sont les cellules dérivées de la moelle osseuse. Le VIH-1 en particulier infecte les lymphocytes T (CD4+) (cible majoritaire), mais aussi les monocytes/macrophages, les cellules dentritiques, les cellules du système lymphatique, hématopoïétique et nerveux.

L'infection par le VIH-1 conduisant au SIDA évolue en plusieurs phases pouvant se succéder dans le temps (Figure 3) :

La primo-infection : 2 à 6 semaines après la contamination, la multiplication virale est active, le nombre de lymphocytes T auxiliaires diminue progressivement et le virus se dissémine dans l'organisme (pour revue, (16)). L'organisme met 6 à 8 semaines pour organiser une défense immunitaire, qui permet de diminuer la charge virale. La baisse de la charge virale est

concomitante d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+, et une séroconversion se produit avec l'apparition d'anticorps spécifiques de protéines du VIH-1. Les symptômes cliniques de la primo-infection sont en général similaires à ceux de la mononucléose.

La phase asymptomatique : ou phase de latence qui dure en moyenne une dizaine d'années. La latence n'est qu'apparente car la destruction du système immunitaire progresse avec une diminution graduelle du taux de lymphocytes. Durant cette période, qui peut s'étendre à plusieurs années, il y a un équilibre entre la production de virus et son élimination. Le virus peut également rester à l'état latent, dans des cellules réservoirs de type CD4+ mémoire et macrophages. C'est au cours de cette période qu'apparaissent des variants du virus.

La phase symptomatique (SIDA) : Le système immunitaire est très affaibli. Cette phase est caractérisée par une augmentation importante de la charge virale ainsi que par un effondrement du taux de lymphocytes T CD4+ en dessous d'un seuil critique. Cette phase symptomatique dure en moyenne 2 à 4 ans et les nombreuses maladies opportunistes qui apparaissent conduisent à la mort du patient.

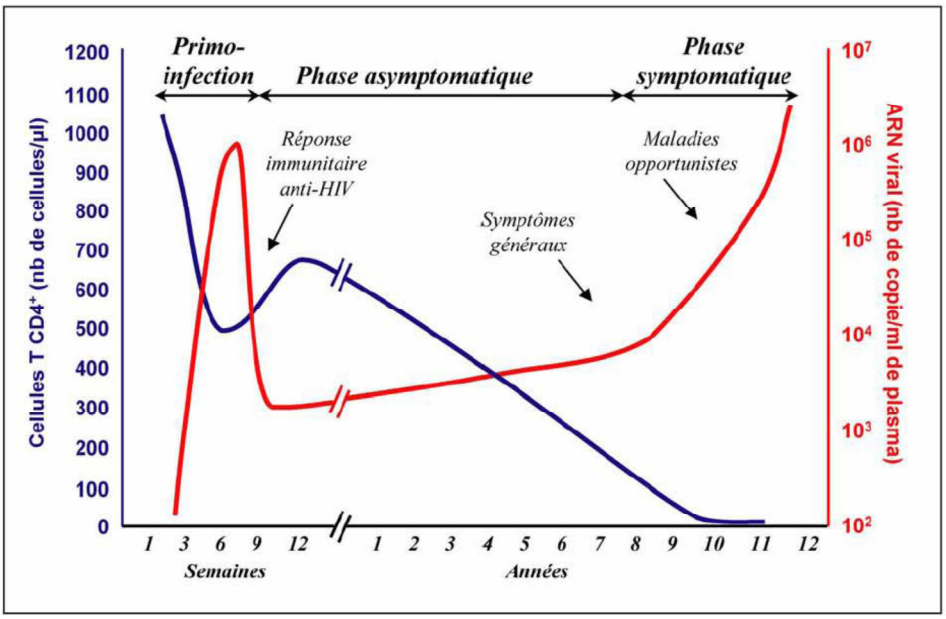

Figure 3 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1.
Les trois phases de l'infection par le VIH-1 sont représentées par l'évolution de la charge virale plasmatique (quantité de virus dans le plasma, en rouge) et du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants (en bleu) au cours du temps.

A.2. Origine et évolution phylogénétique

En 1999, il a été proposé que le virus VIH-1 dérive du virus de l'immunodéficience du chimpanzé (VIScpz), suggérant que l'introduction du virus VIH-1 dans l'espèce humaine résulte d'une transmission inter-espèce. L'Afrique de l'Ouest serait le lieu de la transmission du chimpanzé à l'homme, puisque c'est la seule région dans le monde où se côtoient les hommes infectés par le virus VIScpz (17). A l'heure actuelle, il existe un consensus pour dire que celui-ci s'est produit suite à l'ingestion de tissus infectés. Des études phylogénétiques montrent que le VIH-1 est plus proche du virus qui infecte naturellement les chimpanzés (VIScpz) que de VIH-2. Le virus VIH-2 proviendrait quant à lui d'une transmission à l'homme du virus SIVsm infectant les mangabeys (pour revue, (18)). L'épidémie du VIH-1 se distribue sur toute la planète, alors que l'épidémie du VIH-2 reste « localisée » en Afrique de l'Ouest (Cameroun, Côte d'Ivoire, Sénégal).

Les souches caractérisées du virus VIH-1 sont réparties en 3 groupes phylogénétiquement liés, les groupes M, N et O (Figure 4).

Le groupe M est le groupe « majoritaire » le plus répandu, responsable de la pandémie SIDA. Neuf sous-types de virus non recombinants composent ce groupe M : A (A1, A2), B, C, D, F (F1, F2), G, H, J et K. Le sous type B est quasiment le seul sous-type représenté en Amérique du Nord et en Europe ; en Asie c'est le C qui est majoritaire ; en Afrique on retrouve principalement les sous-types C et A. Des formes recombinantes ont également été trouvées, résultant d'une recombinaison génétique entre des virus de sous-types différents.

Le groupe O « Outlier » a été isolé chez des individus vivant au Cameroun, Gabon et Guinée équatoriale. Son génome présente 65% d'homologie avec le virus groupe M (19).

Le groupe N « New ou Non M, Non O » identifié par (20) dans un prélèvement datant de 1995 chez une femme du Cameroun. Ce groupe est phylogénétiquement lié au virus de l'immunodéficience simienne (SIV) qui infecte les chimpanzés (21).

Les sous-types à l'intérieur des groupes O (« outlier ») et N (« New » ou Non M non O) ne sont, à l'heure actuelle, pas clairement définis. Quant au VIH-2, on dénombre sept sous-groupes (A à G) (Figure 4).

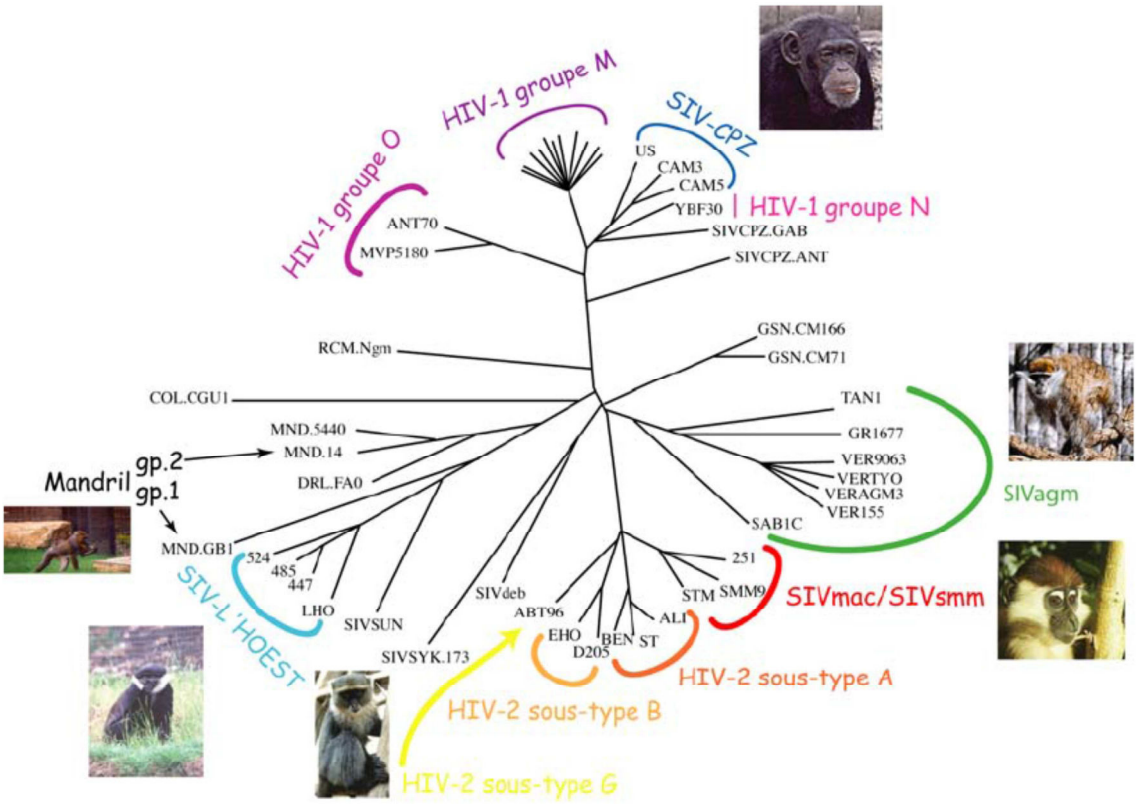

Figure 4: Arbre phylogénétique des lentivirus de primates établi par comparaison de séquences génomiques complètes (adapté de HIV sequence compedium 2002: http ://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/HTML/2002compendium.html)

B Organisation génétique

Le génome du VIH-1 est constitué de deux brins d'ARN non épissés identiques (22), d'environ 9.2 kb, maintenus ensemble par des interactions non covalentes. Le site majeur d'interaction des ARN, nommé « Dimer Linkage Structure » (DLS), a été visualisé par microscopie électronique au niveau des extrémités 5' (23). Ces molécules d'ARN sont issues d'une transcription par l'ARN polymérase II cellulaire et sont donc toutes deux coiffées à leur extrémité 5' et polyadénylées à leur extrémité 3'.

Comme indiqué sur la figure 5, le génome viral comporte 3 régions codantes principales, correspondant aux séquences des polyprotéines Gag, Pol (issues d'un précurseur commun) et Env. Elles codent respectivement pour les protéines de structure, les enzymes virales et les

protéines d'enveloppe. Le génome code également six autres protéines dites protéines auxiliaires ou régulatrices : Nef, Rev, Vif, Vpr, Vpu et Tat (Figure 5).

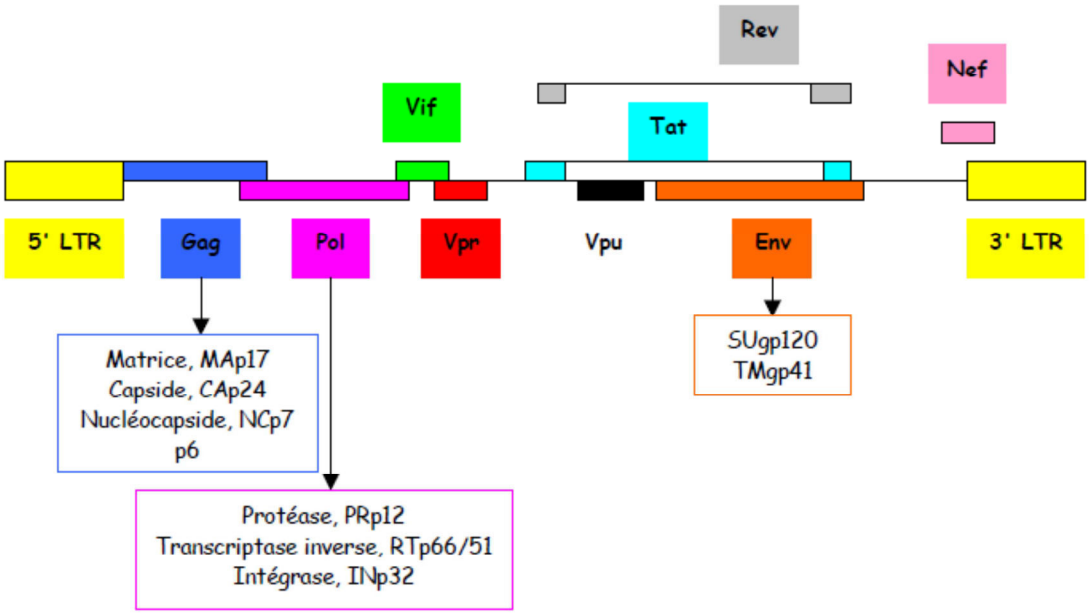

Figure 5 : Le génome du provirus du VIH-1

B.1. Les régions non-codantes

Dans l'ARN génomique, les séquences non codantes ou « UTRs » (UnTranslated Regions) flanquent les régions codantes pour les gènes des protéines virales. La région 5'UTR comporte les séquences R (Repeat), U5 (Unique en 5'), et le domaine Psi, tandis que la région 3'-UTR comporte U3 (Unique en 3') et R.

Suite à la transcription inverse, l'ADN proviral comporte deux régions non codantes, les LTRs (Long Terminal Repeats) aux extrémités 5' et 3'. Chaque LTR contient les séquences U3, R et U5 (Figure 6).

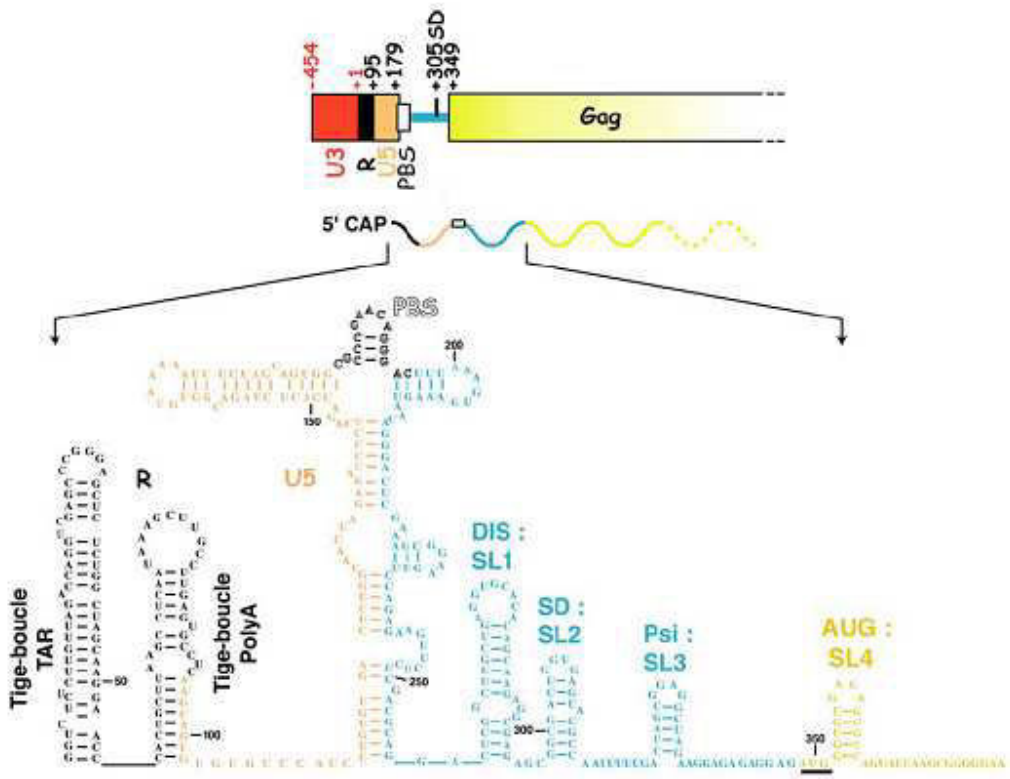

Figure 6 : Structure secondaire de la région traduite 5' de l'isolat MAL du VIH-1 (adaptée de **(24)**).

B.1.1 La région R

La région R (Repeat) (98 nucléotides chez le VIH-1) est présente en deux exemplaires de même polarité aux deux extrémités du génome. En position 5', elle correspond au site +1 de la transcription et au site de la coiffe. Cette région très structurée peut se diviser en 2 domaines ayant des fonctions bien distinctes :

- Une tige boucle appelée TAR (Trans-Activating Response element) composée de 55 à 59 nucléotides (Figure 6). TAR a été beaucoup étudié puisqu'elle est essentielle pour VIH-1. Des mutations affectant la séquence ou la structure de TAR présente à l'extrémité 5' ou à l'extrémité 3' des messagers diminuent grandement la réplication virale (25-27). Cette séquence est importante dans le premier saut de brin de la transcription inverse. TAR est aussi impliqué dans la régulation de la transcription de l'ADN viral via la protéine Tat, elle lie aussi la protéine cycline T1 (28).
- Une tige-boucle contenant le signal de polyadénylation (AAUAAA), en 3' de la séquence R. Ce signal est responsable de l'addition en 3' d'une queue poly(A), nécessaire à la maturation de

l'ARN messager. La stabilisation ou la déstabilisation de cette tige-boucle entraîne de graves problèmes de réplication chez le VIH-1 (29). Malgré la présence de cette séquence aux deux extrémités du génome, ce motif n'est fonctionnel qu'en 3'.

B.1.2 La région U5

La région U5 (Unique en 5'), (83 nucléotides chez le VIH-1) constitue la première partie de l'ARN génomique à être rétrotranscrite. Immédiatement en 3' de la région U5, se trouve la séquence PBS, composée de 18 nucléotides. PBS fixe spécifiquement un ARNt cellulaire utilisé comme amorce. Suivant le rétrovirus, la nature de l'amorce est différente (30). Dans le cas de VIH-1, l'ARNt_3^{Lys} s'hybride au PBS et permet l'initiation de la rétrotranscription (31,32).

B.1.3 Le domaine Psi d'encapsidation et de dimérisation

Le domaine Psi (Packaging signal) situé en 5' est important pour la dimérisation de l'ARN génomique et sa sélection lors de l'encapsidation. Il contient également le SD (site donneur d'épissage), pour l'épissage des ARNm.

Chez le VIH-1, Psi comprend quatre tiges boucles SL1 à SL4 (33,34).

La tige boucle SL1 du domaine Psi contient la séquence DIS (Dimerization Initiation Site) qui constitue le domaine central pour la dimérisation de l'ARN (35). C'est une tige-boucle coiffée d'une boucle de six nucléotides qui peut s'apparier avec la boucle DIS d'une autre molécule d'ARN. Cette interaction boucle-boucle appelée *kissing-loop* initie la dimérisation de l'ARN pleine longueur du VIH-1 qui joue alors son rôle d'ARN génomique. La boucle SL2 contenant le SD (splicing domain), un motif de neuf nucléotides, CUG-GUGAGU ou le tiret entre les nt représentent le site de coupure, qui correspond à un site donneur d'épissage majeur (36). Il est localisé dans la partie supérieure d'une courte tige-boucle. Ce qui signifie que tous les transcrits du VIH-1 sont clivés à cet endroit par le splicéosome sauf l'ARN pleine-longueur. La boucle SL3, qui constitue le site majeur d'encapsidation, a été longtemps considérée comme étant la seule boucle indispensable pour l'encapsidation (68, 69) mais des travaux plus récents ont montré que plusieurs séquences en amont de SL3 notamment la boucle SL1, étaient indispensables pour une encapsidation spécifique de l'ARN génomique (70-72).

B.1.4 La région U3

La région U3 (Unique en 3') (environ 450 nucléotides chez le VIH-1) contient les signaux requis pour la régulation de la transcription de l'ADN proviral en ARN viral par la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte (37).

On distingue d'autres régions non codantes au sein du génome viral :

Le PPT (Poly Purine Tract) et PPTc (Poly Purine Tract central) sont les domaines riches en purines du génome ARN. Le PPT 3' se situe immédiatement en amont de la séquence U3 du LTR en 3' du génome proviral, tandis que le PPTc est localisé dans le cadre ouvert de lecture du gène pol (38). L'activité RNase H de la rétrotranscriptase dégrade l'ARN génomique viral au cours de la synthèse d'ADN double à l'exception de deux séquences riches en purines qui serviront d'amorces à la synthèse du brin d'ADN (+).

RRE (Rev Responsive Element) (351 nucléotides) ce domaine est constitué de plusieurs séquences en tiges-boucles localisées dans le gène env. Il interagit avec la protéine Rev du VIH-1 ce qui facilite l'export nucléaire de transcrits viraux non ou semi-épissés (39).

B.2. Les régions codantes

Le génome du VIH-1 comporte les gènes gag et env des protéines de structure et d'enveloppe, le gène pol des protéines à activité enzymatique. Il comporte également les gènes *tat, rev, vif, vpu, vpr et nef*, codant pour les protéines régulatrices Tat, Rev, Vif, Vpu, Vpr et Nef respectivement.

B.2.1 Les protéines d'enveloppe, de structure, et enzymatique

B.2.1.1. Les protéines d'enveloppe

Le gène *env* (enveloppe) code pour un précurseur clivé en deux glycoprotéines de l'enveloppe : la glycoprotéine de surface gp120 (SU) et la glycoprotéine transmembranaire gp41 (TM).

L'enveloppe du virion est formée au cours du bourgeonnement du virion à la membrane de la cellule hôte. Elle contient donc des lipides et autres composants de cette membrane. La protéine

d'enveloppe virale composée des deux polypeptides TM et SU (Figure 7). Ces polypeptides sont liés entre eux par des ponts disulfures et des interactions non covalentes.

Les protéines d'enveloppe jouent aussi un rôle dans la survie et la réplication du virus. En effet, elles induisent la diminution de l'expression des récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées, en formant des complexes stables avec les récepteurs néosynthétisés dans le réticulum endoplasmique (40).

La glycoprotéine de surface SU : constitue la protéine de liaison au récepteur cellulaire, elle est responsable de l'attachement du virion à la surface de la cellule (Figure 7 I).

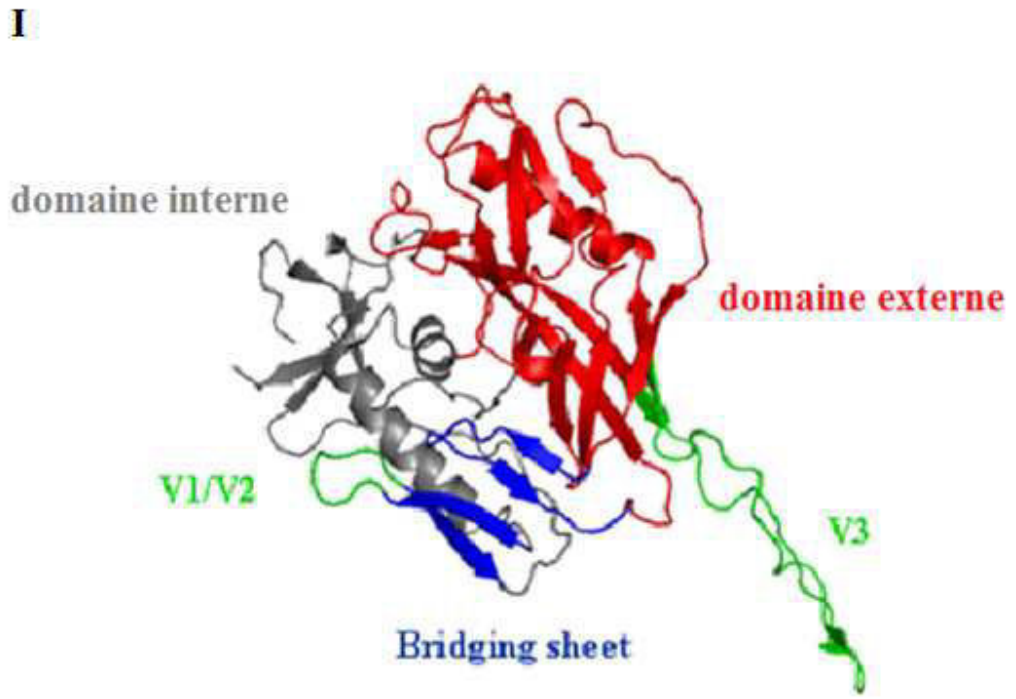

Figure 7 I : Structure tri-dimentionnelle de gp120 qui représente la conformation de la protéine liée à CD4 (pdb : 2b4c). Elle montre les domaines internes et externes de gp120, la tige boucle V1/V2 et les 4 brins β (CD4 induit un « bridging sheet » en bleu qui avec la boucle V3 en vert contribue à la sélectivité et à l'interaction avec le co-récepteur. (41).

La protéine transmembranaire TM : contient les domaines responsables de la multimérisation de la protéine d'enveloppe. Elle est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal interagissant avec la protéine de surface, une région transmembranaire et un domaine C-terminal

qui interagit avec la matrice. La structure de la protéine a été déterminée par cristallographie (Figure 7 II) : il s'agit d'un trimère, chaque monomère étant constitué de deux hélices alpha antiparallèles (42,43).

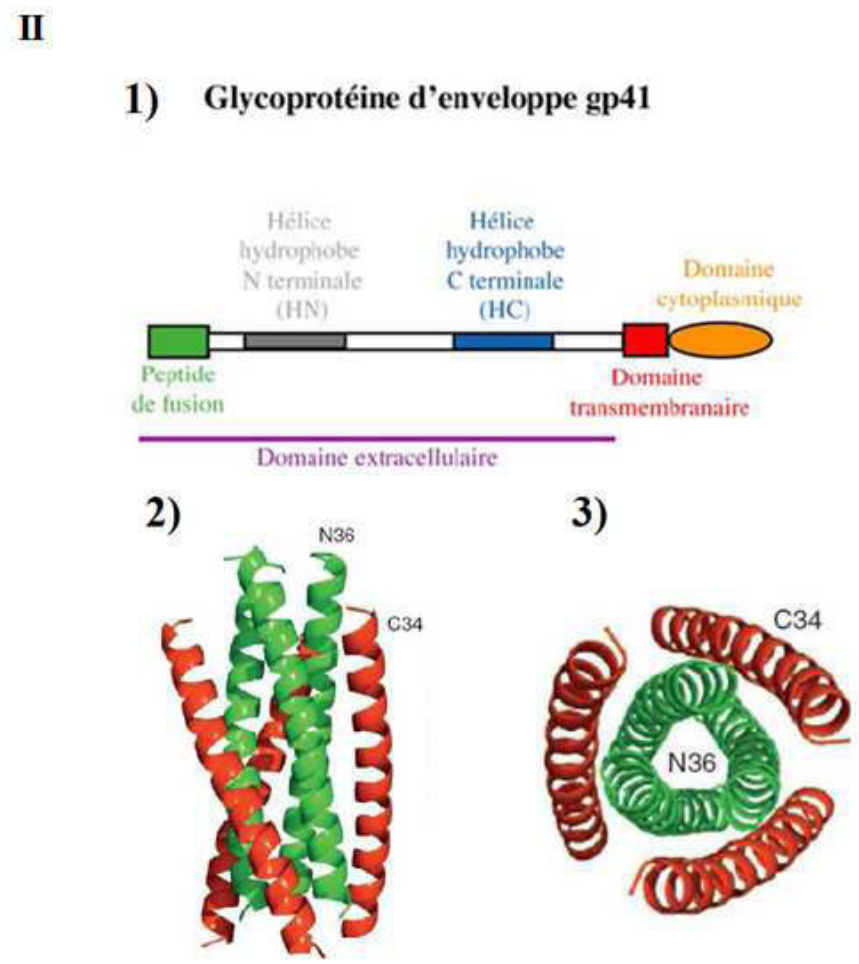

Figure 7 II : 1) La glycoprotéine d'enveloppe gp41 possède trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire, et extracellulaire. Le domaine extracellulaire est essentiel pour la fusion membranaire et contient le peptide de fusion, qui s'ancre dans la membrane de la cellule hôte lors de la fusion, et deux séquences hydrophobes, riches en leucine, formant des hélices alpha. 2) Structure trimérique de gp41 : N36 et C34 régions fonctionnelles formant une structure en alpha hélice stable. Les hélices N36 et C34 pointent dans des directions différentes. 3) vue du haut, les hélices N terminales, N36, s'associent entre elles et forment une structure centrale de type « coiled coil », entourées par les trois hélices C terminales C34. (44).

B.2.1.2. Les polyprotéines de structure Gag et Gag-Pol

La synthèse des précurseurs protéiques Pr55 ^{Gag} et Pr160$^{Gag-Pol}$ se fait à partir d'un même transcrit. En effet, la synthèse de Pr160$^{Gag-Pol}$ est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture des ribosomes en fin de traduction de Pr55^{Gag}. La présence d'une séquence « de glissement » associée à une tige boucle permet un décalage d'un nucléotide vers le côté 5' du cadre de lecture. Le rapport entre la synthèse de Pr55^{Gag} et Pr16$^{Gag-Pol}$ (20 :1) est critique pour la propagation du virus (45,46). La maturation de ces deux précurseurs génère les protéines structurales de la matrice (MA), de la capside (CA), de la nucléocapside (NC), de p6 et de deux petits peptides SP1 et SP2. Pr160$^{Gag-Pol}$ délivre en plus les protéines enzymatiques : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN).

B.2.1.2.1. La matrice (MA)

La matrice (MA) est une protéine de 132 acides aminés et présente un poids moléculaire de 17 kDa. Cette protéine possède plusieurs signaux de ciblage (signal d'adressage à la membrane, signal de localisation nucléaire, signal d'export nucléaire) régulés par des modifications structurales et biochimiques telles que la myristoylation, la multimérisation, ou la phosphorylation.

Les fonctions principales de la matrice impliquent un rôle dans l'assemblage et le bourgeonnement des virus, dans l'association à la membrane et dans la formation de la capside. Dans le cas de VIH-1, la matrice semble interagir avec la protéine d'enveloppe env pour faciliter son association avec l'enveloppe du virion (47,48).

Sa structure a été déterminée par cristallographie (49). Sous forme monomérique en solution, la protéine de matrice est trimérique lorsqu'elle est cristallisée (Figure 8).

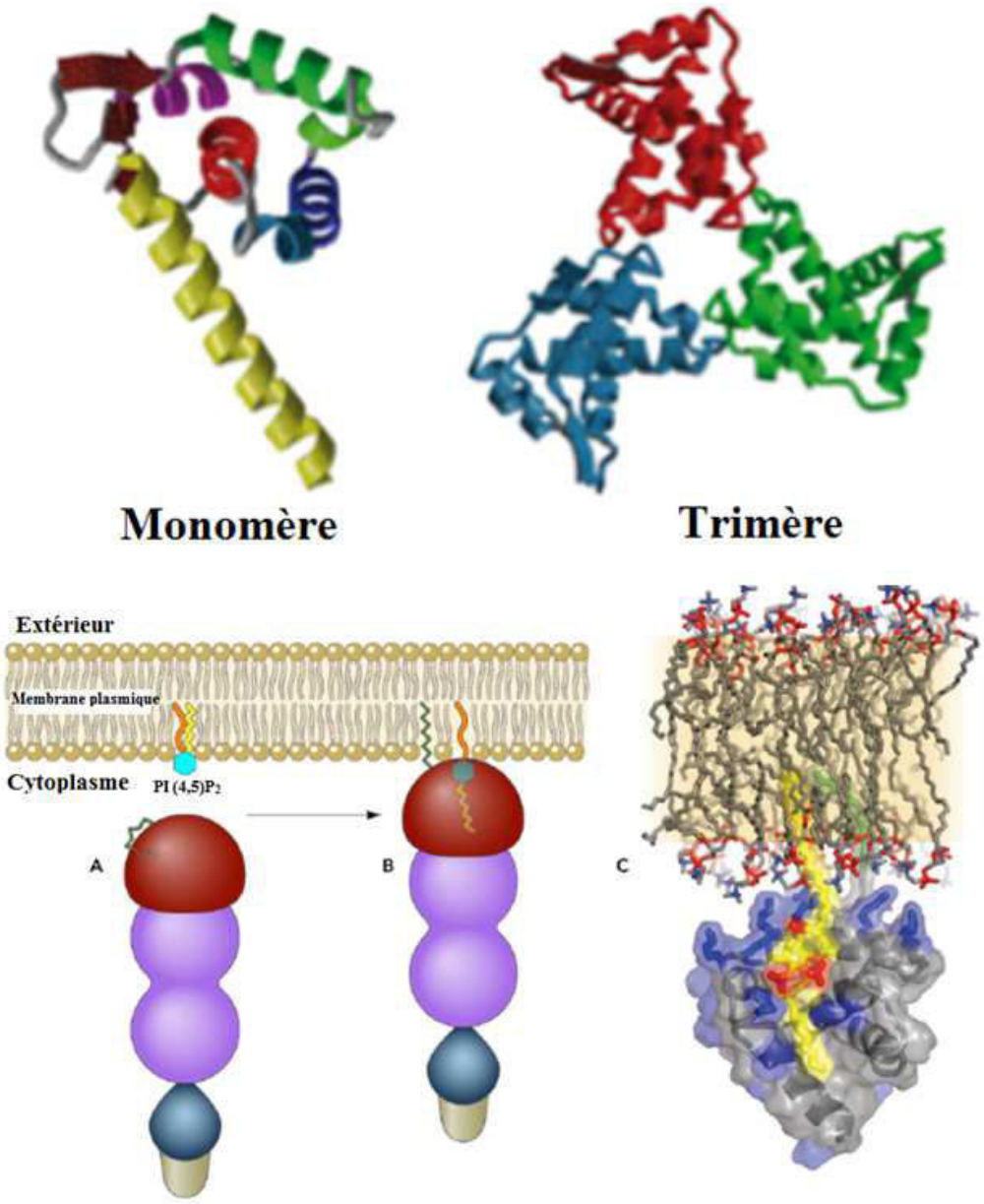

Figure 8 : Structure tri-dimensionnelle de la MA du VIH-1 en monomère et trimère est determinée en cristallograhie aux rayons X. L'extrémité NH2-terminale de l'acide myristique (en vert) se trouve enfouie dans la structure protéique de la MA. PI (4.5) P2, un marqueur de la face cytosolique de la membrane plasmique se trouve dans la membrane interne de la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Il est représenté par sa couleur 1' (orange) et 2' (jaune). La liaison de la MA et de la PI (4.5) P2 rend le groupe myristate accessible, ce qui conduit à son insertion dans la bicouche lipidique. Pendant la formation du complexe entre la MA du VIH-1 et PI(4.5)P2, la chaîne d'acyl insaturé en 2' de PI(4.5)P2 se lie à la partie hydrophobique de la matrice et le groupe myristyl de la MA en vert s'insère dans la bicouche lipidique (50).

B.2.1.2.2. La capside (CA)

Dans le virus mature, la capside (CA), constituée par l'assemblage de la protéine p24 (231 acides aminés) forme le « core » du virus, de forme cônique qui entoure l'ARN génomique viral, l'ARN de transfert ($tRNA^{Lys3}$), les protéines de nucléocapside et les enzymes rétrovirales.

La capside se subdivise en un domaine N-terminal (résidus 1 à 145) et un domaine C-terminal (résidus 146 à 231) (Figure 9).

Le domaine N-terminal est composé de sept hélices alpha, deux brins béta, et une boucle exposée au solvant, liant la cyclophiline A (51). L'implication de ce domaine dans l'infectivité de la particule virale serait liée à son interaction avec une protéine cellulaire, la cyclophiline A (CypA, une peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (52-54). Cette protéine chaperonne interagit avec la capside à un rapport Gag :CypA égal à 10 :1, modifie la structure de la capside (55,56) et inhiberait les interactions CA-CA, facilitant ainsi l'étape de décapsidation (51).

Le domaine CTD est composée de 4 hélices alpha et une petite partie C-terminale de 12 acides aminés, très flexible n'adoptant pas de structure particulière (57). C'est le domaine de dimérisation qui contribue aux interactions Gag-Gag (57) requises lors de l'assemblage. On y trouve le domaine MHR (Major Homology Region), constitué de 20 résidus (de l'acide aminé 153 à 172 dans la capside) qui est hautement conservé dans les protéines de la capside des différents rétrovirus et il est nécessaire lors de l'assemblage.

La capside a un rôle essentiel dans les premières étapes post-infection. Elle contient l'ensemble des acteurs nécessaires à la réplication et de nombreux travaux ont été développés afin de déterminer la stabilité du cœur viral après l'entrée du virus (revue dans (58)). Un premier modèle montre que dès la fusion et l'entrée du virus, la protéine de capside est dissociée du complexe ribonucléoprotéique qu'elle protége et cette dissociation entraine la poursuite de la reverse transcription. Le génome viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée ou en association avec la protéine d'intégrase il forme le PIC et entre dans le noyau via un mécanisme peu défini (59). Un deuxième modèle montre au contraire que la capside se désagrège de manière progressive au fur et à mesure de la reverse transcription. Ainsi, elle protège l'ADN génomique en cours de synthèse et participe à la vectorisation du PIC vers le noyau (60). Enfin, un troisième modèle montre que la capside reste totalement intègre lors du trafic intracytoplasmique du

complexe de réintégration jusqu'à la membrane nucléaire. Cette stabilité permettrait outre la protection d'assurer de très bonnes conditions enzymatiques (concentration, localisation des protéines…) pour le déroulement de la reverse transcription (61).

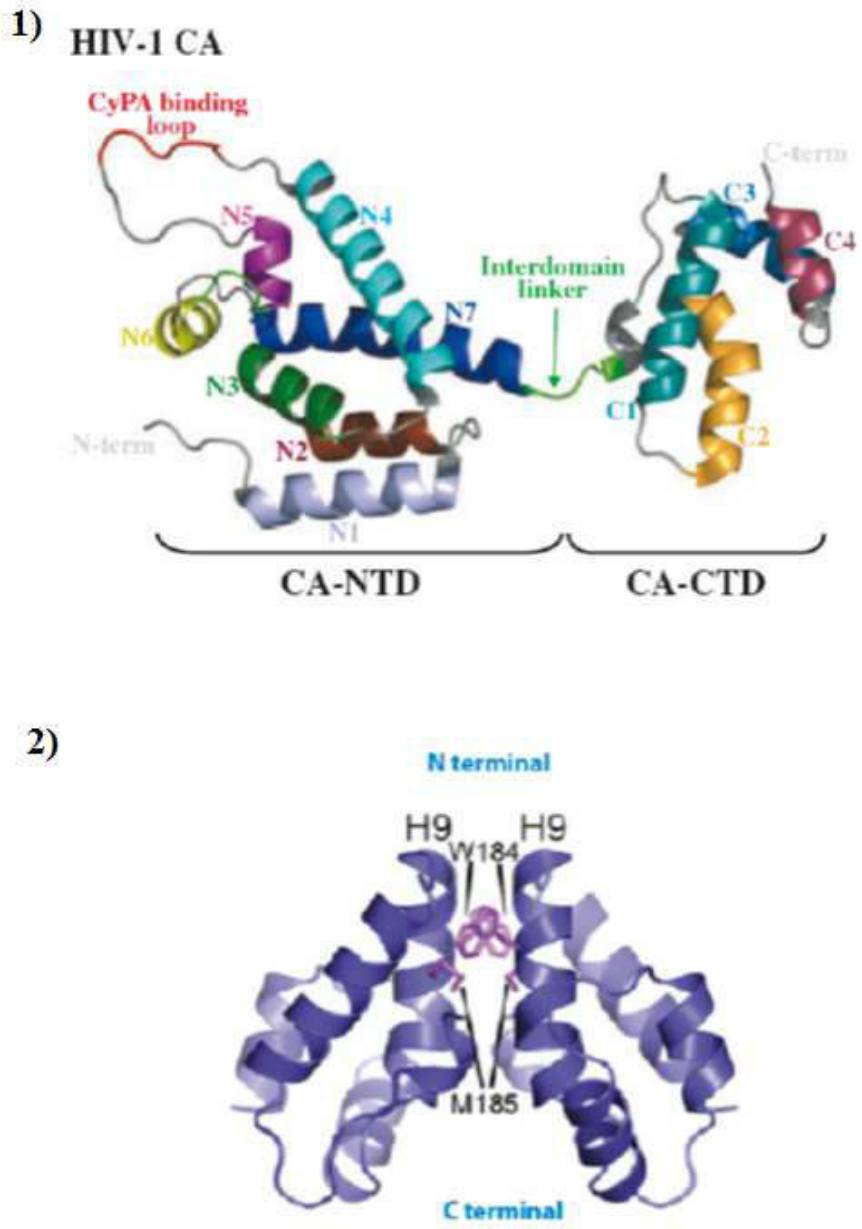

Figure 9 : 1) structure cristalline aux rayons X de la capside du VIH-1 : les hélices N1-N7 dans la région CA-NTD et C1-C4 dans la région CA-CTD, « CyPA-binding loop » (en roupe) et le « interdomain linker (en vert) sont représentées (62). 2) structure 3 D du dimère CA-CA formé après le clivage protéolytique de la jonction MA-CA. La structure en épingle à cheveux qui se forme uniquement après la protéolyse, conduit aux interactions CA-CA en facilitant la condensation du noyau de la capside pendant la maturation (63).

La nucléocapside (NC)

La protéine virale de nucléocapside NCp7 se compose sous sa forme mature de 55 acides aminés et présente un poids moléculaire de 7 kDa. NCp7 est obtenue après clivage protéolytique du précurseur Gag par la protéase virale. C'est une petite protéine basique, caractérisée par deux motifs en doigts de zinc très conservés, CX2CX4HX4C, aussi appelés CCHC, connectés par une séquence basique (64) (Figure 10). Ces doigts de zinc sont aussi appelés motifs dactyles et ils lient le Zinc avec une très forte affinité (Ka = $10^{-14}M^{-1}$) (65). Cette liaison impose un repliement de chaque motif CCHC autour de l'ion et une proximité spatiale grâce à la conformation du pont basique ^{29}RAPRKKG situé entre les deux motifs. Cette organisation conduit à la formation d'un plateau hydrophobe à la surface de la NCp7 du fait du rapprochement des résidus Val13, Phe16, Thr24, Ala25, Trp37 et Met46 (66,67). Il en ressort que la structure des doigts est importante pour son activité chaperonne. En effet, si on mute une des histidines par une cystéine, ce qui modifie la longueur de la liaison entre le peptide et le zinc, donc une déformation de la structure des deux doigts de zinc qui se traduit par une baisse de l'activité chaperonne de la protéine (68-72). Par ailleurs, une mutation des résidus Phe_{16} ou Trp_{37} rend également le virus non infectieux (73). Les résidus N- et C-terminaux (représentée en magenta et vert respectivement : Figure 10), sont très flexibles et balayent l'espace conformationnel.

La NCp7 possède de nombreuses fonctions dans le cycle viral :

Activité de chaperonne d'acide nucléique : Cette activité de chaperonne des acides nucléiques est essentielle lors de la transcription inverse, en induisant l'hybridation de l'ARNt^{Lys3} à l'ARN viral, en augmentant la vitesse de la réverse transcriptase et en activant fortement le saut des brins (74,75). NCp7 favorise le réarrangement des acides nucléiques vers leur conformation la plus stable en favorisant les duplex (76). Cette activité se décompose en trois étapes : interaction avec les acides nucléiques cibles, déstabilisation des brins et hybridation des brins complémentaires.

L'activité déstabilisatrice de la NCp7 dépend essentiellement des doigts de zinc (77) alors que les activités d'hybridation et de condensation dépendent essentiellement des parties basiques entourant les motifs CCHC (78,79) (Figure 10).

La protéine Gag possède elle aussi une activité chaperonne mais qui semble moins performante que celle de la NC (80,81). De manière intéressante, il a été montré que cette activité chaperonne était augmentée avec les produits de maturation de Gag NCp15, NCp9 et NCp7 (80-82). Inversement, la protéine Gag interagit fortement avec les acides nucléiques et cette affinité diminue dans les différents produits de maturations. Ceci suggère un modèle selon lequel lors des premières étapes de l'assemblage la protéine Gag nécessite une forte affinité pour reconnaitre et interagir avec l'ARN génomique. Puis au fur et à mesure de sa maturation par la protéase virale, cette affinité diminue au profit de l'activité chaperonne favorisant la reverse transcription (83,84).

Protection de l'ARNg viral : contre la dégradation par les nucléases et augmente également l'efficacité d'intégration de l'ADN viral dans la cellule hôte en permettant la formation d'un complexe IN-NCp7-ADN plus stable. Le niveau de protection est fortement dépendant de la présence des deux doigts de zinc ainsi que de celle des chaînes latérales basiques (85,86).

Rôle de la NCp7 dans l'encapsidation de l'ARN génomique : La protéine NCp7 présente une forte affinité pour les tige-boucles SL1, SL3 et SL4 (87,88). Elle est le médiateur de la reconnaissance de l'ARN viral parmi l'ensemble des acides nucléiques cellulaires. Les tige-boucles SL1, SL2, SL3 et SL4 ont chacune une affinité différente pour la NCp7 de telle manière que le site reconnu par la protéine est réparti sur les quatre tige-boucles (33). Les doigts de zinc sont nécessaires à l'encapsidation (89,90) mais n'ont pas la même importance. En général, toute mutation entraînant la déstructuration des doigts aura pour effet de diminuer l'encapsidation de l'ARN génomique au profit d'autres ARN notamment les ARN ribosomiques (90,91). Mais le doigt à l'extrémité N-terminale joue un rôle plus important que l'autre doigt puisqu'il reconnaît l'ARN viral (92,93). Une mutation de ce doigt a pour effet de faire baisser considérablement l'affinité de la NCp7 pour la séquence SL3 (72).

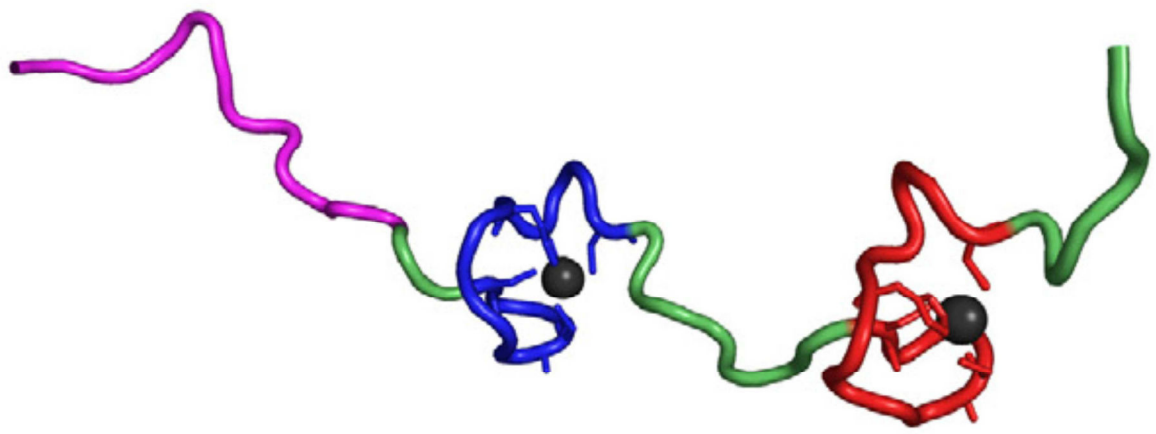

Figure 10 : Structure RMN représentative de la protéine nucléocapside du VIH-1 (PDB 1A1T) (adaptée de (94)).

La protéine p6

se situe à l'extrémité C-terminale du précurseur polyprotéique Gag. Cette protéine mature se compose de 52 acides aminés et a un poids moléculaire de 5 kDa et est surtout impliquée dans le bourgeonnFFFfement des particules virales (95).

Elle possède deux domaines appelés domaines tardifs ou 'late motif' qui interagissent avec plusieurs protéines de la famille des ESCRT. Ces protéines cellulaires sont impliquées dans la fission des membranes permettant 1- de fusionner des vésicules dans les MVB (multivesicular bodies) et 2- de séparer les cellules filles lors de la cytokinèse (revue dans (96)). Le premier motif tardif est une séquence riche en proline PTAP qui permet l'interaction avec le domaine UEV TSG101 du complexe ESCRT-1 (97-99). Le deuxième motif tardif qui semble moins important chez VIH-1 mais au contraire primordial chez d'autres rétrovirus est localisé dans la partie C terminal de p6 (Figure 11). C'est la séquence YPXL qui recrute la protéine Alix et qui est en fait un co-facteur des protéines ESCRT (100,101). De manière intéressante cette protéine ALIX, notamment son domaine Bro est aussi reconnu par la NCp7 lors du bourgeonnement de la particule (102-104).

Ces deux types d'interactions entre Gag et TSG101 ou ALIX permettent surtout à VIH-1 de détourner les protéines cellulaires de la famille des ESCRT à son profit. En effet, cette

interaction permet le recrutement des domaines ESCRT-3 (notamment le domaine CHMP4) et de VPS-4. La protéine CHMP4 est une protéine héliocoïdale qui, en étant recrutée, va polymériser de manière spirale en créant un point de bourgeonnement (105-107). Cette polymérisation va aussi permettre l'interaction avec la protéine VPS4, qui est une hydrolase dépendante ATP et qui en hydrolysant les protéines du domaine ESCRT-3 libère le virus de la cellule infectée (108).

L'ensemble de ce processus impliquant la protéine p6 est très dynamique et de nombreuses études notamment utilisant des outils modernes de microscopie de fluorescence ont montré que le recrutement des protéines ESCRT nécessitait environ 10 minutes (109,110) suivi d'environ 2 minutes pour libérer la particule sous l'action de la VPS4 (111,112).

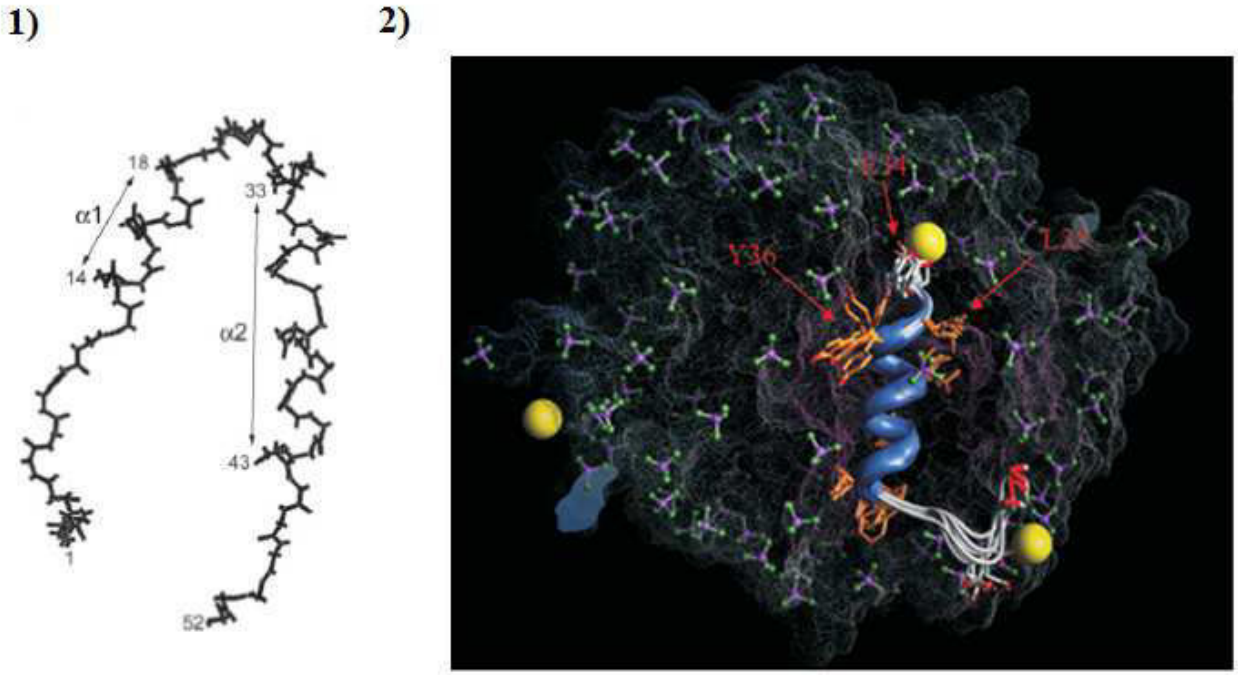

Figure 11 : Structure de p6 $_{(1-52)}$ et p6 $_{(32-52)}$
1 : Structure RMN de p6 $_{(1-52)}$; résolue en présence d'éthanol trifluorérique (TFE) (113).
2 : Structure RMN de p6 $_{(32-52)}$; résolue en présence de 30mM Na+ (sphères jaunes) et de micelles formées à partir de dodecylphosphocholine (DPC). Les groupements de tête de la choline sont représentés en vert et violet (114).

Les peptides SP1 et SP2

SP1 est composé de 16 acides aminés situés entre la CA et la NCp7 du précurseur polyprotéique Gag. Cette séquence qui se confond parfois avec la partie N terminale de la NCp7 aussi appelée le 'I domain' est très important lors de la polymérisation de Gag (115,116). Il semble qu'en milieu aqueux cette séquence ne soit pas structurée alors qu'elle adopte une structure hélicoidale amphipatique lorsque la constante diélectrique du milieu est réduite (116,117) ou sa concentration augmentée (118). Le modèle actuel serait donc que l'augmentation de la concentration locale de Gag pourrait contraindre le SP1 à adopter une structure en hélice qui en exposant des résidus hydrophobes favoriserait l'interaction CA-CA qui se propagerait alors au reste de la molécule Gag (118).

SP2 est situé en aval de la NCp7, il est donc constitutif de la NCp9. Très peu d'études sont consacrées à ce peptide mais il semble que des mutations de sa séquence entraînent des défauts de maturation suggérant un défaut d'accessibilité de la protéase virale (84).

Plusieurs partenaires cellulaires de Gag ont été identifiés mais il y a peu de ces interactions dont la fonction a été déterminée. Il s'agit notamment de la protéine actine (119), Staufen-1 (120,121) et plusieurs autres protéines (122). Ces différentes protéines ainsi que leurs fonctions dans le cycle réplicatif sont résumés dans le tableau 2 suivant :

paramètres d'interaction / partenaires cellulaires	technique utilisé	domaine impliqué/ spécificité	RNA Dépendant/ Indépendant	Virus	Role de l' interaction	type du virus	fonction de la protéine dans la cellule	Références
Stau (Staufen)	co-IP; BRET	les doigts de zinc de la NC de pr55^{Gag} /domaine N-terminal de Staufen et le domaine dsRBD3	Indépendante de l' ARN	incorporé sélectivement dans les virions du VIH-1.	-Régulation de l'oligomérisation de pr55^{Gag} pendant l'assemblage -Sélection et encapsidation de l'ARN génomique -Production des particules virales infectieuses.	VIH-1	-Appartenant à la famille des protéines de liaison à l'ARN double brin (dsRNA) -Rôle dans la localisation de l'ARN, traduction, et la dégradation des ARNm -Principal composant pour le transport de l'ARN des ribonucléoproteines (RNPs), granules de stress (SG) et autres types des RNPs.	(120,123-126)
Lyric (Lysine-rich carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule coisolated= CEACAM); astrocyte-elevated gene 1 (AEG-1); metadherin	une combinaison du pull-down et spectrométrie de masse, Affinité de purification TAP), co-IP	- (MA) and (NC) Gag/ (101-289) Lyric - Dépend de la multimérisation de Gag -Indépendante de l'association de Gag à la membrane.	Indépendant des acides nucléiques	incorporé dans les virions du VIH-1	Régulation de l'expression de Gag et de l'infectivité	VIH-1	- Gène induisant la réplication viral du VIH-1 dans les astrocytes -Impliqué dans la neuropathie -Voie de signalisation y compris Ras, NF-kB, PI3K/Akt, Wnt/β-catenin; -Effets anti-apoptotiques et impliqué dans la tumorigenèse	(127)

ABCE1 (cellular ATP-binding protein); HP68; RNase L inhibitor	co-IP; GST-pull down	5 à 10 résidus basiques de la (NC) du VIH-1 Gag, MA et CA/ ABCE1,	Indépendante de l' ARN	n'est pas présente en quantité significative dans les particules du VIH-1.	-Joue un rôle important dans l'assemblage de la capside après la traduction -Complexes formés au niveau membranaire et leur dissociation intervient dans la production de particules virales -Pourrait agir comme une molécule adaptatrice recrutant TULA pour Gag	VIH-1	-Hautement conservée et présente chez les eucaryotes, y compris les levures et les archéobactéries -Inhibe la ribonucléase L (qui a des propriétés antivirales). -Un rôle anti-apoptotique et pro-tumoral.	(128), **(129,130)**
Alix (apoptosis linked gene 2 interacting protein X)	GST pull down	(domaine Bro1) Alix/(LYPx$_n$L) p6 + doigts de zinc de la NCp7	Dépendante de l'ARN	Alix/Bro1 est incorporé dans les virions du VIH-1 et cette incorporation est dépendente de la NC-p1.	- Favorise le recrutement des composants de la machinerie ESCRT-III par son domaine Bro1 induisant la séparation du virus de la membrane cellulaire et favorisant ainsi la libération des particules virales.	VIH-1	-Protéine adaptatrice impliquée dans plusieurs processus intracellulaires (apoptose, endocytose, trafic membranaire...) -Participe aux évènements de fission de la membrane	(101,103)
Nuc (Nucleolin)	double hybride; GST pull down	Nuc(212)/Gag(NC) et le domaine CA pourra stabiliser l'interaction		Nuc (212) est incorporé dans les virions du Mo-MuLV	-La surexpression de Nuc212 inhibe l'infectivite et la libération du virion - peut inihiber l'assemblage des virus	MuLV	- Navette entre le noyau et le cytoplasme - Possède des motifs de reconnaissance d'ARN -Biogenèse des ribosomes et assemblage.	(131)

Actine	co-IP	Actine/ protéine NCp7 de Gag		Détectée dans les virions du VIH-1	-Rôle dans l'assemblage de Gag et/ou d'autres étapes du cycle viral	VIH-1	Microfilaments d'actine : composant essentiel du cytosquelette	(132)
RPL9 (L9) Ribosomal protein L9	double hybride; FRET; co-IP	C-terminal de la RPL9/(CA) de Gag principal déterminant de l'interaction			-Rôle dans l'assemblage du virus, bourgeonnement et favorise la production virale	MMTV	-Protéine de 192 acides aminés présente en une seule copie dans la grande sous-unité du ribosome. -Suppresseur de tumeur -Joue un rôle important dans la formation du ribosome, et dans son croissance et son développement	(133)
RPS19 (Ribosomal protein S19	co-IP	RPS19/ proteine de la nucleocapside (N)			L'interaction facilite le recrutement du ribosome à la coiffe pendant l'initiation de la traduction médiée par la protéine (N)	Hantavirus	-Protéine ribosomique identifiée chez des patients atteints d'une anémie (Diamond-Blackfan). - Interagit avec des protéines cellulaires y compris NTPases, hydrolases, isomérases, kinases, facteurs de transcription, facteurs d'épissage	(134,135)

Les protéines enzymatiques

Toutes les protéines virales enzymatiques sont obtenues après maturation du précurseur Gag-Pol.

La protéase (PR)

Par un mécanisme autocatalytique, la protéase est relarguée du précurseur $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ (136). Elle est impliquée dans la maturation des virions en clivant les polyprotéines $Pr55^{Gag}$ et $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ en leurs différentes composantes structurales et fonctionnelles. La protéase permet de cliver la polyprotéine à différents sites pour produire les protéines de la MA, CA, NC, et p6 de Gag et les protéines PR, RT, et IN de Pol. En absence de protéase fonctionnelle, les virions formés *de novo* demeurent non infectieux (137). La protéase se compose de 99 acides aminés et appartient à la famille des aspartyl-protéases. Elle se présente sous forme homodimérique avec son site actif, contenant la triade catalytique Asp25-Thr26-Gly27 située à l'interface des deux sous-unités. Comme les processus d'assemblage et de maturation doivent être concomitants, les facteurs influençant l'activité de la protéase peuvent avoir des effets dramatiques sur la production du virus. La surexpression de la protéase peut conduire à des taux de clivages aberrants et une diminution de l'infectivité (138).

La protéase est un homodimère symétrique (Figure 12). Le site actif de la protéine est situé à l'interface entre les monomères. Ce site est recouvert par un « Flap » qui doit être ouvert pour permettre l'accès aux substrats. La protéase constitue la première cible thérapeutique, et différents inhibiteurs dirigés contre cette protéine ont été développés en tant que traitement antiviral.

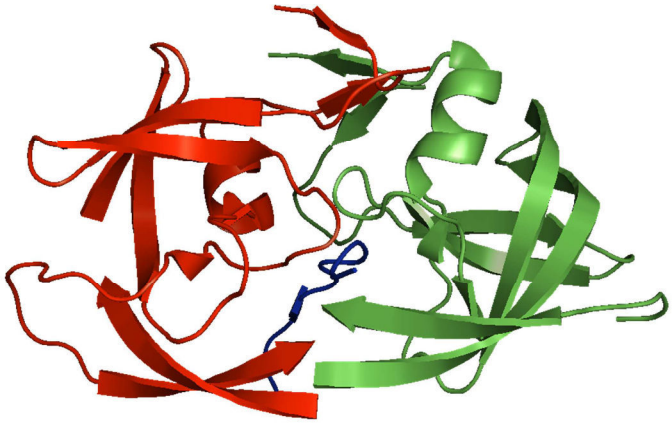

Figure 12 : Homodimère de la protéase du VIH-1 complexé à un substrat polypeptidique (bleu) (fichier pdb 1KJF). Les monomères sont représentés en rouge et en vert respectivement.

La réverse transcriptase (RT)

La transcriptase inverse (RT) est codée par le même précurseur Pr160Gag-Pol. Elle possède trois activités enzymatiques : une activité ADN polymérase ARN dépendante, une activité ADN polymérase ADN dépendante et une activité ribonucléase H (RNase H) polymérase dépendante ou indépendante qui dégrade spécifiquement l'ARN dans les duplex ARN-ADN formés pendant la réverse transcription (139). Elle permet la synthèse de l'ADN proviral à partir de l'ARN génomique. Cette enzyme ne possède pas une activité correctrice dite d' « édition » ce qui explique les recombinaisons génétiques qu'on trouve fréquemment chez VIH-1. Il y aura donc production de mutations (ponctuelles, insertions, délétions) au sein du génome viral avec une fréquence élevée (140).

La RT est un hétérodimère composé des sous-unités p66 de 560 acides aminés (66 kDa) et p51 de 440 acides aminés (51 kDa) et son activité est fortement liée à sa structure dynamique dans le complexe RT-amorce/matrice (p/t) (141) (Figure 13). P66 contient un domaine à activité polymérase composé de quatre sous-domaines appelés « fingers, palm, thumb, connexion » ce dernier interagissant avec le domaine à activité RNase H (142) (Figure 13). Le site actif de la RT, composé des résidus Asp110, Asp185, et Asp186, est conservé dans plusieurs polymérases. La sous-unité p51 possède la même séquence que p66 mais sans avoir le domaine RNase H. Ainsi p51 n'a pas d'activité polymérase, mais interagit avec le domaine RNase H de p66 et joue un rôle dans la structure de la RT.

Les deux sites actifs de la RT, polymérase et RNase-H sont séparés par une distance qui correspond à un duplex de 18 à 19 pb de la conformation ADN-A. Différentes structures de la RT du VIH-1 ont été identifiées parmi lesquelles 20 structures de RT sauvage comprenant ~20 pb de substrats d'acides nucléiques ADN/ ADN en complexe binaire ou ternaire (+dNTP), ce qui représente les différentes étapes du processus de la synthèse d'ADN (143-149).

Un ARN / ADN hybride a été capturé dans le domaine possédant l'activité polymérase de la RT (147) et plus récemment, un autre ARN / ADN hybride qui a un accès facile au site actif de la RNase-H a été aussi retrouvé (150,151). L'ensemble de ces points de vue concernant les complexes RT / acides nucléiques font preuve que la RT peut adopter au moins deux différents états structurels, un compétent pour la polymérisation et un autre pour la dégradation de l'ARN. Des approches de fluorescence ont mis en évidence l'existence simultanée de ces conformations

en solution (152,153) et démontrent que les RT peuvent dynamiquement bouger entre deux orientations, afin de favoriser l'activité polymérase ou l'activité ribonucléase selon la nature de l'amorce ARN ou ADN et/ou en réponse à la présence de dNTP apparenté (154,155).
La RT comme la protéase constituent des cibles thérapeutiques. Deux classes des inhibiteurs de la RT sont utilisés en clinique : analogues nucléosidiques comme l'AZT et ddI qui se lient au site actif de la polymérase et des inhibiteurs non nucléosidique comme le nevirapine.

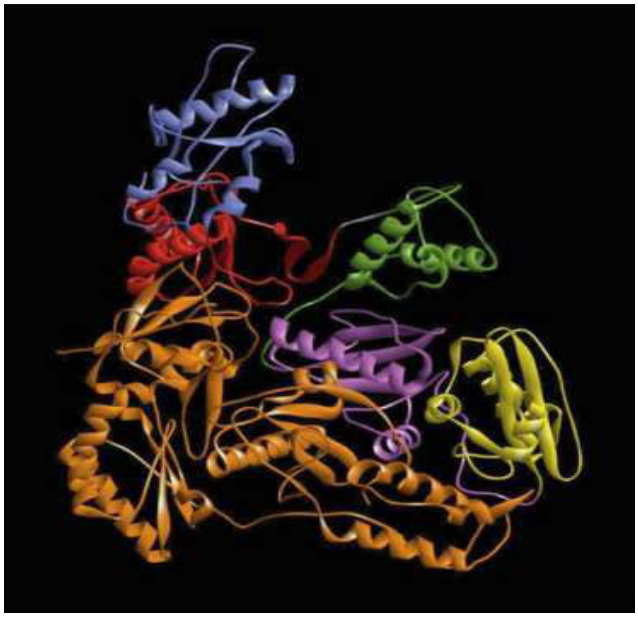

Figure 13 : Structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1.
Les domaines structuraux de la sous-unité p66 sont représentés dans différentes couleurs : les doigts sont en bleu, la paume en rouge, le pouce en vert, la connexion en mauve et le domaine RNase H en jaune. La sous-unité p51 est colorée en orange.

L'intégrase (IN)

C'est une protéine de 288 résidus à 32 kDa, qui permet l'intégration de l'ADN génomique viral dans le génome de la cellule infectée en reconnaissant spécifiquement les extrémités 5' et 3' des deux LTR. Cette étape est essentielle pour la réplication virale. Elle est codée par le précurseur $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ comme tous les autres enzymes virales.

L'intégrase est active en tant qu'oligomères, probablement en tétramères (156). Elle catalyse deux réactions chimiques : le clivage en 3' et le transfert du brin d'ADN en contexte d'un

complexe de préintégration (PIC). Elle comporte trois domaines fonctionnels distincts. Le domaine N-terminal (1-55 résidues) contenant un motif His-X3-His-X23-Cys-X2-Cys qui lie le zinc et forme un dimère avec une large interface hydrophobique montré par RMN (157), ce domaine joue un rôle dans l'oligomérisation de la protéine. Un domaine catalytique (50-212 résidues) central dont la structure dimérique (158) serait dissociée par sa liaison à l'ADN ou à des inihibiteurs (159,160) Un domaine C-terminal (220-270 résidues) de liaison à l'ADN. Le domaine N-terminal (157), les structures du domaine catalytique et du domaine C-terminal (161) ont été résolues par diffraction aux rayons X ou par RMN (Figure 14). Le premier inhibiteur approuvé par la FDA est le raltegravir (Isentress ^{R}).

L'intégrase possède d'autres fonctions que l'intégration, elle est impliquée dans la transcription inverse en interagissant avec la RT (162), l'import nucléaire (163), le ciblage de la chromatine (164). Avant l'intégration, l'IN semble être particulièrement importante dans la translocation du complexe de préintégration (PIC) dans le noyau de la cellule hôte et nécessaire pour l'infection des cellules quiescentes. De plus, comme la dégradation de l'IN associée à l'ADN intégré, via la voie du protéasome, déclencherait la transcription de cet ADN, il a été proposé que l'intégrase joue un rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN proviral (165). En effet, l'IN du VIH-1 interagit avec plusieurs protéines cellulaires, comme par exemple, l'intégrase INI1 (interactor protein 1 une composante essentielle du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SWF) (166), un facteur de transcription LEDGF (lens epithelial derived growth factor) (167), VBP1 (the von Hippel Lindau binding protein 1) (165), TNP-SR2 (Transportin-SR2) (168,169) ainsi que d'autres HMG1, P300, BAF (pour revue voir (170,171)). Parmi ces protéines cellulaires, qui ont été identifié, il a été montré que LEDGF/p75 joue un rôle essentiel dans l'intégration de l'ADN viral (172,173). L'élément N-terminal de LEDGF/p75 possède un domaine PWWP et un motif (AT-hook DNA-binding) permettant de conférer une propriété de liaison à la chromatine, et un autre domaine de liaison (IBD) en C-terminal qui recrute des protéines d'IN lentivirales (174,175).

Une structure RMN du domaine de liaison de LEDGF à l'IN a été résolue (176,177) ainsi qu'une structure cristallographique de ce domaine dans un complexe avec le domaine contenant le noyau catalytique F185K (176,177).

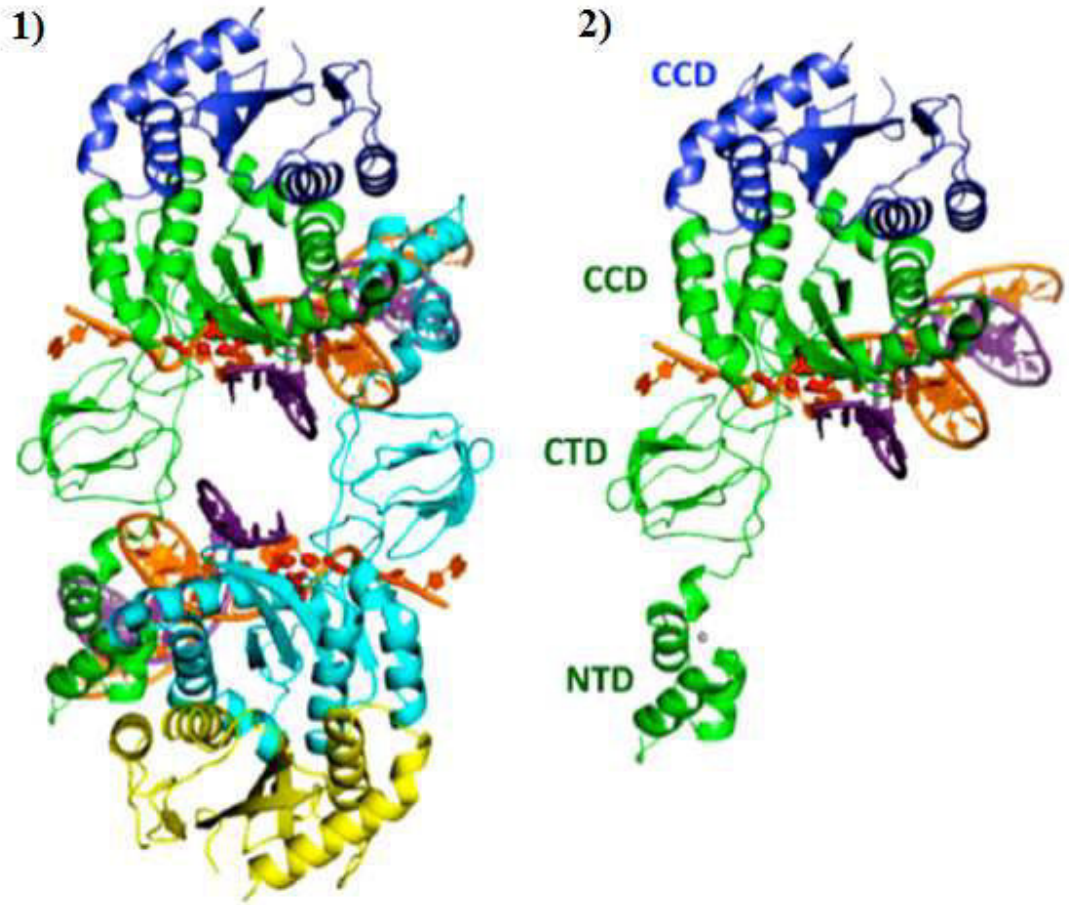

Figure 14 : Structure de l'intasome du VIH-1 : les sous-unités internes du tétramère de l'IN, comprennent les résidus 1-270 interagissant avec l'ADN viral et cellulaire. Elles sont représentées en vert et en bleu clair, les sous-unités externes de l'IN CCDs (résidus 56-202) sont en bleu et en jaune. Les brins d'ADN virales et cellulaires non transférés sont respectivement en mauve et en orange.

B.2.1.3. Les protéines régulatrices

Les protéines auxilliaires Vpr (178), Nef (179) et Vif (180) se trouvent dans la particule virale. Tandis que les protéines régulatrices Tat et Rev et la protéine auxillière Vpu ne sont pas encapsidées.

B.2.1.3.1. Tat (Transactivator of transcription)

Tat est le facteur de transcription indispensable à la réplication virale. C'est un activateur des promoteurs Long-Terminal Repeat (LTR) du virus, qui amplifie la transcription des ARNm en se

fixant à la séquence TAR du 5'-LTR pour une revue voir (181,182). Tat est codé par 2 exons. L'exon 1 code pour la région (1-72 a.a) et l'exon 2 code pour la région C-terminal (183,184). La protéine Tat (14 kDa) est exprimée précocement dans la cellule, elle peut être aussi associée à la particule virale. Elle est composée de 6 domaines (Figure 15 A). Le domaine 1 correspondant à la région N-terminale (1-21 aa) qui est structuré en hélice α. Cette région n'affecte pas trop l'activité de transactivation. Le domaine 2 (22-37aa) contenant 7 cystéines hautement conservées important pour l'activité de Tat. Le domaine 3 (38-47 aa) riches en résidus hydrophobes et dont une seule mutation au niveau de la lysine 41 est suffisante pour abolir l'activité de Tat. Les deux autres régions de la protéine sont le domaine de liaison à l'ARN et sont constituées d'un fragment basique riche en arginine (arginine-rich RNA-binding motif, ARM) (48-60 aa) essentiel à la reconnaissance et à la liaison à la boucle TAR, qui agit également comme signal de localisation nucléaire et permet à la protéine de traverser les membranes intactes des cellules et une autre région riche en glutamine (60-72). Des variations significatives ont été observées au niveau des acides aminés de la protéine Tat entre différentes classes ou sous-types viraux. Tat requiert une quantité minimale d'ARN viral transcrit, afin de pouvoir jouer son rôle de transactivateur. En effet, en absence de Tat, l'ARN polymérase II (ARN pol II) cellulaire, ensemble avec des facteurs nucléaires tels que NF-κB et TFIIH, est capable de remodeler la chromatine et d'initier la transcription Des études structurales menées par RMN montrent que la protéine Tat est peu structurée en solution. Elle ne possède ni d'hélice α ni de feuillet β. Cependant, quand elle interagit avec ses partenaires, elle semble se structurer (185,186).

D'autres fonctions ont pu être associées à Tat, à part son activité de transactivateur. Elle possède la particularité d'être sécrétée des cellules infectées et de pouvoir entrer dans des cellules non infectées en absence d'autres protéines virales (187,188). Elle est capable de mimer les fonctions d'une chémokine extracellulaire (189) ou d'un facteur de croissance (190). De plus, Tat est en partie responsable de l'apoptose des lymphocytes T CD 4+ sains par différents mécanismes, dont l'interaction avec la tubuline (191).

Tat appartient à la famille des IDPs (192). La flexibilité et le désordre conformationnel peuvent donner à Tat sa capacité d'interagir avec de nombreux partenaires cellulaires et viraux (193,194). Ensemble, avec ses propriétés de liaison aux acides nucléiques, la nature désordonnée de Tat suggère que cette protéine a une activité chaperonne des acides nucléiques (195). Cette propriété

de Tat peut expliquer sa capacité à favoriser le recrutement de l'amorce ARNt à l'ARN viral (196), son intervention dans le transfert du premier brin (197) et par ce moyen la stimulation de la transcription inverse comme le fait la NCp7 (198-200).

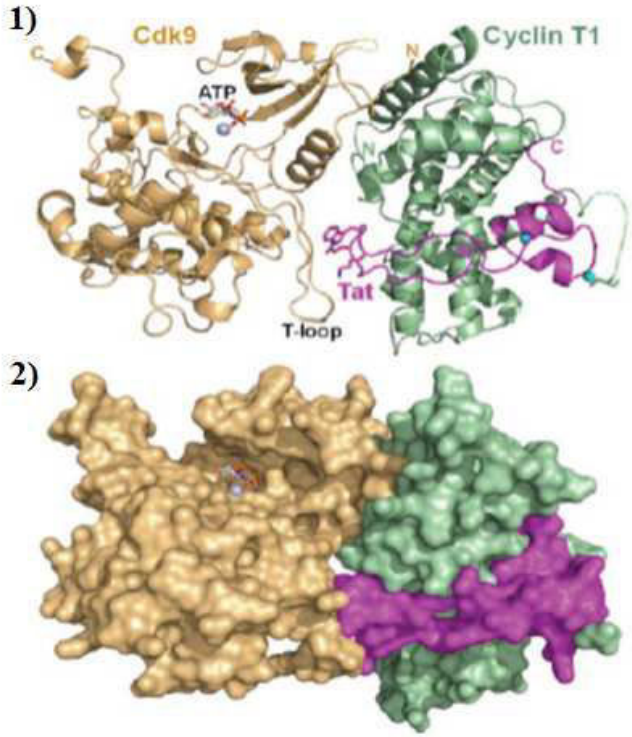

Figure 15 : Structure cristallographique du complexe pTEFb-Tat-ATP (201). (1) Représentation en ruban. (2) Représentation de la surface du complexe. Cdk9 est représentée en beige, la cycline T1 en vert et Tat en rose. Le complexe s'associe avec une molécule d'ATP (en rouge) et des atomes de zinc (gris) et de magnésium (bleu clair).

B.2.1.3.2. Rev (Regulatory of Virion Expression)

La protéine Rev (116 acides aminés) à 13 kDa, est un trans-activateur post-transcriptionnel qui possède un signal d'export nucléaire (Nuclear Export Signal, NES), ainsi qu'un signal d'import nucléaire (Nuclear Localisation Signal, NLS) (202). Elle induit l'export actif d'ARNm, tels que les ARNm codant pour $Pr55^{Gag}$, $Pr160^{Gag-Pol}$ partiellement ou non épissés, du noyau au cytoplasme via une liaison spécifique aux « Rev-response element » (RRE) codés par env. Elle garantit ainsi la production des protéines structurales et enzymatiques virales conduisant à des virions infectieux (39). En absence de Rev, ces ARN partiellement épissés seraient retenus au noyau. Elle contient un domaine ARM (R35-R50) dont la structure a été déterminée par RMN

(203). Ce domaine présente un signal de localisation nucléaire et est impliqué dans la liaison de Rev au RRE (Figure 16). De plus, Rev augmente la stabilité et la traduction des ARNm viraux (39). Sa structure primaire contient deux régions fonctionnelles comme le montre la figure 16. Un domaine riche en arginine qui intervient dans la fixation à l'ARNm et la localisation nucléaire. Ce domaine est flanqué par des séquences qui permettent la multimérisation de Rev et un segment hydrophobe entre les résidus 73-84, responsable de l'export nucléaire en mobilisant la machinerie d'export cellulaire (204,205). En se liant à l'élément de réponse Rev (RRE) situés au niveau des ARN mono-épissés ou semi-épissés, Rev permet leur transport du noyau vers le cytoplasme ou a lieu leur traduction.

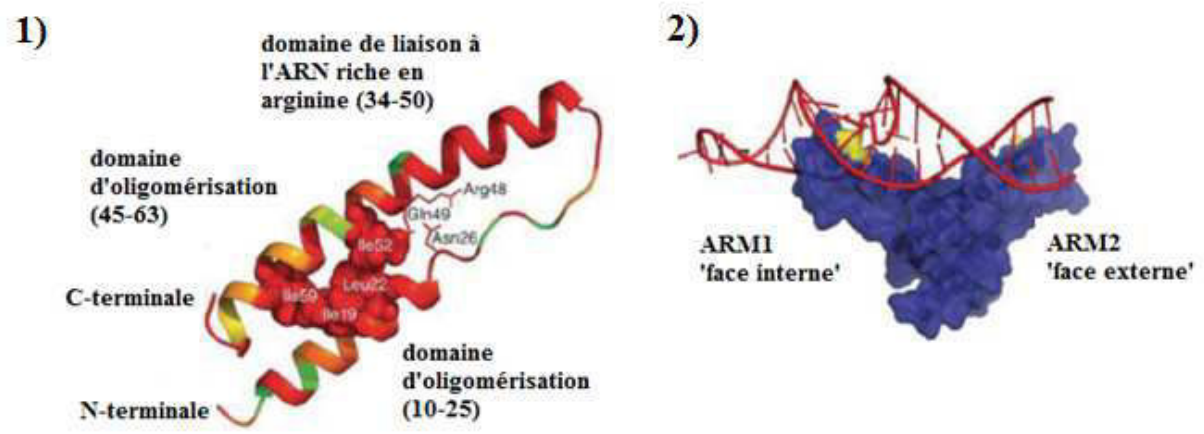

Figure 16 : Structure du dimère Rev (1) le « core » plié du monomère Rev avec ses domaines fonctionnels sont montrés. Les acides aminés les plus importants dans la structure du core sont indiqués sur cette figure. Les différentes couleurs du ruban indiquent la conservation des acides aminés parmi 1201 isolats du VIH-1 dans la base de données « Los Alamos Sequence », qui en vert représentent les moins conservées (26%) et en rouge les plus conservées (100%). (2) modèle du dimère Rev interagissant avec un modèle du site de liaison en tige IIB du RRE (Rev Response Element) (206).

B.2.1.3.3. Nef (Negative Regulatory Factor)

La protéine Nef (206 acides aminés) est localisée dans la nucléocapside (179). Elle est une des premières protéines exprimées, suggérant qu'elle agit rapidement après la transcription virale afin d'assurer une propagation efficace de virus infectieux. De plus, différents travaux ont montré que Nef augmente l'infectiosité du VIH-1 (207-209). Il existe quelques zones très conservées dans la séquence de Nef : une séquence signal de myristylation à la partie N-

terminale et une séquence répétée de prolines (PXXP) flanquée de résidus acides (Figure 17). Initialement, Nef était considérée comme un élément de régulation négatif (d'où son nom) de l'expression des gènes viraux. Au contraire, il est bien établi actuellement que Nef a une action facilitatrice de la réplication virale en particulier dans les lymphocytes primaires infectés en phase G0 puis stimulés après infection (210). Cependant, différents rôles ont pu être attribués à Nef : i) elle diminue la quantité de récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées par un mécanisme d'endocytose suivi d'une dégradation par la voie endo-lysosomale, impliquant l'interaction directe de Nef avec les CD4 (40,211) ; ii) elle régule, aussi négativement, les récepteurs du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I, ce qui diminue la reconnaissance et la lyse des cellules infectées par le système immunitaire (212,213) ; iii) dans les lymphocytes elle stimule la diminution des récepteurs membranaires TCR-CD63 qui établissent des contacts importants au sein des « synapses immunologiques » se formant entre des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules T reconnaissant les antigènes (214).

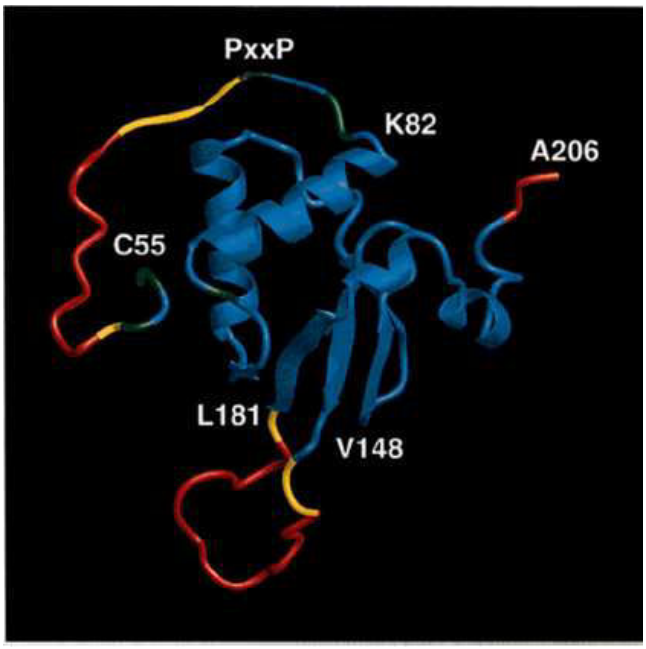

Figure 17 : Structure de Nef $^{\Delta 2\text{-}39\Delta 159\text{-}173}$ du VIH-1 résolue par RMN
Les parties N- et C-terminales sont flexibles. L'hélice polyproline correspond aux résidus 69-78, l'hélice 1 aux acides aminés 81-94, l'hélice 2 aux résidus 105-114. L'hélice 3_{10} est formée par les résidus 187-190 et l'hélice 3 par les acides aminés 194-198 (adaptée de (215)).

B.2.1.3.4. Vif (Virion infectivity factor)

C'est une protéine basique de 192 acides aminés, 23 kDa, produite de manière Rev dépendante (216), ne présentant pas de structure particulière (217). Elle est encapsidée à raison de 7 à 20 molécules par virion environ (180), en interagissant avec la région 5' de l'ARN génomique (218), ainsi qu'avec le précurseur Gag (219). Des anticorps anti-Vif sont détectés chez les patients infectés par le VIH durant les stades de l'infection. Les virions n'exprimant pas cette protéine présente un caractère infectieux environ mille fois plus faible que les virions sauvages (220).

Elle est une protéine essentielle pour la réplication du VIH-1 dans des cellules non permissives y compris les lymphocytes, macrophages et quelques lignées de cellules T (221-226). Le groupe Malim a démontré que Vif neutralise la défense innée intracellulaire qui protège les mammifères des rétrovirus et des rétro-éléments qui ont tendance à envahir leur génome (214,227). Ces composants de l'immunité innée, appartiennent à la famille des APOBEC (Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide), notamment APOBEC3F et APOBEC3G (228,229). Elle inhibe l'action des facteurs cellulaires dont le rôle serait de contrer la réplication du virus (230).

Cependant, des études biochimiques récentes révèlent l'importance de l'oligomérisation de Vif, sa conformation et sa flexibilité en contreagissant A3G ainsi de sa liaison à l'ARNm (231-235).

Son extrémité N-terminale est riche en résidues tryptophane. La présence d'un grand nombre d'acides aminés hydrophobes (8 résidus tryptophanes et 16 résidus leucines) pourrait expliquer pourquoi Vif a une tendance à former des agrégats en solution. Des études de mutagenèse ont montré que ces résidus sont importants pour la liaison à A3G ou A3F. En plus, ce domaine contient des acides aminés qui sont impliqués dans sa liaison à l'ARN génomique in vitro (218,236) et dans des cellules infectées (237,238). Un partenaire de Vif, CBF-β (core binding protein) impliqué dans le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase a été récemment identifié et son domaine d'interaction avec la région N-terminal de Vif a été cartographié (239-241).

Un domaine central contenant un motif à doigt de zinc (HCCH) qui recrute la « cullin 5 » faisant partie du complexe E3 (ubiquitine ligase) afin de diriger A3G vers une dégradation par le protéasome (242).

Un domaine de liaison à la protéine « Elongin C », le SOCS box, formée d'une séquence hautement conservée, elle favorise l'interaction avec l'hétérodimère Elongin C/Elongin B (243), et elle est aussi importante pour le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 qui dirige l'A3G pour sa dégradation. Récemment, il a été montré que les interactions entre Vif et Elongin C/B impliquaient aussi des éléments en aval comme le box cullin 5 et le motif 161PPLP164 (231,235). Le motif PPLP est important pour la fonction de Vif et pour l'infectivité du virus dans les cellules non permissives (244). Il est impliqué dans la multimérisation de Vif, bien qu'il y ait des études récentes qui ont souligné d'autres domaines impliqués dans cette propriété de Vif, comme le motif HCCH, le BC box, et des résidus en aval (S165 et V166). Pour le moment, les propriétés d'oligomérisation de Vif chez HIV-2 et SIV ne sont pas encore connues.

Un domaine C terminal de nature intrinsèquement désordonnée, ce qui est en parallèle avec les modèles de la structure secondaire proposés (234) et de l'analyse de la structure 3D ou les 15 premiers acides aminés du peptide analysé (40 résidus) ont été observés. Cette région est impliquée dans les propriétés chaperonne de Vif qui peut être requise pendant tous les phases de la réplication du VIH-1 (245). Vif pourra faire la balance des propriétés chaperonnes de la NCp7 pour réguler la dimérization de l'ARN génomique et la maturation. Elle pourra aussi en interagissant avec Gag réguler son assemblage ainsi que son clivage. En conséquence, Vif prévient une initiation prématurée de la réverse transcription par la RT pendant la formation du virus. Ce domaine est aussi important pour lier la protéine A3G (Figure 18 A).

La structure tridimensionnelle de Vif n'a pas encore été résolue par diffraction aux rayons X, mais un modèle théorique a été établi par modélisation (246,247). La structure de Vif comporterait 5 hélices α, avec des interactions entre les hélices 2 et 3 et entre les hélices 2 et 5 (Figure 18 B).

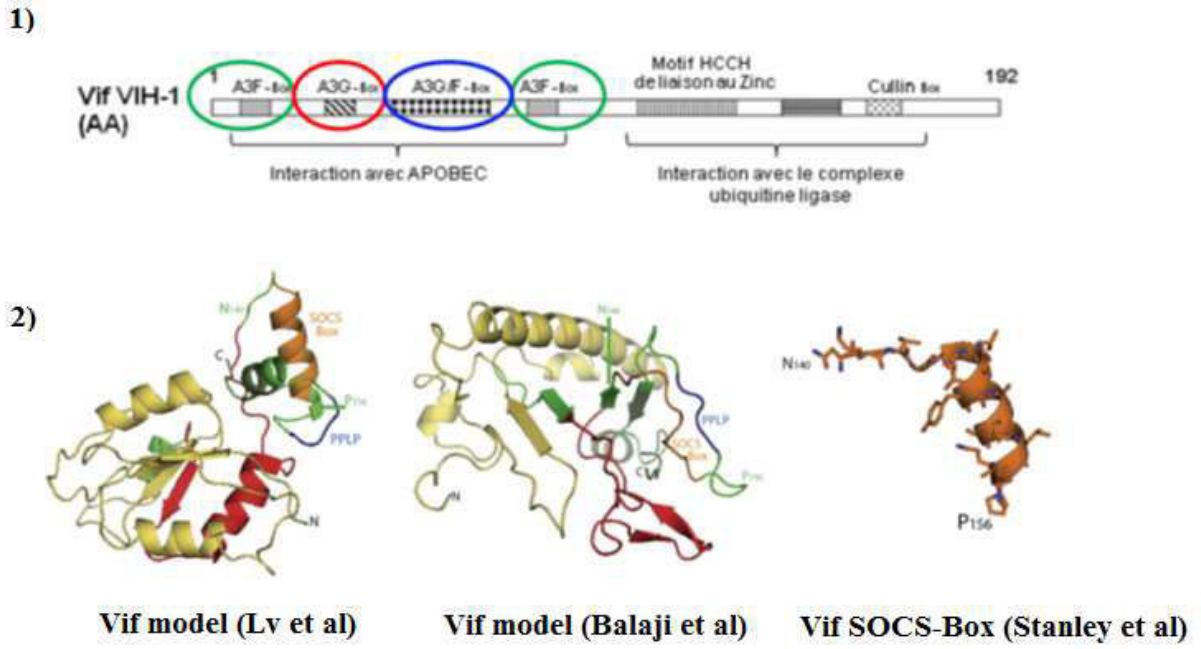

Figure 18 : 1) Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine Vif du VIH-1. 2) Structure 3D de Vif, la figure à gauche montre le model structural de Lv et ses collaborateurs coloré selon les domaines fonctionnels de Vif, la figure du milieu montre un autre modèle structural (PDB :1VZF) de Balaji et ses collaborateurs (246), la figure de droite montre la structure 3D du SOCS box de Vif (PDB : 3DCG-résidus N40-p156 (248) avec une orientation identique à celle représentée à gauche.

B.2.1.3.5. VpU (Viral protein U)

La protéine Vpu n'est présente que dans le VIH-1 et quelques isolats de SIV contrairement à Nef, Vpr, et Vif qui sont codés par le VIH-1, VIH-2 et SIV (249). Vpu est une protéine membranaire de 81 acides aminés (16KDa), dans laquelle un domaine C-terminal cytoplasmique comportant deux hélices α (Figure 19). Elle est présente uniquement dans le VIH-1. Dans le VIH-2, elle est remplacée par Vpx.

Vpu assure deux fonctions primaires au cycle réplicatif du VIH-1 : i) elle se lie via son domaine C-terminal aux récepteurs CD4 dans le réticulum endoplasmique ou ils sont synthétisés (250) et active leur dégradation via le protéasome en recrutant plusieurs facteurs cellulaires (251) (Figure 19). Le transfert des complexes Vpu-CD4 vers le protéasome requiert la phosphorylation des résidus Ser52 et Ser56 (252), ii) Vpu stimule la libération des particules virales à la surface des cellules infectées via son domaine TM. Cette fonction de Vpu n'a pu être observée que dans

certains types cellulaires, notamment dans les cellules exprimant de manière importante un interféron α, la « tetherin » appelée aussi CD317 ou BST-2 (253,254). Les mécanismes d'inihibition du bourgeonnement viral par cet interféron et l'échappement à cette inhibition induit par Vpu ne sont pas encore réellement établis, mais il semblerait que Vpu empêche la tetherin de se localiser au sein de régions membranaires enrichies en cholestérol et protéines (rafts), lieu de bourgeonnement préférentiel du VIH-1 (253-255).

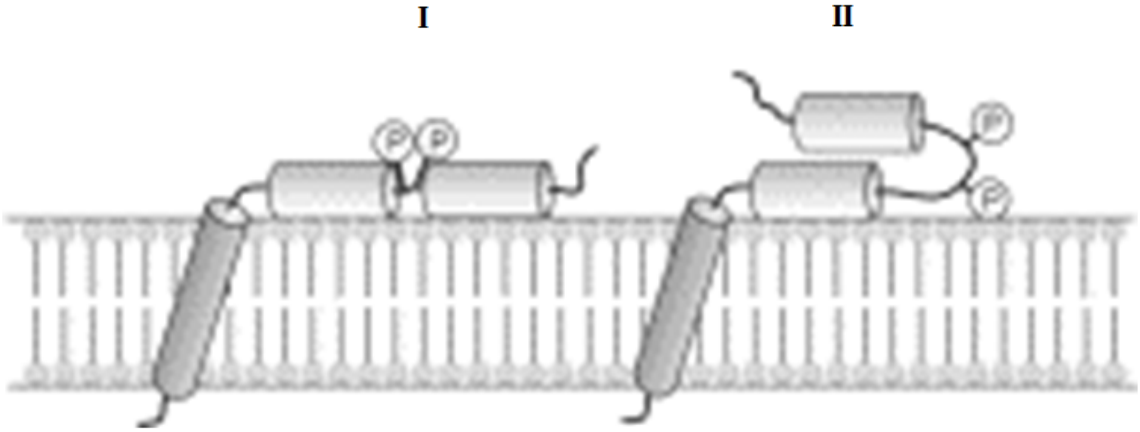

Figure 19 : Modèles de la structure de Vpu du VIH-1 (256)
Dans les deux modèles Vpu présente les 3 hélices alpha dont l'hélice 1 est transmembranaire. Les hélices 2 et 3 représentent le domaine cytoplasmique de Vpu. Dans le modèle I, les deux hélices cytoplasmiques sont alignées et présentent ainsi les deux résidus sérines phosphorylés vers le cytoplasme. Dans le modèle II, les deux hélices cytoplasmiques sont orientées de manière quasi parallèle et les deux phosphosérines dépassent à partie de la boucle reliant les deux hélices.

B.2.1.3.6. Vpr (Viral protein R)

Vpr est une protéine de 96 acides aminés qui a un poids moléculaire de 14 kDa, codée par le gène *vpr*. Ce gène, dont le cadre de lecture chevauche celui de *vif* et de *tat* en 5' et 3' respectivement, est très conservé parmi les différents sous-types viraux du VIH-1. Elle est encapsidée à raison d'environ 275 molécules par virion (257), grâce à son interaction avec le domaine C-terminal du précurseur Gag (258). Dans le virion, Vpr est localisée dans la nucléocapside (259), en association avec l'ARN viral (260). Vpr est détectée dans le sang des patients infectés et interagit avec de nombreuses cibles cellulaires (261). Différentes fonctions ont été attribuées à Vpr incluant : i) la stimulation de l'expression génique à partir du LTR (262). Cette activation est médiée par des interactions entre Vpr et Sp1 (263,264), TFIIB (265) et

TFIID (265). Vpr permet aussi l'expression des gènes à partir des promoteurs cellulaires en activant les récepteurs aux glucocorticoides (265). ii) La facilitation du transport nucléaire du complexe de préintégration (PIC) via l'interaction directe de Vpr avec les importines (266) et les nucléoporines (267). iii) L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 favorable à la réplication virale et l'activation du LTR. Cet effet serait médié par l'interaction de Vpr avec de nombreux facteurs de régulation du cycle cellulaire (264). La déstructuration de l'architecture de l'enveloppe nucléaire et la perte de compartimentation des protéines de régulation, induites par Vpr, seraient aussi à l'origine de l'arrêt du cycle en phase G2. iv) L'induction de l'apoptose via deux voies, dépendantes et indépendantes des caspases (268,269). Bien que ce mécanisme reste à élucider, Vpr a un effet direct sur la perméabilité de la mitochondrie en interagissant avec des protéines du pore mitochondrial (270), ce qui conduit à l'apoptose des cellules infectées ou saines.

Par ailleurs, l'équipe de M. Benichou a démontré par un test double hybride que Vpr interagit uniquement avec la forme non maturée de p6, p6 au sein de $Pr55^{Gag}$ et NCp15 (NCp7+p6). Aucune liaison entre la forme mature de p6 et Vpr n'a pu être identifiée. Cependant, d'autres auteurs ont pu démontrer clairement que Vpr interagit avec la protéine mature (271). Plusieurs équipes ont montré également une interaction *in vitro* entre Vpr et la NCp7 (46,272,273). De plus, Vpr est capable d'interagir avec le domaine C-terminal de la MA libre (274). Il a été montré aussi que Vpr est capable de se lier aux acides nucléiques (260,275-277). De manière intéressante, la protéine p6 était absente des particules virales isolées par des méthodes biochimiques et de centrifugation, alors que la protéine Vpr était retrouvé dans ces particules virales (178). La quantité de Vpr incorporée dans le virion est donc très variable et peut être modulée par le niveau d'expression protéique des cellules.

Les structures du domaine N-terminal (278) et du domaine C-terminal (279) ont tout d'abord été résolues de façon indépendante par RMN, indiquant une succession d'hélices α pour les deux domaines. Puis la structure de cette protéine a été résolue par Wecker et al (280). La structure obtenue présente trois hélices α entourées de deux domaines flexibles. De plus, il a été montré que le domaine N-terminal de Vpr, contient 4 prolines qui sont hautement conservées et subissent une isomérisation cis/trans (281,282). Ces isomérisations sont dû à l'interaction entre les acides 14 et 35 de Vpr avec une peptidyl-isomérase, la cyclophiline A, incorporée au virion du VIH. Le domaine C-terminal de Vpr contient 6 arginines entre les résidus 73 et 96. Ce

domaine serait responsable de la capacité de Vpr à traverser les membranes cellulaires (283-285) (Figure 20).

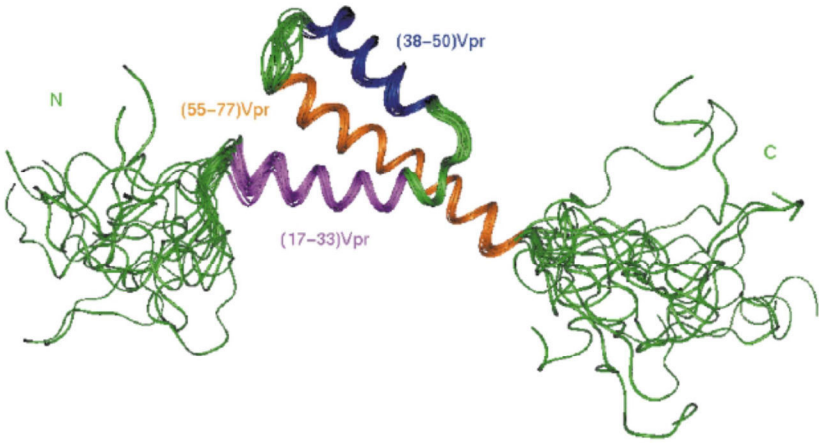

Figure 20 : Structure RMN de la protéine Vpr du VIH-1 : Elle contient 3 hélices α qui sont formées par les acides aminés 17-33, 38-50 et 54-77 colorés en mauve, bleu et orange respectivement. Les structures en boucle et les domaines N-(1-13) et C-terminales (78-96) flexibles et non structurées en solution sont représentés en vert. (286,287).

C La structure de la particule virale

La particule mature du VIH-1 est une particule sphérique de 100 à 120 nm de diamètre. Elle est issue de l'assemblage et de la maturation des polyprotéines $Pr55^{Gag}$, $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ et Env gp160 (Figure 21). La membrane du VIH-1 est une membrane plasmique cellulaire acquise lors du bourgeonnement, dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe virale (gp 120 et gp 41) et des protéines d'origine cellulaire (22) (Figure 21). Les protéines p17 (MA p17) formant la matrice tapissent la face interne de la membrane virale et sont étroitement associées à la membrane par leur extrémité N-terminale myristilée

La structure centrale, appelé nucléoîde ou « core », est délimitée par la capside (CA p24). Ces protéines s'agrègent pour former une structure icosaédrique, dans laquelle l'ARN génomique dimérique est recouvert et protégé par de nombreuses protéines de nucléocapside (NCp7). La capside constitue la coque du noyau viral en forme de tronc de cône. Elle est formée par l'assemblage de la protéine p24. Au cœur de la capside, environ 1500 à 2000 molécules de protéines de la nucléocapside (NCp7) en étroite association avec le génome d'ARN viral

dimérique (288). L'ARNt^{Lys3} cellulaire, servant d'amorce à la transcription inverse, les enzymes virales protéase (PR), réverse transcriptase (RT) et intégrase (IN) et les protéines auxiliaires Vpr, Vif et Nef sont également présents au cœur de la capside (Figure 21). Un grand nombre de protéines et d'acides nucléiques cellulaires sont aussi encapsidés dans la particule virale, notamment la cyclophiline A (289).

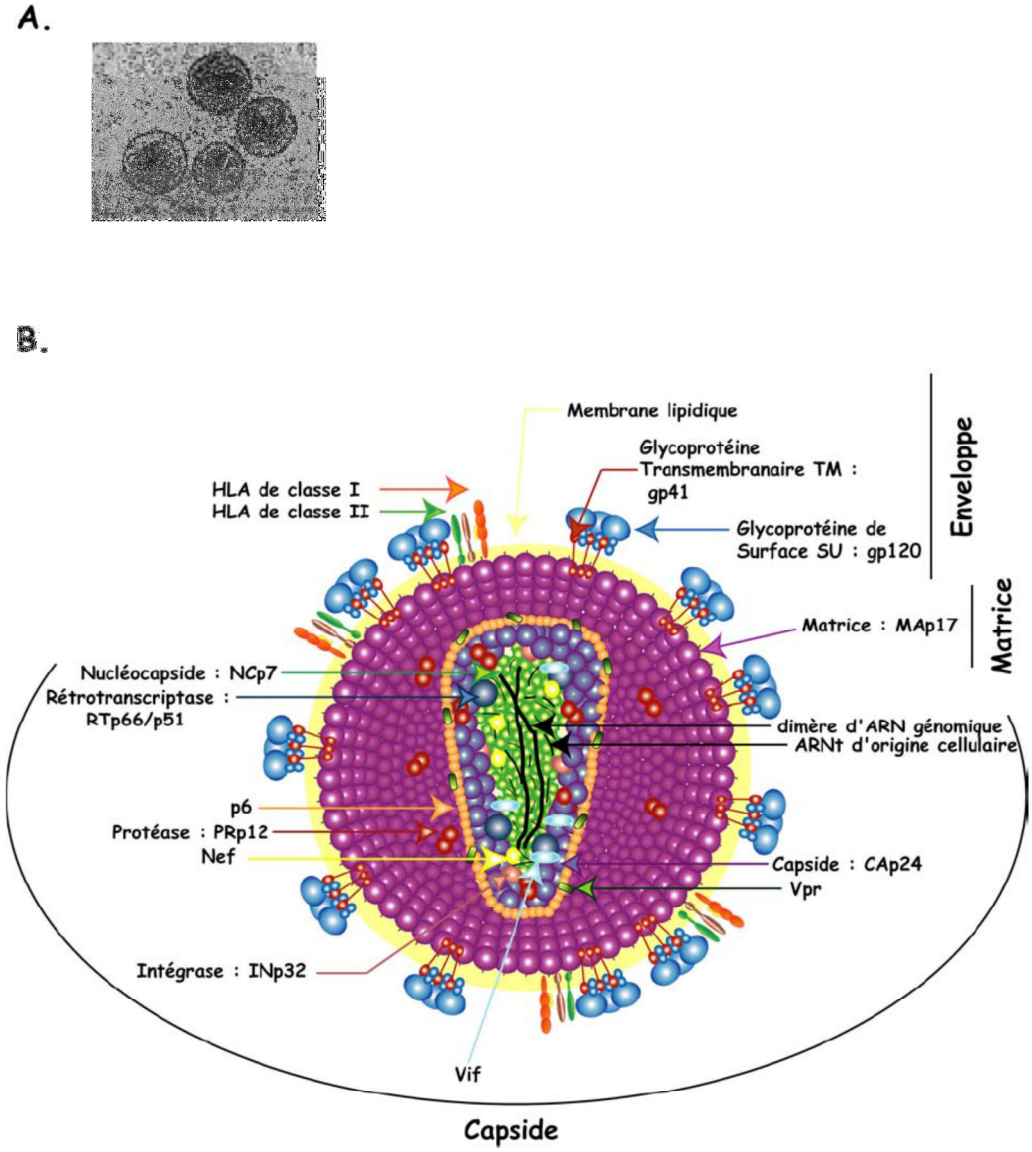

Figure 21: A Particules virales matures vues en cryomicroscopie électronique, B : Représentation schématique indiquant les constituants d'une particule virale mature.

D Cycle réplicatif du VIH-1

Les étapes du cycle viral sont résumées dans la figure 22. La phase pré-intégrative du cycle englobe les étapes d'entrée du virus et de transcription inverse conduisant à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte. La phase post-intégrative débute par l'expression du génome viral et comprend l'ensemble des évènements conduisant à l'assemblage, au bourgeonnement et à la maturation des virions.

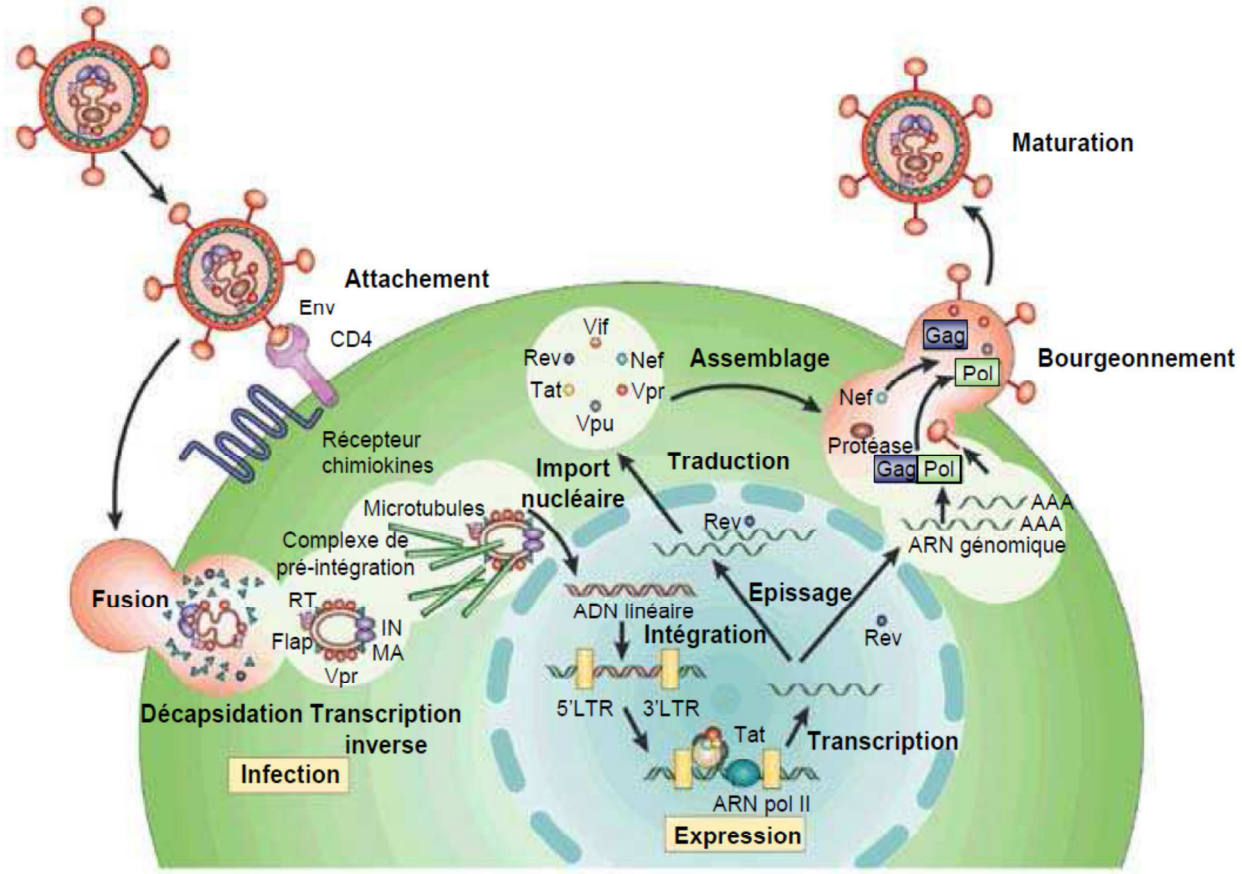

Figure 22 : Cycle de réplication du VIH-1 (290).

D.1. Les phases précoces de la réplication du VIH-1

D.1.1 Reconnaissance, fusion et entrée

Le virus VIH-1 infecte les cellules à récepteur CD4 comme les lymphocytes T auxilliaires, les cellules de la lignée monocyte-macrophage, les cellules dendritiques et les cellules neuronales.

La protéine de surface gp120 sous forme trimérique reconnaît spécifiquement les récepteurs CD4, situés à la surface des lymphocytes T. Cette interaction induit un changement conformationnel de la gp120 qui permet à la protéine d'enveloppe du virus de se lier également à des co-récepteurs, les récepteurs aux chimiokines : CXCR4 (qui facilitent l'entrée du virus dans certaines cellules T) et CCR5 (qui facilitent l'entrée du virus dans les macrophages, les cellules dendritiques et certaines cellules T). Assemblés sous forme de trimères à la membrane virionique, les protéines gp41 permettent alors la fusion des membranes du virion et de la cellule hôte (Figure 23).

Les virions du VIH-1 peuvent pénétrer dans une cellule par endocytose. Plus récemment, une nouvelle forme d'entrée du VIH-1 a été déterminée. Il s'agit de la transmission de cellules en cellules, notamment par la formation de « synapses virologiques (291) ».

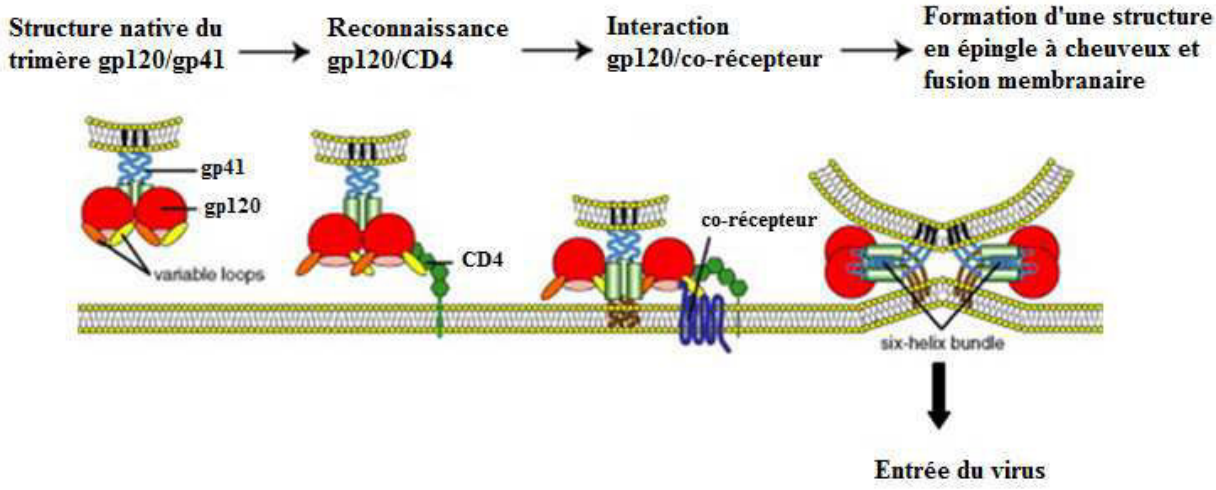

Figure 23 : Représentation shématique des étapes d'entrée du VIH-1, dans la cellule cible (41).
Premièrement, il y a reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur CD4 présent à la surface de la cellule cible. Puis, cette interaction entraine un changement conformationnel de gp120 requis pour la reconnaissance et l'interaction avec le co-récepteur CCR5 ou CXCR-4. Cependant, dans la structure native du trimère gp120/gp41, le peptide de fusion est inaccessible. Pour cela, l'association du complexe gp120/CD4 au co-récepteur est nécessaire pour permettre l'exposition du peptide de fusion de gp41, qui va s'ancrer dans la membrane de la cellule hôte. Ensuite, il y a rapprochement des deux membranes et leur fusion sera facilitée par un réarrangement conformationnel de gp41, qui conduit à la formation de trois motifs structuraux de type « coiled coil » résultant d'une interaction entre les hélices N et C terminales de chaque monomère.

D.1.2 La transcription inverse

Lorsque la fusion des membranes virales et hôtes a été effectuée, la capside et son contenu pénètrent dans le cytoplasme puis l'ARN génomique et les protéines encapsidées sont libérés (étape de désassemblage).

L'ARN génomique viral contenu dans la capside se retrouve dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Le processus de la transcription inverse est initié grâce à l'ARNt^{Lys} portant un groupement 3'OH utilisé comme amorce pour la synthèse de l'ADN. Cet ARNt se fixe d'abord sur l'ARN viral au niveau du site PBS « primer binding site » (Figure 24). La RT reconnait le complexe ARNt/ARN et initie la transcription inverse en procédant à l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce, synthétisant ainsi le brin négatif d'ADN jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN viral. L'ADN formé à cette étape s'appelle brin négatif d'ADN « strong stop » contenant les séquences U5 et R. L'ARNt reste attaché à l'extrémité 5' de ce brin. Afin de continuer la synthèse du brin négatif, l'ADN « strong stop » doit être transféré à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. Ce saut ou transfert, a lieu suite à la dégradation du brin d'ARN rétrotranscrit (U5 et R) du complexe ARN/ADN par l'action de l'activité RNase H. Une fois transféré à l'extrémité 3' du génome viral, l'ADN « Strong-Stop » (-) servira d'amorce à la synthèse du brin d'ADN(-) qui se poursuit jusqu'au PBS. Au cours de la synthèse de ce brin, la RNase H procède à la dégradation de l'ARN du complexe hybride ARN/ADN. Cependant, deux séquences d'ARN, résistantes à la RNase H, sont épargnées. Il s'agit des séquences ppt « polypurin tract ». Une à côté de U3 du LTR 3' et l'autre au centre du génome nommé PPTc (38). Ces deux petites séquences servent d'amorces pour la synthèse du brin d'ADN (+). La synthèse à partir du PPT se termine après avoir rétrotranscrit une partie de l'ARNt^{Lys} encore attachée à l'ADN (-). Le clivage de l'ARNt^{Lys} par l'activité RNase H de la RT s'effectue entre les ribonucléotides A et C de l'extrémité 3' de l'ARNt$_3^{Lys}$, laissant A lié à l'ADN. Cette excision conduit au second saut de brin. Il implique l'ADN « Strong-Stop » (+) qui est transféré et s'hybride à l'extrémité 3' de l'ADN (-) via la reconnaissance spécifique de deux PBS. A ce stade, les brins (-) et (+) poursuivent leur synthèse jusqu'à ce qu'ils forment l'ADN proviral double brin présentant à ses extrémités les séquences LTR.

Après le deuxième saut de brin, et au cours de la synthèse de brin, il y a également libération d'une petite séquence de 99 nucléotides, le « DNA flap » spécifique aux lentivirus et participant à l'importation de l'ADN proviral au sein du noyau de la cellule hôte (292). La conséquence clé des deux translocations qui ont lieu durant la transcription inverse est la duplication des séquences : U5 durant la translocation du brin négatif et U3 durant la translocation du positif. L'ADN résultant contient deux LTR. Chacun est constitué des séquences U3-R-U5.

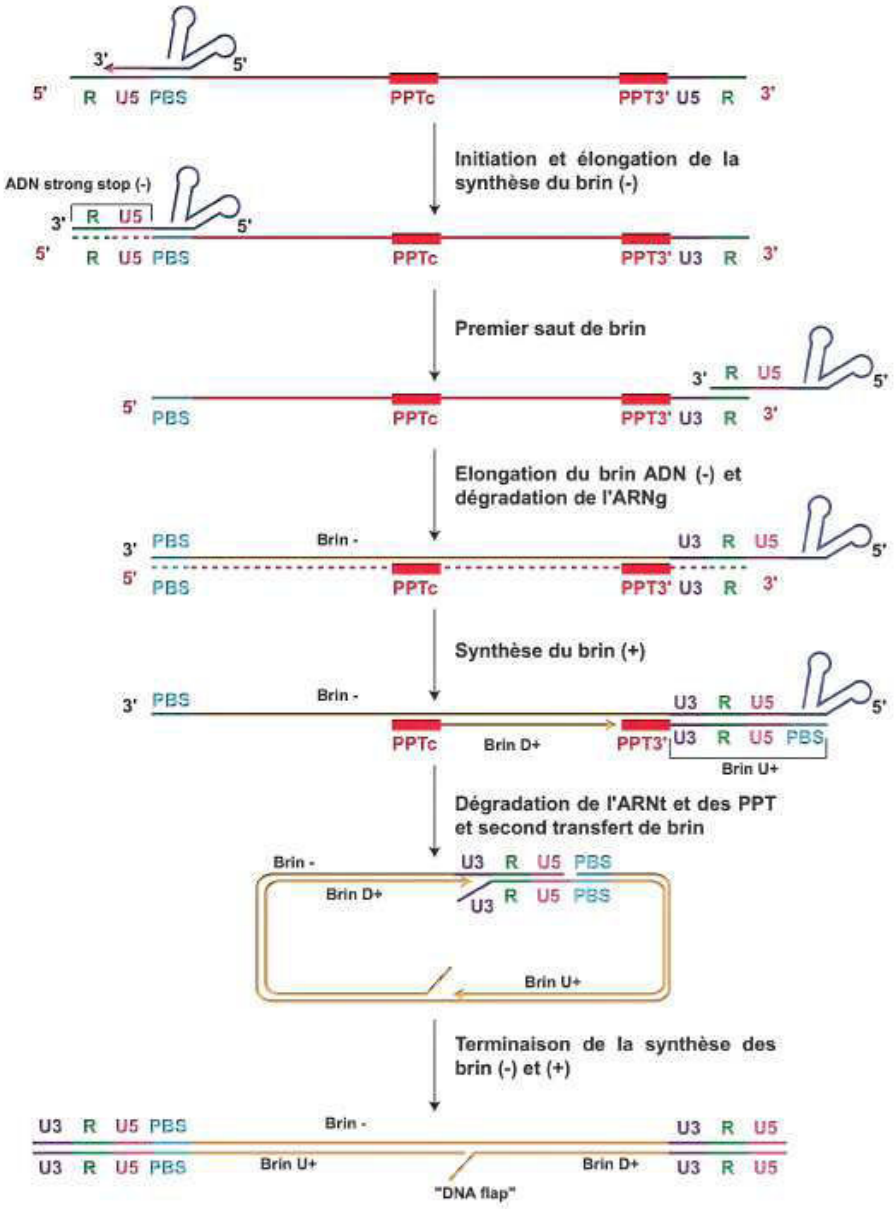

Figure 24 : Représentation schématique de la transcription inverse du VIH-1

D.1.3 Import nucléaire et intégration

Le complexe de pré-intégration possède un diamètre de 56nm alors que le pore nucléaire autorise le passage bi-directionnel de macromolécules dont le diamètre est inférieur à 25nm. Le mécanisme de pénétration du complexe de pré-intégration dans le noyau ne peut donc être passif et en effet, plusieurs des protéines présentes dans le PIC possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS) : la matrice, l'intégrase et Vpr (voir revue (293). Ces signaux de localisation nucléaire sont en général composés d'acides aminés basiques (Figure 25).

L'import des protéines contenant des NLS est pris en charge par le système karyophérine. La karyophérine α se lie directement aux protéines et la karyophérine β augmente l'affinité de la karyophérine α pour les NLS. Certaines karyophérines β font exception et se lient directement aux NLS, par exemple la transportine. Il a été démontré récemment que le VIH-1 peut utiliser l'importine 7 pour assurer l'import nucléaire de son PIC (294). Cependant, seules les protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) peuvent être prises en charge par les importines.

Des NLS ont pu être identifiés dans l'IN, la MA et Vpr. Cependant, le mécanisme exact de l'import du PIC, utilisant l'un ou l'autre de ces NLS, n'a pas encore été établi. La mutation des protéines virales contenues dans le PIC, au sein de leur NLS, n'influence peu ou pas du tout l'infectiosité du VIH-1, puisque ces signaux de localisation nucléaire agissent de manière concomitante et peuvent se remplacer naturellement.

L'intégration, catalysée par l'intégrase (IN), va permettre d'intégrer dans le génome de la cellule hôte l'ADN proviral qui vient d'être synthétisé. Dans un premier temps, IN reconnaît les extrémités de chaque LTR. La séquence reconnue est d'environ 20 paires de base (295). IN va ensuite exciser les nucléotides adjacents aux dinucléotides CA hautement conservés dans les parties U5 et U3 de la séquence LTR (296-298). Cette réaction a lieu en milieu aqueux et le groupe hydroxyle laissé aux extrémités permettra l'insertion dans l'ADN de la cellule par une réaction de trans-estérification, l'ADN cellulaire aura été au préalable clivé par l'intégrase.

Il a également été montré que NCp7 stimulerait l'intégration (299,300). La protéine de la nucléocapside agit par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, elle stimule l'intégration (299) en facilitant l'ouverture des extrémités de séquences nucléotidiques (301-304). Ces extrémités ouvertes sont alors plus aptes à fixer l'ADN du virus. D'autre part comme la NCp7 recouvre

entièrement l'ADN viral par son activité histone, elle va masquer les sites de liaison non spécifiques de IN avec l'ADN et va donc stabiliser la liaison de IN aux extrémités de l'ADN viral (299,300). Enfin, les parties basiques de la NCp7 sont capables d'interagir avec le doigt de zinc d'IN et donc de stabiliser le complexe IN/ADN. A l'instar d'autres protéines décrites ci-dessus, la NCp7 agit comme un cofacteur de l'intégrase.

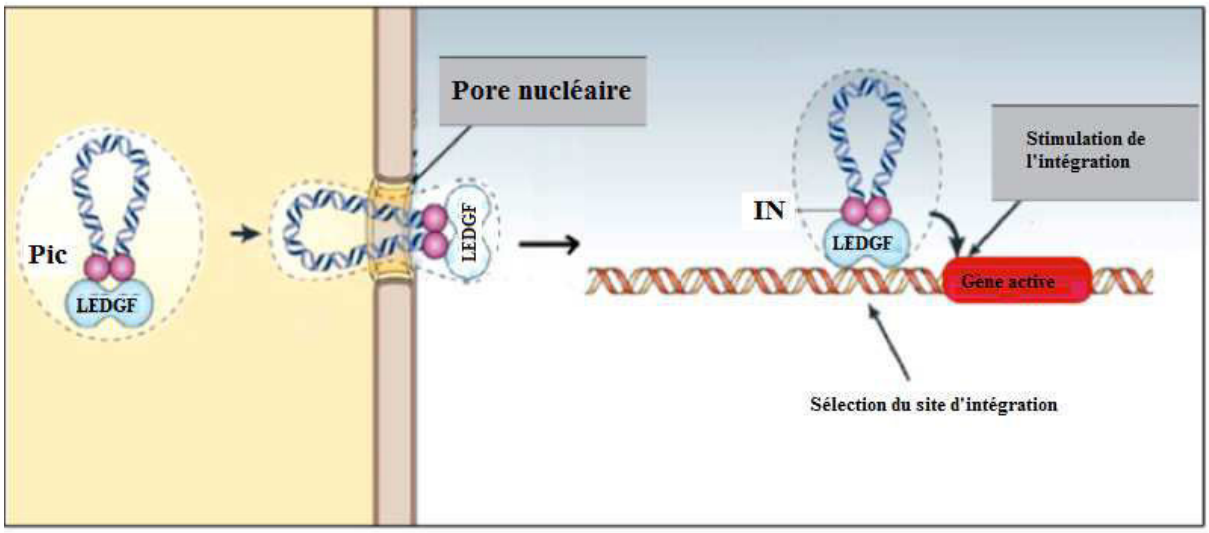

Figure 25 : Illustration de la translocation nucléaire du complexe de préintégration (PIC) à travers les pores nucléaires et la sélection du site d'intégration cible dans le chromosome de l'hôte.

D.2. Les phases tardives (post-intégratives) de la réplication du VIH-1

Le processus d'expression des gènes viraux comporte 4 étapes : (1) la transcription de l'ADN proviral et (2) l'épissage du transcrit primaire. Ensuite les étapes (3) d'export nucléaire et (4) de traduction des ARN messagers.

D.2.1 Transcription de l'ADN proviral

Après intégration dans le génome cellulaire, la transcription du provirus VIH se fait par l'ARN polymérase II, au même titre que l'ADN cellulaire. La région U3 du LTR contient la boîte TATAA sur laquelle se fixe le complexe de transcription cellulaire. En amont de la boîte TATAA, on retrouve de nombreux signaux d'initiation de la transcription, dont trois séquences

régulatrices SP1, précédées de deux enhancers où se fixe le facteur de transcription NF-κB. De plus, la région R à l'extrémité 5' de l'ARN nouvellement synthétisé, possède une structure tige boucle, appelée TAR (« trans-activation responsive »), nécessaire à la fixation de la protéine Tat. L'ARN génomique transcrit est ensuite modifié par polyadénylation à l'extrémité 3' et par addition d'une coiffe en 5' grâce à des enzymes cellulaires. Le génome viral du VIH-1 est composé de neuf cadres de lecture codant pour quinze protéines.

D.2.1.1. Epissage du transcrit primaire

La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation d'une trentaine de transcrits. Ces transcrits peuvent être divisés en trois classes (Figure 26) ;

-L'ARN-non épissé de 9 kb permet la synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol ;

-Les ARN mono-épissés de 4 kb générés par élimination du premier intron qui codent les proteines Env, Vpr, Vpu et Vif ;

-Les ARN multi-episses de 2 kb qui ne contiennent plus d'introns, expriment les proteines Nef, Rev et Tat.

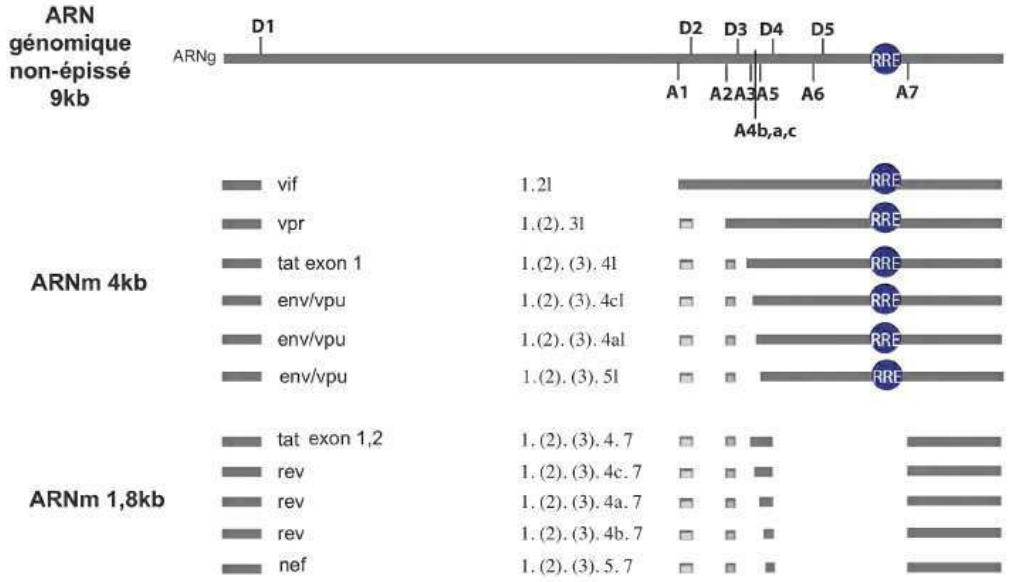

Figure 26 : Profil d'épissage de l'ARNg du VIH-1 (216). La transcription permet la synthèse d'un ARN pré-messager qui contient de nombreux sites donneurs (SD) et accepteurs (SA) d'épissage. L'épissage alternatif est à l'origine de la production d'ARN mono (4Kb) et multi-épissés (1.8Kb), les exons qui composent les ARN épissés majeurs sont indiqués. Les espèces désignées par un « I » correspondent aux ARN épissés complètement épissés. L'exon 1 non-codant est présent sur tous les ARN épissés du VIH-1.

D.2.1.2. Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique

Le maintien d'un équilibre précis entre les différents ARN (épissés et non épissés) est primordial pour la multiplication du virus. En plus d'une régulation fine de l'épissage, le virus VIH-1 produit la protéine Rev qui facilite le transport des transcrits non épissés. En fonction de leur concentration cellulaire, des protéines Rev peuvent venir se fixer sur RRE (élément structuré de l'ARN viral contenant un site primaire de forte fixation de la proteine Rev) (pour revue, (305)). En phase précoce, lorsque la protéine est présente en faible quantité dans la cellule infectée, la fixation n'a lieu qu'au niveau du site de haute affinité. L'action de Rev sur le transport est faible et les ARN épissés sont maintenus dans le noyau par interaction avec les facteurs d'épissage, jusqu'à ce qu'ils soient complètement épissés. En phase tardive, de plus grandes quantités de protéine Rev sont synthétisées et s'oligomérisent le long de l'élément RRE favorisant le transport des ARN peu ou pas épissés (Figure 27). Au sein de l'oligomère, des interactions créées ont pour effet de démasquer le signal d'export nucléaire. Le transport dans le cytoplasme se fait ensuite via le système d'export CRM1/Ran GTP (Figure 27). D'autres éléments de séquence comme l'élément d'instabilité INS20 contenu dans l'ORF de la matrice de Gag, et des éléments introniques riches en A et U, et répartis sur toute la longueur du génome viral, appelés CRS21, pourraient intervenir dans la localisation des ARN viraux dans un compartiment spécifique du noyau. Ce qui permet d'éviter la dégradation des ARN non épissés (306). Donc, la protéine Rev joue un rôle primordial dans l'expression des gènes du virus VIH-1. Elle permet le passage de la phase précoce d'infection, où il y a production des ARNm multiplement épissés codant les protéines régulatrices, à la phase tardive d'infection, au cours de laquelle les ARNm sont peu ou non épissés et permettent la production des protéines structurales, auxiliaires et à activité enzymatique.

Une fois acheminé au sein d'une région péricentriolaire, l'ARNg bifonctionnel peut être traduit au niveau des polysomes libres afin de donner naissance aux précurseurs Gag et Gag-Pol et/ou être dirigé au site d'assemblage où il sera encapsidé (307). La régulation de ces deux événements implique deux cas de figure : soit le même transcrit réalise ces deux fonctions de façon indépendante et/ou concomitantes, soit il existe deux populations distinctes d'ARNg. Chez un rétrovirus simple comme MLV, deux populations d'ARN génomiques coexistent, l'une pour l'encapsidation et l'autre pour la traduction (308,309). Dans le cas des rétrovirus complexes tel

que SIV, l'ARN génomique encapsidé est celui qui est traduit en protéines Gag (310) alors chez VIH-1 et 2, l'ARN encapsidé ne nécessite pas obligatoirement sa traduction (307,311). La régulation de la traduction sera détaillée dans le chapitre III.

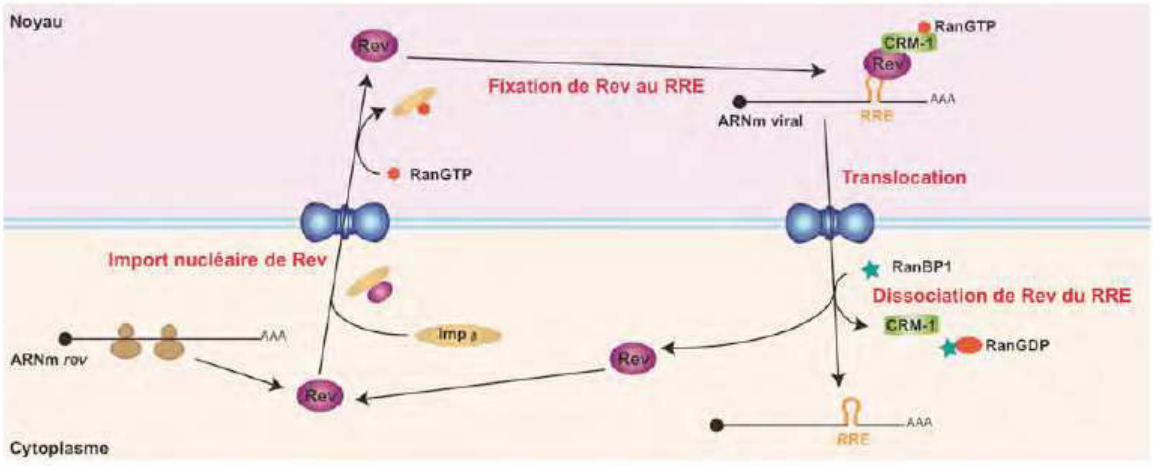

Figure 27 : Transport nucléo-cytoplasmique Rev-dépendant des ARN non et mono-épissés (adapté de (312)).

D.3. Traduction des ARN messagers

La synthèse des protéines virales est réalisée classiquement par la machinerie de traduction de la cellule hôte. Les protéines Env et Vpu, et les précurseurs Gag et Gag-Pol, sont obtenus à partir d'ARNm bi-cistroniques. Dans le cas de Vpu et Env, les deux ORF sont chevauchantes. La traduction de la protéine Env dépend d'un mécanisme appelé « leaky scanning ». La faible efficacité du site d'initiation de la traduction de l'ORF Vpu autorise l'utilisation du codon d'initiation de l'ORF Env situé en aval (313,314). La synthèse du précurseur protéique Gag-Pol est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture des ribosomes en fin de traduction du précurseur Gag.

L'initiation et la régulation de la traduction chez les eucaryotes ainsi que chez les rétrovirus notamment le VIH-1 sera décrite en détails dans le chapitre III.

D.4. Assemblage

La polyprotéine Gag du VIH-1, est l'élément central pilotant la formation des particules virales (315,316). De nombreux travaux montrent que cet assemblage résulte d'une polymérisation de Gag impliquant deux plateformes. L'une est lipidique avec l'ancrage du myristate en N terminal du domaine MA de Gag dans une membrane cellulaire et l'interaction de ses acides aminés basiques avec les charges négatives des phosphatidylinositol 4,5-biphosphate de la membrane plasmique (MP) (317). L'autre plateforme est nucléique avec une interaction entre la (NCp7) de Gag et l'ARN génomique. Par ailleurs, les domaines de Gag indispensables à sa polymérisation sont localisés au niveau de la capside (région MHR (*Major Homology Region)* (318)) et dans le domaine N terminal de la NC (319-322).

Plus récemment, il a été montré que dans la phase tardive du cycle la NCp7, au sein du précurseur Gag (appelée ci-dessous GagNC), possédait aussi un rôle essentiel dans l'assemblage (315). En effet, les parties basiques de la protéine sont indispensables pour la formation des polymères Gag-Gag et permettent également la reconnaissance 'non spécifique' d'un ARN (102,320-322,323 ,324). De leur côté, les motifs dactyles seraient plus impliqués dans le trafic intracellulaire de Gag (325) et dans la reconnaissance des partenaires cellulaires lors du bourgeonnement (102,103). Enfin, des mutations de la NCp7 donnent lieu à une RT tardive suggérant que la NCp7 via son rôle dans les interactions Gag-Gag puisse contrôler de manière temporelle le déclenchement de la reverse transcription (326,327).

Les études sur l'assemblage de Gag puis son trafic et sa localisation à la MP aboutissant au bourgeonnement ont soulevé de nombreuses questions. Ainsi, le degré d'oligomérisation de Gag dans le cytoplasme et le mécanisme d'assemblage au niveau de la MP restent mal connus (102,328,329). Par ailleurs, l'assemblage a lieu principalement à la MP dans des cellules HeLa, Cos, 293T et T alors que dans les cellules de type macrophage et dendritique, il a lieu principalement au niveau de compartiments intracellulaires type LE (*Late Endosomes*)/MVB (*Multi-Vesicular Body*) (330). Cette localisation intracellulaire pourrait provenir soit d'un trafic par la voie endosomale de Gag soit de la MP après endocytose avant d'être dirigé vers une dégradation (331,332 ,333 ,334 ,335). Outre les différents types cellulaires et une éventuelle différence de détectabilité des différentes populations de Gag par immunofluorescence ou pas fusion à la GFP (336), le facteur temps pourrait être à l'origine de ces différences de voies. En

effet, beaucoup d'expériences sont réalisées à un temps fixe post-transfection alors que des études en temps réel ont montré un parallèle entre la diminution de Gag dans des vésicules et l'augmentation de celle-ci à la MP (333,337). Enfin, parallèlement à cet assemblage, la partie C terminale de Gag correspondant à la NCp15 (NC+p6) recrute des facteurs cellulaires (Tsg 101, ALIX) permettant la fermeture des membranes et le relarguage des particules (338) (Figure 28).

Les avancées techniques récentes dans le domaine de la microscopie à fluorescence ont permis de suivre la protéine Gag dans les cellules vivantes. La protéine fluorescente XFP (X= eGFP, mCherry, C, Y) a été placée soit en position C terminale soit en aval de la matrice. Dans ce dernier cas les propriétés d'assemblage et la fonctionnalité de la protéine sont proches de la protéine sauvage (339). Ces études détectent des interactions Gag-Gag principalement au niveau de la MP (324 ,340,341). Par ailleurs, un tag tetra-cystéine (TC) a été placé aux mêmes positions ; la taille de cette séquence de 12 résidus étant compatible avec le suivi des particules dans les cellules (342). Cette séquence interagit de manière irréversible avec FlAsH ou ReAsH pour une émission de fluorescence respectivement dans le vert ou dans le rouge (343). Avec cette approche, le groupe de Freed montre que, dans les macrophages, les vésicules intracellulaires de Gag seraient plus particulièrement utilisées pour infecter une cellule saine par contact cellule-cellule (344). De plus, avec une approche similaire il a été confirmé, dans les cellules HeLa, que Gag utilisait la voie MVB/LE pour s'assembler (345). De façon tout à fait complémentaire, des études biochimiques de fractionnement sub-cellulaires de lymphocytes-T chroniquement infectés et d'immunofluorescence de cellules HT montrent également un possible assemblage de Gag intracellulaire (332,333). Tous ces résultats soulignent l'importance des modèles cellulaires utilisés pour étudier le trafic et l'assemblage de Gag.

Enfin, des données récentes, utilisant une approche de microscopie TIRF (*Total Reflection Internal Fluorescence*) ont permis de suivre l'apparition/disparition de la particule virale au niveau de la membrane plasmique. Ces données, obtenues sur cellules HeLa, montrent qu'une première population de particules virales apparait/disparait avec des temps très courts (5-10 sec.) et leur co-localisation avec le marqueur d'endosomes CD63 suggère leur internalisation par endocytose (110). Une deuxième population est décrite avec une cinétique d'apparition de Gag de l'ordre de dix minutes suivie d'une période plus longue d'environ 25 minutes pouvant correspondre soit à un assemblage au niveau de la MP à partir d'une fraction cytosolique de Gag

soit à une ré-internalisation de Gag dans le cytoplasme (109,110). Ainsi, cette étape de localisation de Gag à la membrane et de bourgeonnement pourrait être influencée par un équilibre entre le relargage extracellulaire de Gag sous forme de particule virale et son internalisation dans la cellule par endocytose.

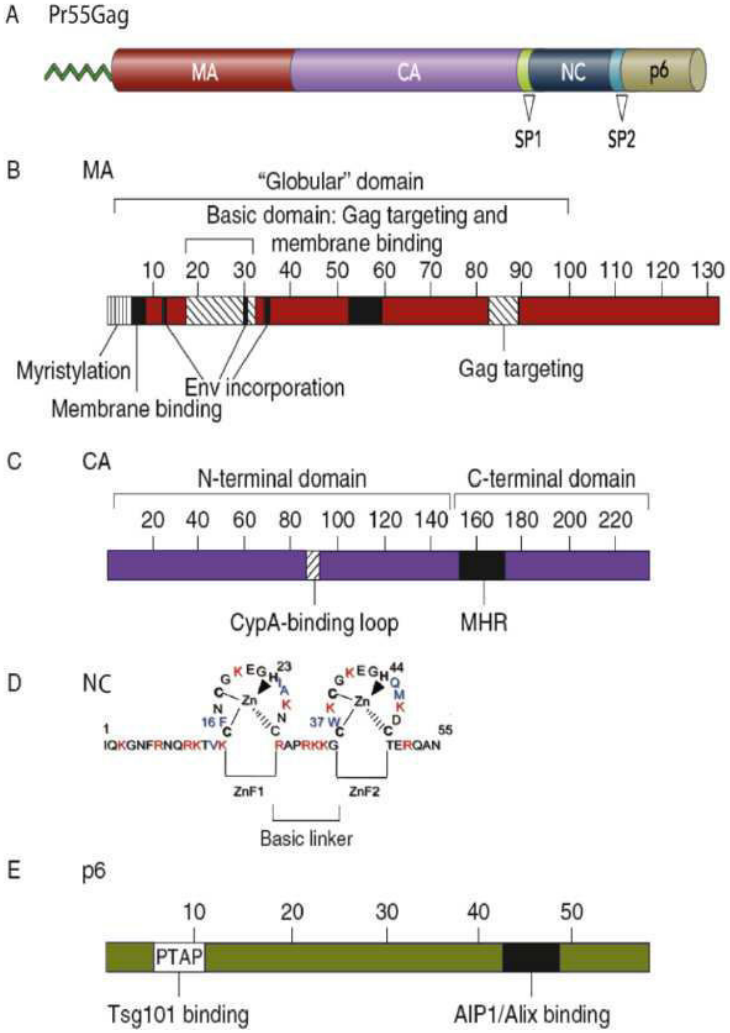

Figure 28 : représentation schématique de $Pr55^{Gag}$ et ses domaines constitutifs. (A) Les positions de la matrice myristoylé (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), la p6 et les peptides SP1, SP2 au sein du $Pr55^{Gag}$ non clivé sont indiquées. (B) Les domaines de la matrice contribuant à l'assemblage du virus, adressage de Gag à la membrane, des étapes après l'entrée du virus et l'incorporation de Env sont montrés. La région de Gag qui forme un domaine globulaire central est indiquée. La présence d'un domaine hautement basique à côté de l'extrémité N-terminal est montrée. (C). Les domaines N- et C-terminal de dimérisation sont indiqués. Les sites de liaison au CypA et la région MHR sont montrés. (D) la séquence en acides aminés de la NCp7 est indiqué ainsi que les domaines en doigt de zinc. (E) la région N-terminale impliquée dans la libération du virus et la région C-terminale de la p6 interagissante avec Alix sont indiqués. Adapté de (315).

D.5. Bourgeonnement

Le bourgeonnement des virions se fait généralement au niveau des radeaux lipidiques 'rafts', ce qui leur confère une membrane riche en cholestérol (346). Le virus emporte également avec lui des protéines de surface cellulaire, qui seront ancrées dans l'enveloppe. Selon les cas, elles correspondent aux marqueurs des radeaux lipidiques ou à ceux des endosomes (347). Ainsi, il semble que les deux sites peuvent coexister. Le bourgeonnement est majoritairement observé au niveau des endosomes dans les macrophages (348) et de la membrane plasmique dans les lymphocytes. La libération des virions à la membrane plasmique serait associée au caractère aigu des infections, caractérisé par une production virale massive, des effets cytopathiques importants et une forte mortalité cellulaire, ce qui n'est pas le cas lors de l'exocytose des virions par fusion des endosomes tardifs à la membrane plasmique.

Dans les deux cas, le virus détourne la voie cellulaire d'expulsion des exosomes, le système VPS (« Vesicular Protein Sorting ») afin de libérer les virions. Ce système est composé des complexes ESCRT-I, II et –III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le précurseur Gag recrute les éléments nécessaires au relargage des virions (131) grâce à son domaine p6 (domaine « L »). Ce peptide permet l'interaction avec des membres du complexe ESCRT-I, Tsg101 et AIP-1/Alix, requis lors des phases tardives du bourgeonnement et de la libération des particules virales.

D.6. Maturation de la particule virale

Les virions ayant bourgeonnés de la membrane plasmique de la cellule hôte ne sont pas infectieux et doivent subir une étape de maturation (pour revue (349)). La maturation est réalisée par la protéase virale qui va cliver les précurseurs Gag et Gag-Pol de façon séquentielle en protéines matures Gag (MA, CA, NC, p6) (Figure 29) et Pol (PR, IN, RT). Le clivage protéolytique est une étape critique dans la morphogenèse du VIH-1 qui permet le changement en forme conique du « core » viral. La maturation est la dernière étape du cycle de réplication du VIH-1 et est indispensable à la production de virus infectieux.

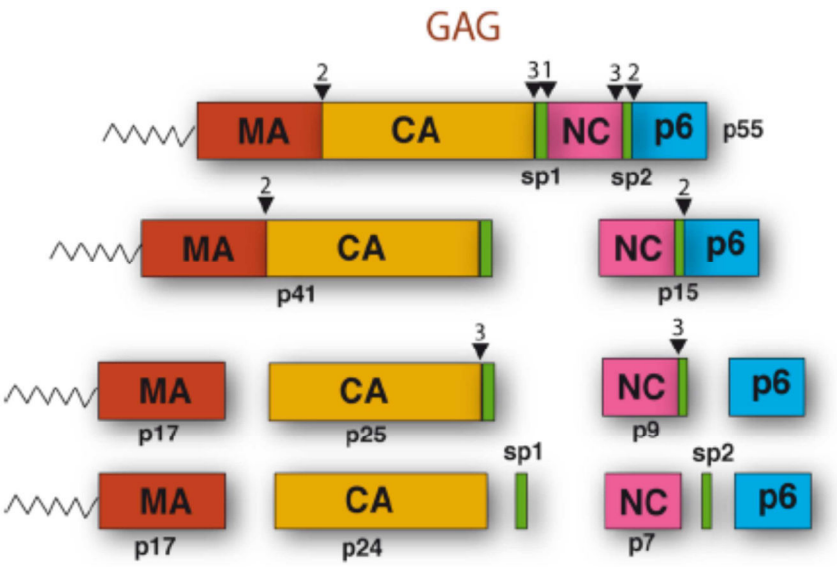

Figure 29 : étape de clivage séquentiel de Gag en différents domaines par la protéase virale pendant la maturation du virus.

Chapitre III : Régulation de la traduction chez les eucaryotes et les rétrovirus

A La traduction chez les eucaryotes

La traduction est le processus qui permet de synthétiser les protéines. Cette synthèse est effectuée par le ribosome, un complexe ribonucléoprotéique de grande taille qui incorpore les acides aminés tout en se basant sur l'information contenue dans les ARNm (Figure 30) (350,351). Un ARNm est une chaîne constituée d'une succession de nucléotides qui débute par une guanosine méthylée (m7G) appelée coiffe 5' liée au premier nucléotide. Il est généralement terminé par une queue de poly(A) située en 3'. L'ARNm est traduit à partir d'un codon initiateur (AUG) et en terminant par un des trois codons de terminaison (UAG, UGA ou UAA). La séquence codante ou cadre ouvert de lecture (ORF) correspond à la région de l'ARNm qui est traduite par le ribosome.

Les ARNt sont de petites molécules d'ARN de 75 à 95 nucléotides. Ils servent d'adaptateurs entre l'ARNm et les acides aminés. Chaque ARNt contient un anticodon de trois nucléotides complémentaire d'un codon particulier et porte l'acide aminé correspondant à ce codon. Lorsqu'il y a un appariement entre un codon de l'ARNm et un anticodon de l'ARNt, le ribosome incorpore l'acide aminé porté par l'ARNt à la chaîne peptidique en croissance.

Les étapes principales de la traduction chez les eucaryotes sont décrites dans ce chapitre ainsi que les deux modes d'initiation de ce processus.

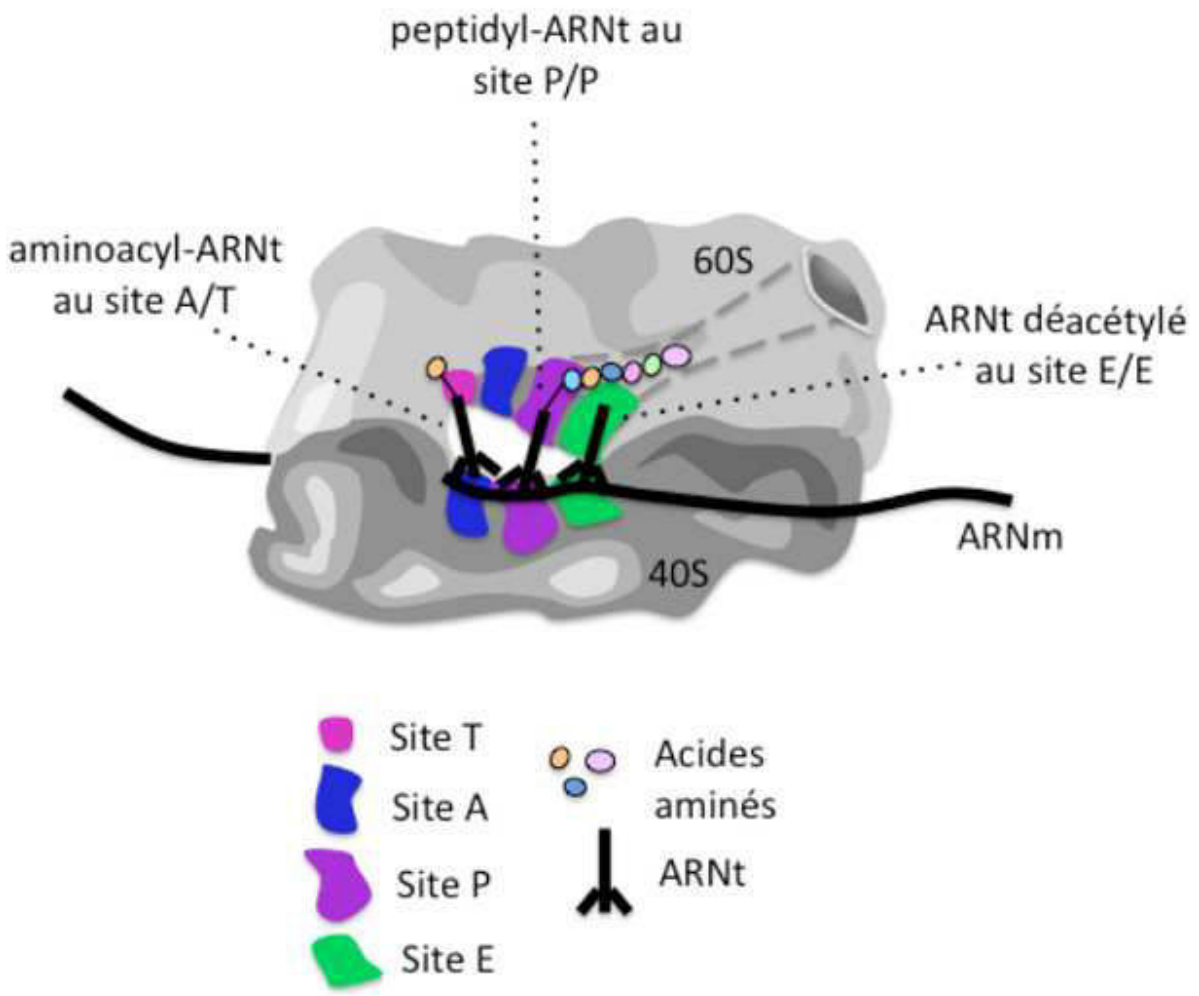

Figure 30 : Représentation des deux sous-unités du ribosome lié à un ARNm (adapté de (352)). Les sites A, P, et E sont représentés sur la petite sous-unité (40S) et la grande sous-unité (60S). Le site T est représenté sur la 60S. Un aminoacyl-ARNt est présent au site d'entrée A/T. Un peptidyl-ARNt est présent au site P/P. Un ARNt désacétylé est présent au site E/E.

B Les étapes de la traduction

Le ribosome est une macromolécule composée d'ARN ribosomique (ARNr) et de protéines, d'où son nom de complexe ribonucléoprotéique. Il est formé de deux sous-unités, la petite et la grande (appelée 40S et 60S, respectivement, chez les eucaryotes, d'après leur coefficient de sédimentation).

Chaque sous-unité comporte trois sites principaux de liaison aux ARNt : les sites A, P et E qui accueillent les ARNt selon leur état d'acylation. La 60S comporte un site supplémentaire appelé

site T. L'ARNt aminoacylé qui porte un acide aminé venant s'ajouter à la chaîne peptidique au niveau du site A (Aminoacyl-ARNt). Le site P (Peptidyl-ARNt) contient l'ARNt lié à la protéine en cours de synthèse. Le site E (Exit) admet l'ARNt déacylé avant sa sortie du ribosome. Un site hybride dit A/T englobant la portion du site A sur la 40S et le site T sur la 60S constitue le site d'entrée des ARNt où se lie un complexe ternaire qui comprend un aminoacyl-ARNt chargé d'un acide aminé et lié au facteur d'élongation eucaryote 1 (eEF1) et à une molécule de GTP.

La traduction d'un ARNm par le ribosome comporte quatre étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Pour chacune des étapes, le ribosome est assisté par plusieurs facteurs cellulaires (353-357).

L'initiation : commence par la reconnaissance de l'extrémité 5' coiffée de l'ARN messager par la petite sous-unité du ribosome chargée d'un ARNt méthionine initiateur (Met-ARNti Met) localisé au site P. Puis, il y aura formation du complexe 43S avec plusieurs facteurs de transcription (ou eIF pour « eukaryotic Initiation Factors »). Ce complexe progresse ensuite le long de la **région 5' non traduite (5'UTR)** jusqu'à atteindre le codon d'initiation (étape de « balayage ») où le ribosome complet (80S) sera assemblé et sera prêt à débuter un cycle d'élongation. Chez les eucaryotes, l'initiation peut être coiffe-dépendante ou IRES-dépendante, c'est-à-dire que la 40S peut se lier au messager soit au niveau de la coiffe soit au niveau d'un site localisé à l'intérieur du messager appelé IRES (ces deux modes d'initiation seront décrits en détail dans le paragraphe C de ce chapitre).

L'élongation : lors de cette étape, il y aura synthèse de la chaine peptidique par le ribosome en suivant les informations contenues dans l'ARNm. D'abord, le ribosome vérifie les interactions codon-anticodon. Le peptide en croissance est alors immédiatement transféré du peptidyl-ARNt situé au site P/P sur l'acide aminé de l'aminoacyl-ARNt nouvellement accommodé au site A/A avec formation d'un nouveau lien peptidique. Ensuite, le peptidyl-ARNt allongé d'un acide aminé et l'ARNt désacétylé de la chaîne peptidique sont déplacés respectivement dans les sites P/P et E/E en entraînant le messager. C'est la translocation qui nécessite l'aide d'un second facteur, eEF2, et l'hydrolyse du GTP. L'ARNt désacétylé est alors expulsé du ribosome. Le ribosome assure la fidélité de la traduction et le maintien du cadre de lecture tout au long de l'élongation. L'étape d'élongation est répétée jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon de terminaison au niveau de son site A/A.

La terminaison : À ce moment, il y aura arrêt de la traduction. Lorsqu'un codon de terminaison se trouve au site A/A, le facteur de terminaison eucaryote 1 (eRF1) le reconnaît et va occuper ce site. En association avec le facteur de terminaison eucaryote 3 (eRF3), il déclenche l'hydrolyse du lien entre la chaine peptidique et le peptidyl-ARNt auquel elle est attachée. La protéine nouvellement synthétisée est relâchée.

Recyclage des ribosomes : La 60S est dissociée de la 40S liée à l'ARNt et à l'ARNm grâce aux facteurs d'initiation eIF3 et eIF1A (356,358,359). Ensuite, l'ARNt désacétylé au site P est relâché grâce au facteur d'initiation eIF1, ce qui est suivi de la dissociation de l'ARNm et de la 40S grâce à la sous-unité j de eIF3. Le Met-ARNti Met se lie alors au site P de la 40S pour former le complexe 43S avec des facteurs d'initiation. La 40S est prête à recommencer un nouveau cycle de traduction.

C L'initiation de la traduction

La traduction des gènes et particulièrement la phase d'initiation, est une étape importante de la régulation de l'expression génique, ce qui permet un contrôle rapide et réversible de l'expression des gènes. L'activité des facteurs d'initiation, leurs structures et leurs interactions avec le ribosome ont permis de mieux comprendre la complexité de l'initiation de la traduction. Il a été proposé, en plus du mécanisme classique d'initiation de la traduction coiffe-dépendant (360-362), que la traduction puisse se faire par entrée interne au niveau de séquences IRES présentes dans le 5'UTR et gag (363,364).

C.1. L'initiation coiffe-dépendante de la traduction

La plupart des ARNm cellulaires sont coiffés au niveau de leur extrémité 5'et polyadénylé à leur extrémité 3'. Ces deux caractéristiques du point de vue structurale sont nécessaires pour la traduction efficace de l'ARNm via le mode coiffe dépendant. Il consiste à la liaison de la sous-unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' des ARNm, au niveau de la structure coiffe. Cet événement nécessite au moins 12 facteurs d'initiation eucaryotes eIFs (365). L'initiation coiffe-dépendante débute par l'interaction du complexe ternaire eIF2-GTP/Met-ARNt$_i^{Met}$ avec le complexe de pré-initiation 43S qui comprend la 40S associés avec eIF3, eIF1 et eIF1A. En

parallèle, le complexe eIF4F formé par eIF4G, eIF4A et eIF4E interagit avec l'extrémité 5'coiffée de l'ARNm (Figure 31). eIF4E est le facteur liant la coiffe qui comprend une guanosine méthylée en position 7 et liée au second nucléotide par une liaison 5-5' phosphodiester inhabituelle (366,367). Le complexe 43S est recruté au niveau de la structure coiffe de l'ARNm grâce à l'interaction de eIF4G, et eIF3 (368,369). Sachant que l'eIF4G est une large protéine d'échafaudage avec de multiples partenaires comme eIF4E, une protéine liant la queue de poly (A). eIF4G lie eIF4E, le facteur liant la coiffe, eIF4A, une hélicase d'ARN qui déroule les structures secondaires de l'ARN pour permettre le balayage de de la région 5'UTR par le complexe 43S avec hydrolyse d'ATP, et PABP, une protéine liant la queue de poly(A) en plusieurs copies. Cette liaison de PABP assure la circularisation de l'ARNm qui est nécessaire pour une initiation efficace. Généralement, les messagers cellulaires possèdent une région 5'UTR peu structurée, ce qui facilite le balayage de l'ARNm par le ribosome. Le balayage se fait en direction 5'-3' jusqu'à ce que l'anticodon du Met-ARNti Met reconnaisse le premier codon AUG placé dans le contexte approprié. Le contexte optimal (aussi appelé séquence Kozak) pour favoriser la reconnaissance d'un codon d'initiation chez les eucaryotes supérieurs est GCC (A/G) CCAUGG avec une purine à la position -3 et une guanine à la position +4. Selon cette nomenclature, le A du AUG est à la position +1. La fidélité de la sélection du codon d'initiation est assurée par eIF1 et eIF1A. Suite à la reconnaissance du codon d'initiation, il y a formation du complexe 48S. Ensuite, il y a une hydrolyse du GTP lié à eIF2 qui entraine la dissociation du complexe 43S et les facteurs eIFs associés (Figure 31). La grande sous-unité ribosomal 60S vient se joindre à la 40S avec l'aide d'eIF5B et avec hydrolyse d'un GTP. Une fois la 80S formée, l'élongation débute. D'autres ARNm ont développé une alternative au mécanisme classique d'initiation coiffe-dépendante comme le saut de ribosome ou *shunting*. Ce mécanisme permet de garder les structures secondaires intactes, en permettant au ribosome de « sauter » par-dessus de larges portions du 5' UTR lors du balayage.

L'initiation coiffe dépendante de la traduction de l'ARNg chez VIH-1 a été montrée *ex vivo* (370) et confirmée *in vivo* (371).

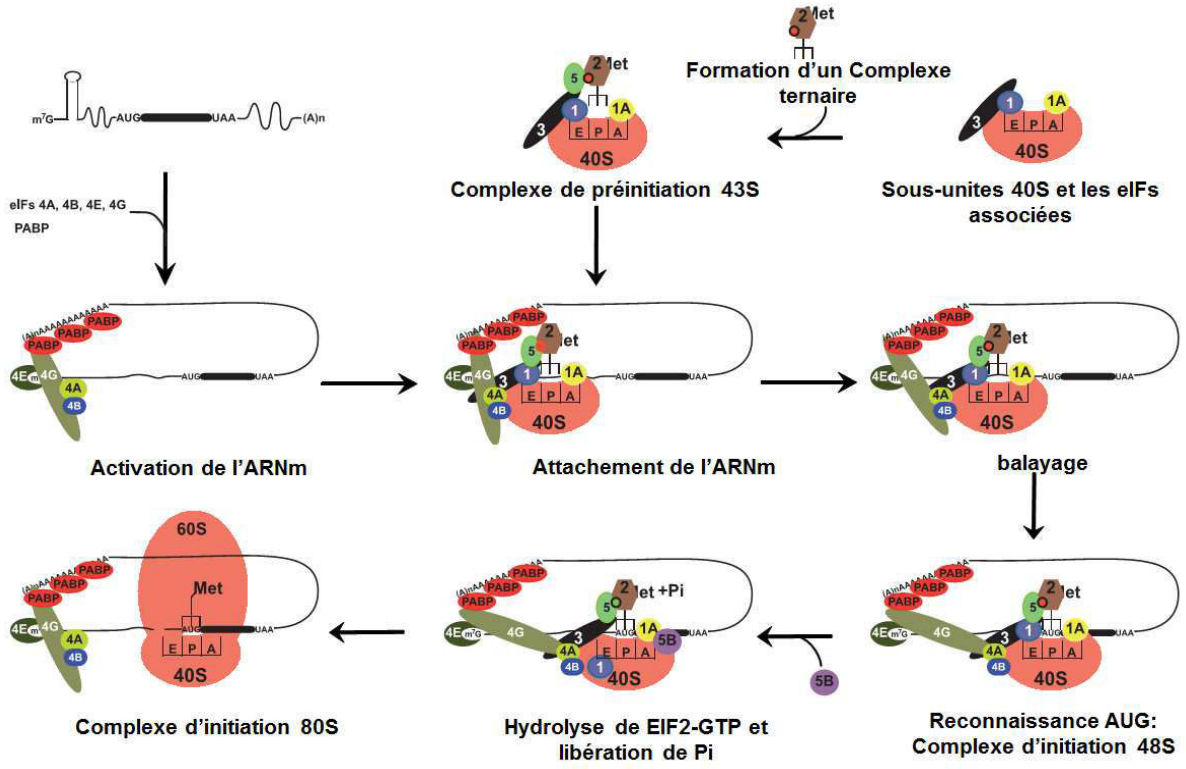

Figure 31 : Modèle de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

C.2. L'initiation IRES-dépendante de la traduction

L'initiation de la traduction de certains ARNm viraux peut être effectuée au niveau d'une séquence appelée IRES (364,372-380). Un IRES est une région structurée de l'ARNm capable de recruter directement la sous-unité 40S du ribosome au niveau du codon de démarrage, indépendamment de la présence de la coiffe et du mécanisme de balayage. La traduction médiée par ces IRES permet d'échapper aux mécanismes contrôlant l'initiation coiffe-dépendante puisque les IRES sont fonctionnels même lorsque la traduction coiffe dépendante est compromise. L'avantage de ce mode de traduction consiste en la possibilité de traduire des ARNm viraux possédant des régions 5'UTR longues et hautement structurées qui seraient difficilement traduits de façon classique.

Il existe une grande diversité d'IRES qui ne possèdent pas de consensus ni au niveau de la séquence ni au niveau de motifs structuraux (381-383). Le mécanisme utilisé par les IRES pour initier la traduction est hétérogène. Certains IRES positionnent directement le codon initiateur du

messager au site P de la 40S. D'autres recrutent la 40S près du codon initiateur puis utilisent un court balayage pour positionner le codon initiateur au site P de la 40S. Certains IRES peuvent même initier à deux codons d'initiation distincts et entrainer la production de protéines différentes (384) ou tronquées (385) ou allongées (386).

Les IRES sont contrôlés par des facteurs cellulaires spécifiques appelés ITAF (*IRES trans-acting factors*) (373,380). Les ITAF sont en général des protéines chaperonne d'ARN qui ont aussi un rôle d'adaptateur facilitant le recrutement de protéines cellulaires notamment celle de la sous unité 40S. Parmi ces ITAFs, on retrouve l'antigène La, les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) et la protéine Unr (*upstream of N-ras*). L'un des plus étudié est la protéine liant une séquence polypyrimidine (PTB), qui à l'instar des autres ITAF, est aussi impliquée dans l'épissage des ARN, et dans la translocation du noyau vers le cytoplasme des ARN… Un ITAF peut être positif, c'est-à-dire stimule l'activité d'un IRES, ou négatif en l'inhibant.

Selon les caractéristiques structurales et fonctionnelles des eIFs et des ITAFs, les IRESes ont été classées en 4 groupes :

- Groupe 1 : contient les IRESes des picornavirus et est divisé en deux sous-groupes majeurs l'entero-/rhinovirus (type I) et le cardio-/aphtovirus (type II). Les deux types d'IRESes ont différentes structures d'ARN avec certains motifs conservés comme le pyrimidine. D'un point de vue fonctionnel, l'initiation ne nécessite pas eIF4E mais nécessite au moins le fragment carboxy-terminal de eIF4G (p100) dans lequel les sites de liaison de eIF4A et eIF3 sont présents (368,387). Ces eIF ne sont pas suffisants pour permettre un recrutement efficace du ribosome ce qui nécessite le recrutement des ITAFs (373,377).
- Groupe 2 : contient les IRESes du virus de l'hépatite C (HCV) et les formes des IRESes du virus CSFV (Classical Swine Fever Virus). Dans ce groupe, l'attachement de la sous-unité 40S sur l'ARNm ne nécessite pas tous les eIFs, mais uniquement le complexe ternaire eIF2 et eIF3 pour donner le 48S PIC (388,389) ; L'association eIF4G/eIF4A n'est pas toujours nécessaire mais leur présence peut dans certains cas, améliorer le recrutement du ribosome (390-392).
- Groupe 3 : contient les IRESes de la famille des dicistrovirus dont le virus de la paralysie du criket (CrPV). Le recrutement du ribosome est unique et l'initiation se fait à partir du site A du ribosome en absence des eIFs et sans l'ARNt initiateur (393,394).

- Groupe 4 : contient les IRESes des ARNs cellulaires qui diffèrent des IRESes viraux parce que l'ARNm est coiffé et la traduction peut impliquer les mécanismes coiffe et IRES dépendant. Le ratio entre coiffe/IRES est probablement régulé par des conditions physiologiques de la cellule qui peut favoriser l'une des deux modes d'initiation. Les IRESes cellulaires nécessitent différentes ITAFs qui se lient à l'IRES pendant le passage de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme (395,396).

C.2.1 La traduction IRES dépendante chez VIH-1

L'utilisation des IRES a été mise en évidence chez de nombreux rétrovirus parmi lesquels SIV^{mac}, FIV VIH-1 et VIH-2 (397-400). Deux IRES ont été identifiés dans le génome du VIH-1, l'un dans la région 5'UTR de l'ARNm en position nucléotidique 104 à 336 (IRES ^{UTR}) (361) et l'autre juste après l'AUG de Gag (IRES ^{Gag}) (401) (Figure 32).

Ce mécanisme IRES conduit à une synthèse très efficace de Gag dans les cellules infectées notamment lors de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M induit par la protéine virale Vpr (401).

A l'heure actuelle, les IRES du VIH-1 n'appartiennent à aucun des groupes déjà décrits dans le paragraphe au-dessus. Ils possèdent les propriétés de la liaison directe et indépendante à la sous-unité 40S et eIF3 et également la capacité de pouvoir recruter tous les eIFs à l'exception d'eIF4E pour initier la traduction (402).

L'IRES ^{Gag} du VIH-1, qui est intégré à l'intérieur de la région codante du Gag, a également été décrite pour SIV. Il est responsable de la synthèse d'un isoforme de plus petite taille $p40^{Gag}$ (Figure 32 I) (361,385,403,404). Chez VIH-2, en plus de la synthèse du précurseur $p57^{Gag}$ la traduction peut aussi débuter à des codons AUG distincts localisés en aval du codon de $Pr57^{Gag}$ et donner les isoformes tronquées $Pr50^{Gag}$et $Pr47^{Gag}$ (Figure 32 II). La fonction de ces isoformes n'a pas été élucidée. Cependant, leur délétion affecte la réplication du VIH-1 (404). De plus il a été montré que les isoformes de VIH-2 étaient incorporées dans le virion immature (403).

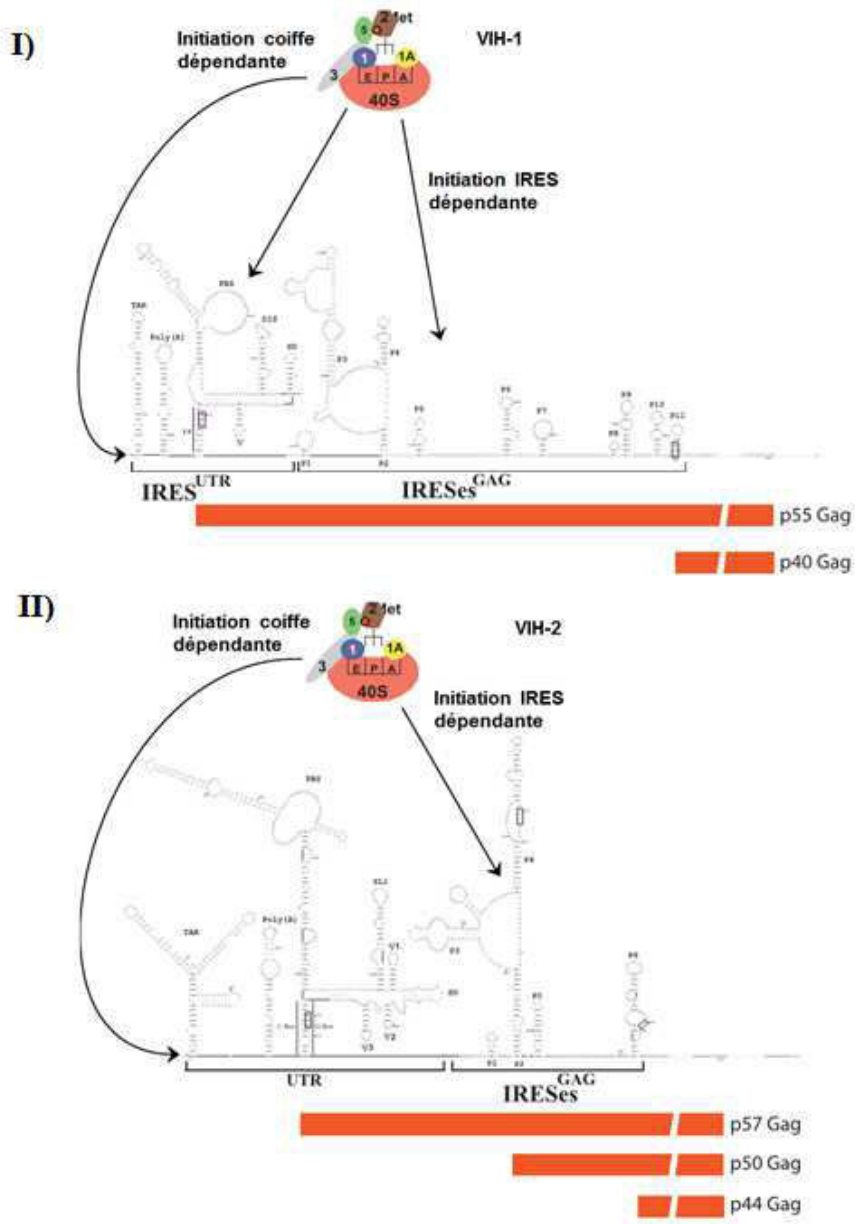

Figure 32 : Recrutement du ribosome sur VIH. (I) modèle de la structure secondaire de l'ARN génomique du VIH-1 du nucléotide +1 jusqu'au 759 (adapté de (385,405)). La région 5'UTR couvre le nucléotide +1 de la transcription jusqu'au 335 est composé de TAR, poly(A), PBS, DIS, SP et le domaine Psi. La région codante de Gag est shématisée par les domaines P1 au P11, qui possèdent une activité IRES. Les complexes ribosomiques peut s'attacher à l'ARNm par la structure 5'coiffe, 5'UTR IRES ou via l'IRES dans la région codante. La p55 et sa structure tronquée p40 du Gag du VIH-1 sont représentées sous la structure de l'ARN. (II) Modèle de la structure secondaire de l'ARN génomique du VIH-2 du nucléotide +1 jusqu'au 906 (adapté de (385,406)). La région 5'UTR couvrant le nucléotide +1 jusqu'au codon d'initiation (nucléotide 545) et est composé de TAR, Poly(A), SL1, Psi1, SD, et Psi3. La région codante du domaine P1 jusqu'au P6 contient un IRES. La liason du ribosome sur l'ARNm peut se réaliser sur l'extrémité 5' et dans la région codante de Gag. La p57 et les formes tronquées p50 et p44 du VIH-2 de Gag sont représentés sous la structure de l'ARN.

C.3. Utilisation alternative du mécanisme coiffe et IRES dépendant

En effet, chez VIH-1 l'ARNm présente une région 5'UTR longue et très structurée ce qui rend la traduction coiffe-dépendante difficile (24,407,408). Ainsi, l'importance du VIH-1 pour avoir l'ARN hélicase A peut suggérer un rôle pour ce dernier dans le déroulement des structures d'ARN que l'on rencontre entre la coiffe et le codon AUG.

D'un autre côté, lors des étapes tardives du cycle de réplication, la protéine Vpr conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (409). Durant cette phase, la traduction coiffe-dépendante est réprimée (410), sans diminution de la synthèse de Gag (411), suggérant une utilisation exclusive d'IRES par VIH-1 pour traduire ses protéines de structure et ses enzymes. En plus, la protéase virale peut moduler la machinerie de traduction de la cellule hôte en ciblant eIF4G et en empêchant la reconnaissance eIF4E ou l'interaction de PABP. Le clivage de eIF4G provoque l'altération de la traduction coiffe dépendante et favorise la traduction IRES dépendante de l'ARN viral (412,413). Par ailleurs, il a été montré que l'activité de ces IRES dépendait de l'environnement de la cellule hôte comme l'arrêt des cellules en phase G2/M (en cas du VIH-1) ou par le stress causé par l'infection (401,414). Cependant, il était difficile de distinguer les contributions des mécanismes d'initiation de la traduction médié par la coiffe ou par IRES au cours de la réplication viral et surtout s'ils fonctionnent en synergie.

D Traduction et encapsidation

La transition entre traduction et encapsidation est critique pour le cycle viral et repose sur un recouvrement entre les signaux nécessaires à la traduction (coiffe en 5', IRES (du nucléotide 104 à 336) et ceux nécessaires à l'encapsidation (du nucléotide 694 au 788 (415)). Chez VIH-1, un ARN génomique non traduit peut être encapsidé (307) (Figure 33). De même, l'utilisation des vecteurs lentiviraux montre que Gag traduite sur un messager peut reconnaitre et encapsider un autre ARN psi+. Cependant, les travaux de M.Ott d'une part et de M.Wainberg d'autre part montrent que les ARN traduits sont préférentiellement encapsidés (416,417).

Dans ce contexte, des études ont été menées pour comprendre le rôle de la protéine Gag dans la balance entre traduction et encapsidation de l'ARN génomique. Il a été démontré que la

polyprotéine Gag peut associer à la 5' UTR de son propre ARNm formant un complexe ARNg-Gag qui crée une plate-forme pour la multimérisation des molécules de Gag qui se trouvent à des concentrations élevées (76,418). La construction d'un tel complexe pourrait progressivement bloquer le balayage du ribosome qui finirait par inhiber la traduction et provoquer la sélection de l'ARNg pour l'encapsider au moment de l'assemblage des particules virales (371,419-422).

Inversement, la traduction de Gag semble être stimulée à des concentrations faibles de Gag (419). Cette stimulation de Gag pourrait être dépendante de la région matrice de Gag. Une possibilité est que Gag interagit avec un facteur d'initiation de la traduction ou avec des facteurs *en trans* par son domaine matrice pour stimuler la traduction. En effet, la matrice (seule ou au sein de Gag) a été montré d'interagir avec eIF5B (422), le facteur nécessaire à la jonction des sous-unités ribosomaux 40 et 60S (423,424) ou lui recrute à la région 5'UTR du VIH-1 via le domaine NC de Gag. De plus, la matrice est capable d'interagir également avec le facteur d'élongation (EF1α) (un composant essentiel de la machinerie de traduction qui conduit l'ARNt aminoacyl aux ribosomes) pour stimuler la traduction (421). Cependant, le facteur d'élongation EF1 α et le facteur d'initiaton 5B seront séquestrés par la matrice à des concentrations élevées de Gag, qui conduit à l'inhibition de la traduction *in vitro.*

En 2010, Abrahamyan et *al.* ont proposé que la protéine cellulaire Staufen servirait d'interrupteur moléculaire pour arrêter la traduction de l'ARNm du VIH-1 et favoriser son encapsidation.

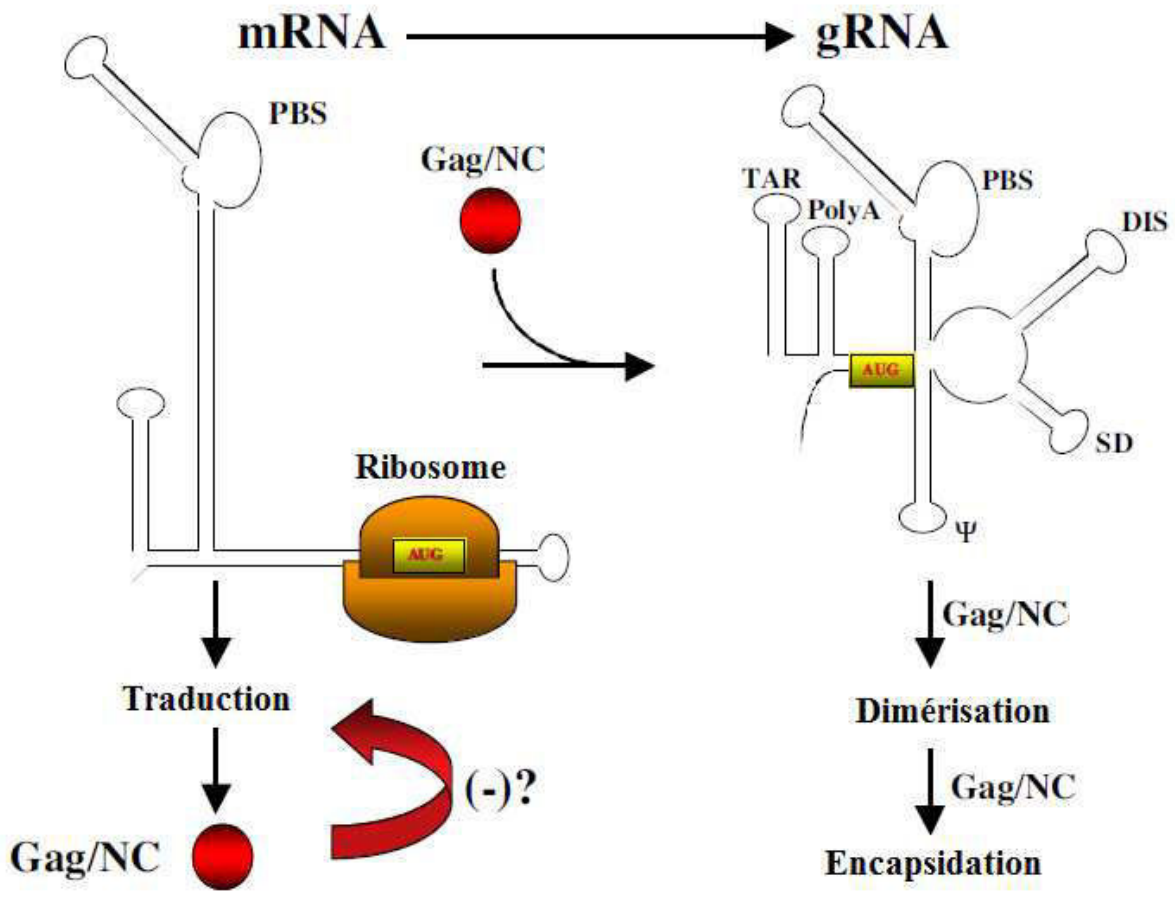

Figure 33 : Le domaine NC de Gag est le principal déterminant dans la transition de l'ARNm à l'ARN génomique. Après la synthèse, l'ARN génomique du VIH-1 est initiallement reconnu en tant que messager pour la production de Gag. Les molécules de Gag néosynthétisé lie l'ARNg via le domaine NC provoquant des réarrengements conformationnelles de la région 5'LTR. Les modifications structurales de l'ARNg favorisées par le domaine NC de Gag exposent les éléments en cis requises pour la dimérisation et l'encapsidation (DIS/Psi). L'effet des réarrengements de la structure de la région 5'LTR probablement provoque l'inhibition de la traduction, et favorise la dimérisation et l'encapsidation. Les structures de l'ARNg sont adaptés de (425).

Chapitre VI : La protéine ribosomique humaine RPL7

A Structure protéique de la RPL7

Dans la cellule eucaryote, l'assemblage du ribosome est considéré comme l'un des aspects du contrôle de l'expression génique. Les ribosomes sont assemblés à partir des protéines ribosomiques et de l'ARN ribosomique dans les nucléoles, et sont ensuite exportés vers le cytoplasme pour effectuer la traduction. Pour cela, les protéines ribosomiques traduites dans le cytoplasme, sont importées dans le noyau puis dans le nucléole. L'une de ces protéines ribosomiques est la RPL7. Plus récemment, la nomenclature des protéines ribosomiques a été modifiée et cette protéine est maintenant appelée RPL30 (426). Par contre, sa référence Uniprot reste la même, P18124. Cependant, dans la suite du manuscrit, nous avons décidé de conserver le nom RPL7.

La protéine eucaryote RPL7, initialement isolée à partir des cellules du foie de rat, se trouve associé avec la grande sous-unité ribosomique 60S dans le cytoplasme (427-429). Comme d'autres ribonucléoprotéines, la RPL7 a été identifiée comme un auto-antigène puissant dans les maladies auto-immunes systémiques : telles que le lupus érythémateux disséminé, une maladie attaquant le tissu conjonctif du corps, et la sclérodermie systémique progressive. Dans certains cas, la RPL7 est fortement exprimée dans les cellules de cancer colorectal, mais pas dans les cellules normales (430).

Cette protéine ribosomique est constituée de 248 acides aminés (431). D'un point de vue structural, la région N-terminale de la RPL7 adopte une conformation en hélices α de la proline 27 à la proline 106 (Figure 34). Cette partie de la molécule est hydrophile comme représenté par le profil d'hydropathie (non montré). Dans la structure globale du ribosome, cette partie apparait localisée sur le dessus de la sous unité 60S, accessible au solvant, comme cela avait été prédit par une approche biochimique. Le groupe de Lin A et *al* (432) (Figure 35) a déterminé cette localisation de la protéine ribosomique RPL7 extraite par biotinylation de la surface du peptide à partir des ribosomes du rat. Le peptide biotinylé appartient à la région NH2-terminale qui s'étend du résidu 1-Met à la position 76 où 4 domaines basiques répétés en tandem résident (427). Les données structurales montrent que cette région basique exposée à la surface du ribosome est susceptible à des modifications chimiques (Figure 35).

I) Séquence protéique de la RPL7

```
MEGVEEKKKE VPAVPETLKK KRRNFAELKI KRLRKKFAQK
MLRKARRELI YEKAKHYHKE YRQMYRTEIR MARMARKAGN
FYVPAEPKLA FVIRIRGING VSPKVRKVLQ LLRLRQIFNG
TFVKLNKASI NMLRIVEPYI AWGYPNLKSV NELIYKRGYG
KINKKRIALT DNALIARSLG KYGIICMEDL IREIYTVGKR
FKEANNFLWP FKLSSPRGGM KKKTTHFVEG GDAGNREDQI
NRLIRRMN
```

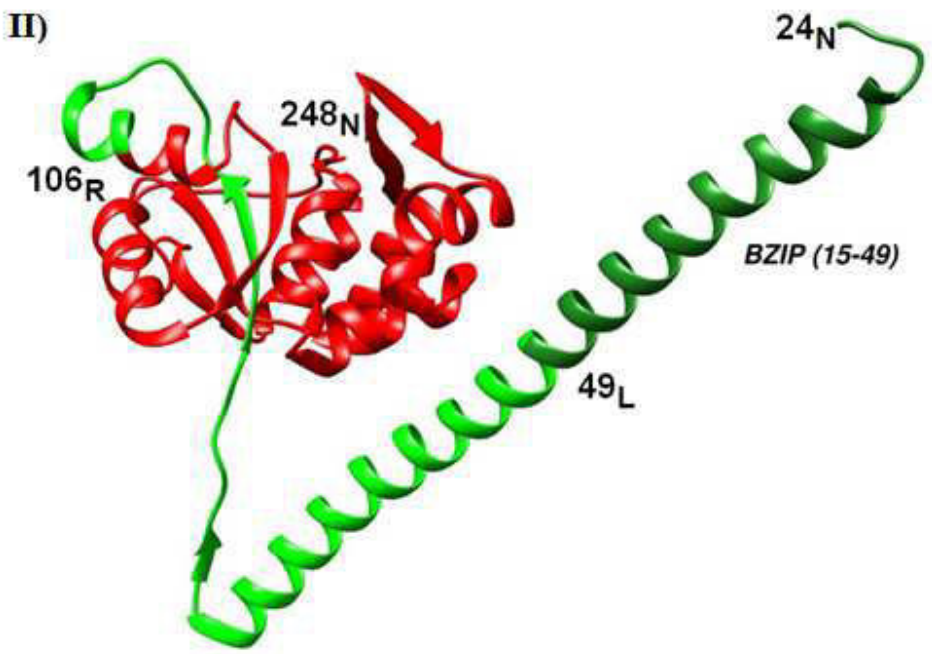

Figure 34 : Séquence primaire et tertiaire de la RPL7. Séquence primaire (I) et structure tridimensionnelle (II) de la protéine RPL7. Sa partie N-terminale formant une hélice (en vert) reste accessible au solvant alors que le domaine central et la partie C-terminale forment une structure compacte profondément ancrée dans le ribosome et en interaction avec les acides nucléiques. (DOI : 10.2210/pdb 3J39).

Cette propriété de la région N-terminale de la RPL7 a été utilisée comme outil pour détecter la distribution du ribosome dans des cellules HeLa, par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la région N-terminale qui contient les 54 premiers résidus de la protéine (anticorps anti-L7n) (433)

Cette région N-terminale basique est aussi considérée comme étant une région de type « leucine zipper » (BZIP) retrouvée dans des facteurs de transcription eucaryotes liant l'ADN (434). Elle serait responsable des homodimères très stables observés (435,436).

Ainsi, cette région N-terminale de la RPL7 possède un domaine de liaison aux acides nucléiques (NBD1) qui peut lier sous sa forme homodimérique une séquence d'ADN double brin riche en lysine-arginine. Le motif NBD1 lie aussi l'ARNr 28S et l'ARNm de la RPL7 avec une affinité similaire. L'aspect moléculaire de l'interaction entre la RPL7 et les acides nucléiques a été mené sur des tests *in vitro*. En utilisant un test de filtration, il a été montré que la protéine native, sa forme Histidine ou GST, liait son propre ARN messager avec une affinité d'une quarantaine de nM. Par des expériences de compétition, il semble que la RPL7 lie plus efficacement son propre ARN ainsi que les ARN ribosomaux, les ARNm riches en A et les poly G mais qu'inversement elle ne reconnaisse que faiblement les ARNt et les poly U, poly C et poly A. Comme préalablement mentionné dans ce paragraphe, cette partie N-terminal possède un motif 'leucine zipper' mais qui est impliqué dans l'interaction avec les acides nucléiques. Pour délimiter cette région de nombreux mutants de délétion ont été crées, ils ont défini que le peptide ^{27}ELKIKRLRKKFAQKMLRKARRK^{48} était le domaine qui interagissait avec les acides nucléiques et notamment de manière plus spécifique avec les ARN versus les ADN.

La protéine ribosomique RPL7, possède quatre domaines basiques de type NLS (signal de localisation nucléaire) dans la région NH2-terminale. Le nombre de ces domaines varie selon les espèces (427,437). Cependant, la fonction de ces séquences basiques en ce qui concerne le ciblage nucléaire n'a jamais été déterminée expérimentalement.

La région centrale qui se plonge dans le 60S, serait impliquée dans les interactions protéine-protéine. Elle contient 2 NLS qui sont impliqués dans la localisation nucléaire de la RPL7.

La région C-terminale de la protéine RPL7 est très conservée chez les organismes. Comme les résidus hydrophobes sont abondants, la plupart de cette région n'est pas exposée à la surface du ribosome. Les 50 derniers résidus de cette région portent un motif de liaison à l'ARN (NBD2) qui lie préférentiellement et avec une grande affinité l'ARN 28S (434,438) ainsi, ce motif semble être spécifique pour la liaison des ARN et à l'inverse des ADN qui sont liés préférentiellement au NBD1. De plus, cette région est connue pour interagir avec les membranes ce qui permettrait l'ancrage du ribosome dans le RE (431).

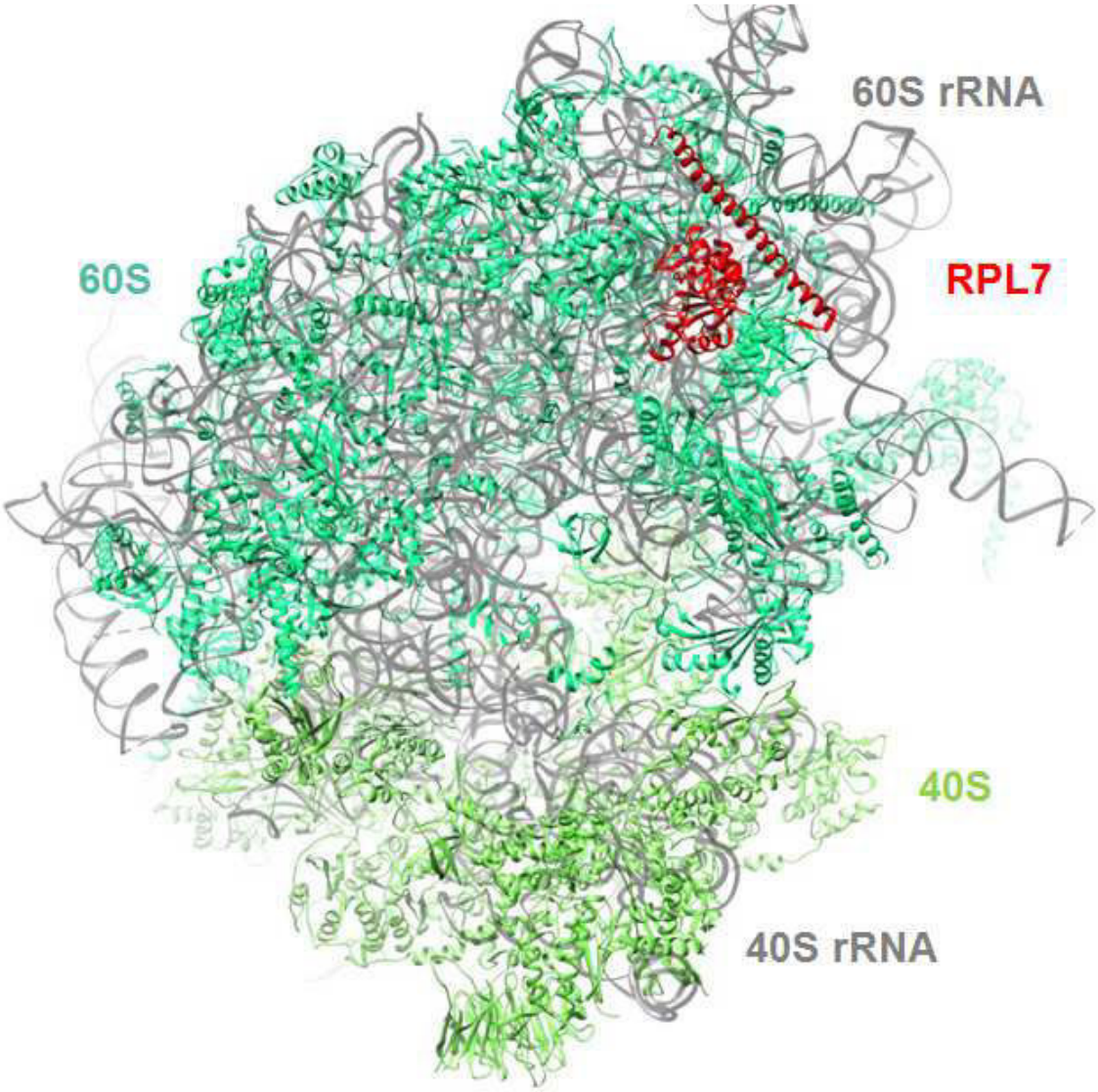

Figure 35 : Structure tridimentionnelle de la protéine RPL7 dans le ribosome 80S de la drosophile Melanogaster. La grande sous-unité 60S est représenté en bleu clair, la petite sous-unité 40S en vert, l'ARNr en gris. La RPL7 est représentée en rouge ou sa partie N-terminale se trouve exposer à la surface du solvant en accord avec la littérature.

B Localisation cellulaire de la RPL7

L'étude de la localisation cellulaire de la RPL7 montre que cette protéine se trouve dans différents compartiments de la cellule. Ainsi, pour suivre la localisation de cette protéine en fonction du temps, des cellules HeLa ont été transfectées par la Flag-RPL7. L'évaluation en

fonction du temps de la distribution cellulaire de la RPL7 dans les cellules a été immunodétecté plusieurs heures post-transfection. Il s'agit de localisation : (a) cytosolique uniquement , (b) condensée à la membrane nucléaire , et (c) distribution combinée nucléoplasme vésicules intra-nucléaires , et nucléole , et (d) concentrée dans les nucléoles (Figure 36 I) . La RPL7 a été détectée dans le cytoplasme dès 4 h post-transfection. A 6 h, 12 h et 24 h post-transfection, la plupart des localisations cellulaires ont été trouvés, avec une diminution de la RPL7 dans la fraction cytosolique (Figure 36 II) (431).

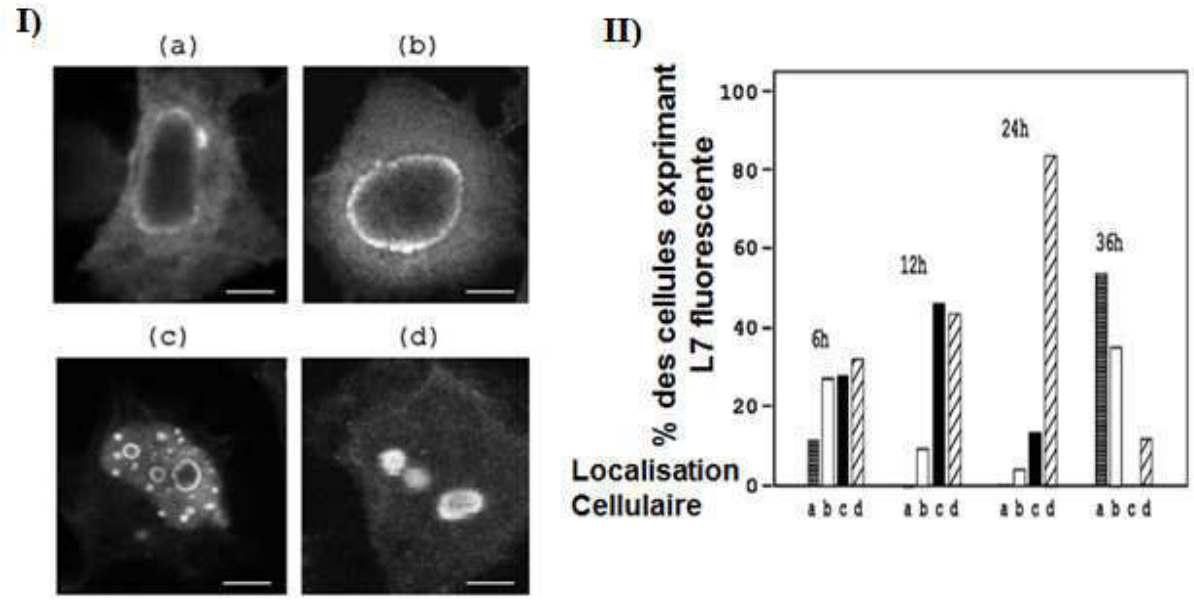

Figure 36 : Analyse de la localisation sub-cellulaire de la protéine Flag-RPL7. (I) Apparition de la Flag-RPL7 dans les cellules post-transfection à différents intervales de temps vue par immunofluorescence avec un anticorps secondaire couplé au FITC sous microscope confocale. L'anti-flag a été utilisé comme anticorps primaire. Echelle représente 5 µm. (II) Distribution cellulaire de la Flag-RPL7 dans les cellules observée à différents intervalles de temps post-transfection.

C Fonctions de la RPL7

C.1. La RPL7 possède une propriété de liaison au réticulum endoplasmique (RE) et est impliquée dans l'association du ribosome au RE

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que la partie C-terminale était importante pour l'interaction de la RPL7 avec les membranes. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* en comparant la RPL7 et le mutant ΔC50 en utilisant la technique SPR (Surface Plasma Resonance) (439). De plus, il semble que la RPL7 soit capable de lier un modèle *in vitro* de réticulum RP-

KM (puromycin salt-treated microsome) avec une affinité voisine de celle obtenue dans les mêmes conditions avec un ribosome entier. Pour confirmer cette hypothèse, les mêmes auteurs ont eu l'idée de suivre la localisation de la RPL7 en présence de l'acide mycophénolique (AMP). Cette molécule provoque une séquestration du GTP pool de la cellule inhibant l'import nucléaire (440). Dans de telles conditions les auteurs décrivent une relocalisation cytoplasmique de la protéine, notamment au niveau du réticulum. Ainsi, il a été proposé un modèle selon lequel la RPL7 permettrait d'ancrer les ribosomes dans le réticulum.

L'ancrage du ribosome au RE durant le processus de traduction-translocation est connu pour être médié par une interaction protéine-protéine ou une interaction protéine-ARN (441-444). D'autre part, le fait que le ribosome sera toujours associé au RE après la traduction reste à déterminer. Matthew D. Potter et al (444) ont proposé que l'affinité des ribosomes pour la membrane du RE diminue pendant la phase d'élongation de la traduction des protéines. Cette diminution de l'affinité est suffisante pour permettre à la membrane de se détacher du complexe de la traduction ribosome-chaîne naissante en absence d'une séquence signal qui peut servir à ancrer le complexe à la membrane du RE. A la terminaison de la synthèse protéique, la grande sous-unité du ribosome inactive assume une conformation stable avec une grande affinité pour la membrane, ainsi permettant une association en continue à la membrane. A la réinitiation de la traduction, la membrane lie toujours le ribosome, et cette interaction est maintenue uniquement si le polypeptide naissant possède une séquence signal ou un domaine transmembranaire qui peut interagir avec les composants de la membrane pour fournir une fonction d'ancrage des ribosomes au RE.

C.2. La RPL7 inhibe la traduction dans un système acellulaire

Sachant que la RPL7 est une protéine ribosomique qui interagit avec le réticulum, l'ARN en cours de traduction et l'ARN28S, Frank Neumann et al ont tenté de mettre en évidence le rôle de la protéine RPL7 lors de la traduction. Pour cela, ils ont développé un système *in vitro* dans lequel ils suivent la traduction de deux ARN messagers codant pour la RPL7 et la luciférase (438).

Comme le montre la figure 37, l'addition de RPL7 soluble entraine une nette diminution de l'expression des deux protéines reportrices. De plus, les auteurs montrent que l'efficacité de l'inhibition de la traduction dépend du temps d'incubation de l'ARN messager et de la RPL7.

Afin de confirmer que l'inhibition dans un système de traduction acellulaire a été spécifiquement médiée par la RPL7, et notamment par sa région BZIP, ils ont utilisé de l'anti-L7 qui interagit avec la région BZIP, et ils ont constaté que l'interaction anticorps-RPL7 neutralise la capacité de la RPL7 à inhiber la traduction.

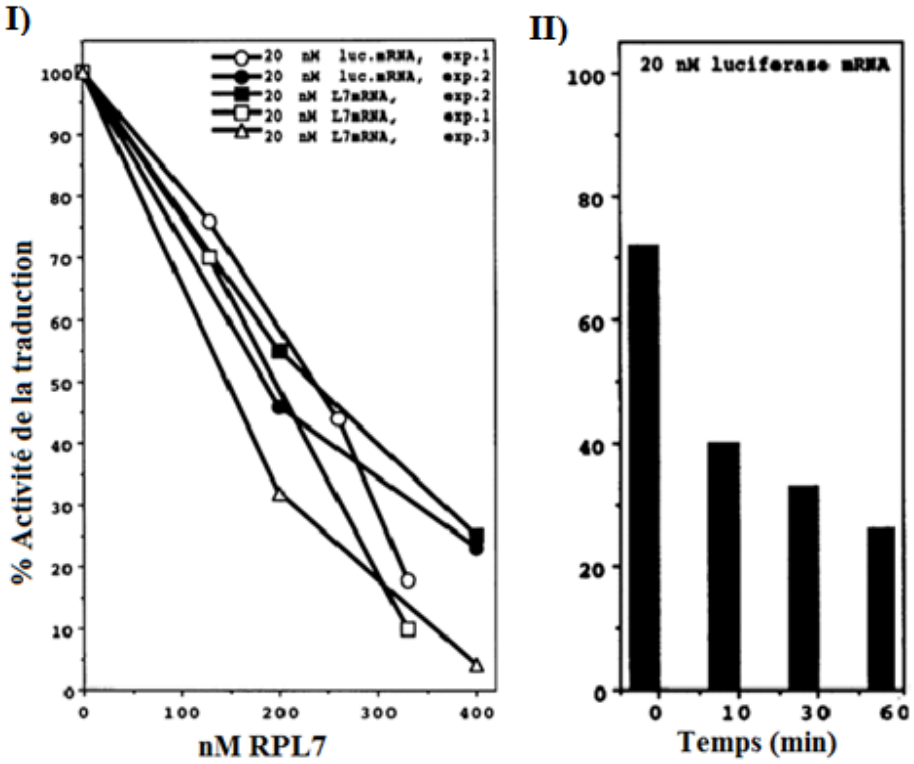

Figure 37 : (I) Courbes montrant l'effet dose de l'inhibition médiée par la RPL7 dans un système acellulaire de traduction : Inhibition de l'ARNm de la RPL7 et de l'ARNm luciférase (luc) par ajout de l'HisL7.
(II) Cinétique de l'inhibition médiée par la RPL7 dans un système de traduction acellulaire : l'ARNm Luciférase (20nM) a été préincubé pendant 0, 10, 30,60 min avec HisL7 avant la traduction acellulaire. L'activité traductionnelle correspondante représenté en colonnes est normalisée à un ARNm incubé sans HisL7 pendant 60 min.

Problématiques et objectifs du travail de thèse

L'ADN proviral intégré dans le génome de l'hôte est transcrit en ARN génomique (ARNg) par l'ARN polymérase II, puis maturé (coiffe et polyadénylation) et exporté vers le cytoplasme sans épissage. Deux possibilités s'offrent alors à lui : être traduit en protéines structurales (Gag/Gag-Pol) et/ou être encapsidé (Figure 38). Chez VIH-1 et 2, l'ARN encapsidé ne serait pas obligatoirement celui traduit (307,311) comme le suggère le développement des vecteurs lentiviraux. Cependant plusieurs études montrent que l'ARN néotraduit est encapsidé préférentiellement par rapport au non traduit (416,417).

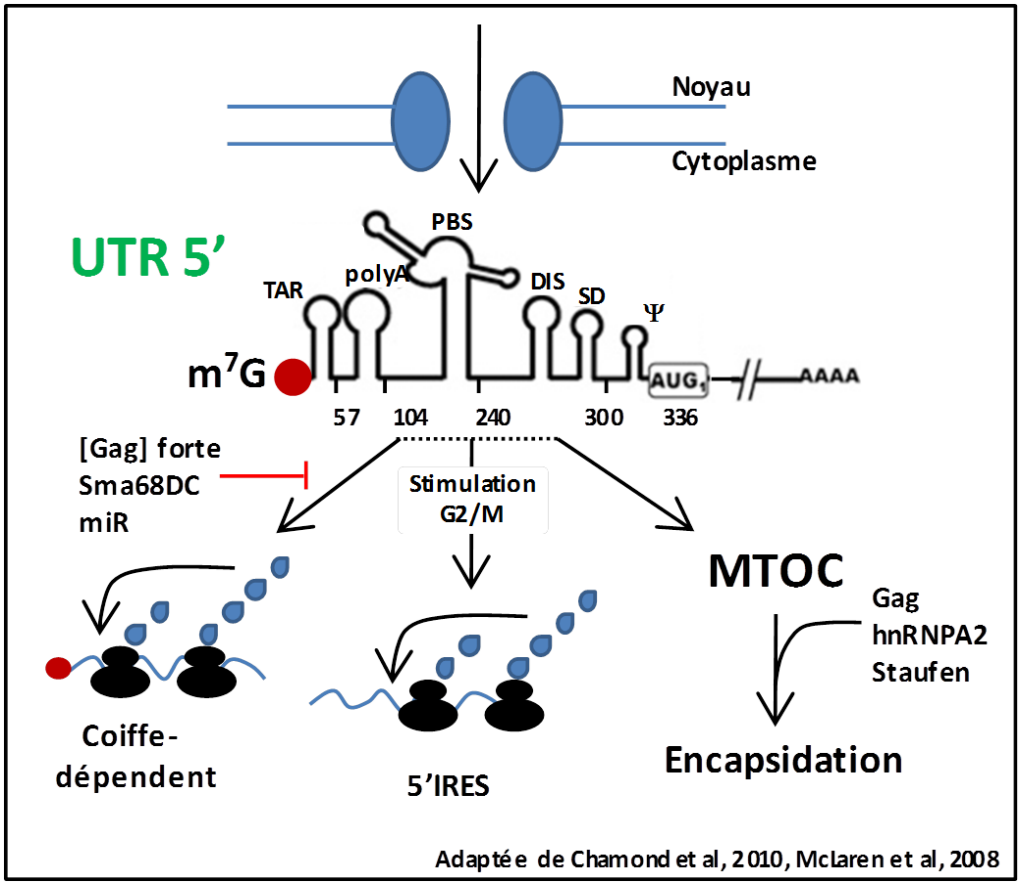

Figure 38 : Traduction et encapsidation de l'ARN génomique du VIH-1

Le domaine 5'UTR est schématisé par les différentes séquences 'en cis' impliquées dans les étapes de traduction et d'encapsidation. Après son export du noyau, l'ARN génomique (ARNg) est traduit en polyprotéines de structure et enzyme Gag et GagPol respectivement. Cette traduction peut être modulée par différents facteurs (Sma68DC, hnRNPE1, miRNA, Gag à forte concentration) ou activée (Rev, Gag à faible concentration). L'ARNg peut aussi se diriger vers les centrosomes (MTOC : centre organisateur des microtubules) et interagir avec les protéines hnRNPA2, Gag, Staufen pour être encapsidé.

Les étapes de traduction et d'encapsidation de l'ARN viral nécessite la même séquence nucléotidique, d'environ 450 bases, appelée 5'UTR. Cette séquence est localisée dans la région 5' de l'ARN génomique. La traduction de Gag de type 'coiffe dépendante' est assurée après modification de cette séquence en 5' en 7mGpppN (guanosine méthylée en position N7, reliée au premier nucléotide transcrit par une liaison 5'-5' triphosphate). De plus, il a été montré récemment que cette région 5'UTR possédait aussi une IRES. Mais cette même région contient aussi le domaine Psi qui est indispensable à l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique. Pour cela, ce domaine Psi est reconnu par la protéine Gag, notamment par les domaines dactyles de la NCp7.

Ainsi, les deux étapes de traduction et d'encapsidation sont extrêmement liées suggérant un équilibre entre les deux. Chez le VIH-1, le modèle actuel permettant d'expliquer cette transition repose sur la quantité de Gag qui interagit avec son propre ARN (419). Ce blocage se ferait par encombrement stérique au niveau du 5' UTR car les motifs d'encapsidation Psi et de la traduction sont superposés, ou par le recrutement de facteurs protéiques (421,422), ou encore par compétition avec des microARN (445). Cependant, aucun de ces modèles ne propose de mécanisme expliquant cet arrêt de traduction ni comment l'ARNg traduit et localisé dans les polysomes serait libéré des ribosomes afin de permettre son encapsidation.

C'est dans le but de comprendre le rôle du 5' UTR de l'ARNg et de celui de Gag dans les toutes premières étapes de la formation des complexes Gag-ARNg que nous avons obtenu, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. R. Benarous (société CellVir, Paris), la liste d'une série de protéines identifiées par un crible double-hybride d'une banque d'ADNc utilisant la NCp7 ou Gag comme appât. Parmi les protéines cellulaires identifiées, nous avons sélectionné la protéine ribosomique RPL7 (*Ribosomal Protein L7,* P18124) car sa fonction d'inhibiteur de la traduction nous permettrait de proposer un mécanisme expliquant la balance entre traduction et encapsidation de l'ARN génomique.

L'objectif de mon travail de thèse est alors de caractériser l'interaction Gag(NCp7)-RPL7 en milieu cellulaire et *in vitro* par différentes techniques biochimiques et microscopiques et de déterminer le rôle fonctionnel du Gag-RPL7 lors du cycle viral.

Chapitre III : Matériels et méthodes

A Matériels

A.1. Lignée cellulaire

Cellules HeLa : constituent la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine. Isolée en 1951, ces cellules adhérentes proviennent de métastases prélevées chez une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, Henrietta Lacks d'où le nom dérive.

Cellules 293T : constituent une lignée dérivative des cellules humaines épithéliales de rein transformées par l'adénovirus E1A qui exprime également l'antigène T SV40 permettant la réplication épisomale des plasmides contenant l'origine SV40 et la région du promoteur.

Cellules CEM-SS : sont des cellules lymphoblastoïdes T4 en suspension. Cette lignée cellulaire dérive de la lignée de cellules CEM établie à partir d'un patient atteint d'une leucémie lymphpoïde aigue ; elles sont dites SS pour « Syncytial Sensitivity ». Les CEM-SS sont permissives au VIH. Elles proviennent de l'équipe du Dr.Moog (Institut de virologie, Strasbourg).

A.2. Plasmides

Dans le tableau 1 ci-dessous, vous retrouvez les plasmides utilisés au cours de ma thèse :

Plasmide	Gène de résistance	Tag	Promoteur	Provenance
eGFP	Kanamycine		CMV	
NCp7-mCherry	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr.V.Goldshmidt
NCp7-eGFP	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr. V.Goldshmidt
NCp7-ΔZF1-eGFP	Ampicilline	C-terminal	CMV	IGBMC
NCp7-ΔZF2-eGFP	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr.V.Goldshmidt
NCp7-RAPAAA-eGFP	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr.V.Goldshmidt
Gag	Ampicilline	/	CMV	Dr. D.Ott (National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA)
Gag-eGFP	Ampicilline	C-terminal (MA)	CMV	Dr.V.Goldshmidt
Gag-mCherry	Ampicilline	C-terminal (MA)	CMV	Dr.V.Goldshmidt
GagLeu	Ampicilline	/	CMV	Dr.A Rein (National Cancer Institute, Frederick, Maryland,

				USA)
GagIleu	Ampicilline	/	CMV	Dr.A Rein (National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA)
Gag-ΔZF1	Ampicilline	/	CMV	Dr.V.Goldshmidt
Gag-ΔZF2	Ampicilline	/	CMV	Dr.V.Goldshmidt
GagRAPAAA	Ampicilline	/	CMV	Hala El Mekdad
Gag-ΔZF1ΔZF2	Ampicilline	/	CMV	Salah EL Meshri
GagM369A	Ampicilline	/	CMV	Fritz, J.V
GagG2A	Ampicilline	/	CMV	Fritz, J.V
RPL7-TC	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr. Real Eleonore
RPL7-eGFP	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr.V.Goldshmidt
RPL7-mCherry	Ampicilline	C-terminal	CMV	Dr.V.Goldshmidt
Flag-RPL7	Ampicilline	N-terminal	CMV	Dr. Real Eleonore
Flag-N54	Ampicilline	N-terminal	CMV	Hala El Mekdad
Flag-ΔN	Ampicilline	N-terminal	CMV	Hala El Mekdad
Flag-ΔNΔC	Ampicilline	N-terminal	CMV	Hala El Mekdad
Flag-ΔC	Ampicilline	N-terminal	CMV	Hala El Mekdad
Flag -C50	Ampicilline	N-terminal	CMV	Hala El Mekdad

A.3. Anticorps primaires et secondaires

Tableau 2 A : Liste des différents anticorps primaires utilisés

Nom	Espèce	Fournisseur	Référence	Fluorophore ou Enzyme	Mono/Polyclonal	Application/ Dilution
Anti-p24 Gag	souris	NIH	6521	/	Monoclonal	WB 1/10000
Anti-p24 Gag	lapin	abcam	32352	/	Monoclonal	WB 1/10000
Anti-nucléoline	lapin	abcam	22758	/	Polyclonal	IF 1/1000
Anti-eGFP	souris	proteintech	66002-1-Ig	/	Monoclonal	WB 1/4000
Anti-RPL7	lapin	abcam	72550	/	Polyclonal	WB 1/5000
Anti-actine	Lapin	Epitomics	1854-1	/	Monoclonal	WB 1/5000
Anti-GAPDH	souris	millipore	MAB374	/	Monoclonal	WB 1/5000
Anti-RPL26	lapin	abcam	59567	/	Polyclonal	WB 1/1500
Anti-RPS7	souris	abcam	57637	/	Monoclonal	WB 1/500
Anti-RPS14	lapin	abcam	50390	/	Polyclonal	WB 1/400
Anti-Flag	souris	sigma	F1804	/	Monoclonal	WB 1/4000

Tableau 2 B : Liste des différents anticorps secondaires utilisés

Nom	Espèce	Fournisseur	Référence	Fluorophore ou Enzyme	Application/ Dilution
Anti-souris HRP		Promega	W402B	HRP	WB 1/10000
Anti-lappin HRP		Promega	W401B	HRP	WB 1/10000
Anti-lappin	chèvre	invitrogen	A110111	Alexa fluor 568	IF 1/2000
Protéine A		invitrogen	101023	HRP	WB 1/15000

A.4. Oligonucléotides

Des oligodésoxyribonucléotides synthétiques (oligonucléotides) proviennent de chez Sigma-Aldrich. Les séquences de ces amorces oligonucléotides utilisées dans les études présentées dans ma thèse sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3A : Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse sont phosphorylés en 5'.

Nom	Séquence de 5' à 3'
Mut-RAPAAA-fwd	GCCAGGAACTGCCGCGCCCCCGCTGCTGCTGGCTGCTGGCGCTGC
Mut-RAPAAA-rev	GGTGTGGCCCTCCTTGCCGCAG

Tableau 3B: Les oligonucléotides utilisés pour le clonage Gateway. La partie s'hybridant au gène d'intérêt est écrite en gras. En italique, on retrouve la séquence intervenant dans la recombinaison (*att*B) avec le vecteur gateway.

Nom	Séquence de 5' à 3'
Rev-L7_1-54	*GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT***CCTATGCTTTTTCATAGATAAGCTTCCTC**
Fw-L7_55-248	*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT***CCAAGCACTATCACAAGGAATATAGG**
Rev-L7_1-197	*GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT***CCTAAACAGTATAGATCTCATGAATC**
Fw-L7_198-248	*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT***CCGGAAAACGCTTCAAAGAGGC**
B1-RPL7-Koz-fwd	*GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT***CCACCATGGAGGGTGTAG**
B2-RPL7courte-STOP	*GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT***CCTAGTTCATTCTTCTAATAAGCCTG**

A.5. Bactéries compétentes

Les bactéries *Escherichia coli* compétentes DH5α sont préparées au laboratoire. Ces bactéries ont été utilisées pour amplifier les ADN plasmidiques. Plusieurs mutations sont retrouvées dans le génotype de la bactérie. On peut citer les mutations *endA1* et *recA1* qui, respectivement, entraîne une inactivation d'une endonucléase intracellulaire permettant donc une plus grande protection des ADN plasmidiques étrangers et permet l'élimination des recombinaisons homologues. Les cellules sont stockées à -80°C dans du tampon TB (Hepes 10mM, $CaCl_2$ 250mM, KCl 25mM, $MnCl_2$ 55mM, pH 6,7) contenant 2% de DMSO.

Des bactéries ultracompétentes de chez New Englands Biolabs (NEB) ont également été utilisées pour amplifier les produits de PCR issus de clonages.

B Méthodes

B.1. Transformation des bactéries compétentes et purification de l'ADN plasmidique

Après décongélation lente des bactéries *E.coli* DH5α dans la glace, 50 µL de ces bactéries compétentes sont incubées avec 1 nanogramme du plasmide d'intérêt dans la glace pendant 10min. Le tube contenant le mélange est ensuite placé à 42°C pendant 45 secondes, puis immédiatement retransféré dans la glace pendant 10 minutes. On parle de choc thermique (heat shock), étape cruciale durant laquelle l'ADN plasmidique exogène est transformé ; puis 950µL de milieu LB stérile (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5g/L, pH 7 – Difco™ LB, Lennox) sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant une heure, étape importante durant laquelle la paroi se reconstitue et les gènes de résistance à l'antibiotique sont exprimés. Finalement, les bactéries sont étalées sur des boites de Pétri contenant du milieu LB agar (agar : 15g/L – Difco™ LB agar, Lennox) ainsi que l'antibiotique dont le plasmide d'intérêt possède le gène de résistance et placées à 37°C pendant la nuit.

L'ampicilline et la kanamycine sont utilisées aux concentrations finales de 100µg/mL et 50µg/mL respectivement.

Le second jour, une des colonies ayant poussée sur le milieu de culture est ensemencée dans 3mL de milieu LB possédant l'antibiotique durant 8 à 10 heures. On parle de préculture. Le soir, 1/1000 de cette préculture est utilisée pour ensemencer 150 mL de milieu LB contenant l'antibiotique et mis en culture à 37°C durant 14 à 16 heures.

La purification de l'ADN plasmidique est réalisée grâce au KIT Nucléobond Xtra Midi Plus® (Macherey-Nagel) et la lecture des concentrations d'ADN est effectuée au nanodrop.

B.2. Culture cellulaire : Passage des cellules HeLa, 293T et CEM-SS

Les cellules HeLa et 293T sont cultivées dans des flasques de de 75cm^2 dans du milieu DMEM, Glutamax (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) mis au point par Harry Eagle en 1959. Ce milieu contient des acides aminés (L-Thréonine, L-Glutamine), des sels (chlorure de potassium et sulfate de magnésium), des vitamines (acide folique, nicotinamide, riboflavine), du glucose et des suppléments organiques tels que du pyruvate. Il est supplémenté par du sérum de veau fœtal 10% ou SVF et 5 ml d'un mélange d'antibiotiques noté P/S pour pénicilline (100

UI/ml) et streptomycine (100 UI/ml). Le sérum permet d'apporter aux cellules les facteurs de croissance dont elles ont besoin pour proliférer et les antibiotiques servent à éviter les contaminations d'origine bactérienne.

La première étape consiste à éliminer le milieu de culture appauvri. Les cellules sont ensuite lavées avec 10mL de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline 10X : KH_2PO_4 1.44g/L, NaCl 9g/L, $NaHPO_4$ 7.95 g/L, pH 7.4) en faisant attention à ne pas verser directement sur les cellules afin de ne pas les décoller. Après élimination du PBS, 2 à 3mL de trypsine 1X, sont ajoutés. L'action de l'enzyme va permettre le décollement des cellules de la paroi plastique de la boite de culture. La flasque est alors placée à l'incubateur pendant 2 à 5 minutes à 37°C (température optimale d'action de la trypsine) dans une atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2. Après vérification au microscope optique de paillasse de la bonne action de l'enzyme, 7 à 8 mL de milieu DMEM, servant à inhiber l'action de la trypsine, par excès de substrat, sont ajoutés. Il est parfois nécessaire afin de forcer le décollement des cellules de « taper légèrement » les parois de la flasque. Les cellules sont ensuite récupérées par pipetage et placées dans un tube Falcon 15mL avant 5 minutes de centrifugation à 1100 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé, et le culot cellulaire est repris dans 10mL de milieu DMEM frais. Les cellules sont alors dénombrées à l'aide d'une cellule de Neubauer :

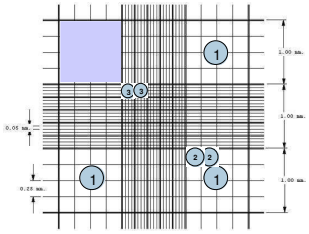

Figure 1 : Cellule de Neubauer
(D'après www.celeromics.com)

L'aire du carré noté 1 est de 1mm x 1mm = $1mm^2$ et le volume est de $1mm^2$ x 0,1 mm = 0,1 mm^3 = 1.10^{-4} ml.

On compte donc les cellules contenues dans 3 des carrés notés 1 (pour en faire la moyenne) et on applique la formule suivante :

$$\text{Concentration cellulaire} = \left(\frac{\text{cellules totales comptées}}{\text{nombre de carrés}}\right) * 10\,000$$

1 million de cellules sont alors placées dans une flasque de 75cm^2 qsp 20mL de milieu DMEM glutaMax (P/S+SVF). Les cellules sont finalement placées à 37°C sous atmosphère humide 95% et 5% CO_2.

Les cellules CEM-SS sont cultivées dans des flasques 75 cm^2 contenant du milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) complémenté par du SVF 10% et 5 ml de P/S (pénicilline et streptomycine à 100 UI/mL chacun). Le passage se fait 2 fois par semaine comme les cellules HeLa. Les cellules contenues dans la flasque sont récupérées et placées dans un tube Falcon de 50 ml afin de subir 10 min de centrifugation à 1100 rpm. Le culot cellulaire est alors repris dans 10 ml de PBS avant une nouvelle centrifugation (10 minutes à 1100 rpm). Le culot est finalement repris dans 10 mL de milieu RPMI 1640 et homogénéisé par aspiration-refoulement. Après comptage des cellules grâce à la cellule de Neubauer, 1 million de cellules sont mises dans une flasque de 75 cm^2 qsp 20 mL de milieu RPMI 1640 (SVF + P/S). Les cellules sont finalement placées à 37°C sous atmosphère humide 95% et 5% CO_2.

B.3. Transfection cellulaire

Les transfections de cellules HeLa et 293T sont réalisées à l'aide d'un Kit Polyplus contenant une solution de jetPEI^{TM} et une solution de 150 mM de NaCl. Le polyéthylène imine (JetPEI) est un agent polycationique qui se lie à l'ADN et permet le transport de celui-ci dans la cellule en quelques étapes. Pour cela, le polycation se fixe aux phosphates négatifs de l'ADN et l'englobe entièrement. Le complexe formé est globalement positif et va pouvoir se fixer aux polysaccharides de la membrane plasmique, qui sont négatifs. Une fois fixé à la membrane, le complexe est endocyté. De plus, le JetPEI possède des propriétés d'éponge à protons, captant les protons du lysosome lors de sa fusion avec l'endosome et inactivant ainsi les hydrolases acides pouvant dégrader l'ADN. Puis le complexe ADN-polycation quitte l'endosome, et se dirige vers le noyau pour être transcrits.

Les transfections des cellules HeLa sont réalisées dans des plaques 6 puits, 12 puits ou dans des boîtes Ibidi (BioValley) dans lesquelles, une quantité de cellule est déposée 1 jour avant la transfection proprement dite (tableau 4).

Si par la suite des observations microscopiques sont réalisées, quelques étapes sont nécessaires au préalable. En effet, des lamelles de verre rondes de 18mm de diamètre sont déposées au fond de chaque puits des boites 6 ou 12 puits (exception faite des boites Ibidi dont la surface de contact stérile est prétraitée pour améliorer l'adhérence cellulaire). Les lamelles sont ensuite stérilisées par ajout d'éthanol 70% pendant 5 minutes, puis des étapes de lavage se succèdent : 1 lavage au PBS 1X (1 x 2mL) et 2 lavages avec du milieu DMEM (2 x 2mL). La quantité cellulaire calculée en fonction du matériel utilisé est ensuite déposée et les cellules sont placées à 37°C (5% CO_2) pendant 24 heures.

Pour chaque échantillon à tester, deux tubes Eppendorf sont préparés selon une méthode spécifique détaillée dans le tableau 4:

		Nombre de cellules adhérentes à déposer	**Quantité d'ADN maximale (µg)**	**Volume d'ADN (µL)**	**Volume de NaCl (µL)**	**Volume de jetPEI® (µL)**
plaque 12 puits	tube 1	80 000 - 100 000	/	/	46	4
	tube 1'		2	**X**	50-**X**	/
plaques 6 puits ou boîte Ibidi	tube 1	200 000 - 300 000	/	/	94	6
	tube 1'		3	**Y**	100-**Y**	/

Tableau 4 : Nombre de cellules HeLa à déposer dans les puits et conditions d'utilisation du jetPEI® utilisées pour les transfections des cellules HeLa

Les volumes d'ADN plasmidiques (X et Y) sont calculés en fonction de la quantité d'ADN voulue et de la concentration des plasmides d'intérêt. Le volume de jetPEI® correspond au double de la quantité d'ADN souhaitée.

La préparation des deux tubes eppendorfs par expérience de transfection est réalisée de manière simultanée. Après une courte incubation de moins de 5 minutes de chaque tube, le contenu du

tube 1 est ajouté au contenu du tube 1' (et non l'inverse) et vortexé pendant 15 secondes. Le tube contenant l'ADN+JetPEI est incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Son contenu est ensuite déposé au goutte-à-goutte sur l'ensemble des cellules du puits ensemencées la veille. Après une brève agitation manuelle de la boite, les cellules sont replacées à 37°C (5% CO_2) et laissées à incuber le temps nécessaire à l'expérience (en général 24 heures pour les expériences d'imagerie et 48 heures pour les co-IP). Afin d'éviter une trop forte toxicité cellulaire du JetPEI, il est important de changer le milieu de culture 5 à 6 heures après la transfection par du milieu DMEM frais.

La transfection des siRNA a été réalisée en utilisant le Kit JetPrime™ Polyplus.

B.4. Fixation des cellules HeLa et CEM-SS au PFA (paraformaldéhyde)

Les cellules sont fixées dans le but de stabiliser les structures (antigènes) aussi proches que possible de leur aspect vivant, en rendant les molécules insolubles dans l'eau (réticulation) et en bloquant les systèmes enzymatiques pour éviter les modifications structurelles ultérieures de l'échantillon.

Le fixateur utilisé au laboratoire est un fixateur non coagulant : le paraformaldéhyde $(CH_2O)n$ (polymère insoluble de formaldéhyde appartenant au groupe des aldéhydes). Il réagit essentiellement avec les protéines et les acides aminés et permet la formation de ponts méthylène.

Cellules HeLa

La fixation des cellules est généralement effectuée 24h post-transfection, en plusieurs étapes. Après retrait du milieu DMEM, les puits contenant les cellules sont lavés 2 fois avec du PBS 1X (2 fois 1mL/puits). Puis, elles sont fixées avec 2 mL de PFA 4% pendant 10 min à température ambiante sous agitation et à l'obscurité. Trois lavages successifs de 5 minutes chacun avec 2 mL de PBS 1X sont ensuite réalisés.

Deux options sont alors possibles :

- Soit déposer les lamelles sur une lame de verre sur laquelle on met une goutte du milieu de montage (composé de DAPI-Fluoromount-G et de Fluoromount-G 50/50). Les lamelles doivent être en contact avec le milieu de montage au moins 16 heures. Ensuite, on peut procéder aux

observations microscopiques après avoir délicatement entouré de vernis la lamelle pour éviter les contaminations et autres mouvements durant les observations.

- Soit réaliser une immunofluorescence.

Cellules CEM-SS

Les cellules CEM-SS étant des cellules en suspension, la culture sur lamelle est impossible, il est donc nécessaire de centrifuger les cellules à 1000 rpm pendant 10 minutes entre chaque étape. Les étapes de lavages (au PBS x1) et de fixation à la PFA sont identiques à celles réalisées pour les cellules HeLa. Une fois la fixation terminée, deux options sont possibles quant à l'utilisation des cellules CEM-SS fixées :

- Soit au dernier lavage PBS, les cellules sont reprises dans un volume de 5 µL de PBS x1 puis déposées sur une goutte de milieu de montage déposée au préalable sur une lame de verre. Pour finaliser le montage, une lamelle de verre ronde de 18 mm de diamètre est délicatement déposée sur une lame. A l'instar des cellules HeLa, l'observation microscopique se fera au minimum 16 heures après la fixation après avoir scellé la lamelle de vernis.
- Soit réaliser une immunofluorescence.

B.5. Immunofluorescence des cellules HeLa et/ou CEM-SS

L'immunofluorescence permet l'observation des protéines exprimées (endogène ou surexprimée suite à la transfection par un plasmide) par la cellule au microscope confocal. La manipulation est identique dans les deux cas, à l'exception des centrifugations qui sont nécessaires entre chaque étapes dans le cas de cellules en suspension et de la manipulation réalisée dans des tubes eppendorf et non dans des puits.

Après les lavages au PBS x1 décris précédemment, les cellules sont perméabilisées avec 2 mL de Triton 0,2 % (dilué dans du PBS X1) pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées trois fois au PBS x1 avec un premier lavage de 5 minutes. Le blocage des sites aspécifiques se fait avec du BSA 2 % (Bovin Serum Albumin) à raison de 2 mL par puits (ou tube Eppendorf) pendant 1 heure sous agitation et à l'abri de la lumière. Après un lavage au PBS x1, 50 µl d'une solution de BSA 4% contenant

l'anticorps primaire dilué (Tableau 2A) est déposée sur du parafilm ou directement dans le tube Eppendorf pour les cellules CEM-SS. La lamelle sur laquelle sont adhérées les cellules HeLa est déposée délicatement sur la goutte d'anticorps dilué, les cellules en contact avec la solution. L'incubation dure 1 h à température ambiante et à l'obscurité (ou sous faible agitation sur la roue pour les cellules CEM-SS). Deux lavages successifs au PBS x1 sont ensuite réalisés. Les cellules sont alors mises en contact avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution de BSA 4% (Tableau 2B) de la même manière que pour l'anticorps primaire. L'incubation est de 40 minutes à l'abri de la lumière (ou sous agitation pour les cellules CEM-SS). Enfin, les cellules sont lavées au PBS x1 trois fois avant leurs placements sur le milieu de montage Fluoromount (SouthernBiotech).

B.6. Microscopie confocale

Les localisations cellulaires des protéines d'intérêt couplées à des fluorophores (eGFP, mCherry, Alexa Fluor, ReAsH) ont été visualisées à l'aide d'un microscope confocal ayant comme source lumineuse un laser.

Le rayon laser monochromatique excitateur est réfléchi par un miroir dichroïque permettant de réfléchir uniquement les longueurs d'ondes sélectionnées. Le rayon pénètre alors dans l'échantillon après avoir été focalisé par un objectif qui, dans notre cas, joue le rôle de condenseur. Le laser fournit de l'énergie aux fluorochromes lors de l'impact optique, ce qui leur permet ainsi de passer sur une couche électronique de plus forte énergie. Les fluorochromes reviendront ensuite naturellement à leur état fondamental, en émettant des rayons lumineux de plus faible énergie provenant des différents plans excités de la préparation. La longueur d'onde de cette lumière fluorescente émise étant supérieure à la longueur d'onde d'excitation, la lumière émise peut traverser le miroir dichroïque. Grâce à un diaphragme variable (« pinhole ») situé dans le plan focal de la lentille du tube optique, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Les rayons sont alors détectés par des photomultiplicateurs, qui vont convertir le signal photonique en signal numérique et l'amplifier. Une image est reconstituée par l'ordinateur, par recomposition des signaux reçus point par point. L'acquisition des images se fait informatiquement grâce au logiciel de Leica. Les images obtenues, une fois capturées, sont analysées à l'aide du logiciel commercial ImageJ.

Le microscope utilisé est le microscope confocal à balayage laser Leica TC SPE-II (objectif G 63X à immersion à huile).

B.7. FRET (Förster/fluorescence Resonance Energy Transfer)

Pour suivre l'interaction NCp7-RPL7 et Gag-RPL7, nous avons procédé à des mesures de FRET entre les deux chromophores utilisés. Il s'agit d'un processus non radiatif par lequel l'énergie d'un fluorophore donneur (eGFP) à l'état excité est transmise à un fluorophore accepteur (mCherry) à proximité immédiate.

Le FRET n'est possible que si le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur se chevauchent (Figure 2). Il faut également que le donneur et l'accepteur aient une orientation favorable et que la distance entre les deux soit inférieure à 10nm (distance de Förster). Si ces deux protéines se trouvent à moins de 10nm l'une de l'autre, un transfert d'énergie est observé entre les deux fluorophores. Cela se traduit par une diminution du temps de vie de l'eGFP et l'interaction entre les deux protéines marquées peut être déduite (Figure 2). En effet, la distance de Förster correspond à la distance à laquelle il est admis que deux protéines interagissent.

Il existe trois méthodes de mesures de FRET (par durée de vie de fluorescence (FLIM), par photoblanchiment de l'accepteur (acceptor photobleaching) et par mesures d'intensité de fluorescence). Pendant ma thèse, les mesures de FRET effectuées ont été visualisées par la technique de FLIM.

Le FLIM est une technique de microscopie permettant l'acquisition d'une image en fonction de la durée de vie du fluorophore. Cette technique a été utilisée lors de nos études pour mettre en évidence des interactions entre protéines en milieux cellulaires, sur des cellules HeLa vivantes.

En pratique, le fluorophore donneur est excité par un laser et son déclin de fluorescence est enregistré pour mesurer son temps de vie de fluorescence. La variation du temps de vie du donneur en présence de l'accepteur permet de calculer l'efficacité du transfert d'énergie grâce à l'équation :

$$E = 1 - \frac{\tau(ad)}{\tau(d)}$$

où $\tau(d)$ est le temps de vie du donneur seul et $\tau(ad)$ celui du donneur en présence de l'accepteur.

On considère que deux protéines interagissent pour un pourcentage de FRET supérieur à 5% et plus le pourcentage de FRET est grand, plus l'interaction est forte. Les mesures d'imagerie par durée de vie de fluorescence sont réalisées sur un microscope à balayage utilisant une excitation à deux photons. Ce système, développé au laboratoire (446,447), est composé d'un microscope à fluorescence inversé Olympus IX70 équipé d'un objectif à eau (60X, ouverture numérique = 1.2). Les fluorophores sont excités par un laser titane/saphir qui délivre des impulsions de 100fs et qui est accordable entre 700 et 950nm. La fluorescence émise par l'échantillon est enregistrée à l'aide d'un photo-détecteur couplé à un système TCSPC (carte de comptage de photon corrélé en temps). Ce système permet d'obtenir des images où le contraste est donné par le temps de vie de fluorescence de l'eGFP ainsi que des images en intensité. Les données brutes sont analysées à l'aide d'un logiciel commercial (SPC image) permettant de déduire, pour chaque pixel ou groupe de pixel de l'image, les temps de vie associés aux déclins de fluorescence. On peut donc, à l'aide d'une échelle traduisant les temps de vie de fluorescence en couleur (bleu au rouge), reconstituer une image en temps de vie de la cellule observée et ainsi, déterminer s'il y a interaction entre deux protéines ou non. En cas d'interaction, on observera un changement de couleur de la cellule passant du jaune (eGFP seule) au bleu.

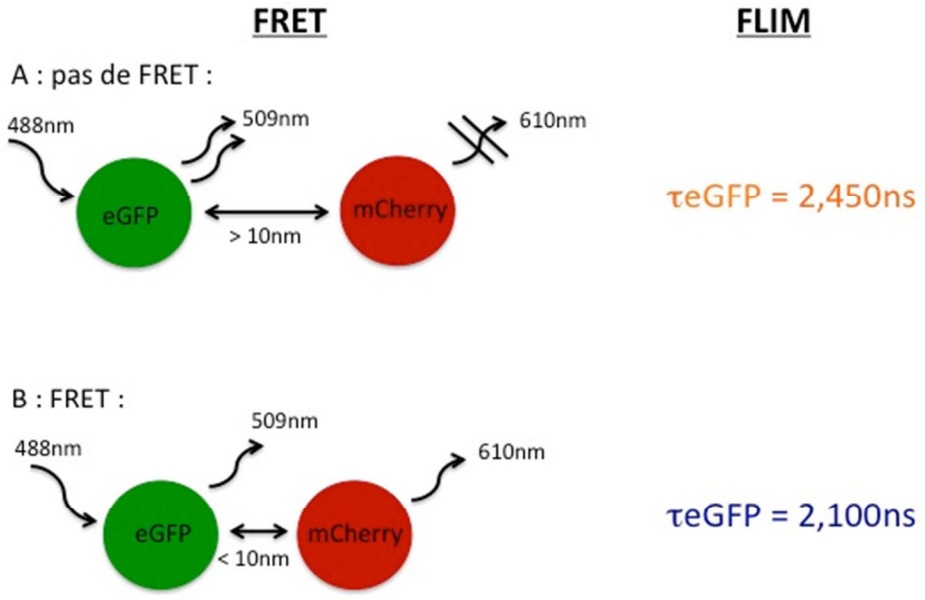

Figure 2 : Principe de la technique FRET-FLIM

B.8. Dosage des protéines

La méthode de dosage de Bradford est une analyse spectroscopique permettant de mesurer la concentration de protéines en solution par dosage colorimétrique. En effet, le bleu de Coomassie G250 change d'absorbance lors de son interaction avec les acides aminés basiques (l'arginine en particulier) ou aromatiques des protéines.

La solution de Bradford est obtenue par mélange de 1mL de solution « Biorad Protein Assay» avec 4mL d'eau milliQ. 200µl de cette solution de bleu de Coomassie est ensuite déposée dans les puits d'une plaque 96 puits (200ul/puits). Afin d'établir une gamme étalon, une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) est diluée au dixième dans du tampon Tris et un volume croissant de BSA est ensuite déposé dans les puits d'une plaque 96 puits (Figure 3). Parallèlement, les solutions contenant les protéines (lysat cellulaire) sont aussi diluées au 1/20e dans du tampon Tris et 10µL de cette solution protéique sont alors déposés (Figure 3).

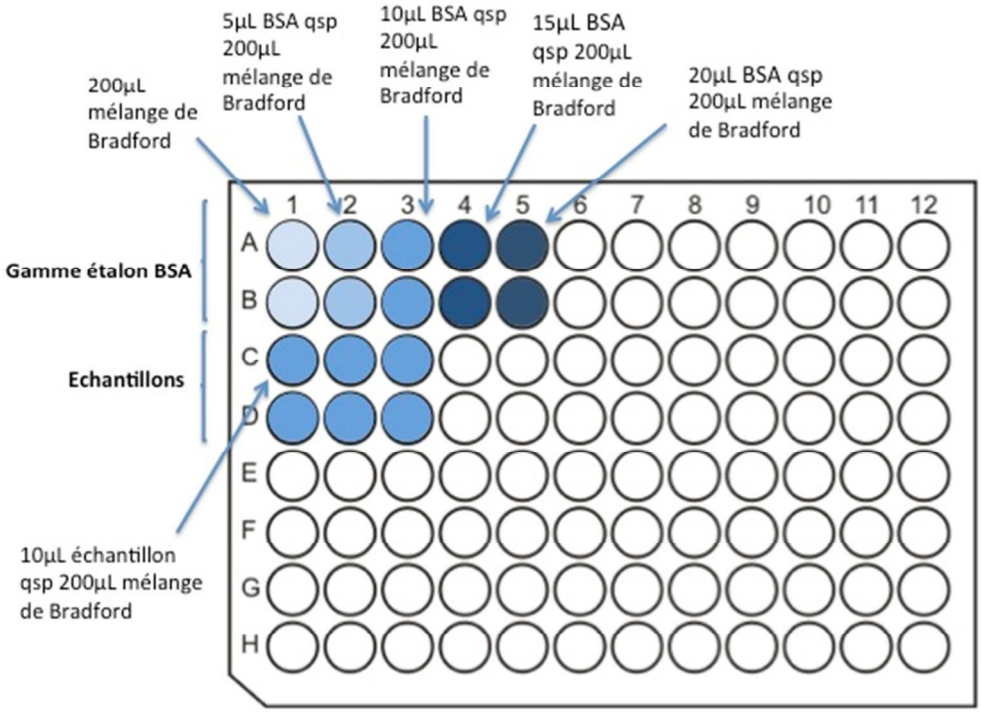

Figure 3 : Plaque 96 puits pour un dosage de Bradford, exemple de 3 échantillons
L'absorbance à 595nm est obtenue grâce au spectrofluorimètre SAFAS FLX-Xenius. Les densités optiques ainsi obtenues permettent de calculer la concentration protéique des échantillons et ainsi de déterminer le volume de proteines à prélever pour la suite de l'expérience de co-IP.

B.9. Co-immunoprécipitation

Pour un même échantillon, 3 puits d'une plaque 6 puits ont été transfectées. 48 heures post-transfection, le milieu DMEM est retiré des puits par une pompe à eau. Ensuite, les cellules sont rincées avec 1 mL de PBS 1X, trypsinées par l'ajout de 1 mL de trypsine (1X) et incubées à 37°C pendant 2 à 3 minutes. Puis, 2 mL du milieu DMEM sont ajoutés et le volume total des 3 puits, correspondant au même échantillon, est transféré dans un même tube falcon de 15 mL. Les cellules récupérées sont centrifugées à 14000 rpm pendant 3 min. Puis, le surnageant est aspiré et le culot est lysé par l'ajout de 1mL de tampon de lyse par échantillon (Tris HCL 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP40 1%, 0.05% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) pendant 30 minutes à 4°C qui sera ensuite transféré dans des tubes Eppendorf et centrifugé 10 minutes à 4°C à 14000 rpm. Le surnageant est récupéré puis la quantité de protéines totales est dosée par la méthode de Bradford. Le surnageant sera divisé en deux parties (selon Figure 4) : 20µg de protéines sont utilisées en 'input' et 1mg de protéines totales vont servir pour l'immunoprécipitation (IP).

'L'input' permet de vérifier si les protéines d'intérêts sont bien présentes dans le lysat avant l'immunoprécipitation. Les protéines de 'l'input' sont directement dénaturées durant 5 min à 95°C dans une solution de Laemmli 1X (Tris-HCL 250 mM, glycérol 100%, SDS 20%, bleu de bromophénol 5 mg) contenant 100 mM de DTT.

Les protéines de l'IP sont incubées avec 1 µg de l'anticorps d'intérêt (anti-p24 Gag, anti-eGFP ou anti-Flag) et agitées pendant 2 heures sur une roue à 4°C. Parallèlement, des billes magnétiques (50µl par échantillon) recouvertes de protéines A (dynabeads) sont lavées au PBS 1X (700µl), puis équilibrées par deux lavages successifs dans du tampon NP40 (précédemment décrit). Afin de séparer les billes des solutions de lavage, les tubes sont placés sur un portoir aimanté. Les billes ainsi préparées sont incubées avec les tubes IP puis placées sous agitation sur la roue à 4°C pendant une heure. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec 500 µl de tampon de lyse NP40 puis reprises dans 50µl d'une solution composée de Laemmli et de DTT (32.5 µL d'H2O, 5µL DTT, 12.5µL Laemmli 4X) et dénaturées 5 minutes à 95°C. Leur stockage se fait à -20°C avant leur analyse par western blot (Figure 4).

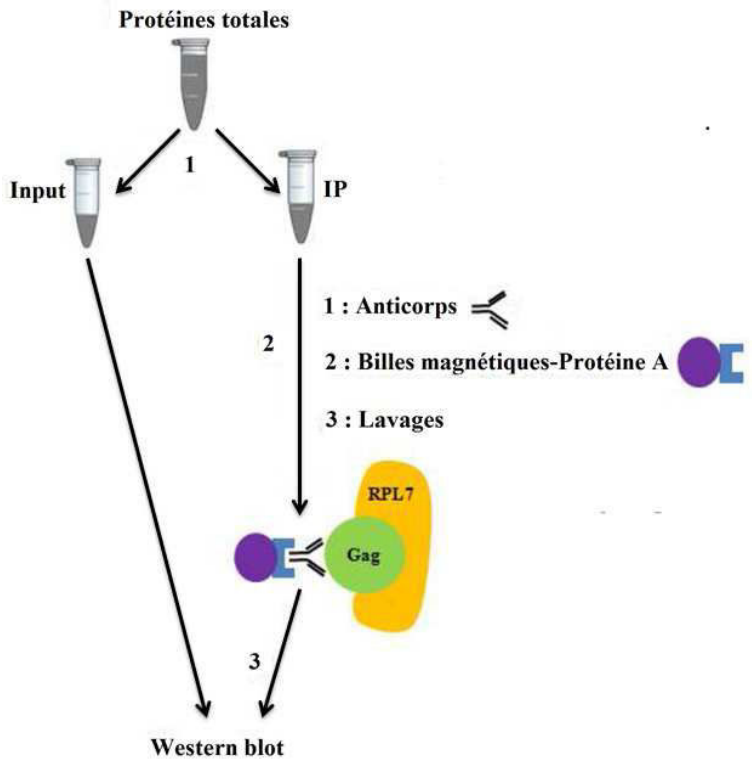

Figure 4 : Principe de la co-immunoprécipitation

B.10. Western blot

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8% ou 12% (en fonction de la taille des protéines à révéler) dans un tampon de migration (15,14 g de Tris, 72,05 g de glycine, SDS 20%, pH 8,8, dilué au dixième, qsp 500 mL eau milliQ). Les échantillons sont chargés dans les puits du gel (stacking gel) puis séparés (separating gel) en fonction de leur masse moléculaire en appliquant un courant de 110 volts (0,05 A) pendant deux heures. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene fluoride) préalablement activée au méthanol. Le transfert se fait en milieu liquide (15,14 g de Tris, 72,05 g de glycine dilué au dixième avec 20% d'éthanol, qsp 500 mL eau milliQ), dans la glace et sous une intensité de 80 volts pendant deux heures sous agitation. La membrane récupérée est placée une heure dans un tube Falcon 50 contenant 10 mL d'une solution de TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween 20 0,05%) contenant 3% de caséine (Biorad). Cette étape de blocage permet de saturer la membrane. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans le même tampon (la dilution dépend de l'anticorps utilisé) pendant une nuit à 4°C ou pendant une heure à

température ambiante (Tableau 2A). Puis la membrane est lavée 3×10 minutes avec 10 mL de TBS-T et incubée une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (horseradish peroxydase) (Tableau 2B). Pour la révélation, deux tubes Falcon 50 sont préparés, le tube A contenant 17 µL d'acide coumarique (90 mM), 40 µL de luminol (250 mM), 400 µL de Tris 1 M, pH 8,5 et 3,5 mL d'eau et le tube B contentant 2,5 µL de peroxyde d'hydrogène, 400 µL de Tris 1 M, pH 8,5 et 3,6 mL d'eau. Ces deux tubes sont mélangés et la solution est déposée sur la membrane pendant une minute et ensuite éliminée. La membrane est placée dans une cassette et la révélation se fait en chambre noire ou à l'aide de la caméra las4000-GE Healthcare sans avoir besoin de la cassette. La peroxydase catalyse l'oxydation du luminol en présence d'H_2O_2. Le luminol retourne à son état réduit en émettant des photons (chimioluminescence) qui impriment un film photographique. Ce film est ensuite révélé, lavé puis fixé, toujours dans la chambre noire (produits Kodak), avant d'être séché et analysé. La membrane peut être réutilisée pour détecter d'autres protéines : après trois lavages de 10 min chacun avec du TBS-T, elle est déshybridée avec 10 mL d'une solution 'restore plus western blot stripping buffer' (ThermoScientific) pendant 15 min à température ambiante et sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3×10 min dans du TBS-T et placée sous agitation. Puis, les étapes de blocage et d'incubation avec les solutions contenant les anticorps primaire et secondaire sont renouvelées comme décrit précédemment.

B.11. Cytométrie en flux (FACS)

Des études de FACS (fluorescence activated cell sorting) sur des cellules exprimant Flag-RPL7, ou transfectées avec des siRNA dirigés contre la RPL7 ont été réalisées, afin de vérifier si la surexpression ou la sous-expression de la RPL7 induit l'apoptose dans des cellules 293T.

Au cours du processus de l'apoptose les phosphatidyl sérines (PS), orientées dans des cellules saines majoritairement du côté intra-cytoplasmique, procèdent à un mouvement dit « flip flop ». Elles se trouvent alors orientées vers le côté extracellulaire et ce phénomène permet de mesurer les cellules apoptotiques à l'aide du test à l'annexin-V. En effet, l'annexin-V est capable de reconnaître la PS externalisée dans le processus d'apoptose. Ainsi, toutes les cellules présentant une fluorescence verte, due à la reconnaissance de la PS par l'annexin V conjugué au

fluorochrome FITC seront des cellules apoptotiques. Dans les étapes tardives de l'apoptose ou lors de la nécrose, la membrane cellulaire devient perméable. Cette perméabilité membranaire permet à l'iodure de propidium (PI) d'accéder au noyau et le coloré en rouge.

Ainsi, les cellules 293T transfectées avec la Flag-RPL7 et les siRNA sont lavées avec du PBS puis récoltées dans des tubes Falcon 15 mL. 10^6 cellules/mL sont resuspendues avec 100 µL du tampon Annexin V (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$) et puis transférées dans des tubes de culture de 5 mL. 5 µL d'annexine V et 5µL de PI sont ajoutées aux cellules. Ensuite, les cellules sont vortexées et incubées pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. Puis, 400 µL d'annexine V sont rajoutées aux cellules. Après, ces cellules sont analysées par cytométrie en flux en utilisant l'analyseur BD FACS Calibur par l'aide de M.Claudine Ebel de la plateforme de l'IGBMC.

B.12. Double hybride

Le double hybride est un système d'étude *in vivo* des interactions protéine-protéine. Il est basé sur la capacité du facteur de transcription de la levure Gal4 à être séparé en deux domaines de repliement indépendants. Lors de ce test, les deux protéines d'intérêt X et Y sont fusionnées aux deux sous-domaines de Gal4 (domaine d'activation et domaine de liaison à l'ADN) et ciblées dans le noyau de la levure. Si X et Y interagissent, le facteur de transcription Gal4 est reconstitué et l'activation d'un gène rapporteur placé sous contôle de Gal4 sera observée. A l'inverse, si les protéines n'interagissent pas, le facteur de transcripion sera inactif et le gène rapporteur ne sera pas transcrit (Figure 5). Dans notre cas, le gène rapporteur est celui de l'histidine.

Nous avons utilisé la technique de double-hybride chez la levure pour étudier l'interaction entre Gag-RPL7 et la NCp7-RPL7. Pour cela, les gènes codant RPL7, Gag et la NCp7 ont été clonés dans les deux vecteurs pActII (codant le domaine d'activation à Gal4) et pGBKT7 (codant le domaine de liaison à l'ADN de Gal4).

Les constructions pActII ont été transformées par la méthode de Li/Ac dans des levures *Saccharomyces Cerevisiae* de souche AH109 (Mat a trp1–901 leu2–3, 112 ura3–52 his3–200 gal4D gal80DLYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3 MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ) et les constructions pGBKT7 dans les levures de

souches YGHX13 (MaTα Gal4Δ Gal80Δ ade2-101::KanR, his3, leu2-3-112, trp1-901, ura3-52 URA3::UASGAL1-LacZ, Met).

Les simples transformants ont été sélectionnés pour leur auxotrophie pour la Leucine (ActII) ou le tryptophane (GBKT7). Les diploïdes obtenues après le croisement des simples transformant ont été sélectionnés sur un milieu minimal sans Leucine ni Tryptophane (6,7 g nitrogen base sans acides aminés, 20g D-Glucose, 0,15g Drop Out (sigma) qsp 1 litre).

Un clone de chaque diploïde a été prélevé et déposé sur un milieu –Leu/-Trp/-His pour sélectionner les positifs.

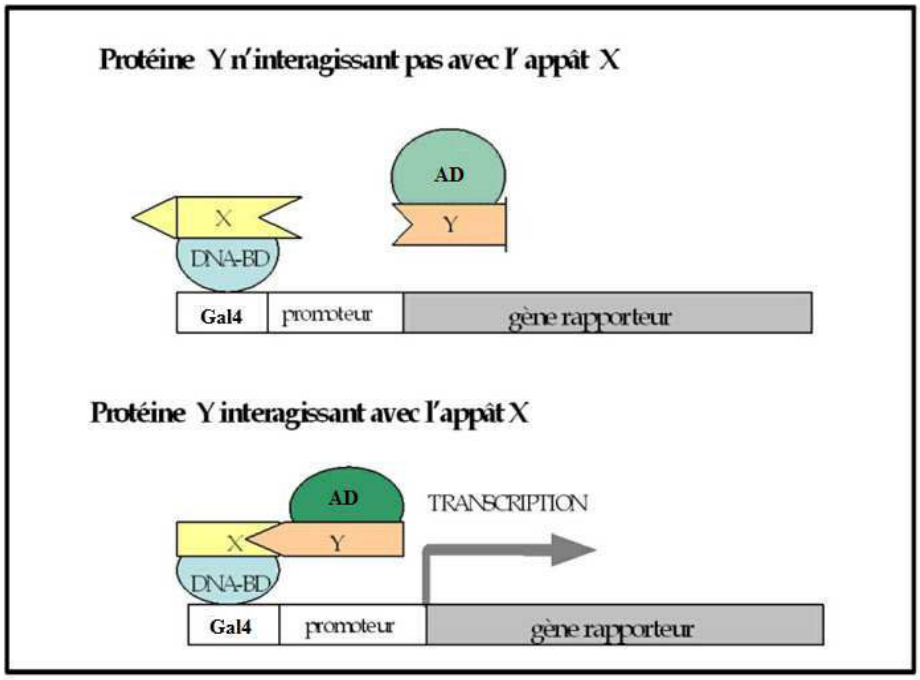

Figure 5 : Principe du système de double-hybride en levure *Saccharomyces Cerevisiae*

B.13. Clonage Gateway

Pour effectuer les mutants de délétions de la RPL7, j'ai utilisé le clonage Gateway dont je décris le principe ci-dessous. Les amorces utilisées dans ce clonage sont représentés dans le tableau 3B.

La technique Gateway est une méthode de clonage universelle, rapide et hautement efficace permettant de transférer des fragments d'ADN dans des vecteurs multiples. Cette technologie utilise le système de recombinaison du phage lambda pour faciliter le transfert, entre vecteurs, de

séquences d'ADN hétérologues flanquées des sites att modifiés. Le système est basé sur deux réactions de recombinaison. Tout d'abord, la réaction BP permet la recombinaison d'un substrat flanqué de séquences attB (produit de PCR flanqué des séquences attB) avec un vecteur donneur flanqué des séquences attP (Figure 6), ce qui génère un clone d'entrée flanqué des sites attL. Cette réaction est catalysée par la BP Clonase™ enzyme mix (composée d'intégrase Int et de facteur d'intégration IHF). Une fraction de cette réaction est directement utilisée pour transformer des bactéries DH5 α. La sélection se fait par 2 mécanismes : le gène ccdB (dont le produit est toxique pour la bactérie) permet d'effectuer une sélection négative, et le gène de résistance à un antibiotique permet, lui, d'effectuer une sélection positive. Les clones positifs, vérifiés par séquençage, sont utilisés pour la seconde réaction de recombinaison : la réaction LR (Figure 6). Elle permet la recombinaison d'un substrat flanqué des séquences attL (vecteur donneur) avec un vecteur de destination flanqué des séquences attR. Cette réaction catalysée par la LR Clonase™ (composée d'intégrase Int, d'excisionase Xis et de facteur d'intégration IHF) L'avantage principal de cette technique est qu'une séquence ADN peut être clonée dans des vecteurs multiples adaptés à des systèmes aussi divers que les bactéries, les cellules de mammifères ou encore les cellules de plantes, sans passer par des étapes de digestion - ligation.

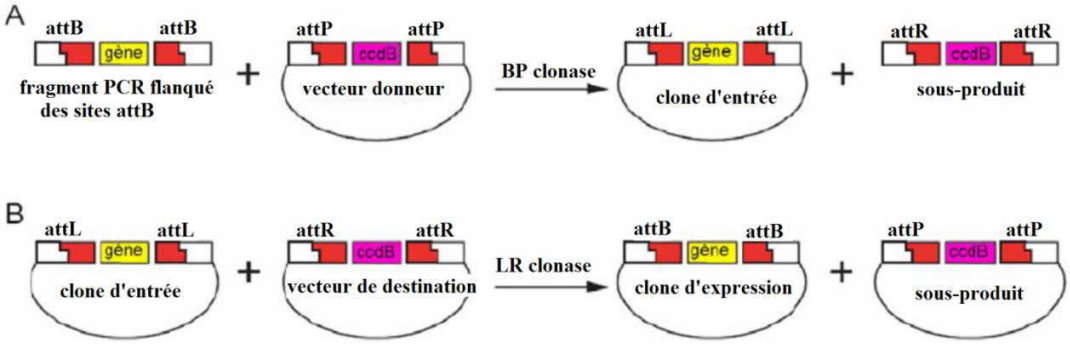

Figure 6 : Schéma des deux étapes nécessaire au clonage GATEWAY®

B.14. Mutagenèse

Pour effectuer la mutation GagRAPAAA, j'ai utilisé le protocol du « Site-Directed Mutagenesis Kit » qui consiste en 3 étapes :

-La première étape consiste en une réaction de PCR (Voir tableau 5) pour l'amplification du plasmide à muter avec des amorces phosphorylés dont leur design se fait comme le montre la figure 7.

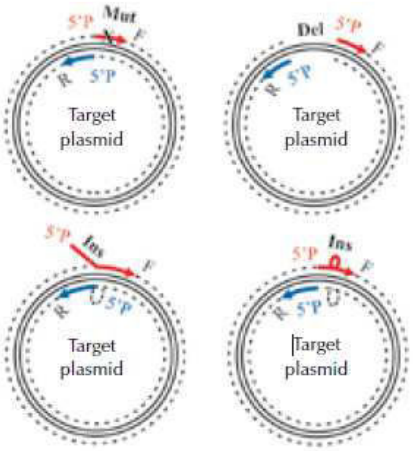

Figure 7 : Représentation schématique de différentes mutations

Composant	Volume finale de la réaction 50µL	Concentration finale
H_2O	Qsp 50µL	
Tampon 5x Phusion HF	10µL	1x
10Mm dNTPs	1µL	200µM chacun
Amorce A	2.5 µL	10µM
Amorce B	2.5 µL	10µM
ADN à muter	x µL	1 ng
ADN polymérase Phusion Hot Start (2U/µL)	0.5µL	0.02 U/µL

Tableau 5: Réaction de la mutagenèse

L'amplification est réalisée grâce à un thermocycleur avec le programme suivant : 1 cycle de 10 min à 98°C, 30 cycles d'une élongation de 4 min/cycle à 72°C, suivi d'un dernier cycle de 10 min à 72°C. Les séquences des amorces utilisées sont données dans le Tableau 3A.

-Une étape de circularisation du produit de PCR avec l'ADN ligase Quick T4.

-Transformation de l'ADN circularisé dans des bactéries ultracompétentes (NEB), puis vérification de la mutation par séquençage du plasmide.

Résultats

La recherche des partenaires cellulaires de Gag et de la NCp7 a été initiée en collaboration avec le docteur Richard Benarous (Société Cellvir, Paris), en criblant par double-hybride en levure une banque d'ADN complémentaires humains construite à partir d'ARN messagers isolés de la lignée lymphocytaire CEM (448,449). Ce criblage a permis d'identifier plusieurs protéines capables d'interagir avec la protéine Gag et la NCp7 mature (voir tableau 1).

Parmi les différentes protéines identifiées, nous nous sommes focalisés sur la protéine ribosomique L7 (RPL7). En effet, cette protéine, qui appartient à la sous-unité 60S du ribosome, a la capacité d'inhiber la traduction de plusieurs ARN messagers (438,450). Elle pourrait donc être un bon candidat pour expliquer l'arrêt de la traduction de l'ARN viral au profit de son encapsidation (Voir paragraphe ci-dessus).

Lors du crible en double hybride, 3 clones indépendants codants une région partielle de RPL7 (protéine ribosomique, [68-248] ont été obtenue lors de l'utilisation de NCp7 comme appât. Ce résultat est renforcé par l'obtention de cinq clones indépendants codant la forme complète de RPL7 [~8-248] lorsque la protéine Gag est utilisée comme appât Ces résultats suggèrent que la région correspondante à la NCp7 dans le précurseur Gag est le site de liaison à la RPL7. D'autres proies communes aux 2 appâts sont également identifiées i) une autre protéine ribosomique (RPL23A) mais dont le score est inférieur, ii) des protéines impliquées dans l'épissage et transport des pré-ARNm (hnRNPA2/B1, hnRNPM), iii) d'une ubiquitine hydrolase (BAP1) et enfin iv) une chaperonne de protéines (RanBP9) qui interagit directement avec l'ARN génomique et favorise son export du noyau vers le MTOC (451). De plus, cette approche de double-hybride a directement permis la découverte de nombreux partenaires cellulaires des protéines rétrovirales tels que β-cop, TIP47, LEDGF, l'UNG … (252,452-456).

	NCp7	Gag
	Nombre de clones indépendants	Nombre de clones indépendants
RPL7	3	5
hNRNPA2/B1	2	5
hNRPM	2	3
RPL23A	3	1
BAP1	10	1
RanBP9	4	2

Tableau 1 : Proies trouvées par la technique du double-hybride en utilisant la NCp7 (orange) ou Gag comme appât (bleu).
Ce tableau a été obtenu par la société Hybrigenics, il tient compte de la banque utilisée, de l'organisme et des résultats de criblage, ainsi que du nombre des ADNc indépendants retrouvés dans le même criblage.

Afin de confirmer les résultats du crible en haut débit, nous avons réalisé un test double- hybride deux à deux chez la levure. Pour cela, les gènes codant RPL7, Gag et NCp7 ont été clonés dans les vecteurs pActII (domaine d'activation de Gal4) et pGBKT7 (domaine de liaison à l'ADN de Gal4) (Voir matériels et méthodes). Chaque construction a été transformée individuellement dans 2 souches de levures (AH109 pour ActII et YGHX13 pour pGBKT7). Après croisement des levures, les diploïdes ont été sélectionnés sur milieu dépourvu de leucine et de tryptophane et après repiquage les clones positifs pour l'interaction ont été sélectionnés pour leur capacité à induire une auxotrophie sur milieu dépourvu de leucine, tryptophane et histidine. Les résultats ont montré que la RPL7 fusionnée au domaine d'activation de Gal4 interagit avec NCp7 et Gag (Voir figure 1). Cependant, aucune interaction n'est observée lorsque RPL7 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, ceci peut être expliqué par la toxicité observée pour la levure lors de la surexpression des protéines de fusion de NCp7 et Gag au domaine d'activation de Gal4.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont donc pour but d'aboutir à une caractérisation de l'interaction des complexes Gag-RPL7, et de déterminer la fonction de cette interaction dans le cycle réplicatif du virus VIH-1.

De ce fait, par l'utilisation de la technique de co-immunoprécipitation et d'imagerie (FRET-FLIM), nous avons voulu **confirmer l'interaction entre Gag(NCp7) et la RPL7 en milieu**

cellulaire ainsi que dans un contexte viral et identifier les domaines protéiques des deux partenaires réellement impliqués dans leur interaction. Dans un deuxième temps, nous avons initié des travaux afin de comprendre le **rôle de cette interaction dans le cycle viral** en surexprimant ou sous-exprimant la RPL7 dans des cellules 293T infectées et en déterminant les différents paramètres de la production virale.

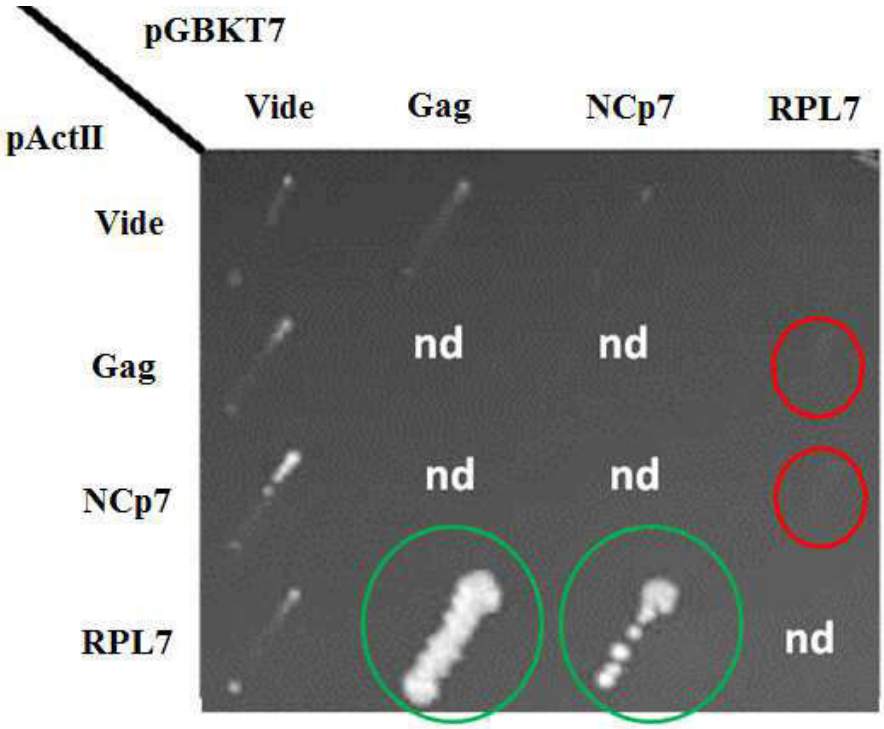

Figure 1 : Résultats du double-hybride deux à deux chez la levure pour l'interaction Gag-RPL7 et NCp7- RPL7 Les cercles verts montrent une interaction entre Gag et la RPL7 et entre NCp7 et la RPL7. Les cercles rouges indiquent l'absence de l'interaction entre Gag-RPL7 et NCp7-RPL7 dans le cas ou RPL7 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4.Ceux-ci se traduisant par la croissance des levures sur un milieu –Leu/-Trp/-His. La croissance des levures est maintenue à 30 °C pendant 4 jours. (n.d) signifie non déterminé.

Enfin, sachant que Gag et la RPL7 jouent un rôle dans la régulation de la traduction, il a été important de **déterminer le lieu de l'interaction et de localiser les différents partenaires dans les compartiments de la cellule**.

I. Interaction de la protéine virale Gag du VIH-1 avec la protéine ribosomique RPL7 suivie par co-immunoprécipitation

I.1 Gag est-elle capable de co-immunoprécipiter la RPL7 endogène ?

Les résultats déjà obtenus par double-hybride ont montré l'interaction Gag(NCp7)/RPL7. Cette technique seule n'est pas suffisante pour fournir la preuve d'une réelle interaction dans un contexte cellulaire dû à la présence de faux positifs ou de faux négatifs et doit être confirmée par une autre approche biochimique.

Pour cela, nous avons utilisé la technique de co-immunoprécipitation (Voir matériels et méthodes). Cette technique consiste à mettre en contact un surnageant cellulaire contenant les protéines cellulaires et d'intérêts (Gag) et un anticorps dirigé contre la protéine à immunoprécipiter. Puis, ce mélange est incubé avec des billes substituées par des protéines A. Dans cette expérience, nous avons utilisé comme contrôle négatif, des cellules HeLa non transfectées (NT), des cellules transfectées par un plasmide exprimant l'eGFP, et des cellules transfectées avec la protéine virale incubées avec des billes-protéine A sans avoir rajouté l'anti-Gag p24 (Figure 2).

Nous avons dans un premier temps vérifié que la protéine Gag reconnaissait l'isotype $IgG_{2\beta}$ de l'anti-Gag dirigé contre la p24 qui est notre anti-Gag p24 utilisé dans la suite du manuscrit (457,458) (non montré).

Dans la figure 1 ci-dessous, la partie 'Input' correspond à une analyse par western blot des protéines contenues dans le lysat cellulaire (avant ajout de l'anticorps et des billes). Cela permet de vérifier l'expression de la protéine virale produite après transfection et de confirmer la présence de la protéine cellulaire endogène. Dans cette figure, la membrane (a) incubée avec un anticorps anti-Gag p24, montre la présence d'une bande à 55 kDa uniquement dans le puits 3 correspondant à la protéine Gag. Cette même membrane est révélée par un anticorps anti-RPL7 (membrane b, puits 1, 2,3). Le signal montre la présence de la protéine endogène à une taille de 27 kDa. Cette protéine étant une protéine cellulaire endogène, elle est détectée dans les trois échantillons.

La membrane a' correspond à l'immunoprécipitation de la protéine Gag par les billes saturées en anti-Gag p24. Cette membrane révélée par un anti-Gag p24 montre que la protéine virale a bien

été immunoprécipitée via son propre anticorps sur des billes couplées à la protéine A (puits 6a'). Cette même membrane est ensuite révélée par un anti-RPL7 (membrane b'). Comme le montre le signal obtenu, la présence simultanée des deux protéines dans le même puits 6 prouve que la protéine Gag a co-immunoprécipité la protéine endogène RPL7. Aucune autre bande n'a été détectée démontrant la spécificité de la co-IP.

Ce premier résultat confirme l'interaction Gag-RPL7 obtenue précédemment par le test de double-hybride.

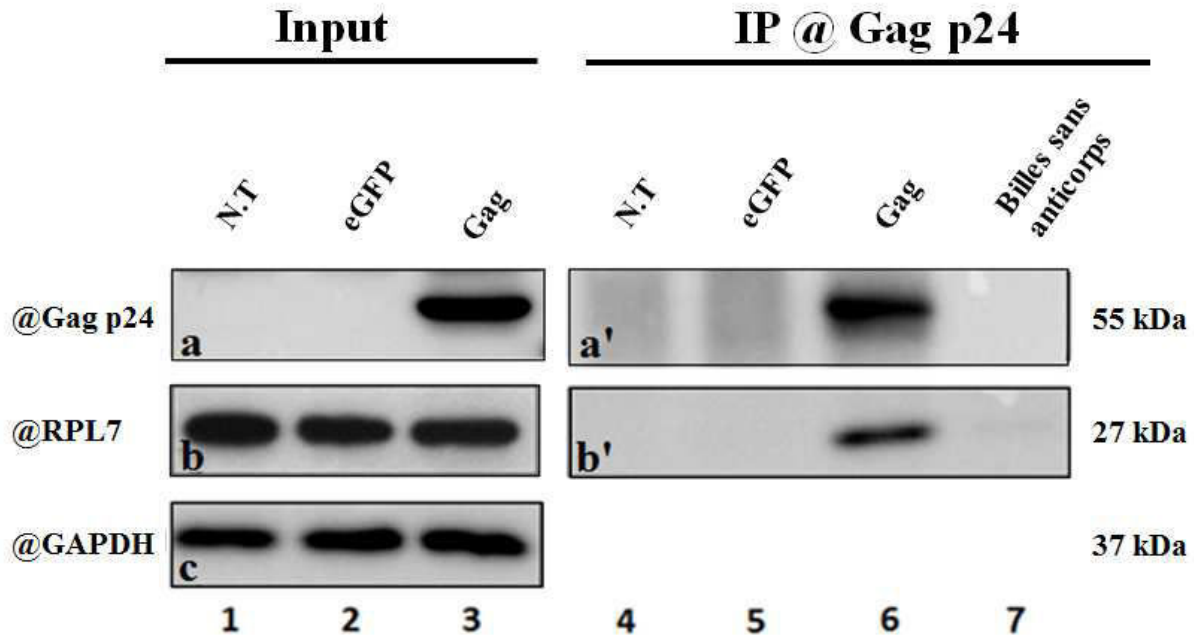

Figure 2 : Co-immunoprécipitation de la RPL7 par la protéine Gag.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2 µg de plasmides codant Gag et, 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites, dosées et incubées avec des billes-protéine A et l'anticorps anti-Gag p24. Puits 1 et 4 : cellules non transfectées. Puits 2 et 5 : cellules transfectées avec de l'eGFP. Puits 3 et 6 : cellules transfectées avec Gag, Puits 7 : cellules non transfectées incubées avec des billes sans anticorps.
'Input' : protéines totales avant immunoprécipitation révélées par un anti-Gag p24 (membrane a) ou par un anti-RPL7 (membrane b). Un anticorps dirigé contre la GAPDH (c) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits. IP : protéines après immunoprécipitation de Gag et révélation par un anti-Gag p24 (membrane a') ou par un anti-RPL7 (membrane b'). La présence des deux protéines Gag et RPL7 dans le même puits 6 montre une co-immunoprécipitation de la RPL7 par la protéine Gag.

I.2 L'interaction Gag-RPL7 est-elle aussi valide en immunoprécipitant la RPL7 ?

Nous avons voulu valider l'interaction Gag-RPL7 mais cette fois-ci en capturant la RPL7 endogène par son anticorps et en révélant la membrane par un anti-Gag p24. Malheureusement, nous n'avons pas observé d'immunoprécipitation de la RPL7 suggérant que l'anticorps anti-RPL7 n'était pas capable de reconnaître la RPL7 (non montré). Notre hypothèse pour expliquer ce défaut d'immunoprécipitation serait que la séquence 200-248 reconnu par l'anticorps chevauche la région identifiée par double-hybride comme interagissant avec Gag. Une autre possibilité serait que l'anti-RPL7 soit incapable de reconnaitre la forme native de la protéine. En effet, ce même anticorps reconnait très bien la RPL7 mais dans des conditions dénaturantes en western blot.

Pour surmonter ce problème, la RPL7 a été fusionnée à une étiquette Flag N-terminale (12 acides aminés). Après transfection de ce plasmide, l'expérience d'immunoprécipitation a été répétée en immobilisant la Flag-RPL7 par un anti-Flag et en détectant la présence ou non de la protéine Gag-eGFP. Comme le montre la figure 3, membrane a' et b', nous avons pu détecter la présence simultanée de Gag-eGFP et de la Flag-RPL7 dans le puits 6.

Ainsi, l'interaction Gag-RPL7 ne dépend pas des conditions d'immobilisation des différents partenaires.

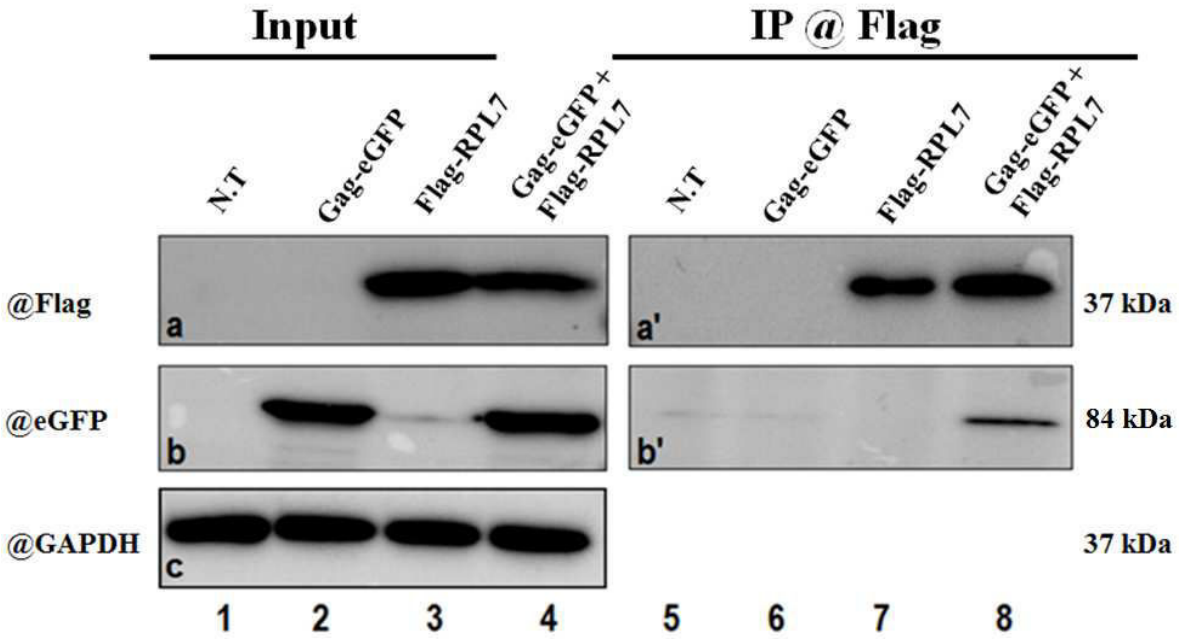

Figure 3 : Co-immunoprécipitations de la protéine Gag par la RPL7.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant Flag-RPL7 et Gag-eGFP. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-Flag. Puits 1 et 5 : cellules non transfectées. Puits 2 et 6 : cellules transfectées avec Gag-eGFP. Puits 3 et 7 : cellules transfectées avec Flag-RPL7. Puits 4 et 8 : cellules co-transfectées avec Gag-eGFP et Flag-RPL7.
La membrane est incubée avec un anti-Flag (a-a'), un anti-eGFP (b-b'). 'Input' : membrane (a) montrant l'expression de la Flag-RPL7 (puits 3 et 4) ; membrane (b) montrant l'expression de Gag-eGFP (puits 2, 4). IP-coIP : co-immunoprécipitation de la RPL7 et Gag (a'-b'puits 8). Un anticorps dirigé contre la GAPDH (c) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits.

I.3 L'interaction Gag-RPL7 dépend elle des acides nucléiques ?

Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer si cette interaction Gag-RPL7 dépendait de la présence d'un acide nucléique. En effet, lors de la formation de la particule virale, la protéine Gag polymérise sur une plateforme nucléique grâce à une interaction entre le domaine NCp7-acides nucléiques qui peuvent être d'origine viral ou cellulaire (323,459). Des études précédentes, ont montré que cette plateforme nucléique est aussi nécessaire pour que Gag puisse interagir avec APOBEC (460) ou avec EF1α (421) et plus récemmment avec ALIX (461).

Parallèlement, la RPL7 lie les ARN avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, qu'ils soient ribosomiques ou messagers (462). Ceci montre que les 2 protéines Gag et RPL7 interagissent avec les ARN, ce qui nous inciterait à penser que l'interaction Gag-RPL7 puisse être due à la présence de la plateforme nucléique. Pour tester cette hypothèse, nous avons vérifié si cette interaction est toujours valide en absence de l'ARN. La même expérience de co-

immunoprécipitation a donc été répétée mais en quadruplant l'échantillon correspondant aux cellules transfectées avec Gag. Ensuite, deux échantillons traités et non traités avec la RNase A (100µg/mL) ont été incubés avec l'anticorps anti-Gag p24 (Figure 4) ; les deux autres échantillons, eux aussi traités et non traités avec la RNAse A, ont en parallèle été soumis à une extraction de l'ARN par le Kit « Tri Reagent Protocol, Sigma-aldrich ». Les acides nucléiques purifiés ont été quantifiés au nanodrop et les ARN ont été ensuite visualisés sur gel d'agarose grâce au bromure d'éthidium.

Les fractions obtenues après immunoprécipitation sont révélées par un anti-Gag p24 (Figure 4a). Elles montrent que la même quantité de Gag a été immunoprécipitée (puits 7 et 8). Puis la membrane a été révélée avec un anti-RPL7. Comme le montrent les puits 7 et 8 de la figure 4b, nous avons constaté que le traitement par la RNAse provoque, de manière reproductible, une détection plus importante de la RPL7 (Figure 4b, puits 8). Nous avons montré que cette augmentation n'est pas due à la quantité de Gag immunoprécipitée puisque la même quantité de Gag est retenue sur les billes (Figure 4a, puits 7 et 8), ni de la quantité de protéine de l'input (membrane c révélée avec un anti-GADPH). La dégradation des ARN a été confirmée à la fois par quantification des ARN purifié au nanodrop (absence d'ARN détecté après traitement à la RNAse) et sur gel d'agarose (aucun signal n'a été observé comparé au témoin sans RNAse où l'on détecte une bande ayant migré à 2 kb et qui correspond à la petite sous-unité ribosomique et une autre bande à faible masse moléculaire de 1 kb (Figure 4 II, puits 2).

Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'avoir toujours un ARN intermédiaire entre le complexe Gag-RPL7, ARN qui serait protégé de la digestion par la RNase.

Ainsi, l'interaction Gag-RPL7 ne dépendrait pas de la présence d'ARN. Cependant, nous constatons de manière reproductible une augmentation de la quantité de RPL7 co-immunoprécipitée par Gag suggérant que l'ARN puisse géner l'interaction Gag-RPL7. Cette amplification du signal de la RPL7 peut être due à une libération des sites d'interaction avec Gag qui seraient masqués par la présence d'ARN. En d'autres termes, nous pouvons proposer que la RNAse A puisse libérer la partie C-terminale de la RPL7 de son interaction avec les acides nucléiques et favoriser ainsi son exposition pour une interaction avec la protéine Gag.

En conclusion, ces premières expériences confirment les résultats obtenus par double-hybride et montrent que le précurseur Gag du VIH-1 pourrait recruter la protéine RPL7 de manière indépendante de l'ARN.

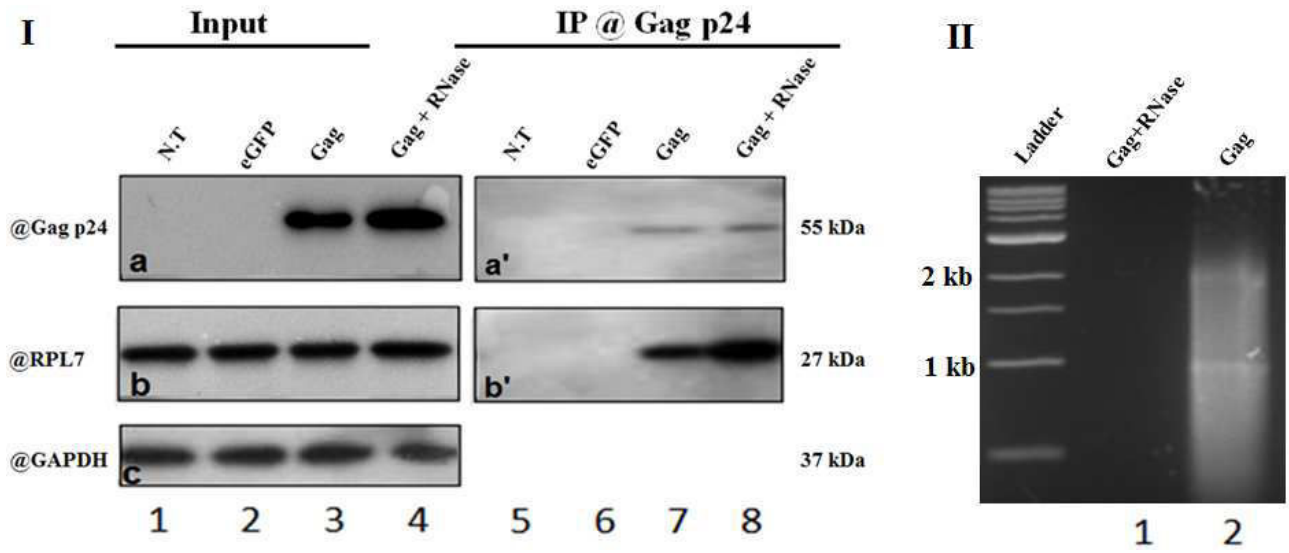

Figure 4 I : Co-immunoprécipitation de la RPL7 par Gag en absence et en présence de la RNase A.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant Gag et, 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-Gag p24. Puits 1 et 5 : cellules non transfectées. Puits 2 et 6 : cellules transfectées avec l'eGFP. Puits 3 et 7 : cellules transfectées avec Gag. Puits 4 et 8 : cellules transfectées avec Gag puis les protéines sont incubées 15 min en présence de RNase A (1µg/14 µl protéines) juste avant l'immunoprécipitation de Gag.

La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a) ou avec un anti-RPL7 (b). Un anticorps dirigé contre la GAPDH (c) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits. 'Input' : protéines totales avant l'immunoprécipitation. IP : immunoprécipitation. La présence simultanée de la RPL7 et de Gag dans les pistes 7 et 8 confirme l'interaction Gag-RPL7. Ainsi, la détection de la RPL7 d'une manière plus importante dans le puits 8 par rapport au puits 7 (image a et b) montre que cette interaction serait indépendante de l'ARN.

Figure 4 II : Gel d'agarose montrant l'effet du traitement à la RNase.

II. Interaction de la protéine virale Gag du VIH-1 avec la protéine ribosomique RPL7 suivie par imagerie

En établissant l'interaction Gag-RPL7 par des techniques biochimiques comme le double-hybride et la co-immunoprécipitation, il était nécessaire de suivre cette interaction en milieu cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs techniques d'imagerie telles que la microscopie confocale permettant de localiser les différents partenaires et la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) visualisée par FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) permettant de suivre une interaction (463,464). Pour cela, nous avons utilisé des plasmides codant les protéines d'intérêts fusionnées avec les rapporteurs eGFP ou mCherry

(RPL7-mCherry, mCherryRPL7, RPL7-eGFP, Gag-eGFP et Gag-mCherry). De plus, nous avons utilisé des plasmides qui codent pour Gag-TC et pour la RPL7-TC. Ces constructions possèdent un motif qui a une séquence de 12 acides aminés riches en cystéines (465). Les motifs TC en présence des dérivés d'arsenic ReAsH ou FlAsH sont capables de former des liaisons covalentes. Seules les composés liés au FlAsH et ReAsH émettent de la fluorescence (343,466). Nous avons utilisé aussi un plasmide codant la Flag-RPL7. La protéine chimérique ainsi produite est immunodétectée par un anti-Flag reconnu par un anti-alexa568.

II.1 Quelles sont les localisations des différentes constructions de Gag et RPL7?

Dans un premier temps, nous avons transfecté des cellules HeLa avec un plasmide exprimant la protéine Gag afin de visualiser sa localisation. Par microscopie confocale, l'immunodétection de Gag par un anti-Gag p24 lui-même révélé par un anti souris-Alexa568 montre que cette protéine se localise essentiellement dans le cytoplasme (Figure 5 A). De même, les protéines Gag-mCherry et Gag-eGFP diffusent essentiellement dans le cytoplasme (Figure 5 B, C). L'absence de localisation à la membrane plasmique de ces trois constructions est en accord avec les données de la littérature montrant que i) l'anti-Gag p24 reconnait difficilement son antigène lorsque Gag est assemblé (76,325) et ii) les protéines eGFP/mCherry placées en C terminal ou dans notre cas en aval de la matrice, gênent considérablement l'assemblage. Inversement, la protéine Gag-TC-ReAsH qui se trouve principalement sur la membrane plasmique (Figure 5 D) en accord avec le fait que la taille du marqueur n'a probablement pas d'effet majeur sur l'assemblage de Gag (467). Concernant la RPL7, sa localisation via un anti-RPL7 montre que la protéine se trouve dans le cytoplasme, le noyau et s'accumule dans les nucléoles. Cette localisation est en accord avec les travaux de J.-R.Ko et *al* (431) (Figure 5 E). Par contre les protéines de fusion mCherry-RPL7 (Figure 5 F), RPL7-mCherry (Figure 5 G) et RPL7-eGFP (Figure 5 H, I) ont principalement une localisation nucléolaire. Dans ces trois cas, il semble que la fusion en N- ou C-terminal des protéines reportrices provoque une rétention de la RPL7 dans le compartiment nucléaire et plus particulièrement nucléolaire. Cependant, la Flag-RPL7 se trouve dans le cytoplasme, le noyau et principalement dans les nucléoles (Figure 5 J).

Concernant la RPL7-TC-ReAsH se trouve principalement dans les nucléoles, et faiblement dans le cytoplasme (figure 5 K).

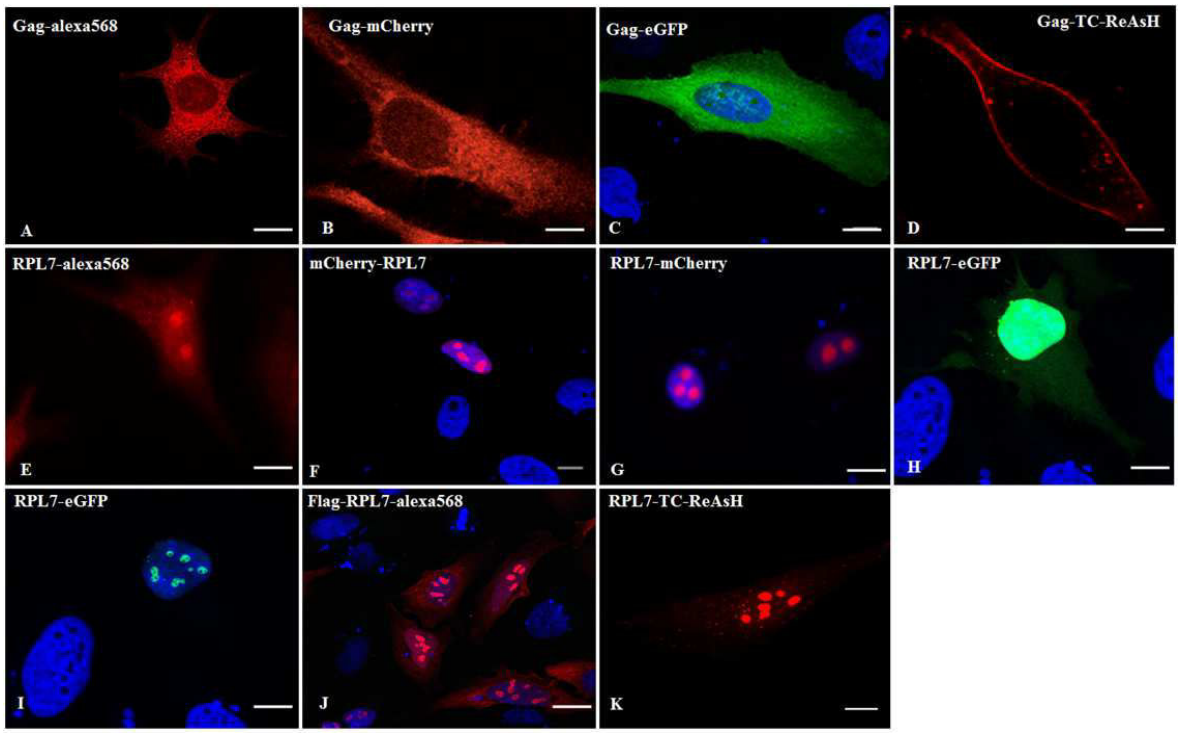

Figure 5 : Localisation dans les cellules HeLa de Gag, Gag-mCherry, Gag-eGFP, mCherry-RPL7, RPL7-mCherry, RPL7-eGFP, Flag-RPL7 et RPL7-TC observée au microscope confocal 24 heures post-transfection.
2.10^5 des cellules HeLa ont été transfectées par 1µg de plasmides exprimant Gag, Gag-mCherry, Gag-eGFP, mCherry-RPL7, RPL7-mCherry, RPL7-eGFP, Flag-RPL7 et RPL7-TC. 24 heures post-transfection, ces cellules ont été fixées au PFA 4%, puis observées au microscope confocal. Gag-alexa568, Gag-mCherry et Gag-eGFP se trouvent dans le cytoplasme (Figure 3 A, B, C). GagTC-ReAsH est détecté sur la membrane plasmique (Figure 3 D). La mCherry-RPL7 (figure 3F) et la RPL7-mCherry (figure 3G) sont localisées dans les nucléoles contrairement à la RPL7 endogène (figure 3E) qui se trouve dans toute la cellule. Comme la RPL7 endogène, la Flag-RPL7 est localisé dans le noyau, les nucléoles et le cytoplasme (Figure 3 J). La RPL7-TC se trouve principalement dans les nucléoles, et dans le cytoplasme (Figure 3 K). Gag, RPL7 endogène et la Flag-RPL7 est détectée par alexa-568.
Ainsi, Gag-eGFP (3A) ne se colocalisent pas avec la RPL7 fusionnée à la mCherry que ça soit du côté N ou C-terminal, ni avec RPL7-eGFP. Les échelles représentent 10µm.

Enfin, des cellules HeLa ont été transfectées par la construction Flag-RPL7 et la protéine chimérique a été localisée *via* un anti-Flag et un anticorps secondaire marqué alexa568. La fusion de la RPL7 avec un Flag sur la partie N-terminale permet donc d'avoir une localisation cellulaire proche de celle observée avec la protéine endogène (comparer les images E et J).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu co-localiser les deux partenaires. Nous avons donc pris comme couple la Flag-RPL7 et Gag-eGFP que nous avons co-transfecté dans des cellules HeLa.

Pour affiner cette co-localisation, nous avons utilisé différents ratios en µg de plasmides exprimant Gag et RPL7. Dans la figure 6, Gag-eGFP (B2) et Flag-RPL7 (C2) montrent une bonne co-localisation pour les ratios de 0.2/0.4 et 0.2/0.8 se traduisant par la couleur jaune sur l'image composite (Figure 6 D2). En effet, lorsque la quantité de plasmide exprimant la RPL7 augmente, nous constatons que la protéine chimérique ne diffuse plus dans le cytoplasme mais se retrouve localisée dans le noyau. Ces deux ratios seront utilisés pour effectuer des expériences de FRET ultérieurement.

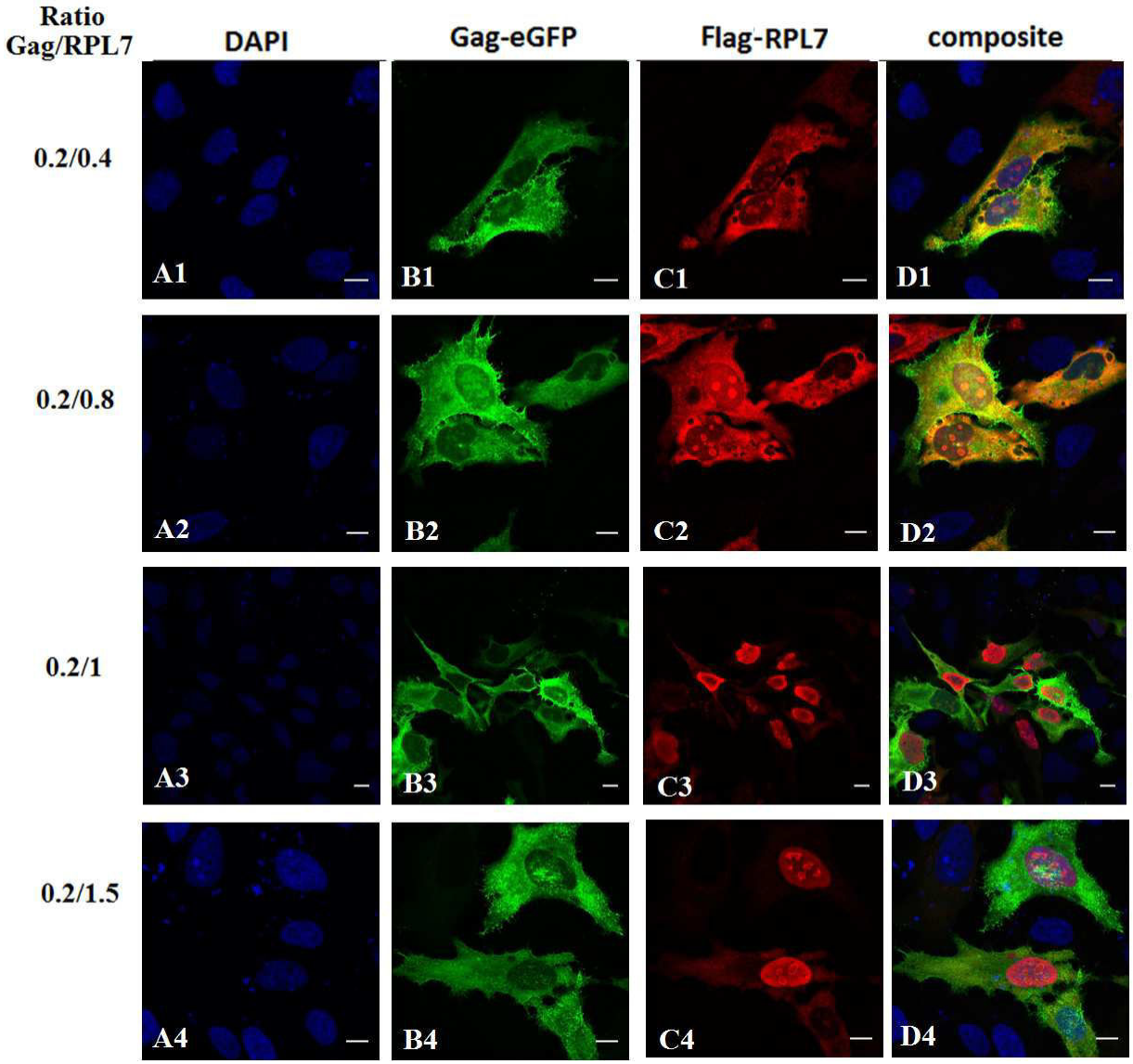

Figure 6 : Localisation dans les cellules HeLa de Gag-eGFP, de la Flag-RPL7 et colocalisation de ces 2 protéines observée au microscope confocal 24 heures post-transfection
$2x10^5$ cellules HeLa sont co-transfectées avec 1µg de plasmides total exprimant Gag-eGFP et la Flag-RPL7 en différent ratios, la Flag-RPL7 est immunodétectée par un alexa-568. Les 4 lignes de la figure 4 représentent respectivement les ratios Gag/RPL7 (0,2; 0,4) ; (0,2; 0,8); (0,2; 1); (0,2; 1,5).
Gag-eGFP présente une localisation cytoplasmique dans la cellule (B1, B2, B3, B4), la Flag-RPL7 se localise dans le cytoplasme, noyau et nucléoles (C1, C2, C3, C4), Enfin, nous observons une meilleure co-localisation de GageGFP et de la Flag-RPL7 à des ratios correspondant à (0,2 : 0,4) et (0,2;0,8) (figure 4 A2, B2, C2, D2). Les échelles représentent 10 µm.

II.2 L'interaction Gag-RPL7 est-elle validée par FRET-FLIM ?

Afin de suivre cette interaction Gag-RPL7 dans des cellules HeLa, nous avons utilisé la technique FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) visualisée par FLIM (Fluorescence Life Time Imaging). C'est une technique de microscopie basée sur le transfert d'énergie entre deux fluorochromes. Elle permet de quantifier les événements de FRET *in situ* en tenant compte d'un paramètre important τ, défini comme le temps moyen que passe une molécule à l'état excité avant de retourner à son état de bas niveau d'énergie. Il est établi que la valeur de τ du donneur d'énergie diminue s'il y a interaction avec l'accepteur d'énergie comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Il nous est donc possible d'étudier des interactions directes entre des protéines chimériques fluorescentes dans un environnement cellulaire, en suivant la diminution du temps de vie de fluorescence de la protéine eGFP. Cette diminution se traduit par l'apparition d'une couleur bleue. Nous avons décidé de vérifier si cette co-localisation entre Gag et RPL7 observée au microscope confocal pourrait correspondre à une interaction spécifique entre ces deux protéines.

II.2.1 Interaction en utilisant le couple Gag-eGFP et Flag-RPL7-alexa568 :

Nous avons utilisé Gag-eGFP comme donneur et la Flag-RPL7-Alexa568 comme accepteur dû à la colocalisation dans le même compartiment cytoplasmique de Gag-eGFP et de la Flag-RPL7 comme la montre les figures obtenues par microscopie confocale (Figure 6). L'eGFP/alexa568 a été décrit comme étant un couple de FRET (468) ce qui valide son utilisation dans nos expériences de FRET.
Les cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides d'intérêts ont été observées après fixation au PFA et la détermination du temps de vie de l'eGFP (seule ou en fusion avec nos protéines

d'intérêt) a été réalisée 24 heures post-transfection. L'étude par FLIM des cellules exprimant l'eGFP nous a permis de déterminer un temps de vie égal à 2.49±0.01ns réparti uniformément dans la cellule comme le montre la couleur verdâtre diffuse (Figure 7A). A partir des images de temps de vie de fluorescence représentées sur la figure 7, nous avons pu constater que le temps de vie de fluorescence de l'eGFP n'est pas modifié lorsqu'elle est couplée à Gag (2.4±0.04 ns) et lorsqu'elle est co-exprimée avec la Flag-RPL7 (2.38±0.01 ns) (contrôles) (Figure 7 B, C) (Tableau 2).

Dans les cellules co-exprimant Gag-eGFP et la Flag-RPL7 détectée par un anti-Flag-alexa568, le temps de vie de Gag-eGFP est de 2.34±0.026 ns qui se traduit par cette image verdâtre similaire à celle obtenue avec les cellules Gag-eGFP (7B). Ce qui suggère qu'il n'y a pas eu un transfert d'énergie entre les deux chromophores.

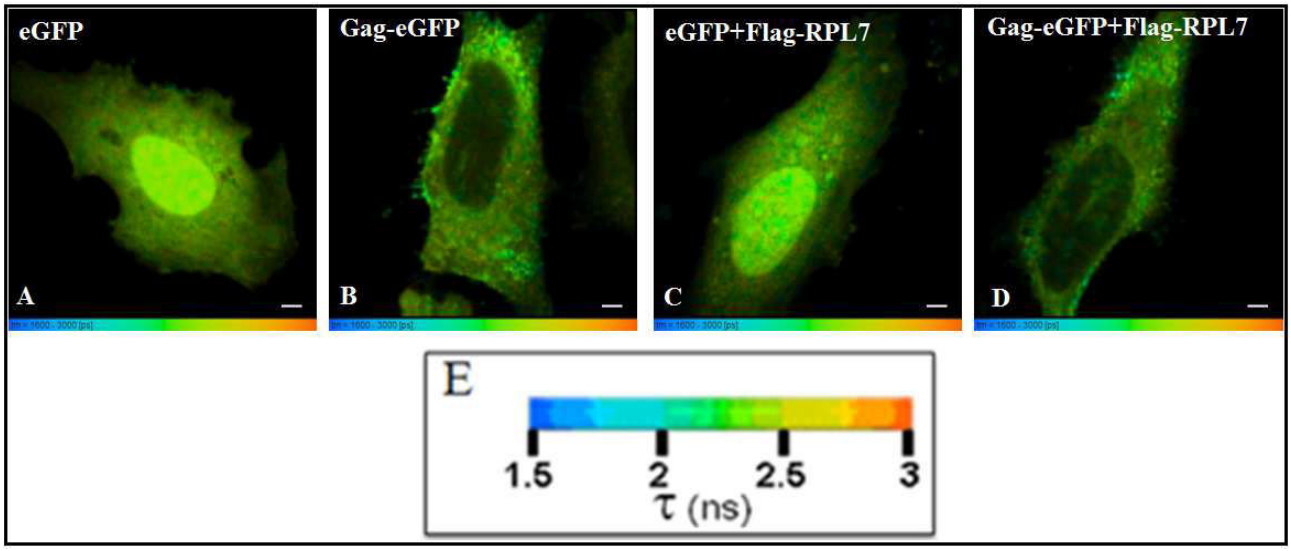

Figure 7 : Etude de l'interaction Gag-eGFP et Flag-RPL7 alexa568 suivie par FRET-FLIM sur cellules HeLa

$3x10^4$ cellules HeLa ont été co-transfectées avec 1µg de plasmides total et les images de FLIM sont obtenues 24 heures post-transfection sur cellules fixées au PFA 4%. Cellules exprimant : l'eGFP (A), Gag-eGFP (B), eGFP et Flag RPL7-alexa568 (C), Gag-eGFP et Flag-RPL7-alexa568 (D).
L'échelle (en nanosecondes, E) permet la conversion des temps de vie en couleur, les temps de vie longs sont en rouge (absence d'interaction) et les temps de vie courts sont en bleu (caractéristique d'une interaction).
Les figures A et B nous servent de témoins afin de voir si la fusion de Gag à l'eGFP influence le temps de vie de l'eGFP. Aucun changement de couleur n'est observé montrant l'absence d'homoFRET.
La figure C nous sert de contrôle négatif, comme il n'y a pas de changement de couleur par rapport à la figure A et B, ceci montre que l'eGFP n'interagit pas avec la Flag-RPL7.
Sur la figure D, la persistence de la couleur jaune verdâtre au niveau du cytoplasme nous montre qu'il n'y a pas eu un transfert d'énergie entre les protéines Gag-eGFP et Flag-RPL7. Les échelles représentent 1 µm.

	N	n	Cytoplasme		Cellule	
			E(%)	τ(ns)	E(%)	τ(ns)
eGFP	3	23	-	2.43 (±0.01)	-	2.49 (±0.01)
Gag-eGFP		25	-	2.42 (±0.03)	-	2.40 (±0.04)
eGFP+Flag-RPL7		38	-	2.3 (±0.01)	-	2.38 (±0.01)
Gag-eGFP+Flag-RPL7		56	<5%	2.39 (±0.04)	<5%	2.34 (±0.03)

Tableau 2 : les temps de vie (τ) de l'eGFP seule ou fusionné à Gag sont les valeurs moyennes de plusieurs cellules. Pour chaque cellule, les mesures ont été effectuées dans le cytoplasme, noyau et sur la cellule entière. L'efficacité de FRET (E) est relié à la distance entre les deux chromophores et calculé à partir du ratio du temps de vie en présence ou en absence de l'accepteur en utilisant l'équation (voir matériels et méthodes). Les valeurs de l'efficacité représentent les valeurs moyennes sur toute la cellule. 'N' correspond au nombre de fois ou la manipulation a été réalisée et 'n'au nombre de cellules analysées. Un pourcentage de FRET supérieur à 5% montre une interaction.

II.2.2 Interaction en utilisant le couple Gag-eGFP et RPL7-TC-ReAsH :

Pour tenter de visualiser une interaction Gag-RPL7 par imagerie, nous avons donc changé de couple et choisi Gag-eGFP et RPL7-TC. Ainsi, des expériences de FLIM ont été réalisées sur des cellules HeLa transfectées avec des plasmides codant pour Gag-eGFP et pour RPL7-TC-ReAsH. L'utilisation de ce couple eGFP/TC-ReAsH a été déjà validé dans notre laboratoire pour montrer du FRET entre Vpr-eGFP et Gag-TC-ReAsH (464,469).

24 heures post-transfection, nous avons incubé les cellules HeLa avec du ReAsH (voir matériels et méthodes) avant de les observer au microscope.

L'étude par FLIM des cellules HeLa co-exprimant Gag-eGFP et la RPL7-TC, nous a permis de déterminer un temps de vie égal à 2.56±0.02 ns comme le montre la couleur jaune dans le cytoplasme (figure 8 D). La valeur de ce temps de vie est très proche à celle obtenue sur des cellules exprimant Gag-eGFP seul (2,53±0,02) (Tableau 3).

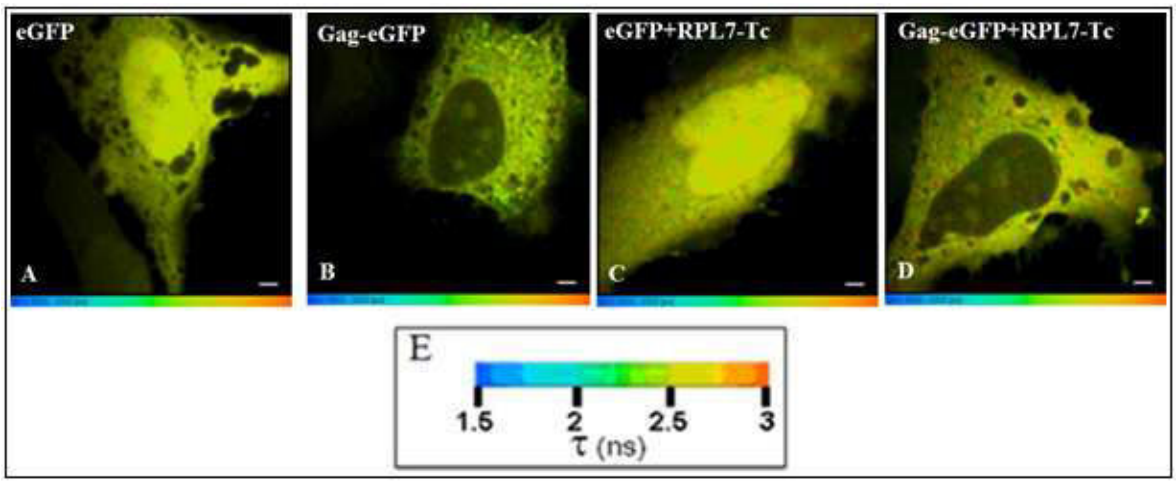

Figure 8 : Etude de l'interaction Gag-eGFP et RPL7-TC ReAsH suivie par FRET-FLIM sur cellules HeLa.

2.10^5 cellules HeLa ont été co-trasfectées avec 1µg de plasmides total, et les images de FLIM sont obtenues 24 heures post-transfection sur cellules fixées au PFA 4%. L'eGFP (A), Gag-eGFP (B), eGFP et RPL7-TC-ReAsH (C), Gag-eGFP et RPL7-TC ReAsH (D).
Sur la figure D, aucun changement de couleur n'est observé par rapport au contrôle (figure 6A, B) montrant qu'il n'y a pas eu transfert d'énergie entre Gag-eGFP et RPL7-TC ReAsH. Les échelles représentent 1µm.

	N	n	Cytoplasme		Cellule	
			E(%)	τ(ns)	E(%)	τ(ns)
eGFP	1	10	-	2.55 (±0.02)	-	2.54 (±0.02)
Gag-eGFP		10	-	2.53 (±0.02)	-	2.49 (±0.04)
eGFP + RPL7-Tc		10	-	2.52 (±0.08)	-	2.52 (±0.06)
Gag-eGFP+ RPL7-Tc		20	<5%	2.56 (±0.02)	<5%	2.52 (±0.07)

Tableau 3 : les temps de vie (τ) de l'eGFP seule ou fusionné à Gag sont les valeurs moyennes de 10 à 20cellules. Pour chaque cellule, les mesures ont été effectuées dans le cytoplasme, noyau et sur la cellule entière. L'efficacité de FRET (E) est relié à la distance entre les deux chromophores et calculé à partir du ratio du temps de vie en présence ou en absence de l'accepteur en utilisant l'équation (voir matériels et méthodes). Les valeurs de l'efficacité représentent les valeurs moyennes sur toute la cellule. 'N' correspond au nombre de fois ou la manipulation a été réalisée et 'n'au nombre de cellules analysées. Un pourcentage de FRET supérieur à 5% montre une interaction.

En conclusion, les 2 stratégies utilisant RPL7 anti-Alexa ou RPL7-TC-ReAsH, montrent une absence de FRET entre les protéines ribosomique et virale. Nous n'avons donc pas pu visualiser l'interaction Gag-RPL7 par FLIM.

Cependant, cette absence de FRET ne remet pas directement en cause les résultats obtenus par double-hybride et co-immunoprécipitation. En effet, le FRET est possible à deux

conditions i) une proximité spatiale des deux rapporteurs inférieur à ≈10nm (distance de Förster) et ii) l'orientation respective des chromophores. Ce sont des paramètres que nous ne maitrisons pas dans une interaction en milieu cellulaire et qui peuvent expliquer la raison pour laquelle aucune image FLIM n'a été obtenue.

D'autres couples ont été essayé entre Gag-mCherry et la RPL7-eGFP ainsi que le couple Gag-eGFP et la RPL7mCherry (non montré). De même, aucun FRET n'a été observé entre Gag et la RPL7 comme les deux protéines se retrouvent dans différents compartiments de la cellule (Voir Figure 5 B, C, G, H, I).

III. Cartographie des domaines impliqués dans l'interaction Gag-RPL7

III.1 Quels sont les domaines de Gag responsables de l'interaction avec la RPL7 ?

Après avoir démontré une interaction Gag-RPL7, nous avons tenté de déterminer les domaines de Gag responsables de cette interaction (Figure 9). Comme il a été montré par double-hybride l'importance du domaine NCp7 dans le précurseur Gag sur son interaction avec la RPL7, nous avons utilisé un plasmide dans lequel la NCp15 (NCp7-Sp2-p6) a été remplacée par un fragment peptidique de la protéine GCN4. Ce domaine correspond à un peptide de 30 acides aminés riche en leucine, qui facilite la dimérisation (GagLeuZF) ou la trimérisation (GagIleu) de Gag et la production de Virus Like Particules (VLP) de manière ARN indépendante (470,471).

Barklis et al ont eu l'idée de remplacer la NCp7 par ce domaine leucine zipper pour mimer le rôle de la NCp7 dans une interaction protéine-protéine (472).

Nous avons tout d'abord comparé la localisation de ces 2 mutants avec celle de la protéine sauvage après leur expression et leur immunodétection dans des cellules HeLa (figure 9 I). La figure (9 I, A) montre que Gag sauvage détectée par un anti-Gag p24 se localise principalement dans le cytoplasme (figure 9 IA). Nous avons la même localisation pour GagLeu que pour le sauvage (figure 14 I, B). Par contre, GagIleu avait une localisation particulière non diffuse dans le cytoplasme mais concentrée dans des petites vésicules la plupart du temps péri-nucléaire (figure 9 I, C). Cependant, comme l'anti-Gag p24 ne détecte pas Gag sous sa forme assemblée à

la membrane plasmique, peut-être que les deux mutants y vont mais nous n'étions pas capable de les observer à la membrane à cause de l'anticorps.

Puis, ces deux constructions, GagLeuZF et GagIleu, ont été transfectées dans des cellules HeLa pour tester leur capacité à co-immunoprécipiter la RPL7 (figure 9 II). Les protéines sont détectées à une taille de 43 kDa en accord avec les résultats obtenus dans la littérature (470) (figure 9 a et a', puits 4, 5 et 9,10). La RPL7 est présente dans le lysat cellulaire (figure 9b, puits 1, 2, 3, 4 et 5). En revanche et de manière intéressante, nous constatons qu'elle n'est pas détectée dans les puits 9 et 10 (figure 9b').

La perte de l'interaction entre GagLeu et GagIleu avec la RPL7 renforce le fait que la présence de la NCp7 de Gag soit indispensable à la reconnaissance du complexe Gag-RPL7.

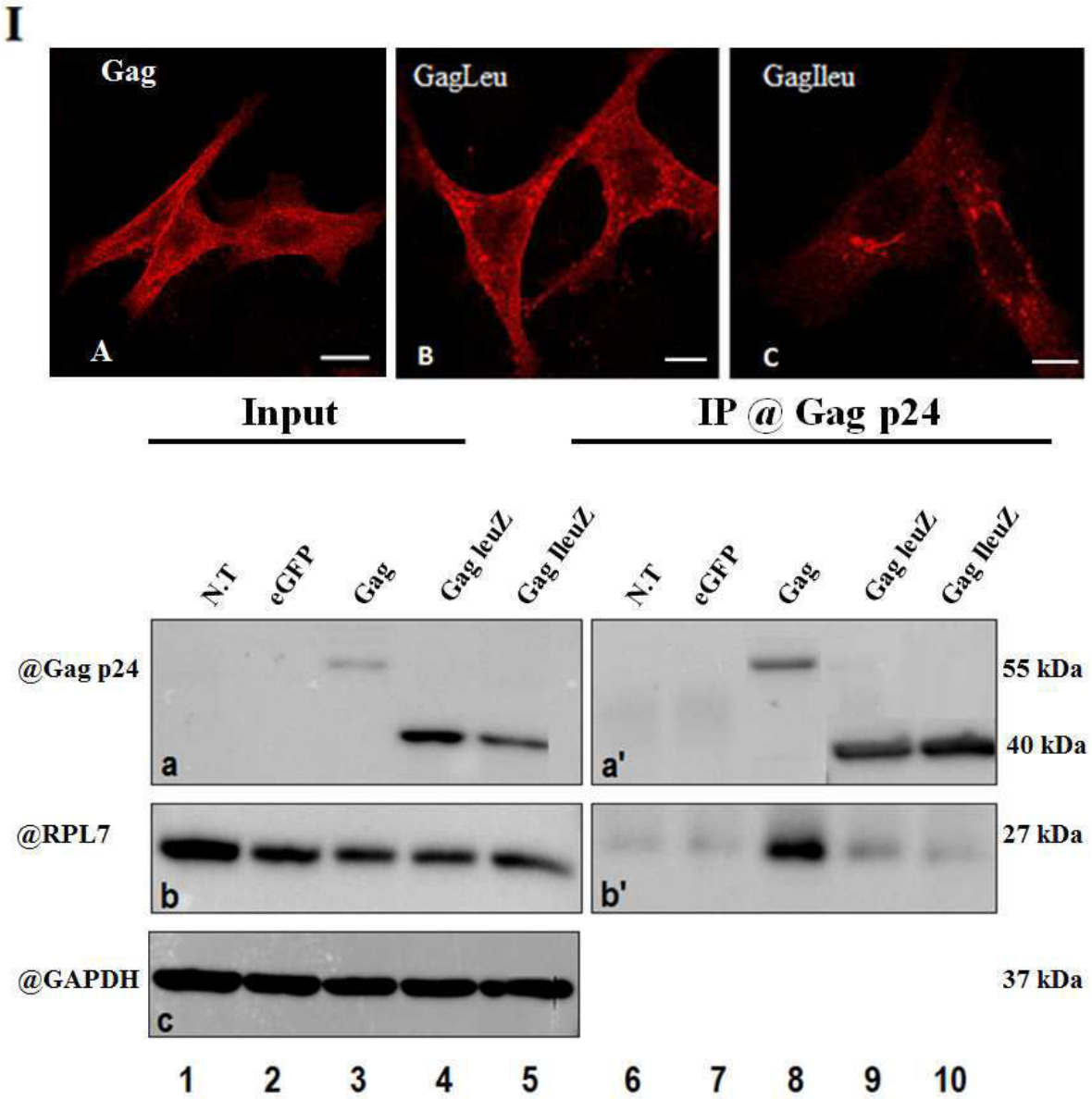

Figure 9 I : Localisation des mutants de Gag dans les cellules HeLa : 2x105 cellules HeLa sont transfectées (JetPEI) avec 1µg de plasmides total exprimant Gag, GagLeu, GagIleu. 24 heures post-transfection, ces cellules sont fixées, puis leur localisation est observée au microscope confocal. Les échelles représentent 10µm.

Figure 9 II : Co-immunoprécipitations de la protéine RPL7 par les mutants de Gag : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, Gag, GagLeu et GagIleu. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-Gag p24. Pistes 1 et 6 : cellules non transfectées. Pistes 2 et 7 : cellules transfectées avec l'eGFP. Pistes 3 et 8 : cellules transfectées avec Gag. Pistes 4 et 9 : cellules transfectées avec GagLeu. Pistes 5 et 10 : cellules transfectées avec GagIleu.
La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a-a') ou avec un anti-RPL7 (b, b'). 'Input' : membrane a montrant l'expression de Gag, GagLeuZF, GagIleu (puits 3, 4,5) ; membrane b montrant l'expression de la protéine cellulaire dans tous les puits (puits 1, 2, 3, 4,5). IP : immunoprécipitation de Gag, GagLeu, GagIleu (puits 8, 9,10). L'absence de la RPL7 dans la membrane b' puits 9 et 10 contrairement à ce qu'on observe dans le puits 8 montrant la perte de l'interaction de GagleuZF ainsi de GagIleu avec la RPL7.

Malheureusement, dans ces constructions, la partie C-terminale tronquée contient également la p6, nous ne pouvons donc pas exclure que la p6 puisse avoir un rôle dans l'interaction. Pour cela, nous avons utilisé un plasmide dans lequel nous avons délété uniquement le domaine NCp7 de Gag (GagΔNCp7).

De plus, pour cartographier de manière plus précise, le rôle des sous-domaines de la NCp7, d'autres mutants ont été utilisés comme GagΔZF1, GagΔZF2, GagΔZF1ΔZF2 (voir Figure 10). Dans ce dernier mutant seules les parties basiques entourant les motifs dactyles restent présents.

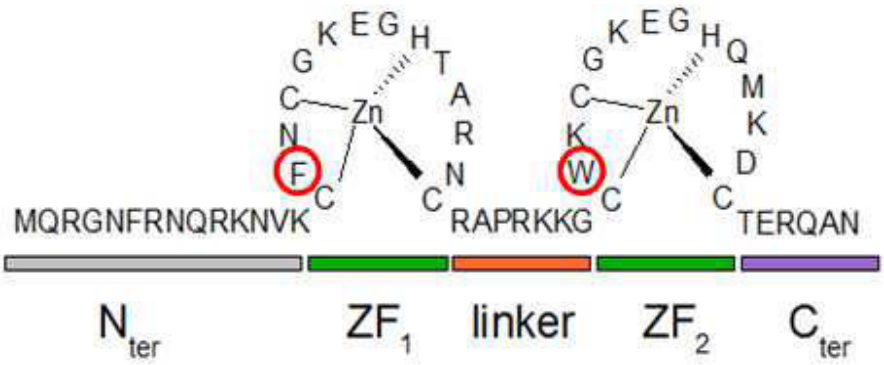

Figure 10: Séquence protéique de la NCp7 du VIH-1.
Les résidus cystéines et histidines responsables de la liaison du zinc sont représentées dans cette figure. Les deux motifs dactyles, résidus 13-29 (ZF1) et 35-50 (ZF2), sont reliés par la région inter-distale basique 29-35.

D'autre part, nous avons étudié le rôle de la région basique interdactyle en remplaçant les acides aminés en position 32, 33 et 34 (RKK) par l'alanine, ce mutant a été appelé « GagRAPAAA ». Les raisons de ces délétions/mutations résident dans l'importance de la structure 3D de la protéine (66) et du rôle potentiel de la région inter-dactyle en tant que 'NLS'.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que tous les mutants s'expriment dans les cellules HeLa. Comme le montre la colonne 'input' des figures 11 I et II, toutes les protéines s'expriment (11 I, puits 3-6 et 11 II, puits 3-5). Comme attendu, les deux mutants de délétion, GagΔNCp7 et GagΔZF1ZF2 migrent plus rapidement que les autres.

Les résultats les plus importants de cette figure résident dans les membranes 11 Ib' et 11 IIb'. En effet, nous constatons une très nette diminution de RPL7 co-immunoprécipitée par les deux protéines GagΔNCp7 (11 Ib', puits 11) et GagΔZF1ΔZF2 (11 IIb', puits 10). Inversement, lorsque l'un des motifs dactyles, ZF1 ou ZF2 est enlevé ou que la partie basique RAPRKK est

modifiée par des résidus hydrophobes, alors la protéine RPL7 est co-immunoprécipitée de façon équivalente à celle co-mmunoprécipitée par Gag sauvage.

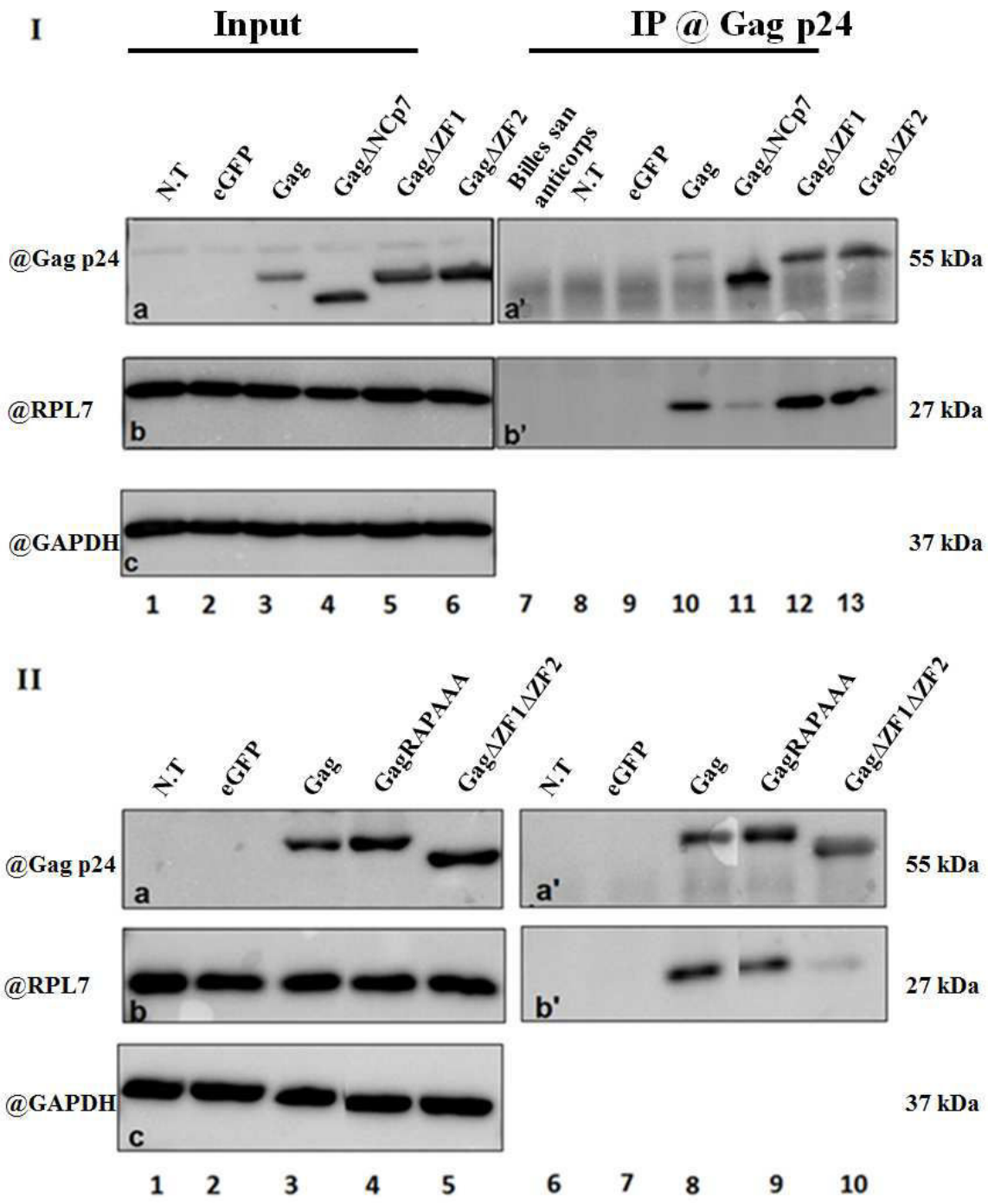

Figure 11 : Co-immunoprécipitations de la RPL7 avec les mutants de Gag.

I) Les cellules Hela ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant l'eGFP, Gag, GagΔNCp7, GagΔZF1, GagΔZF2, GagRAPAAA, GagΔZF1ZF2. Cellules transfectées avec l'eGFP pistes (2 et 8) ; cellules transfectées

avec Gag pistes (3 et 10) ; cellules transfectées avec GagΔNCp7 pistes 5 et 11 ; cellules transfectées avec Gag ΔZF1 pistes 5 et 12 ; cellules transfectées avec Gag ΔZF2 pistes 6 et 13 ;
II) cellules transfectées avec GagRAPAAA pistes 4 et 9 ; cellules transfectées avec GagΔZF1ZF2 pistes 5 et 11.
La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (11I a-a', 11II a-a') ou avec un anti-RPL7 (11I b-b', 11II b-b'). 'Input' : membrane a (Figure 11I, II) montrant l'expression de Gag, Gag ΔNCp7, Gag ΔZF1, Gag ΔZF2 (puits 3,4,5,6), GagRAPAAA , GagΔZF1ZF2 (puits 4,5), membrane b (Figure 11 I, II) montrant l'expression de la protéine cellulaire dans tous les puits (1,2,3,4,5,6 ; 1,2,3,4,5). IP : immunoprécipitation de Gag, Gag ΔNC, Gag ΔZF1, Gag ΔZF2 (Figure 11 I, puits 8, 9, 10, 11,12) ; GagRAPAAA et GagΔZF1ZF2 (Figure 11 II, puits 4 et 5). L'absence de la RPL7 dans la membrane b' (Figure 11I, puits 11 et Figure 10II, puits 10) contrairement à ce qu'on observe dans le puits 8, montre la perte de l'interaction de GagΔNCp7 et de Gag ΔZF1ZF2 avec la RPL7.

En conclusion de toutes ces expériences de co-IP, nos résultats confirment que c'est le domaine NCp7 de Gag qui est responsable de son interaction avec la RPL7 et ce sont les domaines structurés de la NCp7, ZF1 et ZF2 qui sont impliqués dans cette interaction.

III.2 Quels sont les domaines de la RPL7 impliqués dans l'interaction avec le domaine NCp7 du précurseur Gag ?

Après avoir identifié les domaines de Gag responsables de l'interaction avec la RPL7, nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, à déterminer les domaines de la RPL7 impliqués dans l'interaction avec Gag.

Il a été montré que la protéine ribosomique RPL7 comporte 3 régions dans sa structure primaire contenant plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS). La région NH2-terminale est constituée des 54 premiers acides aminés (N54), contient trois signaux de localisation nucléaire (NLS) monobasiques. Elle est suivie d'une région portant 2 NLS dans la section centrale de la protéine localisée entre les acides aminés 55 et 197. Enfin, la région C-terminale composée des 50 derniers acides aminés de la protéine est responsable de la liaison à la membrane. La région centrale qui couvre les 144 acides aminés est supposée être impliquée dans la structuration et la fonction des ribosomes. Par analogie avec un autre homologue de la RPL7, nommé RPL30, cette région centrale (55-197 acides aminés) a été suggérée comme étant impliquée dans des interactions protéine-protéine (431).

5 mutants de délétions de RPL7 ont été clonés afin d'être testés par coIP pour leur interaction avec Gag. (Voir Figure 12 A):

- le ΔN, correspond à la délétion des 54 premiers acides aminés.
- le ΔC, dans lequel les 50 derniers acides aminés sont délétés

- le ΔNΔC, domaine central, obtenu par combinaison des deux premiers et dans lequel les deux parties N et C terminales ont été délétés.
- Enfin, pour déterminer si le domaine de liaison à l'ARN (N-terminal) ou de liaison à la membrane (C-terminal) sont impliqués dans l'interaction protéine-protéine, les mutants N54 (1-54 acides aminés) et C50 (197-248 acides aminés) ont été créés.

  L'expression de ces mutants a été analysée par western blot, et la taille des protéines mutées produites dans des cellules HeLa a été comparée par rapport à la taille de Flag-RPL7 (Figure 12 B).

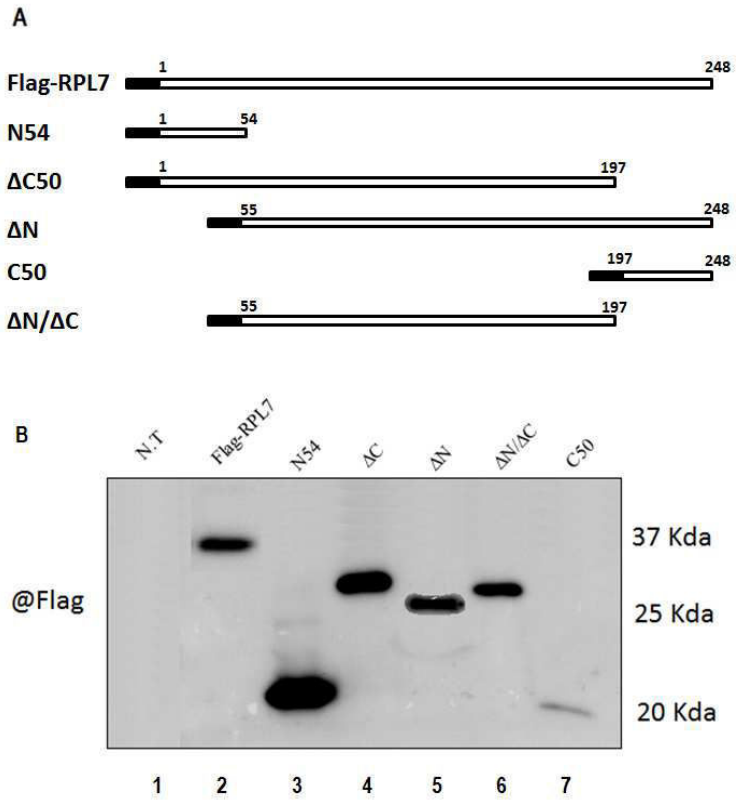

Figure 12 : Analyse par western blot de l'expression des mutants de la Flag-RPL7. (A) Schéma des différents mutants qui ont été construits. La barre en noir représente le peptide Flag. (B) Les cellules HeLa ont été transfectées par 2µg de plasmides exprimant les mutants de Flag-RPL7 et lysées 24h post-transfection. La membrane révélée par un anti-Flag, on observe une bonne expression de tous les mutants (sauf C50) à la taille attendue.

Afin de vérifier la localisation des mutants de RPL7, des cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec ces constructions. De plus, leur co-localisation a été testée en cotransfectant ces mutants avec un mélange Gag/Gag-eGFP de ratio (1/3). Ce mélange de vecteurs exprimant Gag et Gag-eGFP est utilisé avec le même ratio pour suivre le phénotype du Gag sauvage en

conservant ses propriétés d'assemblage. Les cellules ont été observées par microscopie confocale 24 h post-transfection après immuno-détection indirecte avec un anticorps anti-Flag comme représentées dans la figure 12. Les résultats montrent:

- Les 4 mutants ΔC, N54, ΔN et ΔNΔC se localisent tous dans le noyau et les nucléoles (Figure 12 C, E, G, I, K).
- C50 a été retrouvé au niveau de la membrane plasmique ce qui est en accord avec le fait qu'elle contient le domaine de liaison membranaire (Figure 12 K).

La localisation de ces mutants, dans des cellules HeLa a déjà été montrée dans les travaux de J.-R.Ko et al (431).

En présence de Gag, aucun effet n'a été observé sur la localisation de ces mutants (Figure 13 D, F, H, J, L).

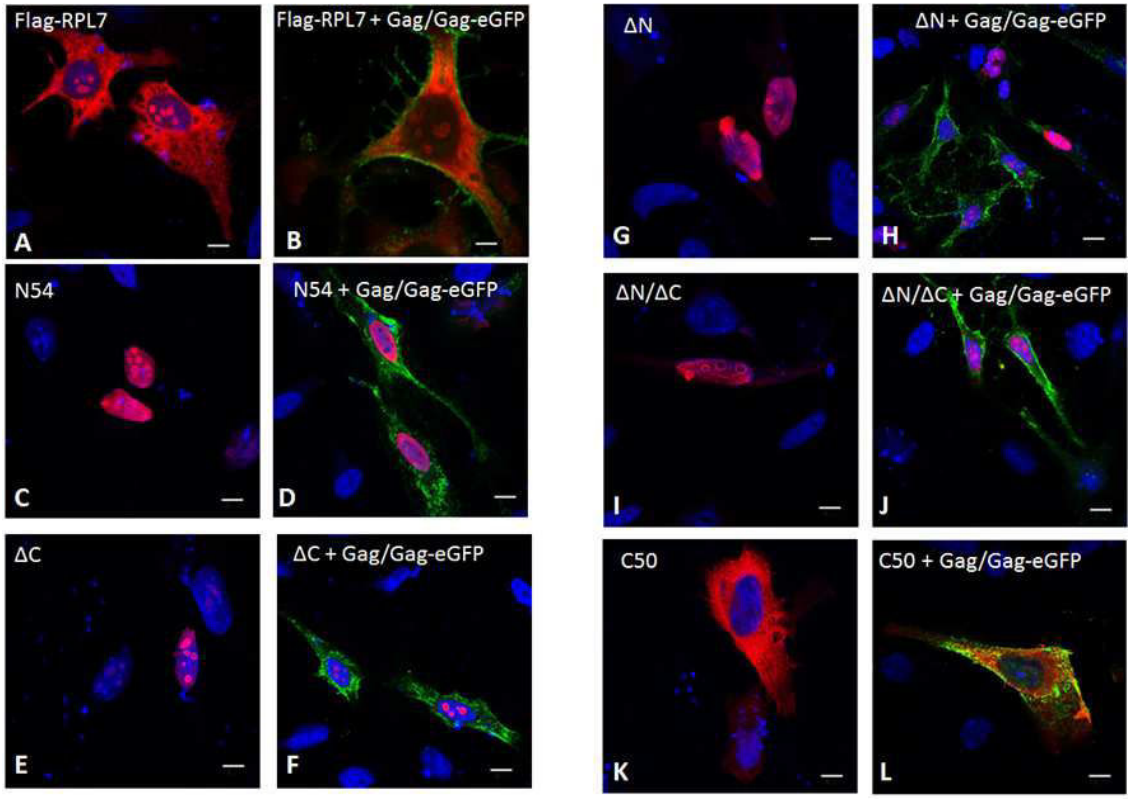

Figure 13 : Localisation dans les cellules HeLa de la Flag-RPL7 et de ses protéines mutées en présence et en absence de Gag/GageGFP observée au microscope confocal 24 heures post-transfection.
2.10^5 cellules HeLa ont été transfectées par 0.6µg de plasmides exprimant Flag-RPL7, ΔC, N54, ΔN, ΔN/ΔC, C50 ou co-transfectées par Gag/Gag-eGFP (0.3/0.1) et les mutants de Flag-RPL7. 24 heures post-transfection, ces cellules ont été fixées au PFA 4%, puis observées au microscope confocal. La distribution cellulaire de la Flag-RPL7 et de ses protéines mutées est détectée par immunomarquage avec un anti-alexafluor 568 sous microscope confocal. L'anti-Flag a été utilisé comme anticorps primaire. L'utilisation du DAPI permet de délimiter le noyau. Les échelles représentent 10µm.

Pour déterminer les domaines de la RPL7 impliqués dans l'interaction avec Gag, des expériences de co-immunoprécipitations ont été effectuées sur des lysats de cellules HeLa co-transfecté par les mutants de délétion de Flag-RPL7 et Gag. Dans 'l'input', nous avons observé une bande à 37 kDa située au-dessus des 27 kD attendus pour la RPL7 endogène et qui correspond à la Flag-RPL7 (figure 14 I, b puits 3, 4). Nous observons ensuite, des bandes de tailles inférieures à 20, 30, 30, et 25 kDa qui correspondent aux mutants N54, ΔN, ΔC, ΔN/ΔC (figure 14 I, b puits 5, 6, 7, 8) aussi voir Figure 11. La protéine virale Gag-eGFP est détectée dans les puits 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (Figure 14 I, a). Les résultats montrent que Gag-eGFP est capable d'interagir avec la Flag-RPL7 (b', puits 13) et avec le mutant ΔC (b', puits 16), mais faiblement avec les mutants N54 et ΔN (b', puits 14,15). Cependant, nous n'étions pas capables d'analyser le résultat obtenu dans le cas du mutant C50, comme nous ne l'avons pas détecté dans l'input (Figure 14 I, puits 9). En western blot, son expression de manière reproductible, était toujours faible dans des cellules HeLa (Figure 12, puits 7).

Par ailleurs, les résultats du criblage double-hybride en levure obtenus par le docteur Richard Benarous avait montré que la région de RPL7 qui s'étend de l'acide aminé 68 jusqu'au 248 est impliquée dans l'interaction avec Gag. Ce qui avait été confirmé par nos résultats de double-hybride (Figure 14 II) qui montrent une interaction entre le mutant ΔN (acides aminés 55 jusqu'au 248) et Gag. Les autres mutants ne sont pas testés en double-hybride.

Ces résultats suggèrent que différents domaines de RPL7 situés dans différentes régions de RPL7 sont capables d'interagir avec Gag.

Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être confirmé.

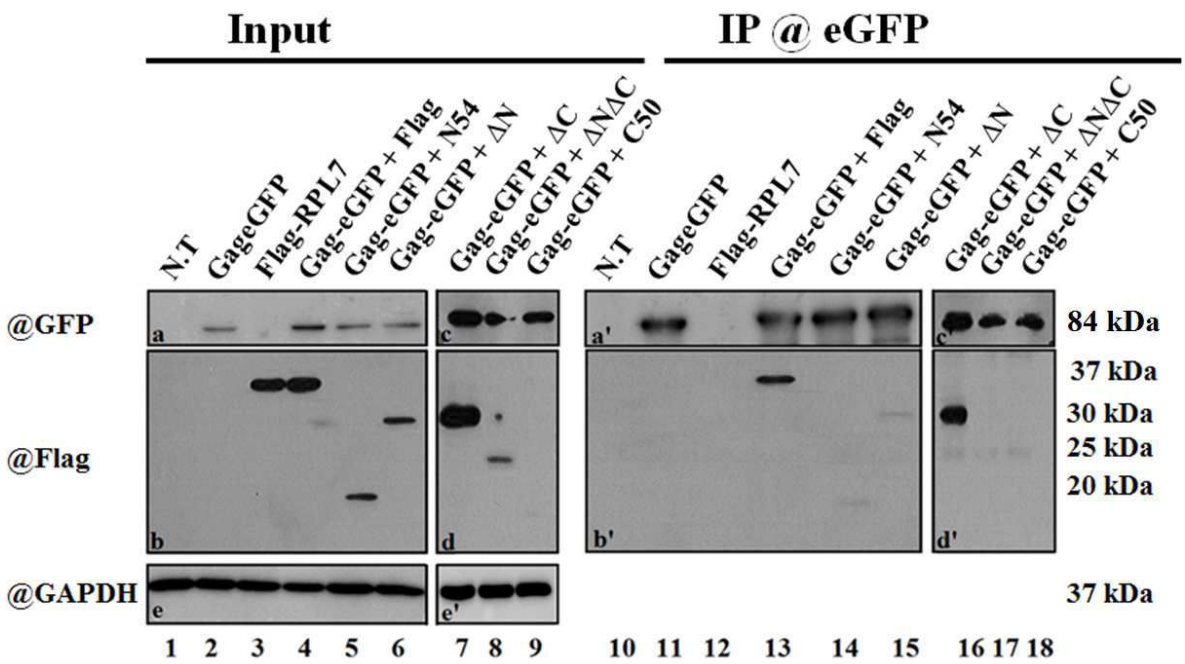

Figure 14 I : Co-immunoprécipitations des mutants de la Flag-RPL7 avec Gag. Les cellules HeLa ont été transfectées (JetPei) avec 2µg de plasmide codant eGFP, Gag et Flag-RPL7, Gag et N54, Gag et ΔC, Gag et ΔN, Gag et ΔN/ΔC, Gag et C50. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-Gag. Pistes 1 et 9 : cellules non transfectées. Pistes 2 et 10 : cellules transfectées avec l'eGFP. Pistes 3 et 11 : cellules transfectées avec Gag et Flag-RPL7. Pistes 4 et 12 : cellules transfectées avec Gag et N54. Pistes 5 et 13 : cellules transfectées avec Gag et ΔC. Pistes 6 et 14 : cellules transfectées avec Gag et ΔN. Pistes 7 et 15 : cellules transfectées avec Gag et ΔN/ΔC. Pistes 8 et 16 : cellules transfectées avec Geg et C50.
La membrane est incubée avec un anti-Gag (a-a', c-c') ou avec un anti-Flag et un anti-RPL7 (b-b',d-d'). 'Input' : membrane a,c montrant l'expression de Gag (puits 3,4,5, 6, 7, 8) ; membrane b, d montrant l'expression de la protéine cellulaire dans tous les puits (puits 1,2,3,4,5,6,7,8) ; de la Flag-RPL7 et de ses mutants (puits 3, 4, 5, 6, 7, 8). IP : immunoprécipitation de Gag (puits 11, 12, 13, 14, 15, 16). Pas de co-immunoprécipitations observé.

Ainsi, les résultats de co-IP des mutants de RPL7 sont résumés dans le tableau 4.

		Gag-eGFP
RPL7	Flag-sauvage	+++
	Flag-N54	+
	Flag-ΔN	+
	Flag-ΔC	+++
	Flag-ΔN/ΔC	-
	Flag-C50	n.d

Tableau 4 : Co-immunoprécipitation de Flag-RPL7 ou de ses mutants avec Gag-eGFP

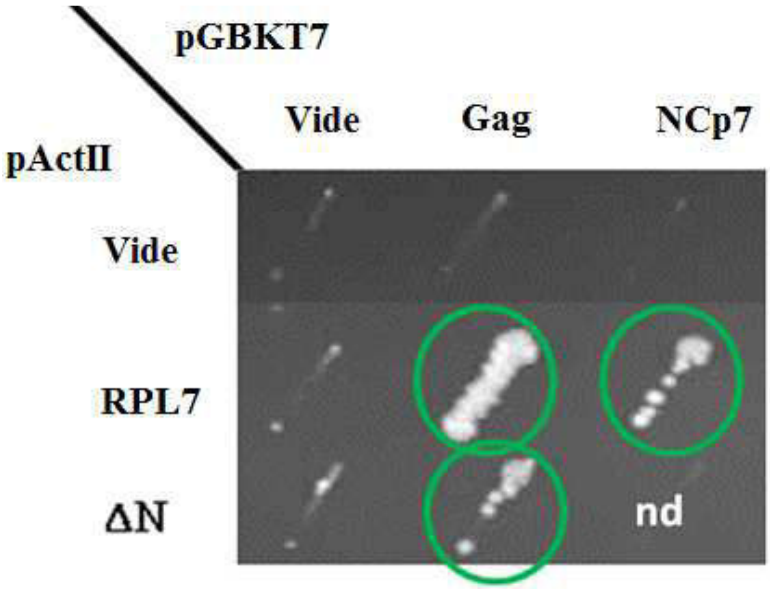

Figure 14II : Résultats du double-hybride chez la levure en utilisant la RPL7 en proie et Gag en appât :
Le cercles verts montrent une interaction entre Gag et la RPL7, NCp7 et la RPL7 ainsi entre Gag et le mutant ΔN se traduisant par la croissance des levures sur un milieu –Leu/-Trp/-His. La croissance des levures est maintenue à 30 °C pendant 4 jours. (n.d) signifie non déterminé.

IV. Rôle de l'oligomérisation de Gag dans l'interaction avec RPL7

Pour étudier le rôle de l'oligomérisation de Gag dans la reconnaissance Gag-RPL7, nous avons utilisé une stratégie :

Utilisation de mutants de Gag déficients en oligomérisation et en trafic à la membrane :

Cependant, la NCp7 de Gag du VIH-1 est impliquée dans l'assemblage de Gag (Adamson & Freed, 2007) et sa délétion entraîne des défauts de trafic intracellulaire de ce précurseur et des défauts de production de virus (Grigorov *et al*., 2007). Pour savoir si l'interaction Gag-RPL7 est indépendante du rôle de la NCp7 dans la polymérisation de Gag, nous avons testé deux autres mutants de Gag. Pour cela, des cellules HeLa ont été transfectées par deux plasmides exprimant les protéines GagG2A et GagM369A. Dans le mutant GagM369A, le remplacement de la méthionine en position 369 par l'alanine, modifie la structure de la capside et en conséquence affecte l'oligomerisation de Gag et l'assemblage des VLPs (341,416,473).

Dans l'autre mutant GagG2A, le résidu Glycine accepteur du myristate au niveau N-terminal de la matrice a été remplacé par une alanine, empêchant $Pr55^{Gag}$ d'être myristylé et de former des VLP correctement assemblées à la membrane plasmique (342,474). Des travaux précédents au laboratoire ont montré que ces mutations se traduisaient effectivement par une diminution très importante de l'oligomérisation de Gag (464).

Des cellules HeLa ont été transfectées par Gag, GagG2A et GagM369A puis fixées au PFA et la localisation de chacun des mutants a été observée en immunofluorescence par microscopie confocal et comparée avec celle de Gag sauvage. Par comparaison avec la protéine sauvage (Figure 15, A) G2A se trouve dans le cytoplasme sous forme diffuse (Figure 15, B). GagM369A présente une localisation cytoplasmique ainsi que membranaire proche de celle de la protéine Gag sauvage (Figure 15, C).

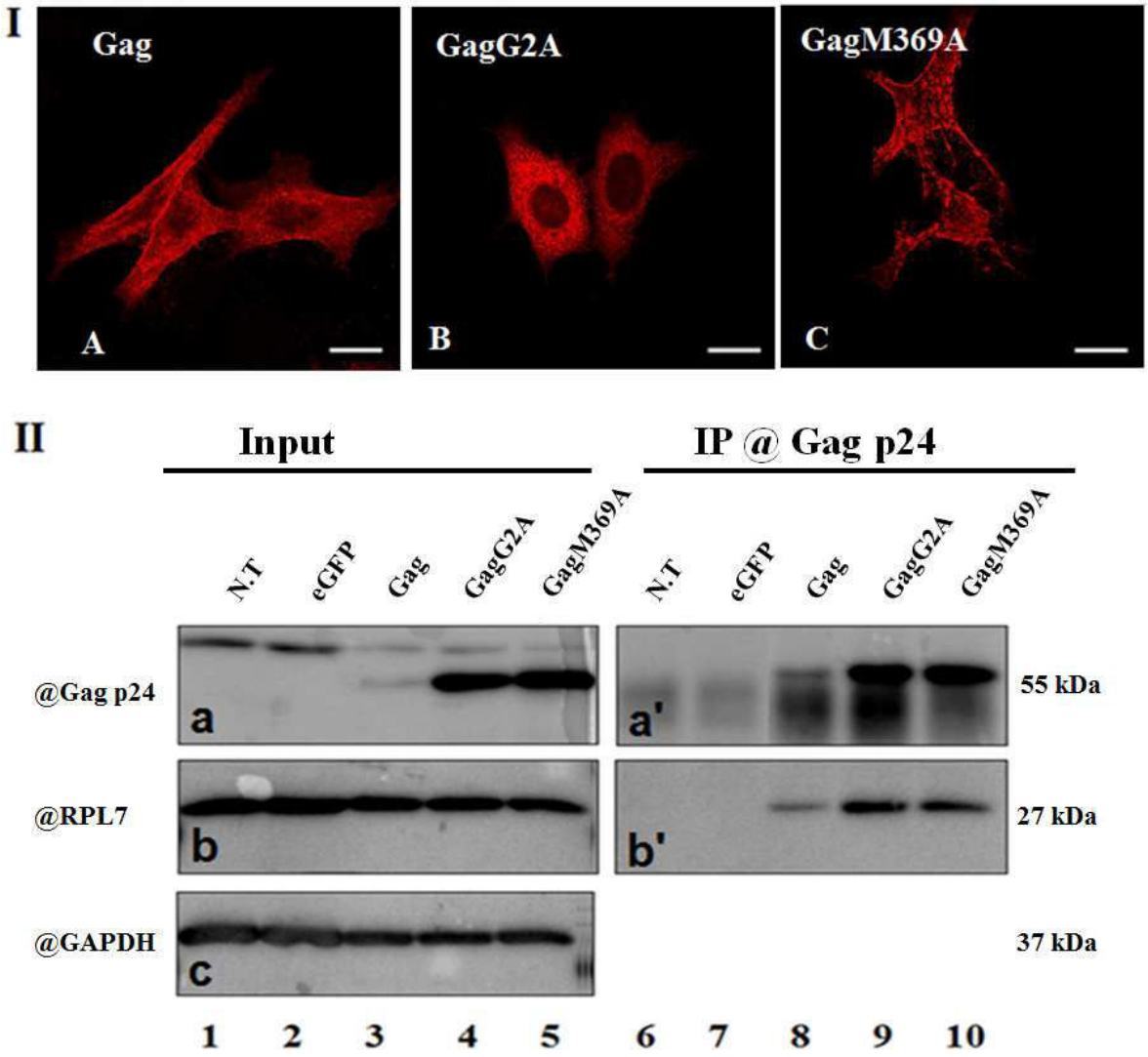

Figure 15 I : Localisation des mutants de Gag dans les cellules HeLa :

$2x10^5$ cellules HeLa sont transfectées avec 1µg de plasmides total exprimant Gag, GagG2A, GagM369A. 24 heures post-transfection, ces cellules sont fixées au PFA 4%, puis leur localisation est observée au microscope confocal. Les échelles représentent 10µm.

Figure 15 II : Co-immunoprécipitations de la protéine RPL7 par les mutants de Gag : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, Gag, GagG2A, GagM369A. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-Gag p24. Pistes 1 et 6 : cellules non transfectées. Pistes 2 et 7 : cellules transfectées avec l'eGFP. Pistes 3 et 8 : cellules transfectées avec Gag. Pistes 4 et 9 : cellules transfectées avec GagG2A. Pistes 5 et 10 : cellules transfectées avec GagM369A.
La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a-a') ou avec un anti-RPL7 (b-b'). 'Input' : membrane a montrant l'expression de Gag, GagG2A, GagM369A (puits 3, 4,5) ; membrane b montrant l'expression de la protéine cellulaire dans tous les puits (1, 2, 3, 4,5). IP : immunoprécipitation de Gag, GagG2A, GagM369A (puits 8, 9,10). La persistance du signal de la RPL7 dans la membrane b' puits 9 et 10 comparé au signal observé dans puits 8 montre que l'interaction existe toujours entre les mutants GagG2A ; GagM369A et la RPL7.

Puis, nous avons testé la capacité de ces protéines à interagir avec la protéine RPL7 par co-IP en co-transfection des plasmides codant pour les protéines Gag, GagG2A et GagM369A dans des cellules HeLa. 'L'input' démontre que ces protéines respectivement (Figure 15 II, membrane a puits 3,4 et 5) ont bien migré à la taille attendue de 55 kDa. Après révélation avec un anti-RPL7, nous avons constaté que ces deux protéines co-immunoprécipitaient la protéine RPL7 de manière comparative à la protéine Gag (puits 8-10).

Les résultats de co-IP de la RPL7 avec les mutants de Gag sont résumés dans le tableau 5 :

A		RPL7 Endogène
Gag	eGFP	+
	Sauvage	+
	Leucine-Zipper	-
	ΔNCp7	-
	ΔZF1	+
	ΔZF2	+
	ΔZF1ΔZF2	-
	RAPAAA	+
	369A	+
	G2A	+

Tableau 5 A : Co-immunoprécipitation de la RPL7 en fonction des mutants de Gag

B	Gag					
	Sauvage	G2A	369A	Leucine-Zipper	ΔNCp7	ΔZF1ΔZF2
Oligomérisation	+++	+	+	+++	+	+
Localisation dans la membrane plasmique	+++	-	±	+++	±	±
RNA	+++	+++	+++	-	n.d	n.d
RPL7	+++	+++	+++	-	+	+

Tableau 5 B : Co-immunoprécipitations de la RPL7 en fonction des propriétés d'assemblage de Gag

Ainsi, nous en déduisons que l'interaction Gag-RPL7 pourrait être indépendante de l'assemblage de Gag et de son adressage à la membrane plasmique. Il faudrait confirmer cela en utilisant d'autres mutants de Gag qui sont décrits dans la littérature et connus pour être monomériques à l'instar de M39A, W184A et M185A (127).

V. Caractérisation de l'interaction entre la protéine NCp7 mature et la protéine cellulaire RPL7

V.1 La RPL7 endogène interagit-elle avec la NCp7 mature ou uniquement quand elle est au sein du précurseur Gag ? Si oui, quels sont les domaines de la NCp7 impliqués dans l'interaction avec la RPL7 ?

Pour asseoir définitivement le rôle du domaine NCp7 de Gag dans l'interaction Gag-RPL7, nous avons tenté de co-immunoprécipiter la protéine cellulaire par la protéine NCp7 seule. En même temps, comme dans le cas de Gag, des mutants de la protéine NCp7 mature ont été utilisés pour cartographier les sous-domaines de cette protéine impliqués dans l'interaction avec la RPL7.

Dans cette expérience, l'absence d'anticorps anti-NCp7 au laboratoire a nécessité l'utilisation des plasmides exprimant les protéines en fusion avec l'eGFP, NCp7-eGFP, NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, NCp7RAPAAA-eGFP. Les anticorps anti-NCp7 ont donc été remplacés par des anticorps anti-eGFP. Les résultats ont montré que la NCp7-eGFP était capable de co-immunoprécipiter la RPL7 (Figure 16I a'b', puits 6). Comme dans le cas de Gag, nous avons voulu déterminé si cette interaction NCp7/RPL7 est dépendante des acides nucléiques. Après traitement à la RNAse A, les résultats ont montré une détection plus importante de la RPL7 que celle obtenue en absence de ce traitement, ce résultat est similaire à ceux obtenus avec Gag (Voir paragraphe I.3). La dégradation des ARN a été confirmée comme cité précédemment. Concernant les mutants de la NCp7, des résultats similaires à la NCp7 sauvage ont été obtenus lorsque qu'on enlève le premier doigt de zinc (figure 16, b', puits 10) ou le deuxième (figure 16, b', puits 11) ou lorsque la partie interdistale est mutée (figure 16, b', puits 12). Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus lorsque ces mutations sont effectuées dans le cadre de la protéine Gag (voir figure 10 I puits 12, 13, 10 II puits 9). Malheureusement, nous n'avons pour

l'instant pas pu obtenir le dernier mutant dans lequel les deux motifs dactyles sont simultanément enlevés.

En conclusion, la comparaison de ces résultats de co-immunoprécipitations avec ceux de la NCp7 au sein du précurseur Gag, montrent que le domaine NCp7 interagit avec la RPL7 que ça soit sous forme libre ou au sein du précurseur d'une manière indépendante de l'ARN. De plus, la délétion de l'un des domaines de la NCp7 n'affecte pas son interaction avec la RPL7.

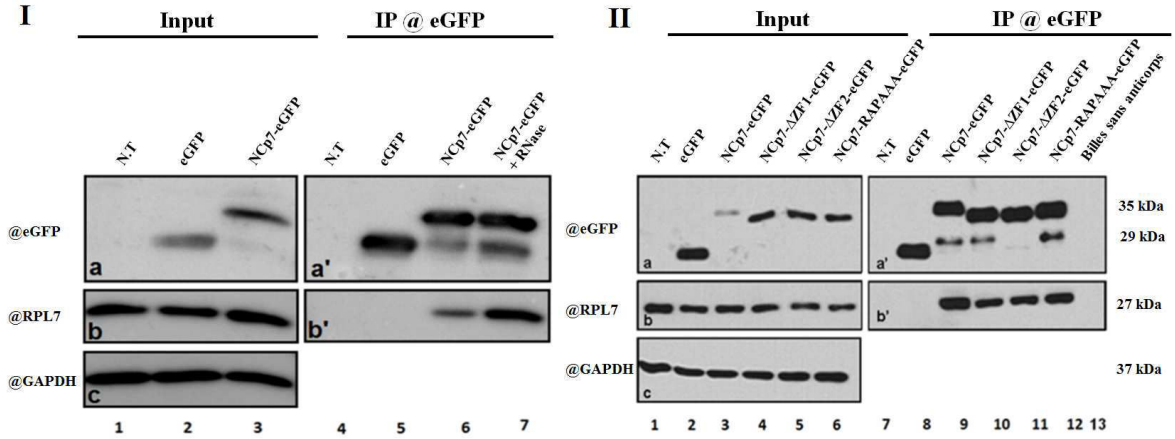

Figure 16 I : Co-immunoprécipitation de la RPL7 par la NCp7 en absence et en présence de la RNase
Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, NCp7-eGFP. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-eGFP Pistes 1 et 4 : cellules non transfectées. Pistes 2 et 5 : cellules transfectées avec l'eGFP. Pistes 3, 6 et 7 : cellules transfectées avec NCp7-eGFP. Pistes 7 : cellules transfectées avec NCp7-eGFP puis les protéines sont incubées 15 min en présence de RNase A (1µg/14 µl protéines) juste avant l'immunoprécipitation de la NCp7-eGFP.
La membrane est incubée avec un anti-eGFP (a) ou avec un anti-RPL7 (b). Un anticorps dirigé contre la GAPDH (c) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits. La présence simultanée de la RPL7 et de la NCp7 dans les pistes 6 et 7 confirme l'interaction Gag-RPL7. Ainsi, la détection de la RPL7 d'une manière plus importante dans le puits 7 par rapport au puits 6 (image a et b) montre que cette interaction dépend partiellement de l'ARN.

Figure 16 II : Cartographie des domaines de la NCp7 impliqués dans l'interaction avec la RPL7 suivie par co-immunoprécipitations.
Les cellules Hela ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, NCp7-eGFP, NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, NCp7AAA-eGFP. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-eGFP. Pistes 1 et 7 : cellules non transfectées. Pistes 2 et 8 : cellules transfectées avec l'eGFP. Pistes 3 et 9 : cellules transfectées avec NCp7-eGFP. Pistes 4 et 10 : cellules transfectées avec NCp7ΔZF1-eGFP. Pistes 5 et 11 : cellules transfectées avec NCp7ΔZF2-eGFP. Pistes 6 et 12 : cellules transfectées avec NCp7AAA-eGFP.
La membrane est incubée avec un anti-eGFP (a-a') ou avec un anti-RPL7 (b-b'). 'Input' : membrane a montrant l'expression de NCp7-eGFP, NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, NCp7AAA-eGFP (puits 3,4,5,6) ; membrane b montrant l'expression de la protéine cellulaire RPL7 dans tous les puits (1,2,3,4,5,6). IP : immunoprécipitation de NCp7-eGFP et ses mutants (puits 9, 10, 11,12). Dans la membrane c, un anticorps dirigé contre la GAPDH permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits.

V.2 Validation de l'interaction de la NCp7 mature et de ses mutants avec la RPL7 par imagerie.

Pour confirmer les résultats de l'interaction NCp7-RPL7 obtenues par co-immunoprécipitation et double-hybride, nous avons utilisé la technique du FRET-FLIM (voir matériels et méthodes) entre NCp7-eGFP (protéine donneuse) et RPL7-mCherry (protéine acceptrice).

Pour cela, dans un premier temps, nous avons vérifié la localisation cellulaire de la protéine chimérique NCp7-eGFP et de ses mutants. Après transfection des cellules HeLa par un plasmide exprimant la NCp7-eGFP ou de ses mutants, les cellules sont fixées au PFA 4% et observées au microscope confocal 24 heures post-transfection. La NCp7-eGFP se localise dans les nucléoles (figure 17A) comme c'est le cas de la NCp7-YFP du HIV-1 (475). En plus de sa localisation nucléolaire, la NCp7-eGFP se trouve aussi dans le cytoplasme. Il en est de même pour ces différents mutants testés (NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, NCp7RAPAAA-eGFP) (figure 17B, C, D).

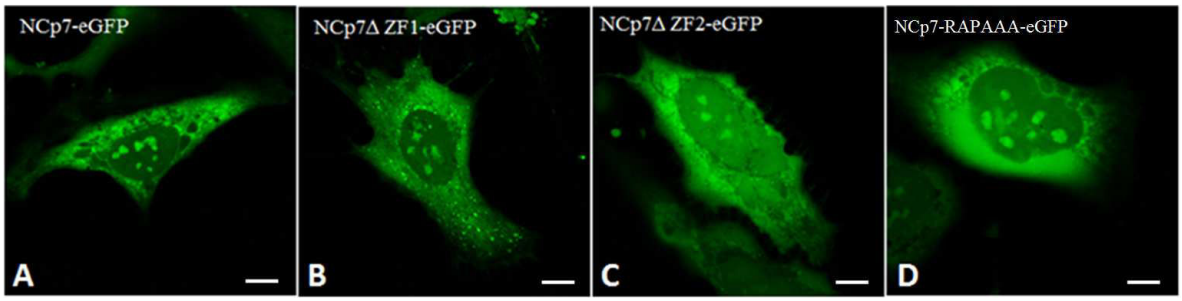

Figure 17 : Localisation de la NCp7 et de ses mutants. 2x105 cellules HeLa sont transfectées avec 1µg de plasmides total exprimant NCp7-eGFP, NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, NCp7RAPAAA-eGFP. 24 heures post-transfection, ces cellules sont fixées, puis leur localisation est observée au microscope confocal. Les échelles représentent 10µm.

La RPL7-mCherry ayant une localisation essentiellement nucléolaire, une co-localisation a pu être observée dans les noyaux et plus particulièrement dans les nucléoles se traduisant par la couleur jaune en co-transfectant les plasmides codant pour la NCp7-eGFP et la RPL7-mCherry (Figure 18 C).

Dans un deuxième temps, pour démontrer que la colocalisation pourrait correspondre à une interaction, des expériences de FRET visualisé par FLIM ont été réalisées. Ainsi, l'étude par FLIM des cellules exprimant l'eGFP nous a permis de déterminer un temps de vie égal à 2.45±0.02 ns réparti uniformément dans la cellule comme le montre la couleur jaunâtre diffuse dans la figure 19 I. De même, des mesures de FLIM effectuées sur des cellules exprimant la

NCp7-eGFP (Figure 19I B) ont donné un temps de vie équivalent de 2.43±0.03 ns. Ce qui montre que le temps de vie de l'eGFP n'a pas été modifié lors de son couplage à la NCp7. De plus, nous observons que la localisation cellulaire des protéines chimères NCp7 fluorescentes est différente de celle de l'eGFP seule.

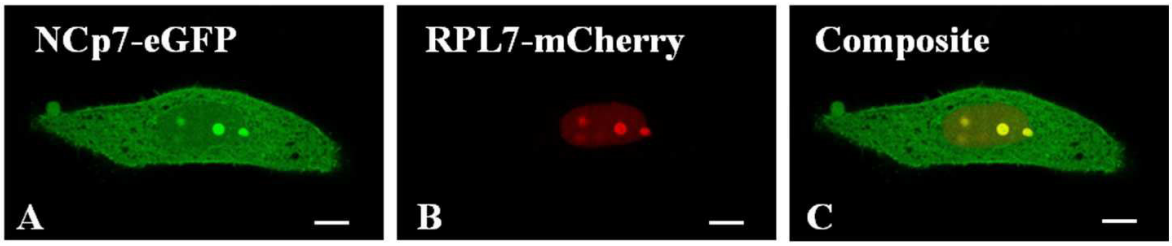

Figure 18: Localisation dans les cellules HeLa de NCp7-eGFP, de la RPL7-mCherry et colocalisation de ces 2 protéines observée au microscope confocal 24 heures post-transfection
$2x10^5$ cellules HeLa sont transfectées avec 1µg de plasmides total exprimant NCp7-eGFP (Figure 18A) et la RPL7-mCherry (Figure 18B).
La figure 18C, montre une co-localisation entre NCp7-eGFP et RPL7-mCherry dans les nucléoles. Les échelles représentent 10µm.

Par ailleurs, les images en temps de vie sont très semblables à celles obtenues en microscopie confocal (Figure 17) montrant que cette technique microscopique n'influence pas la localisation cellulaire des protéines. Enfin, un autre contrôle a été effectué en étudiant des cellules co-exprimant l'eGFP et la RPL7-mCherry (Figure 19D). Nous avons obtenu un temps de vie de 2.4±0.01 ns montrant l'absence de FRET entre l'eGFP et la RPL7-mCherry.

Dans des cellules HeLa co-transfectées avec des plasmides exprimant la NCp7-eGFP et la RPL7-mCherry (Figure 19F) une importante diminution du temps de vie de l'eGFP a pu être observée plus particulièrement au niveau des nucléoles. En effet, le temps de vie moyen dans le cytoplasme est de 2.41±0.04 ns et celui dans les nucléoles est de 2.19±0.07 ns ce qui se traduit par l'apparition d'une couleur verte dans le cytoplasme et bleu dans les nucléoles. En utilisant l'équation 1 (Voir Matériels et Méthodes), nous avons pu calculer que ces diminutions de temps de vie dans les nucléoles correspondaient à des efficacités de transfert d'énergie de 8.7%.

Connaissant la taille des protéines reportrices (eGFP ou mCherry) par rapport à la taille des protéines d'intérêts, ces expériences ont été poursuivies avec des constructions permettant d'autres protéines chimères. Ainsi, lorsque nous observons des cellules exprimant la NCp7-eGFP et la mCherry-RPL7 (Figure 19E) la localisation cellulaire de l'interaction et l'efficacité du transfert d'énergie sont comparables à ceux observés précédemment. Par contre, lorsque la partie N-terminale de la NCp7 est fusionnée à l'eGFP (Figures 19C) alors le temps de vie de l'eGFP

correspond à celui de la protéine seule (Figure 19A) et l'efficacité de FRET est inférieure à 5%. Ainsi, la protéine eGFP-NCp7 a perdu la capacité d'interagir avec la protéine RPL7 que celle-ci soit marquée au niveau de son extrémité N ou C-terminale (résultats non montré).

La localisation cellulaire de l'eGFP-NCp7 est similaire à celle de la NCp7-eGFP, cependant l'absence de FRET observé suggère que la fusion de l'eGFP à l'extrémité N-terminale de la NCp7 provoque un changement de la conformation de la protéine chimérique, ou au minimum un éloignement des fluorophores (créant une distance entre l'eGFP et la mCherry supérieure à 10nm). Pour confirmer qu'une co-localisation de 2 protéines ne signifie pas toujours une interaction des deux protagonistes, nous avons testé le couple NCp7-eGFP et nucléoline-mCherry. En effet, la nucléoline est une autre protéine nucléolaire et nous avons obtenu un plasmide exprimant la nucléoline-mCherry (don du Dr. Ph Bouvet, ENS, Lyon). Son expression a été vérifiée par western blot (non montré). Comme le montre la Figure 19G, le temps de vie de l'eGFP ne diminue pas dans les cellules exprimant la NCp7-eGFP et la nucléoline-mCherry suggérant une absence d'interaction entre ces deux protéines.

Ainsi, ces résultats nous permettent de démontrer que la NCp7 et la RPL7 interagissent dans la cellule et plus particulièrement dans les nucléoles.

Les mêmes expériences de FRET ont été répétées mais cette fois-ci avec les mutants de la NCp7-eGFP. L'étude par FLIM des cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides exprimant la protéine virale mutée NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7-RAPAAA-eGFP ou NCp7ΔZF2-eGFP et la RPL7-mCherry (figure 19 H), montre une diminution du temps de vie qui correspond à un pourcentage de FRET de 7.5, 8.96 et 6.98% respectivement dans les nucléoles.

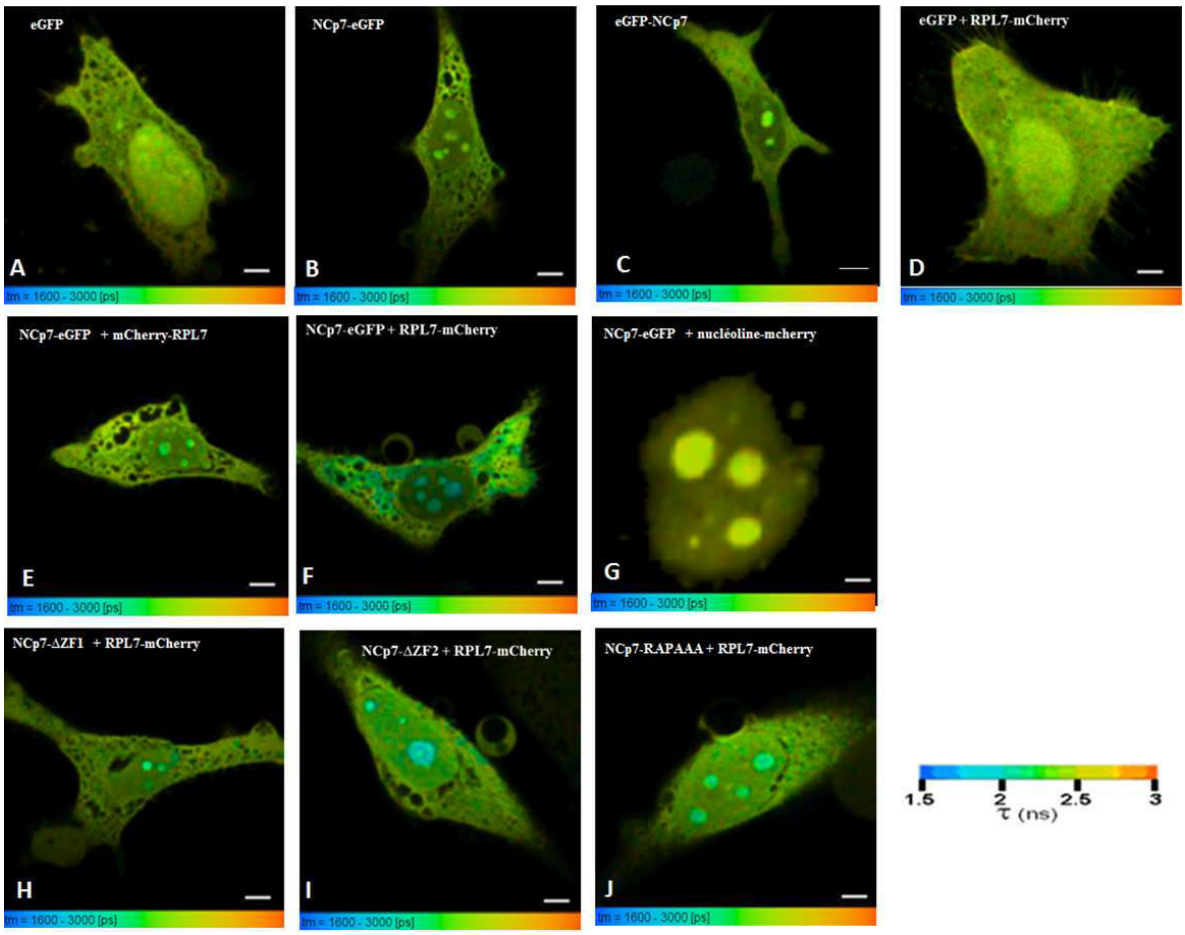

Figure 19 I: Etude de l'interaction NCp7-eGFP et RPL7-mCherry suivie par FRET-FLIM sur cellules HeLa

2.10^5 cellules HeLa ont été transfectées et co-transfectées avec 1µg de plasmides total et les images de FLIM sont obtenues 24 heures post-transfection sur cellules fixées au PFA 4%. Cellules exprimant : l'eGFP (A), NCp7-eGFP (B), eGFP-NCp7 (C), eGFP-NCp7 et RPL7-mCherry (D), NCp7-eGFP et RPL7-mCherry(E), NCp7-eGFP et mCherry-RPL7 (F), NCp7-eGFP et nucléoline-mCherry (G), NCp7ΔZF1-eGFP et RPL7-mCherry (H), NCp7ΔZF2-eGFP et RPL7-mCherry (I), NCp7-RAPAAA-eGFP et RPL7-mCherry (J),
Les mesures de FRET sont réalisées sur 30 cellules en 3 expériences indépendantes (10 cellules par expérience).
Sur la figure 16, la couleur bleu observée dans les nucléoles correspond à un temps de vie de 1.79 ns. Ceci traduisant une interaction entre la NCp7-eGFP et la RPL7-mCherry. La figure (16I, G) nous sert de témoins afin de montrer la spécificité de l'interaction NCp7-eGFP et la RPL7-mCherry en utilisant la nucléoline. Les échelles représentent 1 µm.

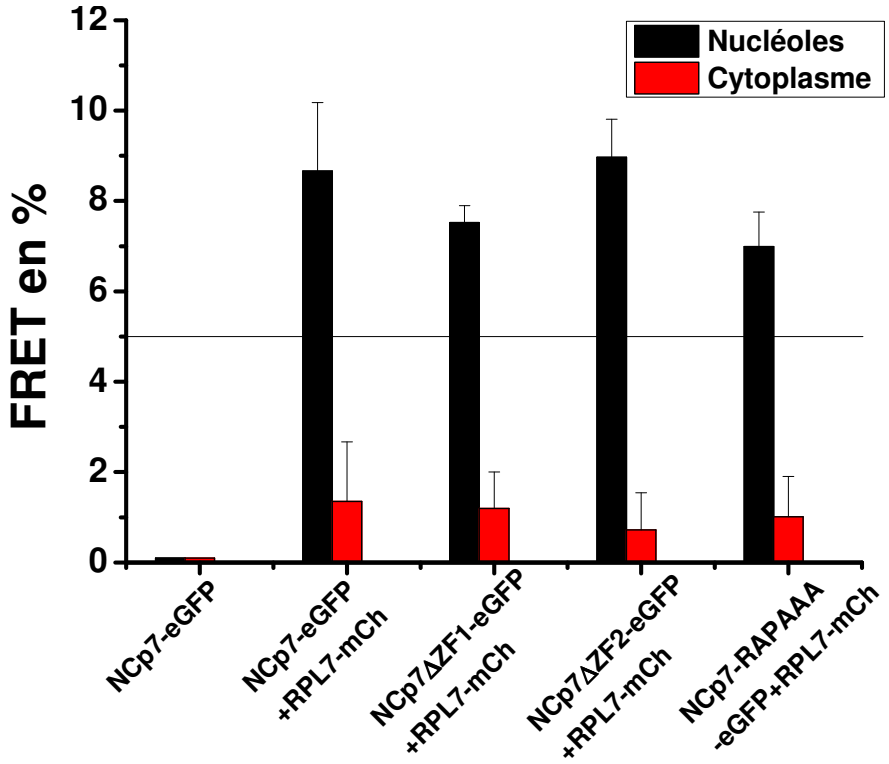

Figure 19 II : Histogramme de distribution du FRET
L'histogramme représente les valeurs de FRET entre la NCp7-eGFP et la RPL7-mCherry, NCp7ΔZF1-eGFP et la RPL7-mCherry, NCp7ΔZF2-eGFP et la RPL7-mCherry, NCp7AAA-eGFP et la RPL7-mCherry dans le cytoplasme, nucléoles et noyau. Le tiret noir représente la valeur limite de 5% au-delà de laquelle on considère qu'il y a du FRET.

Les résultats de FRET-FLIM et de co-IP de la NCp7eGFP, NCp7ΔZF1-eGFP, NCp7ΔZF2-eGFP, la NCp7-RAPAAA-eGFP avec la RPL7-mCherry se ressemblent et démontrent tous une interaction avec la RPL7. D'autre part les résultats de co-IP de la NCp7 et ses mutants avec la RPL7 sont comparables avec ceux obtenues avec les co-IP des mutants de Gag.

Ces résultats montrent que l'interaction de la RPL7 n'est pas affectée par la délétion/substitution d'un domaine de la NCp7 (ZF1, ZF2 ou RAPRKK).

En outre, nous avons testé une interaction entre Gag et une autre protéine ribosomique de la sous unité 60S, la RPL26. A l'instar de la RPL7, cette protéine se localise au niveau des mêmes structures cellulaires (nucléoplasme et nucléole). De plus, des études d'interaction (240) ont montré que les valeurs du Mist score des couples Gag- RPL26 ou NCp7- RPL26 sont très proches de celles des couples RPL7-Gag ou RPL7-NCp7. Le Mist score (Mass Spectrometry Interaction Stastistics) correspond à une somme pondérée de trois mesures : l'abondance des

protéines mesurées par les intensités des pics du spectre de masse (l'abondance), l'invariabilité de la surabondance des pics (reproductibilité) et l'unicité d'une interaction hôte – pathogène observée dans l'ensemble des purifications virales (spécificité).

Les deux mêmes techniques, co-IP et FRET-FLIM utilisées pour étudier l'interaction Gag-RPL7 et NCp7-RPL7, ont été utilisées pour l'étude d'une interaction potentielle entre Gag-RPL26 et NCp7-RPL26.

VI. Etude de l'interaction de la protéine RPL26 et des protéines virales Gag et NCp7 par co-immunoprécipitation

Nous avons vérifié si la protéine virale Gag-eGFP était capable de co-précipiter la RPL26 endogène. Des analyses contrôles similaires à celles effectuées précédemment (NT, eGFP) ont été réalisées.

La figure 20 a, a' correspond à une membrane révélée par un anticorps anti-eGFP. Dans la partie 'input' (Figure 20 I a puits 2, 3, 4) et dans celle de l'IP (Figure 20 I a' puits 7) nous avons observé respectivement l'expression et l'immunoprécipitation des protéines eGFP, Gag-eGFP, GagΔNCp7-eGFP.

Afin de mettre en évidence la présence de la protéine RPL26 et donc sa co-immunoprécipitation potentielle par Gag, la membrane a été révélée par un anticorps anti-RPL26. Dans 'l'input', la RPL26 est détectée dans les puits de 1 à 4 à la taille attendue de 17 kDa (Figure 20 b). D'autre part, dans le puits 7, nous avons observé une co-immunoprécipitation de la RPL26 uniquement dans les cellules transfectées avec Gag-eGFP (Figure 20 a'-b', puits 7)**.** De plus, nous n'avons pas observé de co-immunoprécipitation de la RPL26 avec GagΔNCp7-eGFP (Figure 20 I b', puits 8). Ce qui indique que **la partie NCp7 au sein de Gag est capable de reconnaître la RPL26**. Afin de vérifier l'homogénéité du dépôt protéique, nous avons déshybridé la membrane que nous venions de révéler avec l'anticorps anti-RPL26, puis nous l'avons incubée en présence d'un anticorps anti-actine (Figure 20c). La quantité de protéines totales est similaire dans les 4 puits. **Ces résultats ressemblent à ceux que nous avons obtenus avec la RPL7 et indiquent que la RPL26 interagit avec Gag *via* le domaine NCp7.**

Enfin, nous avons démontré que l'immunoprécipitation de la RPL26 endogène sur des billes couplées à l'anticorps anti-RPL26 permettait la capture ou la co-IP de Gag (non montré), **ce qui valide encore une fois l'interaction Gag-RPL26.**

Après avoir défini l'interaction entre Gag et RPL26, et avoir démontré l'implication du domaine NCp7 dans cette interaction, nous avons ensuite vérifié si une interaction entre NCp7 mature et RPL26 existait.

Les résultats ont montré que la NCp7-Flag est capable de co-immunoprécipiter la RPL26 endogène (Figure 20 II a', b', c' puits 6). Ce qui montre une interaction entre la NCp7 mature et la RPL26. La spécificité entre la NCp7 et la RPL26 a été validé par l'utilisation d'un contrôle, l'eGFP qui montre l'absence de co-immunoprécipitation avec la NCp7 (figure 20 II d', puits 6).

Cette interaction a aussi été validée en immunoprécipitant la RPL26 endogène sur des billes couplées à l'anticorps anti-RPL26 et qui a permis la capture de la NCp7 (non montré).

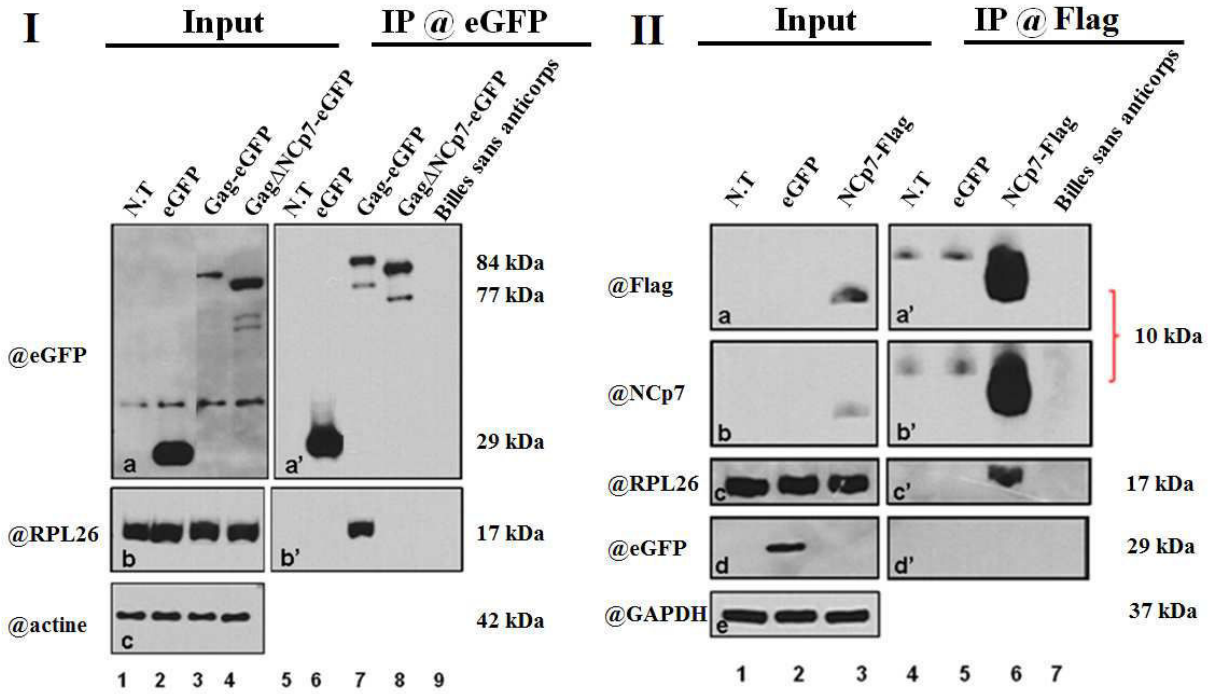

Figure 20 I : Co-immunoprécipitations de la protéine RPL26 par Gag et NCp7.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, NCp7-eGFP, Gag-eGFP, GagΔNCp7-eGFP. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-eGFP. Puits 1 et 6 : cellules non transfectées. Puits 2 et 7 : cellules transfectées avec l'eGFP. Puits 3 et 8 : cellules transfectées avec NCp7-eGFP. Puits 4 et 9 : cellules transfectées avec Gag-eGFP. Puits 5 et 10 : cellules transfectées avec GagΔNCp7-eGFP.

La membrane est incubée avec un anti-eGFP (a-a'), un anti-RPL26 (b-b') ou avec un anti-actine (c). 'Input' : membrane a montrant l'expression de l'eGFP, NCp7-eGFP, Gag-eGFP, GagΔNCp7-eGFP (puits 2, 3, 4,5) ; membrane b montrant l'expression de la protéine cellulaire RPL26 dans tous les puits (puits 1, 2, 3, 4,5). IP :

immunoprécipitation de l'eGFP, NCp7-eGFP, Gag-eGFP, GagΔNCp7-eGFP (puits 7, 8, 9,10). La présence simultanée de NCp7-eGFP et de Gag-eGFP avec la RPL26 (puits 8 et 9) montre une co-immunoprécipitations de la NCp7 et de Gag avec la RPL26. Un anticorps dirigé contre l'actine (c) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits.

Figure 20 II : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de plasmides codant eGFP, NCp7-Flag. 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéines A et l'anticorps anti-flag. Puits 1 et 4 : cellules non transfectées. Puits 2 et 5 : cellules transfectées avec l'eGFP. Puits 3 et 6 : cellules transfectées avec NCp7-flag. Pistes 7 : cellules non transfectées incubées avec des billes sans anticorps.
La membrane est incubée avec un anti-Flag (a-a'), un anti-NCp7 (b-b'), un anti-RPL26 (c-c'), un anti-eGFP (d-d'), anti-GAPDH (e). 'Input' : membrane (a,b) montrant l'expression de la NCp7-flag ; membrane (c) montrant l'expression de la RPL26 endogène (puits 1,2,3) ; membrane (d) montrant l'expression de l'eGFP. IP-coIP : co-immunoprécipitation de la NCp7-flag avec la RPL26 (a'-b'-c' puits 6) mais pas avec l'eGFP (d', puits 6). Un anticorps dirigé contre la GAPDH (e) permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits.

VII Etude de l'interaction de la protéine RPL26 et des protéines virales Gag et NCp7 par imagerie

VII.1 Quelles sont les localisations des différentes protéines : Gag, NCp7 et RPL26 ?

Afin de confirmer l'interaction NCp7-RPL26 qui a été déjà montré par co-immunoprécipitation, nous avons réalisé des expériences de FRET-FLIM. Comme cette technique est basée sur la localisation des interactants, nous avons donc suivi la localisation cellulaire des protéines de Gag, NCp7 et la RPL26 fluorescentes. Des cellules HeLa, ont été transfectées, fixées au PFA 4%, et observées au microscope confocal à 24 heures post- transfection. La protéine RPL26 fusionnée à l'eGFP se localise majoritairement dans le noyau et plus spécifiquement dans le nucléole (Figure 21 B2). Des études similaires ont été effectuées sur la protéine Gag-mCherry. Cette protéine est, quant à elle, localisée préférentiellement dans le cytoplasme et est exclue du noyau (Figure 21 C3). Nous avons alors co-transfecté les plasmides exprimant Gag-mCherry et RPL26-eGFP, et nous avons montré que ces deux protéines ne colocalisent pas (Figure 21 C4). Le même effet est observé, quand nous avons co-transfecté Gag-eGFP, et la RPL26-Flag. Gag-eGFP ayant une localisation cytoplasmique (Figure 21 D2), et RPL26-Flag visualisé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-Flag et un anticorps secondaire marqué alexa568, avait principalement une localisation nucléolaire (Figure 21 D3) ; aucune colocalisation n'a pu être observée (Figure 21 D4). Dès lors, nous n'avons pas pu poursuivre nos études par des expériences de FRET-FLIM entre Gag et RPL26.

En parallèle, des études de microscopie confocale, nous ont permis de montrer que la NCp7-mCherry avait une localisation cellulaire principalement cytoplasmique et nucléolaire (Figure 21 E3) et que celle de la RPL26-eGFP était principalement nucléaire et surtout nucléolaire (Figure 21 E2). Nous avons donc poursuivis nos analyses par une co-transfection des plasmides exprimant RPL26-eGFP et la NCp7-mCherry. Une colocalisation entre les deux protéines fluorescentes est observée au niveau des nucléoles (couleur jaune sur l'image composite de la figure 21 E4). Comme nous avons observé une colocalisation dans le cas de la NCp7-mCherry et RPL26-eGFP au microscope confocal, nous avons décidé de vérifier si cette co-localisation observée pourrait correspondre à une interaction spécifique entre ces deux protéines.

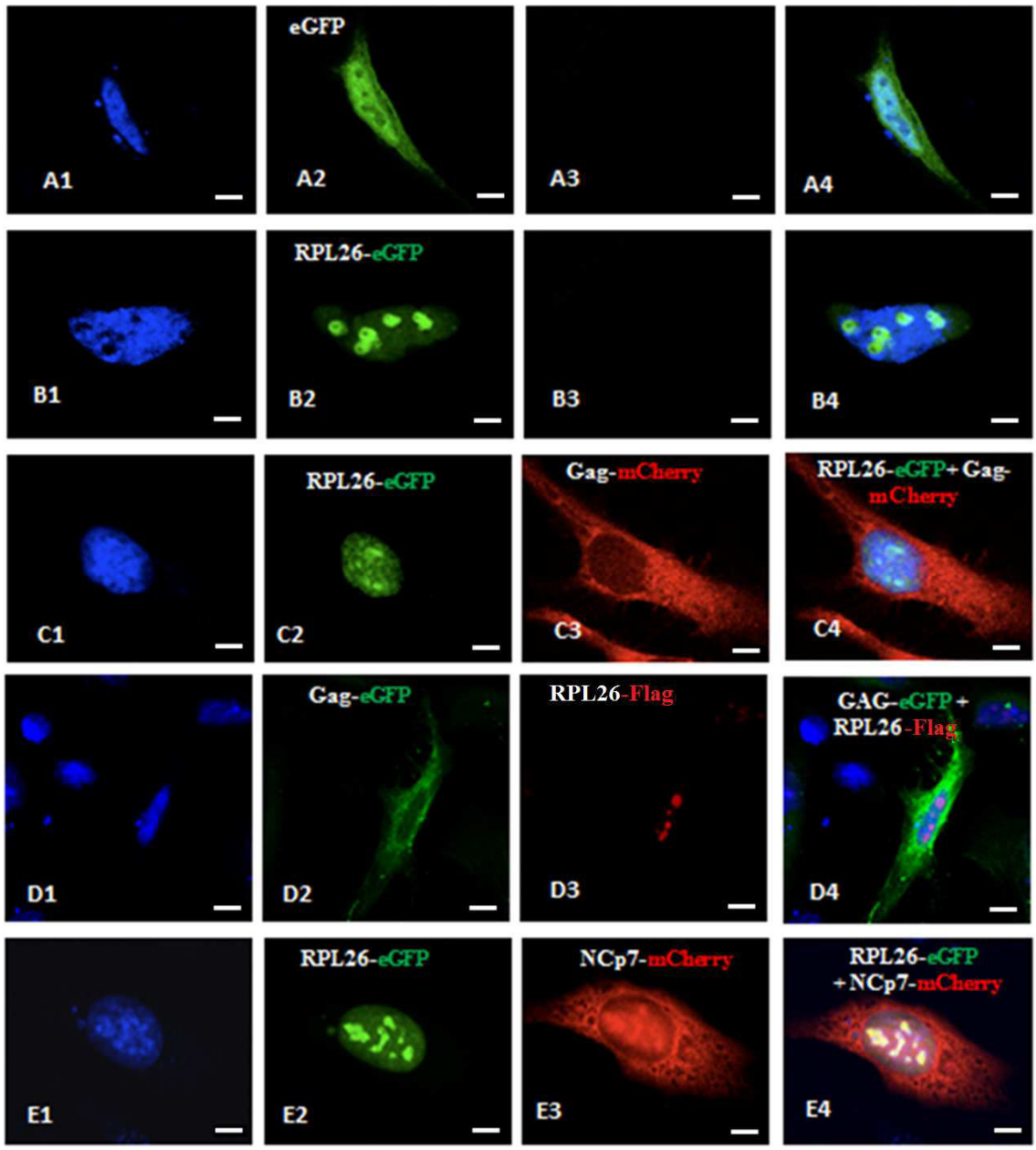

Figure 21 : Localisation dans les cellules Hela de l'eGFP, de la RPL26-eGFP, de Gag-eGFP, de Gag-mCherry, de la RPL26-flag, de la NCp7-mCherry.
2x105 cellules Hela sont transfectées avec 1µg de plasmides total exprimant l'eGFP seule (A2), la RPL26-eGFP (B2). D'autres cellules ont été co-transfectées dans les mêmes conditions par les couples RPL26-eGFP/Gag-mCherry (C2, C3), Gag-eGFP/RPL26-flag (D2, D3), RPL26-eGFP/NCp7-mCherry (E2, E3).
L'eGFP a une localisation diffuse dans la cellule et le noyau à l'exception du nucléole (A2 et A4). La RPL26-eGFP est localisé dans le noyau et plus spécifiquement dans le nucléole (B2, B4). La protéine Gag-mCherry est présente dans le cytoplasme (C3). La RPL26-flag se trouve dans les nucléoles (D3). On retrouve la NCp7-mCherry dans le cytoplasme et dans les nucléoles (E3). Les protéines RPL26-eGFP et Gag-mCherry ne se co-localisent pas (C4) ainsi que Gag-eGFP et RPL26-flag (D4). Les protéines RPL26-eGFP et Gag-mCherry (E4) co-localisent dans les nucléoles. Les échelles représentent 10 µm.

VII.2 Une colocalisation RPL26-eGFP et NCp7-mCherry correspond elle à une interaction?

Les cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides d'intérêt ont été observées après fixation au PFA 4% et la détermination du temps de vie de l'eGFP (seule ou en fusion avec nos protéines d'intérêt) a été réalisée 24 heures post-transfection. L'étude par FLIM des cellules HeLa exprimant l'eGFP et RPL26-eGFP a permis de déterminer un temps de vie τ moyen égal à 2,47 ns $\pm$ 0,01(Figure 22 A) et 2.43 ns $\pm$ 0,01 (Figure 22 B) respectivement.

Dans les cellules co-exprimant la RPL26-eGFP et la NCp7-mCherry, nous observons une diminution du temps de vie dans le nucléole à 2,23 ns $\pm$0.02 (Figure 22 C) qui correspond à un pourcentage moyen de FRET de 8,2 %. Ce pourcentage de FRET étant supérieur à 5%, nous pouvons en déduire que la protéine RPL26 interagit avec la protéine NCp7 au niveau des nucléoles.

Dans les cellules co-exprimant la RPL26-eGFP et la mCherry-NCp7, nous avons observé une plus faible diminution du temps de vie moyen, (2,33 ns $\pm$ 0,02, Figure 22 D) (Voir tableau 5) correspondant à un FRET de 5,7 %. Cette différence de temps de vie peut s'expliquer par la localisation N-terminale de la mCherry au niveau de la NCp7 dont sa conformation 3D peut être modifiée, influençant ainsi l'interaction entre RPL26 et la NCp7.

En définitive, ces premières analyses par FRET-FLIM permettent de conclure que la co-localisation nucléolaire de la NCp7 avec la RPL26 définit une interaction spécifique.

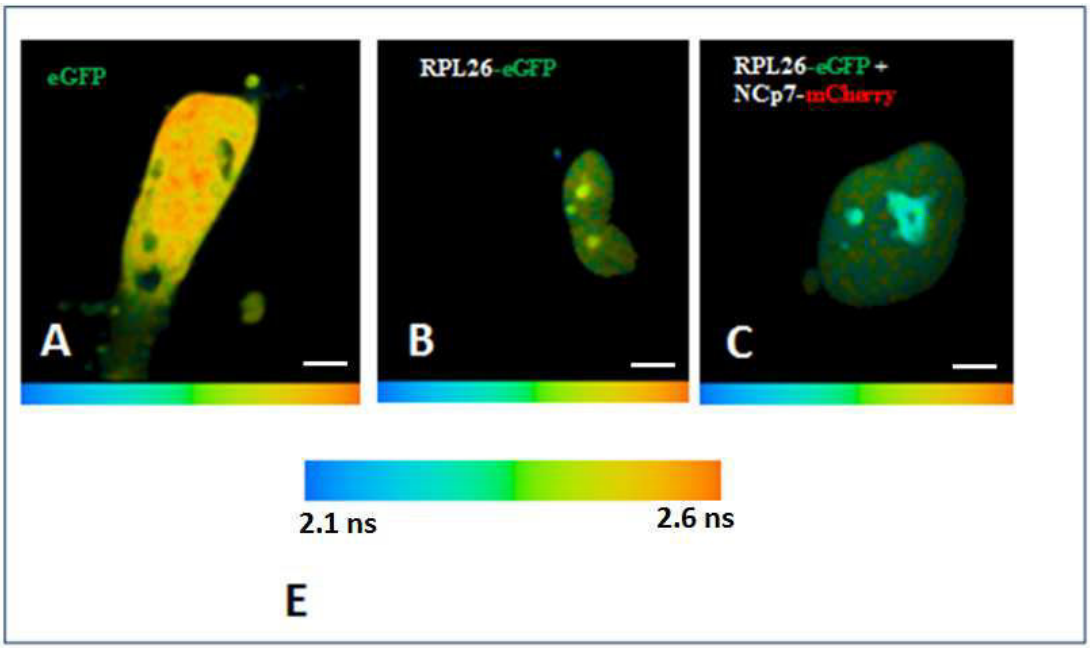

Figure 22 : Etude de l'interaction RPL26-NCp7 suivie par FRET-FLIM sur cellules HeLa.

3.10^5 cellules Hela ont été transfectées avec 3 µg de plasmides et les images de FLIM sont obtenues 24 heures post-transfection sur cellules vivantes. Cellules exprimant : l'eGFP (A), la RPL26-eGFP et la NCp7-mCherry (C), RPL26-eGFP et la mCherry-NCp7 (D).
Les figures A et B nous servent de témoins afin de voir si la RPL26-eGFP influence le temps de vie de l'eGFP. Il n'y a qu'un faible changement de couleur du jaune au vert clair montrant l'absence d'homoFRET.
Sur la figure C, la présence de bleu au niveau du nucléole nous montre que les protéines RPL26-eGFP et NCp7-mCherry interagissent. Le changement de couleur est moins important sur l'image D montrant que l'interaction est moins forte mais qu'il y a tout de même une diminution du temps de vie. Les échellles représentent 1µm.

	N	n	Temps de vie moyen	Pourcentage de FRET	Interaction
			τ(ns)	E(%)	
eGFP	3	16	2.46 (±0.01)	/	/
RPL26-eGFP		22	2.43 (±0.01)	/	/
RPL26-eGFP+NCp7-mCherry		40	2.23 (±0.02)	8.2	OUI
RPL26-eGFP + mCherry-NCp7	1	4	2.33 (±0.02)	5.7	Probable

Tableau 5 : les temps de vie (τ) de l'eGFP seule ou fusionné à Gag sont les valeurs moyennes de 16 à 40 cellules. L'efficacité de FRET (E) est relié à la distance entre les deux chromophores et calculé à partir du ratio du temps de vie en présence ou en absence de l'accepteur en utilisant l'équation (voir matériels et méthodes). Les valeurs de l'efficacité et du temps de vie de la cellule représentent les valeurs moyennes sur toute la cellule. 'N' correspond au nombre de fois ou la manipulation a été réalisée et 'n'au nombre de cellules analysées. Un pourcentage de FRET supérieur à 5% montre une interaction.

VIII. Interactions de Gag avec d'autres protéines ribosomiques

Nous avons voulu savoir si la protéine Gag pouvait précipiter l'intégralité ou du moins d'autres protéines ribosomiques. Nous avons débuté cette étude avec la protéine RPS14 car nous disposions au laboratoire d'anticorps dirigés contre cette protéine qui appartient à la petite sous-unité ribosomique 40S. Des expériences de coimmunoprécipitations ont été initiées (Figure 23). Dans cette figure, les protéines RPL7 et RPS14 sont détectées dans tous les puits de la colonne 'input' (Figure 23 b, c puits 1, 2, 3) et la quantité de protéine déposée est identique comme l'indique la GAPDH (Figure 23 d puits 1, 2, 3) alors que Gag est uniquement présent dans les cellules transfectées avec le plasmide codant la protéine virale (Figure 23 a', puits 3). Lorsque Gag est immunoprécipitée (Figure 23 a', puits 6), il entraîne la protéine RPL7 (Figure 23 b', puits 6) comme montré précédemment (Figure 1, puits 6). Cependant, l'utilisation d'un anticorps anti-RPS14 ne permet pas la détection de la protéine RPS14 dans le puits contenant les deux protéines Gag et RPL7 (Figure 23 c', puits 6).

Nous avons testé l'interaction de Gag avec une autre protéine ribosomique de la même sous-unité 40S, RPS7, partenaire d'interaction connu de la RPL7 (476). La membrane (a-a'') a été incubé avec un anticorps anti- RPS7, de même aucun signal n'a été detecté (Figure 23, d'puits 6).

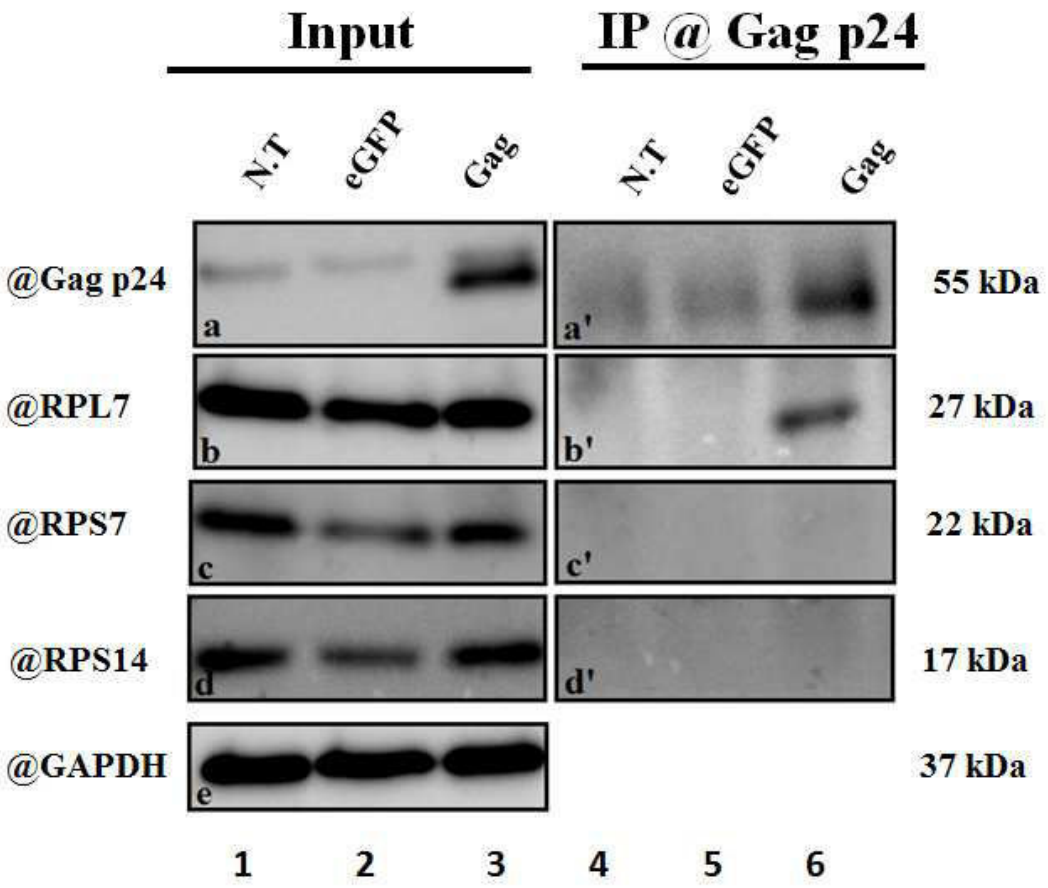

Figure 23 : Interaction de la RPL7 RPS14 et RPS7avec Gag
Les cellules HeLa ont été transfectées avec 2 µg de plasmides codant Gag et, 48h post-transfection, les protéines totales sont extraites et incubées avec des billes-protéine A et l'anticorps anti-Gag p24. Puits 1: cellules non transfectées. Puits 2 : cellules transfectées avec de l'eGFP. Puits 3 : cellules transfectées avec Gag.
'La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a-a'), avec un anti-RPL7 (b-b') ou avec un anti-RPS14 (c-c'). 'Input' : membrane a montrant l'expression de Gag (puits 3) ; membrane b montrant l'expression de la protéine cellulaire RPL7 dans tous les puits (1, 2,3) ; membrane c montrant l'expression de RPS14 une autre protéine cellulaire (puits 1, 2,3). IP : immunoprécipitation de Gag (membrane a'puits 6). Dans la membrane c', pas de co-immunoprécipitation avec la RPS14 (puits 3), mais avec la RPL7 (membrane b', puits 3). Un anticorps dirigé contre la GAPDH permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits (membrane d).

En conclusion, la protéine Gag interagit avec la RPL7- RPL26 toutes deux appartenant à la sous-unité 60S du ribosome mais aucune co-IP n'a pu être observée laissant suggérer que Gag interagit plus particulièrement avec les protéines de la grande sous-unité.

IX. Incorporation de la protéine RPL7 et de RPL26 dans les virions

Après avoir établi qu'une interaction directe existe entre Gag, RPL7 et la RPL26 dans différents systèmes cellulaires nous avons testé si les protéines RPL7 et RPL26 sont incorporées dans les particules virales du VIH-1. Afin de montrer que les protéines cellulaires (RPL7 et RPL26) ont été incorporées, les particules virales ont été produites et purifiées à partir des cellules 293T transfectées par des plasmides (possédant le backbone Bal) puis analysées par western blot. Comme contrôl de la présence des différentes protéines, nous avons analysé des cellules CEM-SS infectées ou non infectées et démontré que les protéines cellulaires RPL7 et RPL26 sont présentes dans les deux types de populations (Figue 24 b-c, puits 1 et 2). La p24 n'a été détectée que dans les cellules infectées (Figure 24, puits 2). Les virus produits puis purifiés, ont été soumis à la même analyse par western blot et permis de confirmer la présence de p24 ainsi que des protéines cellulaires démontrant leur incorporation dans la particule virale populations (Figue 24 a-b-c, puits 3). Aucun signal ou très faible n'a été détecté dans le surnageant après purification des virions (Figure 24 a-b-c puits 4).

Ces résultats indiquent que les protéines RPL7 et RPL26 sont incorporées dans les virions.

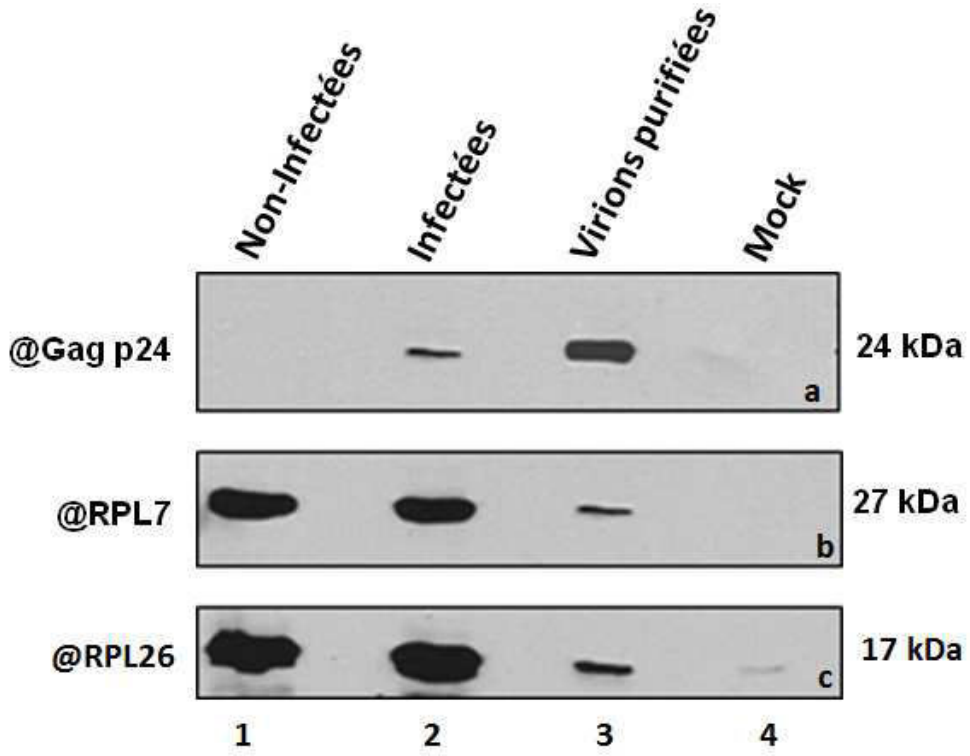

Figure 24 : Incorporation des protéines cellulaires dans les virions.

Des cellules 293T ont été infectées avec du VIH Lai CXCR4. 96 heures post-infection, les protéines totales sont extraites, et les particules virales produites à partir de ces cellules sont purifiées puis analysées par western blot. Pistes 1 : cellules non infectées, piste 2 : cellules infectées, piste 3 : virions purifiées, piste 4 : mock (surnageant après purification des virions).
Les membranes ont été révélées par un anti-Gag p24 (a), un anti-RPL7 (b), un anti-RPL26 (c).Dans les cellules non transfectées, les protéines cellulaires RPL7 et RPL26 sont détectées (puits 1). Aprèsinfection, Gag est également détectée (puits 2). Gag, RPL7 et RPL26 ont été détectées dans les virons purifiés (puits 3). Après purification des virions, aucune protéine n'a été détectée dans le surnageant (puits 4).

X. Caractérisation de l'interaction Gag-RPL7 et Gag-RPL26 en contexte viral

X.1. Interaction de Gag avec la RPL7 et la RPL26 dans des cellules CEM-SS infectées par co-immunoprécipitation

Les premières expériences montrant l'interaction Gag-RPL7 et Gag-RPL26 dans un contexte cellulaire ont été réalisées dans des cellules HeLa transfectées avec des plasmides exprimant Gag ou NCp7 sous le contrôle de promoteur fort CMV (cytomégalovirus). Ces expériences réalisées

dans un contexte de surexpression de Gag dans un système de cellules modèles HeLa, demandent à être confirmées dans des cellules infectées.

Dans ce but, des lignées cellulaires CEM-SS ont été infectées par le VIH_{LAI} (souche CXCR4) et l'interaction Gag-RPL7 et Gag-RPL26 a été analysée par co-IP. Les travaux d'infections ont été réalisés dans le laboratoire du Dr.Christiane Moog (INSERM U1110) par Dr.Marina Biedma. Quatre jours post infection, nous détectons 45% de cellules infectées par marquage intracellulaire de la protéine de capside, analysé par cytométrie en flux (non montrés). Ces cellules ont été lysées (tampon Tris-NaCl-NP40) et les protéines virales contenant la p24 a été immunoprécipitées avec un anti-Gag p24. La révélation par un anticorps anti-RPL7 ou un anti-RPL26 permet la détection des protéines cellulaires dans les cellules infectées et non infectées (Figure 25 A b, c, puits 1 et 2). La p24 est retrouvée sous différentes formes matures p55 (Gag), p41 et p24. Après immunoprécipitation de Gag, la RPL7 et la RPL26 sont détectées uniquement dans les cellules infectées (Figure 25 A b', c' puits 4). L'échantillon du puits 4 est en parallèle testé par un anti-Gag p24 qui détecte uniquement cette protéine virale dans les cellules infectées (Figure 25 A, puits 2 et 4). La présence simultanée de p24, p55, RPL7, et RPL26 montre que les protéines cellulaires RPL7 et RPL26 ont été co-immunoprécipitées par la protéine Gag dans les CEM-SS infectées par VIH-Lai (Figure 25 A, puits 4). Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le domaine p24 de Gag et/ou si la p24 mature interagisse aussi avec la RPL7 endogène.

Nous n'avons pas pu démontrer une co-IP de Gag par la RPL7 fixée sur des billes couplées à l'anti-RPL7 car comme expliqué précédemment (Voir paragraphe I.2), l'anti-RPL7 n'a jamais permis l'IP de la RPL7 endogène sur les billes. Par contre, nous avons pu immunoprécipiter la RPL26 sur des billes couplées à des anticorps anti-RPL26, qui a permis la co-IP de Gag confirmant l'interaction spécifique entre Gag et RPL26 (non montré).

Ces résultats montrent que l'interaction Gag-RPL7 et Gag-RPL26 est effective dans un contexte de cycle réplicatif infectieux.

X.1.1. L'interaction Gag est-elle spécifique des protéines de la grande-sous unité ribosomiques 60S?

Afin de tester d'autres protéines ribosomiques dans un contexte viral, nous avons testé l'interaction de Gag avec la protéine ribosomique de la petite sous-unité 40S, RPS7. La membrane (d-d') a été lavée et ré-incubée en présence d'anticorps anti-RPS7. De manière similaire aux résultats obtenues hors contexte virale, aucune co-IP de la RPS7 n'a pu être détectée (Figure 25B, puits 4)

On en déduit que Gag pourrait interagir plus spécifiquement avec des protéines de la grande sous-unité ribosomique 60S.

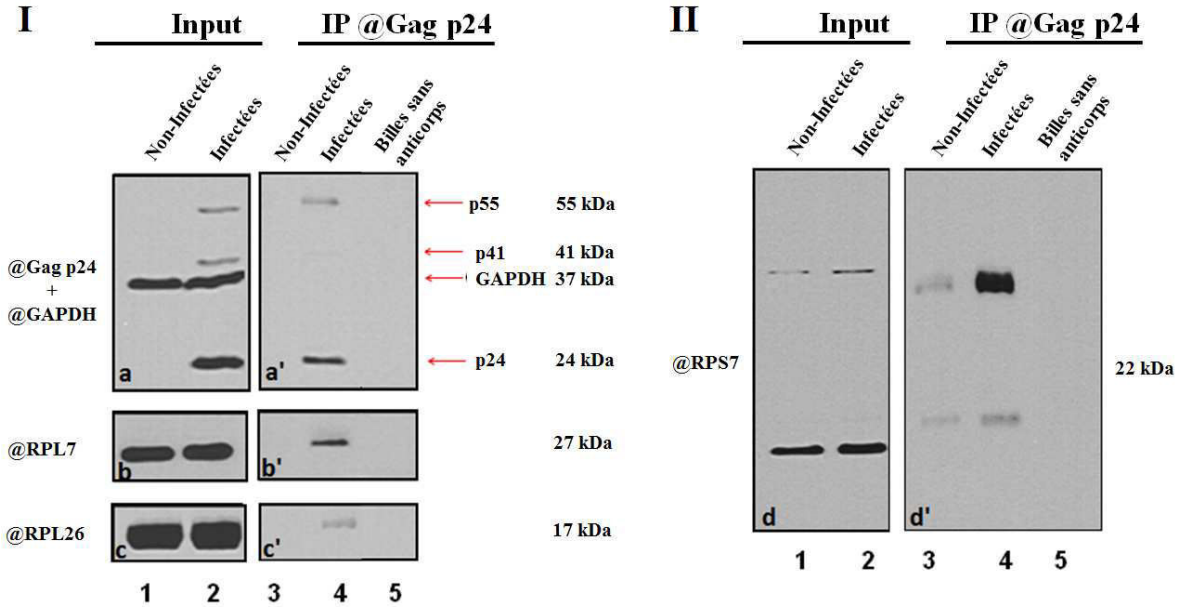

Figure 25 A : Interaction Gag-RPL7 et Gag-RPL26 dans des cellules CEMSS.

Des cellules CEMSS ont été infectées avec du VIH Lai CXCR4 et, 96 heures post infection, les protéines totales sont extraites, incubées avec des billes magnétiques-protéine A et l'anticorps anti-Gagp24.
'Input' : puits 1 et 2, protéines totales avant immunoprécipitaion. 'IP' puits 4 et 5 protéines après immunoprécipitation. La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a, a') et incubée avec un anti-GAPDH (a), un anti-RPL7 (b, b'), un anti-RPL26 (c, c'). La révélation de la membrane par un anti-Gag p24 montre la détection de Gag (p55) et de ses produits de clivage (p41, p24) (membrane a, puits 2) ainsi l'immuno-précipitation de Gag et de p24 (membrane a', puits 5). La révélation de la membrane (b) et (c) respectivement par un anti-RPL7 et un anti-RPL26 montre la détection de ces 2 protéines dans les cellules non infectées et infectées dans l'input (puits 1 et 2). La présence simultanée de la RPL7, de la RPL26 et de Gag dans le même puits 4 montre une co-immunoprécipitation de la RPL7 et de la RPL26 avec Gag.

Figure 25 B : La membrane (d-d') est détectée par un anti-RPS7. Dans l'input, la protéine cellulaire se trouve dans les 2 puits (1 et 2). L'absence de la RPS7 dans le puits 4 montre que cette protéine ne co-immunoprécipite pas avec Gag.

X.1.2. Interaction Gag-RPL7 confirmée dans des cellules PBL

Pour confirmer l'interaction Gag-RPL7 en contexte virale, nous avons choisi d'infecter des cellules primaires. Pour cela, des cellules PBL ont été infectées par la souche virale VIH^{LAI}, lysées puis les protéines virales sont immunoprécipitées avec un anti-Gag p24. La membrane (a) incubée avec un anticorps anti-Gag p24 montre une faible bande de p55 (Gag) dans les cellules infectées (Figure 26, a puits 2). Bien que le bruit de fond de la membrane (a') soit élevé, des bandes correspondantes à p55 (Gag) et p24 ont été détectées (Figure 26, a' puits 5). La révélation par un anti-RPL7 permet la détection de la protéine cellulaire dans les cellules infectées et non infectées de 'l'input' (Figure 26, b puits 1 et 2). Nous avons observé que la RPL7 a été co-immunoprécipitée avec p55 (Gag) et p24 uniquement dans les cellules infectées (Figure 26 b', puits 5). **Ces résultats ont montré la validité de l'interaction dans des cellules primaires infectées**.

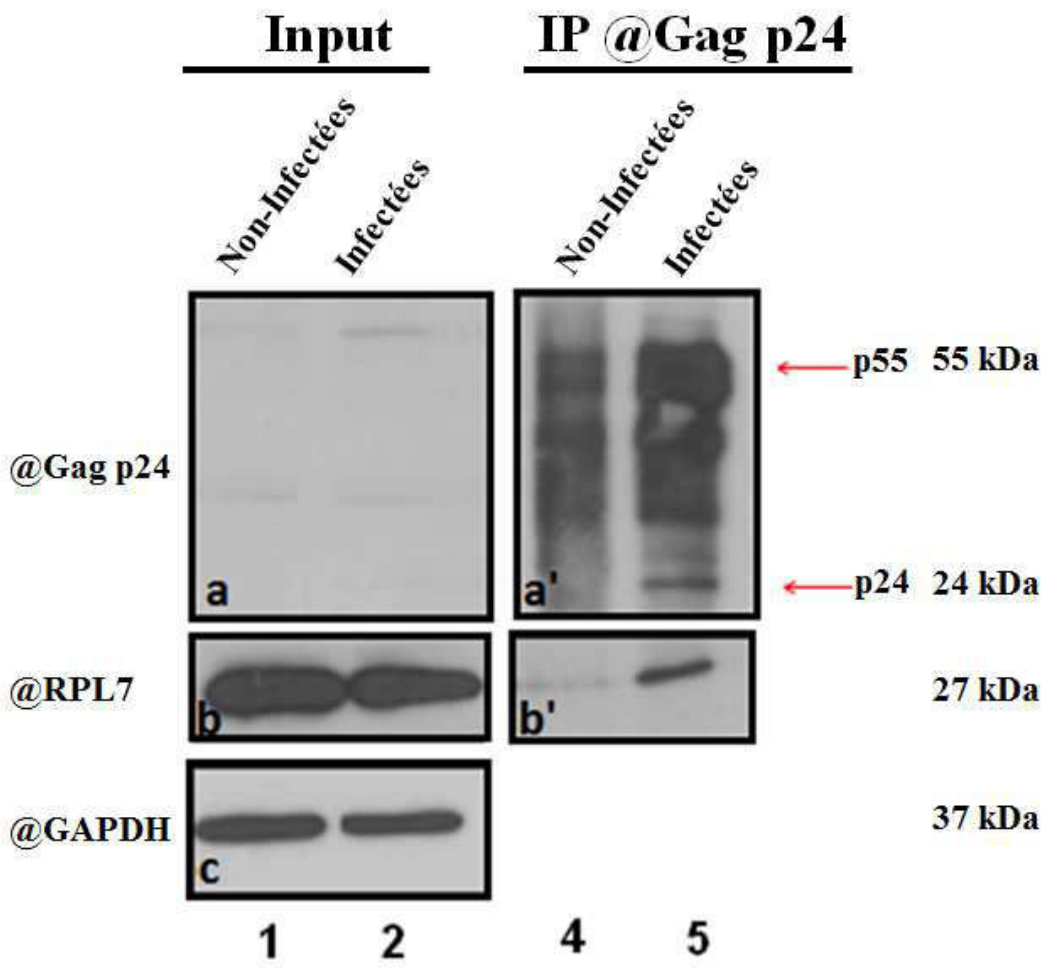

Figure 26: Interaction Gag-RPL7 dans des cellules PBL.
Des cellules PBL ont été infectées avec du VIH Lai CXCR4 et, 96 heures post infection, les protéines totales sont extraites, incubées avec des billes magnétiques-protéine A et l'anticorps anti-Gag p24.
'Input' : puits 1 et 2, protéines totales avant immunoprécipitaion. 'IP' puits 4 et 5 protéines après immunoprécipitation. La membrane est incubée avec un anti-Gag p24 (a-a'), un anti-RPL7 (b-b'), un anti-nucléoline (c-c'). La révélation de la membrane (b) par un anti-RPL7 montre la présence de la protéine cellulaire dans les puits (1 et 2). La présence simultanée de Gag et de la RPL7 dans le puits 4 montre une co-immunoprécipitations de la RPL7 avec Gag (puits 5).

X.2. Interaction de Gag avec la RPL7 et la RPL26 dans des cellules CEM-SS infectées par imagerie

Afin de poursuivre la caractérisation des interactions Gag-RPL7 et Gag RPL26 toujours en contexte viral, une étude de la localisation des protéines cellulaires et virales par imagerie des différents partenaires était nécessaire. Des cellules CEMSS ont été infectées par le virus SF162, et les protéines RPL7 et Gag ont été détéctées par leurs anticorps respectifs. Cependant, comme

mentionné ci-dessus avec les cellules HeLa, l'anti RPL7 n'a pas permis de détecter la protéine. Sachant que les résultats de co-IP de la RPL26 obtenus montrent une grande similitude avec celles de la RPL7, nous avons poursuivi notre étude avec un anti-RPL26 qui sera détecté par un anti-alexa568 et un anti-p24-FITC dans cellules non infectées et infectées (Figure 27). Dans des CEM-SS non infectées, nous n'avons détecté que la RPL26 dans le cytoplasme (Figure 27 A). Après l'infection des CEM-SS par le virus SF162, ces cellules deviennent plus grandes formant des syncytiums (Figure 27 B, D) et **une colocalisation est observée entre les deux protéines traduite par la couleur jaune** (Figure 27 B4).

A titre de contrôle, pour montrer que la localisation de p24 est cytoplasmique nous avons choisi de tester la protéine nucléoline qui se localise particulièrement dans les nucléoles. Comme prévue, aucune co-localisation n'a été observée de ces 2 protéines (Figure 27 D4).

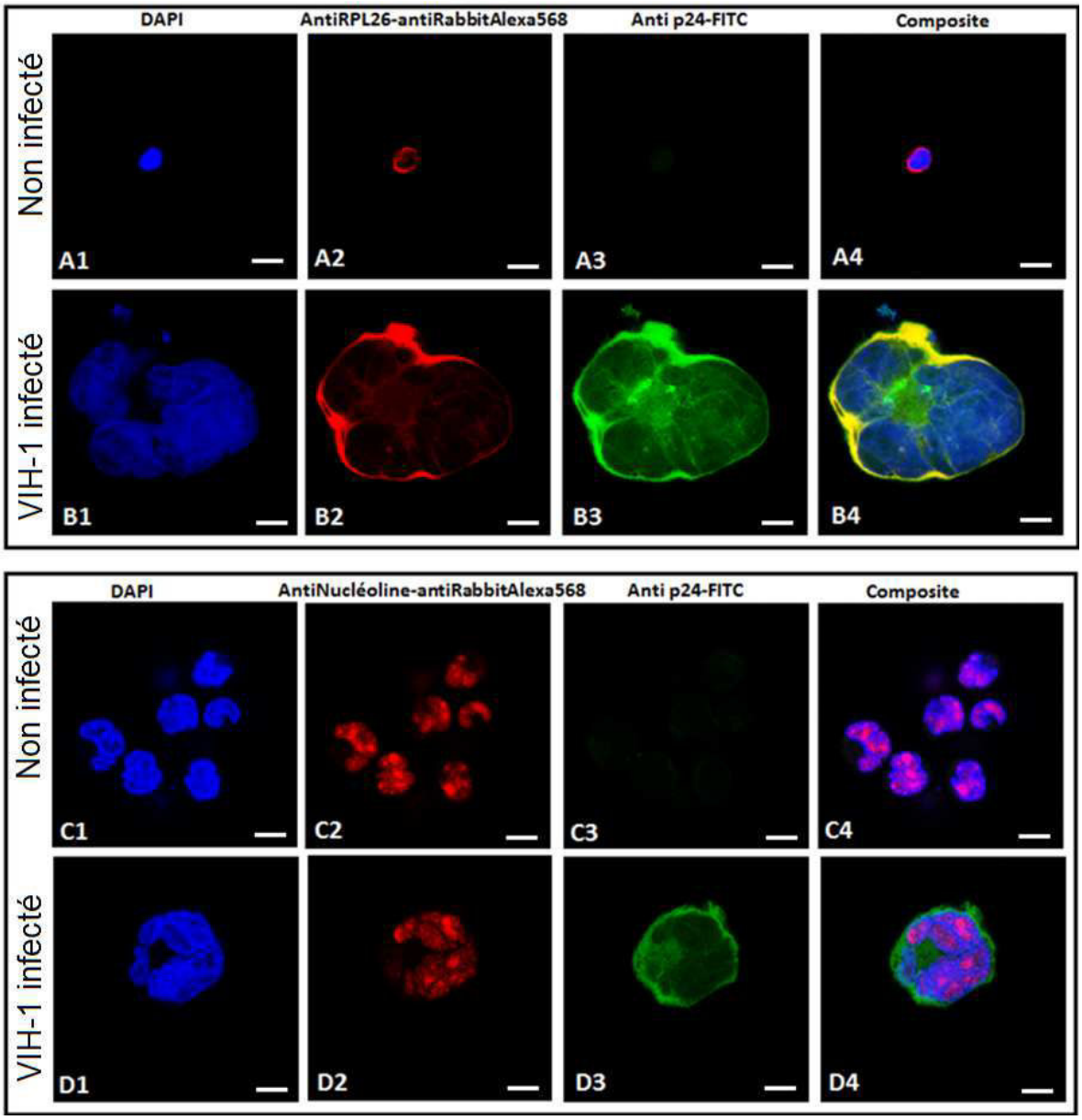

Figure 27 : Localisation de la RPL26 et de p24 dans des cellules CEMSS infectées.
Des cellules CEMSS ont été infectées avec du VIH Sf162 et, 96 heures post infection, les protéines sont détectées anti-RPL26-alexa568 (A2, B2) et anti-p24 FITC (A3, B3, C3, D3), anti-nucléoline (C2, D2). Leur localisation a été observée par microscopie confocal.
Dans les cellules non infectées, la RPL26 a une localisation cytoplasmique (A2, A4). Une colocalisation a été observée dans les cellules infectées entre p24 et la RPL26 comme le montre la couleur jaune (figure B4 composite).
Dans les cellules non infectées, la nucléoline se trouve dans le noyau et dans les nucléoles (C2, C4). Aucune colocalisation n'a été observée dans les cellules infectées entre p24 et la nucléoline. Les échelles représentent 10 µm.

XI. Aspect fonctionnel de l'interaction Gag-RPL7

XI.1. Effet de Gag sur la localisation de RPL7

Après sa traduction, la protéine Gag s'accumule dans le cytoplasme et s'assemble au niveau de la membrane cellulaire. La protéine RPL7 endogène est retrouvée dans les nucléoles ainsi que dans le noyau et dans le cytoplasme où on doit la trouver sous forme soluble ou associée au ribosome (Figure 28 b, les deux cellules sont délimitées). On doit souligner ici que plusieurs fois nous avons mentionné ci-dessus que l'anti-RPL7 ne permettait pas la détection de la RPL7 dans les cellules. Cependant, les premiers lots d'anti-RPL7 commandés au début du projet le permettait.

Pour savoir si la localisation de la RPL7 endogène est influencée par la présence de Gag, nous avons co-transfecté un mélange de vecteurs exprimant Gag et Gag-eGFP (3/1) et nous avons immunodétecté la RPL7 par un anti-RPL7 qui est détecté par alexa-568 puis comparé entre les cellules transfectées exprimant Gag et ceux non transfectées.

Dans les cellules non transfectées, nous avons eu 89.8% des cellules qui possèdent leur RPL7 endogène dans les nucléoles (Figure 28 a, les deux cellules délimitées). Par contre, dans les cellules transfectées avec le mélange Gag/GageGFP, nous n'en avons eu que 32.4%. Dans la figure 28 a, nous avons entouré par une ligne blanche deux cellules situées à gauche qui n'expriment pas Gag (contrôle interne) et nous constatons que la RPL7 s'accumule dans les nucléoles. Inversement, dans les deux cellules situées à droite de cette image a, un marquage plus diffus est observé au niveau du noyau où les nucléoles ne sont plus distinguées du reste du nucléoplasme. Or, ces mêmes cellules expriment la protéine Gag comme le montre la figure 28 b (cellules non délimitées). Ces deux figures a et b sont représentatives du phénotype observé. Comme témoin, les expériences de l'eGFP, mCherry, Vpr et hCG 1, ne modifient pas la localisation nucléolaire de la RPL7 (non montré).

Ces résultats suggèrent que l'interaction avec Gag pourrait influencer la localisation de la RPL7 aux niveaux du noyau et plus particulièrement du nucléole. On peut émettre l'hypothèse d'une séquestration de la RPL7 dans le cytoplasme mais cela nécessitent des expériences complémentaires.

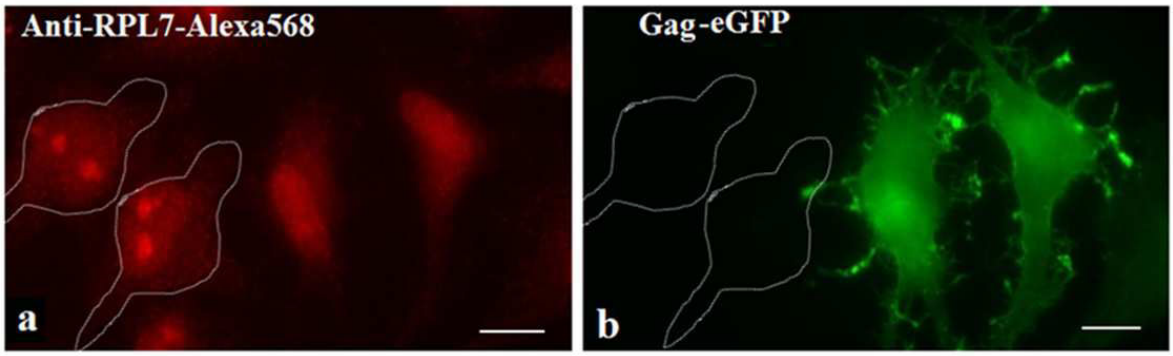

Figure 28 : Gag influence la localisation cellulaire de la RPL7

Les cellules sont transfectées par un mélange de plasmides experimant Gag/GagMA-eGFP puis la RPL7 est détectée par immunofluorescence (IF).
a : Fluorescence de l'eGFP du mélange Gag/Gag-eGFP ; b : RPL7 détectée par IF avec un anti-RPL7.
Les pointillés blancs de l'image a délimitent des cellules non transfectées avec un marquage important des nucléoles. On note dans les deux autres cellules de cette image ont une absence de marquage significatif des nucléoles. L'image 'a' montre que ces deux cellules expriment la protéine Gag. Les échelles représentent 10 µm.

Est-ce que Gag qui par nature s'assemble et se dirige vers la membrane plasmique entrainerait la RPL7 à la périphérie de la cellule jusqu'à son encapsidation ? (comme le montre nos expériences figure 28). Nous n'avons pas pu déchiffrer cela durant ma thèse.

XI.2 Résultats préliminaires montrant l'effet des interactions GagNCp7-RPL7 sur la réplication du VIH-1.

Dans le but d'étudier l'effet de l'interaction Gag-RPL7/RPL26 sur la réplication du virus, 2 stratégies sont en cours de développement :

- La première stratégie repose sur la surexpression de la RPL7 en transfectant transitoirement les plasmides RPL7-eGFP, Flag-RPL7.
- La seconde stratégie se base sur la diminution de l'expression de la RPL7 en utilisant des siRNA dirigés contre la RPL7.

Ces 2 stratégies nous permettent d'étudier l'effet de la surexpression ou de la sous-expression des protéines cellulaires RPL7 sur la production virale dans des cellules 293T.

XI.2.1 Sur-expression de la RPL7

Dans la première stratégie, nous avons surexprimé la RPL7 en transfectant des plasmides exprimant la RPL7-eGFP, Flag-RPL7 dans des cellules 293T. Afin de suivre l'évolution dans le temps de la surexpression des protéines, un western blot a été réalisé sur des échantillons prélevés à 24 et 48 heures post-transfection.

Dans la figure 29 A, nous avons détecté par un anti-RPL7, la RPL7 endogène et la RPL7 surexprimée. La même intensité de signal correspondante à l'expression de la RPL7 endogène est observée à 24 et 48 heures dans tous les échantillons (Figure 29, puits 1 à 8), car c'est une protéine cellulaire endogène. Par ce même anticorps, nous avons détecté une augmentation de la surexpression de la RPL7-eGFP correspondante à 4 et 7% respectivement à 24 et 48h post-transfection comparée à l'expression de la RPL7 endogène. De même, nous étions capables de détecter par cet anticorps une surexpression de la Flag-RPL7- correspondante à 18%, et 42% respectivement après 24 et 48 h post-transfection. Afin de confirmer la détection de la RPL7-eGFP et de la Flag RPL7, des westerns blots utilisant un anti-eGFP et un anti-Flag ont été aussi réalisés et une détection plus importante de ces protéines surexprimées a été observée.

En comparant les résultats, nous avons constaté que la surexpression de la RPL7 varie en fonction du temps et de la construction utilisée.

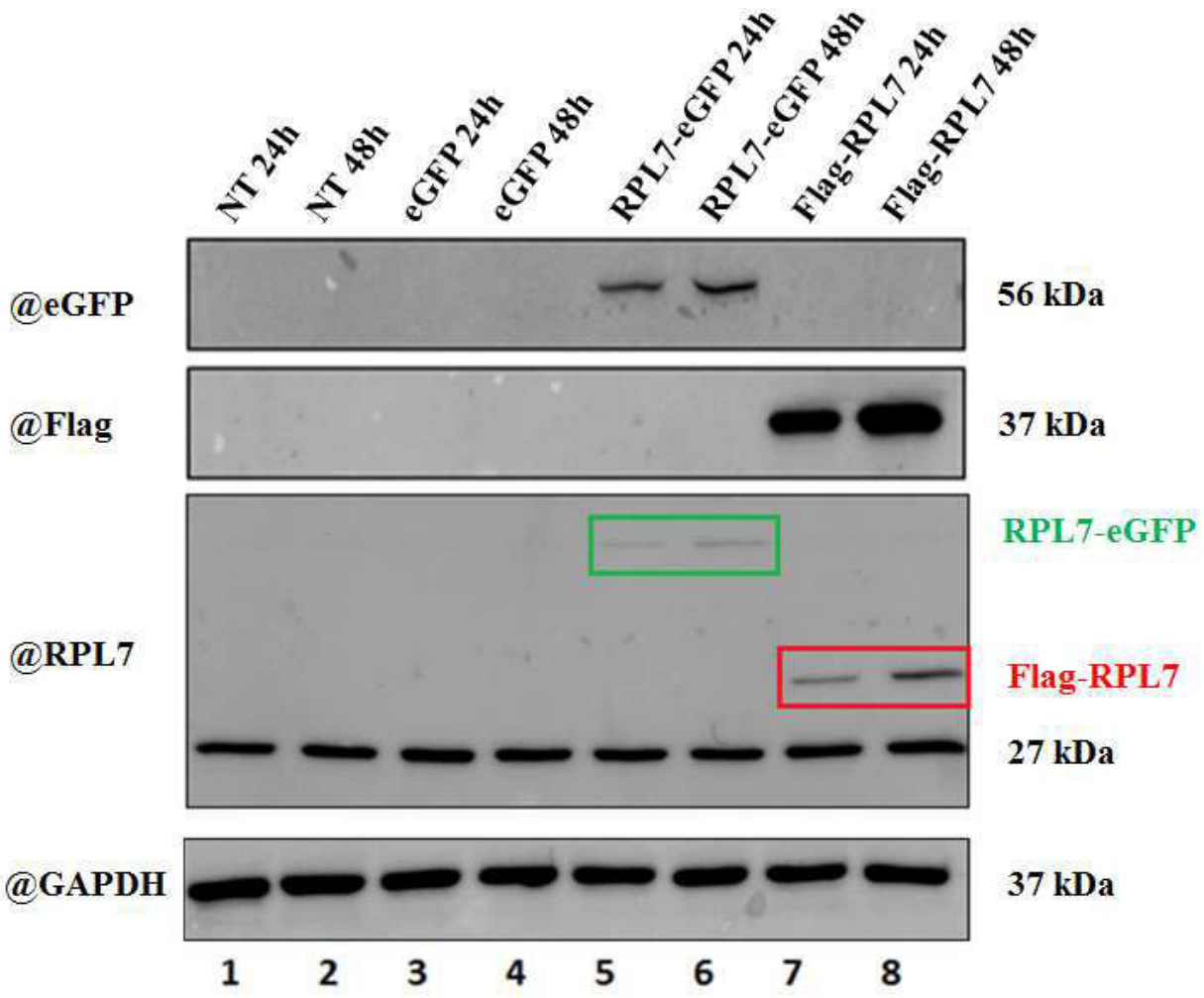

Figure 29 : Analyse par western blot de la surexpression de RPL7-eGFP et de Flag-RPL7 dans les cellules 293T au cours du temps.
Les cellules 293T ont été transfectées par 2µg de plasmides RPL7-eGFP et de Flag-RPL7. Les protéines totales sont récupérées à 1 et 2 jours post-transfection. Puits 1et 2 : protéines totales issues de cellules non-transfectées ; pistes 2,3 : cellules transfectées avec de l'eGFP ; puits 4,5 : cellules transfectées avec de la RPL7-eGFP ; puits 7, 8 : cellules transfectées avec de la Flag-RPL7.
Les membranes ont été révélées avec un anticorps (a) anti-RPL7, (b) anti-flag, (c) anti-eGFP. Dans la membrane (a), la RPL7 endogène a été détectée dans tous les puits (1 à 8) aussi la RPL7-flag (puits 7,8). Dans la membrane (b), l'intensité du signal de la Flag-RPL7 est moins importante à 24h (puits 7) que celle obtenue à 48h (puits 8). La même chose est observée pour la RPL7-eGFP dans la membrane (c) (puits 5,6). Un anticorps dirigé contre la GAPDH permet de confirmer le dépôt de la même quantité de protéines dans tous les puits

XI.2.2. Sous-expression de la RPL7

Dans un premier temps, nous avons transfecté transitoirement des siRNA (siRPL7) dans des cellules 293T et nous avons évalué la quantité de protéine RPL7 après 24 et 48 heures post-transfection.

Le western blot, révélé par un anti-RPL7, montre une diminution de l'expression de la RPL7 (Figure 30, puits 5 et 6). Une déplétion de la RPL7 de 35 à 45% a été observée 24 et 48 heures post-transfection respectivement comparée aux cellules transfectées par des sicontrôles (Figure 30, puits 3 et 4).

Par ailleurs, cette diminution est spécifique des siRNA car l'expression de la GADPH n'est quant à elle pas affectée.

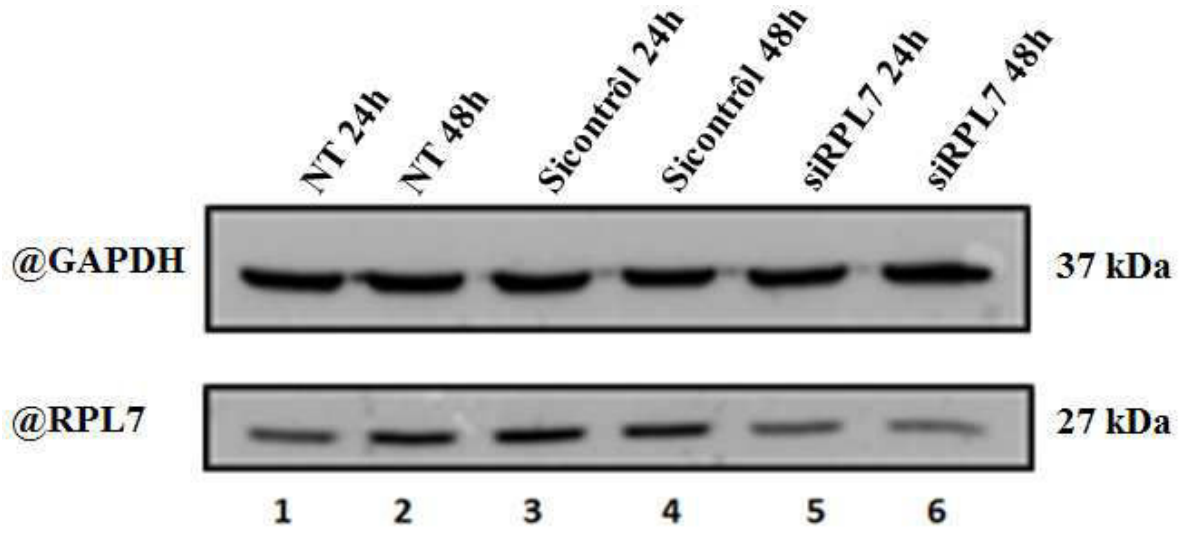

Figure 30 : Analyse par western blot de la sous-expression de la RPL7 dans des cellules 239T après 24 et 48 heures post-transfection.
4.10^5 cellules 293T ont été transfectées avec des sicontrôles et des siRPL7 (50nmole siRNA, Dharmacon). Les protéines totales sont récupérées 24 et 48 heures post-transfection. Les membranes ont été révélées avec un anticorps anti-RPL7 et anti-GAPDH. En révélant la membrane avec un anti-RPL7, l'intensité du signal de la RPL7 est diminuée en présence des siRPL7 à 24 heures (puits 5) ainsi qu'à 48 heures (puits 6).

XI.2.3. Effet de la surexpression et de la sous-expression de la protéine RPL7 sur la cytotoxicité

Des études de FACS (fluorescence activated cell sorting) sur des cellules 293T exprimant Flag-RPL7 ou siRPL7 ont été réalisées, afin de vérifier si une surexpression ou une sous-expression

de la RPL7 pourrait induire une toxicité cellulaire. L'apoptose a été mesurée par l'annexin-V fusionné au chromophore FITC (FITC Annexin-V) et la nécrose (ou les étapes tardives de l'apoptose) à l'iodure de propidium (PI) (Figure 31). Ainsi, les cellules PI et FITC Annexin-V négative (a) sont des cellules viables, les cellules FITC Annexin-V positive et PI négative (b) sont en phase précoce d'apoptose et possédant des membranes intactes, les cellules PI positive et FITC Annexin-V négative (c) sont en phase tardive d'apoptose et qui ont perdu leur membrane, les cellules PI et FITC Annexin-V positives (d) sont en nécrose.

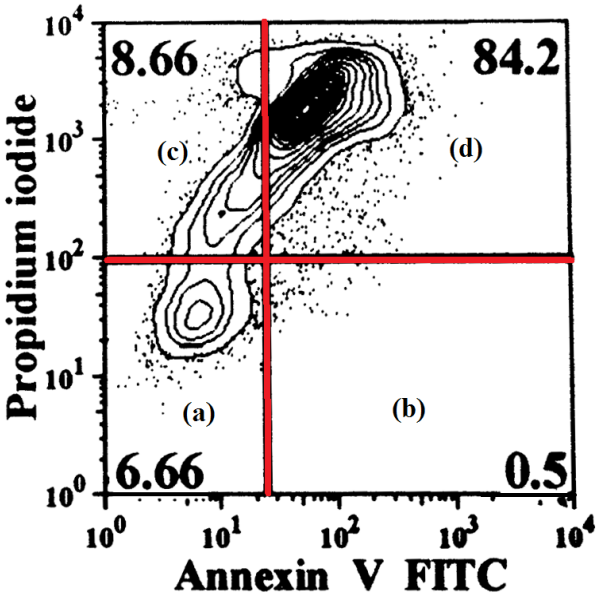

Figure 31 : Représentation schématique du test d'apoptose dans des cellules 293T

Nous avons donc utilisé ce test sur des cellules 293T exprimant Flag-RPL7 et siRPL7 afin de pouvoir comparer le nombre de cellules dans différents phases d'apoptose (Tableau 6).

Overexpression				
	cellules viables (%)	**phase précoce d'apoptose (%)**	**phase tardive d'apoptose (%)**	**Phase nécrotique (%)**
Flag-RPL7 (24h)	76.6	16.9	3.18	3.3
Flag-RPL7 (48h)	75.4	15.9	4.87	3.8
siRNA				
siRPL7 (48h)	86	5.27	3.07	5.67
Contrôl				
Doxorubicine	6.66	0.5	8.66	84.2

Tableau 6: Résultats de FACS montrant le pourcentage de cellules dans différents phases apoptotiques.
Ce tableau montre le pourcentage des cellules dans différents phases apoptotiques surexprimant la Flag-RPL7, et siRPL7. Le doxorubicine est utilisé à une concentration de 0.5 µM comme contrôl positif.

Les résultats ont montré que les cellules sur-exprimant la Flag-RPL7 n'induisaient pas l'apoptose 24 et 48 heures post-transfection comme le montre respectivement le faible pourcentage des cellules en phase tardive d'apoptose (3.18 et 4.87%) ainsi qu'en phase nécrotique (3.3 et 3.8%) (Voir tableau 6). Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons observé en western blot (Figure 31, puits 7 et 8). Dans le cas de la sous-expression de la RPL7, les résultats de FACS ont montré qu'il n'y pas une induction d'apoptose montrées par le pourcentage élevé des cellules viables de 86% (pour siRPL7).

XII.3. Effet de la surexpression de la RPL7 sur la production virale dans des cellules 293T

Dans le but de comprendre le rôle de la protéine RPL7 dans le cycle de réplication du VIH-1, nous avons produit de pseudovirus du VIH-1 en présence de différentes quantités de RPL7. Pour cela, nous avons co-transfecté la lignée cellulaire 293T avec un plasmide exprimant les protéines virales à l'exception de la protéine d'enveloppe gp120 (symbolisé par BB ou BackBone) et un plasmide exprimant la gp120 du virus VIH-1 QHO en présence de différentes quantités de plasmide codant RPL7-eGFP.

Le rendement de la transfection de RPL7-eGFP ainsi que la quantité de p24 dans les cellules productrices et dans le surnageant sont déterminées par cytométrie et ELISA 48 heures post-transfection, comme représentés dans la figure 32 I, II, III.

L'histogramme de la Figure 32 I montre le pourcentage de cellules 293T exprimant l'eGFP (en l'occurrence exprimant la RPL7-eGFP). Les quatre premières colonnes sont des contrôles avec le BB seul (colonne blanche), BB avec 200ng de pCI-neo (colonne orange), utilisée comme contrôl négative, 200ng de RPL7-eGFP (colonne verte) ou BB avec gp120 (colonne grise). Seul le troisième contrôl permet l'obtention d'un signal d'eGFP (20% de cellules eGFP positives). Ce résultat est normal car seul cet échantillon exprime la RPL7-eGFP. Puis le pseudovirus (BB plus gp120) a été produit en présence de quantités croissantes de pCI-neo ou de RPL7-eGFP. Seules les transfections possédant la RPL7-eGFP sont détectées par cytométrie en flux et le nombre de cellules eGFP positives augmente (5, 7.5, 10, 15%) respectivement de manière proportionnelle à la quantité de plasmide exprimant la RPL7-eGFP (12.5, 25, 50, 100, 200 ng) (colonnes oranges) jusqu'à un plateau. Cependant, dans cette expérience, la quantité de plasmide finale varie de 12.5 à 200 ng de plasmides codant la RPL7-eGFP. Ces transfections ont donc été répétées (colonnes violettes) mais en normalisant la quantité totale de plasmide transfectée à 200ng avec du pCI-neo (c.à.d transfecté comme précédemment avec une quantité croissante de RPL7, allant de 12.5 à 200 ng et complété à 200 ng par pCI-neo). Nous constatons là aussi une augmentation progressive du nombre de cellules eGFP positives (10 puis 15%) jusqu'à un plateau qui arrive beaucoup plus tôt qu'avec le pseudovirus co-transfecté avec le plasmide codant la RPL7-eGFP sans le plasmide pCI-neo. Les flèches noires correspondent à des comparaisons d'une même quantité de RPL7 pour une quantité variable de plasmide total. Nous voyons donc que l'expression de l'eGFP est dépendante de la quantité de pCI-neo, en accord avec l'effet 'carrier' des plasmides.

Dans un premier temps, la quantité de p24 dans les cellules productrices (p24 intracellulaire), a été déterminée sur les mêmes échantillons (Figure 32 II). Dans les trois premières colonnes, l'ajout de 200 ng de pCI-neo ou de 200 ng de RPL7- eGFP à BB seul (colonne orange et verte) entraine une diminution du nombre de cellules p24 positives jusqu'à 2% comparé à BB seul (colonne blanche) où ce nombre de cellules est de 4%. Cela suggère que le plasmide pCI-Neo ou la RPL7- eGFP (par leur quantité de 200ng) pourront être toxique.

Puis, le pourcentage de cellules p24 positives determiné dans les cellules transfectées par des quantités variables de pCI-neo (colonnes vertes) ou de RPL7-eGFP (colonnes oranges) montrent tout d'abord une augmentation du nombre de cellules p24 positives (effet carrier de plasmide pCI-neo sur BB+gp120) qui passe de 2 à 4% (comparé colonne grise et premier colonne verte) suivie d'une diminution importante à plus forte concentration de plasmide (toxicité). Sachant que le même résultat est obtenu avec les plasmides exprimant pCI-neo ou RPL7-eGFP, nous pouvons en déduire que l'augmentation initiale serait dû à l'effet ''carrier'' alors que la diminution pourrait résulter de l'effet cytotoxique de plasmide (ou de la lipofectamine, l'agent de transfection utilise dans cette experience).

Pour montrer que le problème est lié à la toxicité des plasmides, nous avons fait l'expérience à quantité de plasmide final constante (colonnes violettes). Mis à part la condition BB+gp120+L750+ pCI-neo, nous remarquons que le pourcentage de cellules p24 positives reste constant de 2% quelle que soit la quantité de plasmides exprimant la RPL7-eGFP (sachant que la quantité de plasmides totaux est de 200 ng). Les flèches noires montrent le pourcentage de cellules p24 positives avec des quantités croissantes de RPL7 transfectée mais avec une quantité totale de plasmide normalisé à 200 ng. Les quantités de p24 dans les cellules sont sensiblement égales avec ou sans RPL7. Par ailleurs, les flèches rouges comparent la même quantité de RPL7 (25ng) avec deux quantités de plasmides totaux différents (25ng colonne orange et 200ng colonne violette). Dans ce cas, le pourcentage de cellules p24 est inversement proportionnel à la quantité de plasmide démontrant l'effet toxique d'une transfection avec 200 ng de plasmides.

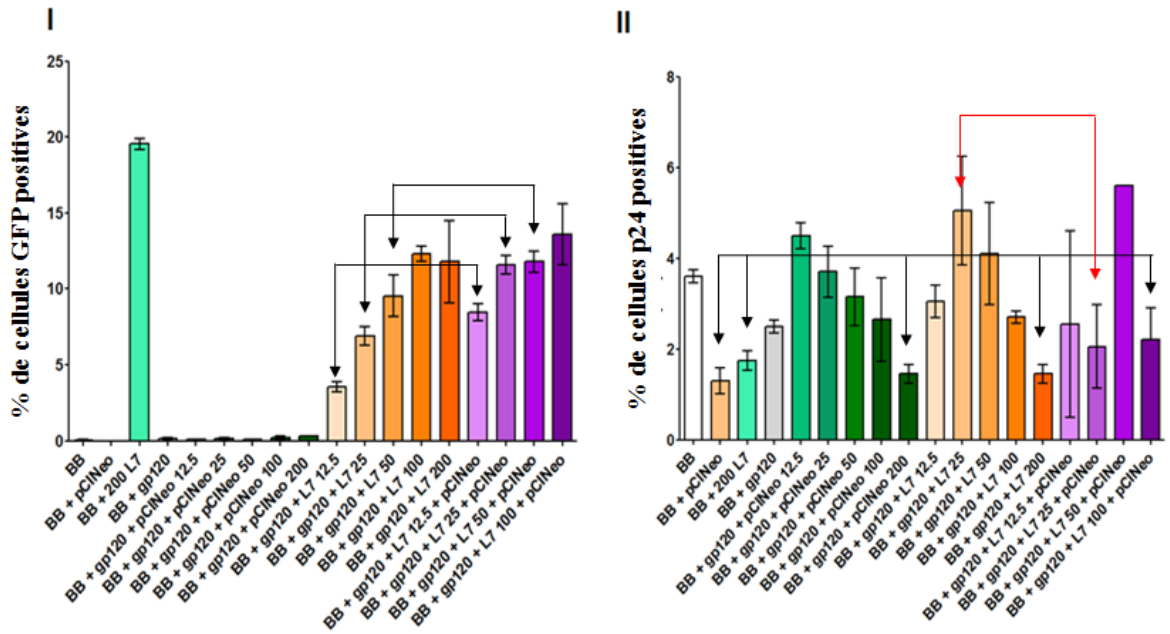

Figure 32 I : Histogramme représentant le pourcentage de cellules transfectées par laRPL7-eGFP déterminé par cytométrie.
Figure 32 II : Histogramme représentant le pourcentage de cellules contenant la p24 déterminé par cytométrie.

Enfin, le surnageant contenant les virus produits à partir des cellules transfectées (comme présenté ci-dessus) ont été prélevé et la quantité de p24 a été dosée par test ELISA (figure 33 III). Comme précédemment, nous avons constaté qu'à une quantité équivalente de plasmides transfectés (200 ng par exemple, voir flèche noir), la quantité de p24 est équivalente qu'avec une forte quantité de plasmides pCI-neo ou de RPL7-eGFP. **Ainsi, cette expérience, répétée dans des conditions similaires avec du pcDNA (non montré), n'a pas permis de conclure un effet de la RPL7 sur la quantité de p24 produite dans ces conditions expérimentaux.**

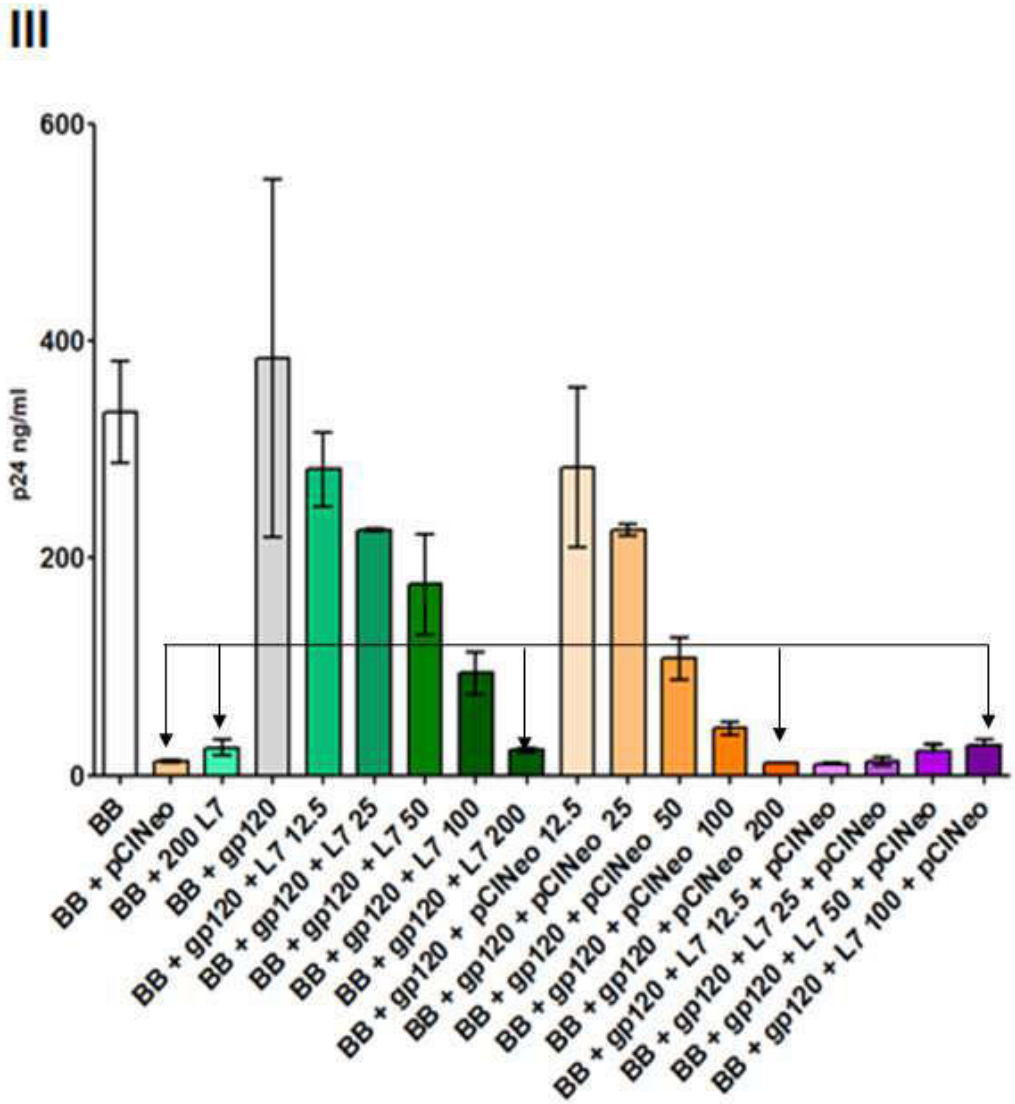

Figure 32 III : Histogramme représentant la quantification de p24 produite à partir des cellules 293T déterminée par ELISA.

Discussions et perspectives

La NCp7, a été très étudiée ces dernières années pour son rôle de protéine chaperonne d'acide nucléique. Ce rôle consiste à modifier les structures en tige boucle trouvées dans l'ARN génomique afin de promouvoir l'activité enzymatique de la reverse transcriptase durant la phase précoce du cycle (76,459,479,480). Mais, plus récemment, il a été montré que le domaine NCp7 de Gag était indispensable aux étapes tardives du cycle que sont la production des protéines virales, leur assemblage et la reconnaissance spécifique de l'ARN génomique (481). Chez le VIH-1, cette production de protéine dépend préférentiellement de l'ARN génomique qui sera encapsidé. Ainsi, l'ARN génomique traduit est aussi celui qui est spécifiquement enrichi dans la particule virale mais le mécanisme expliquant l'arrêt de la traduction au profit de cette encapsidation n'est pas encore décrit. C'est dans ce contexte que nous avons cherché de nouveaux partenaires du domaine NCp7 du précurseur Gag. Ensuite, parmi les partenaires identifiés nous avons sélectionné la protéine ribosomique RPL7. Cette protéine qui appartient à la grande sous-unité 60S jouerait un rôle dans l'appareil de traduction. Elle pourrait nous permettre de proposer un mécanisme expliquant le 'switch' entre traduction et encapsidation de l'ARN génomique.

Pendant ma thèse, j'ai démontré que la RPL7 était une nouvelle protéine cellulaire reconnue par la NCp7 mature ou au sein du précurseur Gag. En utilisant différentes techniques biochimiques et d'imagerie, j'ai montré l'importance des motifs dactyles de la NCp7 dans cette interaction. En effet, la protéine Gag délétée des motifs dactyles mais conservant les parties basiques N et C terminales de la NCp7 n'interagit plus avec la RPL7. Ceci suggère que ses domaines flexibles basiques de la NCp7 sont moins importants que son domaine central structuré pour la formation du complexe Gag-RPL7. De plus, il semble que ni les ARN cellulaires ni la polymérisation de Gag au niveau de la membrane plasmique ne soient nécessaires. On en déduit alors que cette interaction pourrait avoir lieu dans les phases précoces de la traduction avant la polymérisation de Gag. Des résultats similaires ont été obtenus avec une autre protéine ribosomique de la grande sous-unité (RPL26). Inversement, l'absence d'interaction de Gag avec deux des protéines de la petite sous unité (RPS7 et RPS14) semble suggérer qu'une interaction préférentielle de Gag pour les protéines de la grande sous-unité ribosomique.

Par ailleurs, nous avons pu établir que les 54 premiers et les 50 derniers résidus de la RPL7 sont impliqués dans l'interaction avec Gag. Cependant, ces résultats priliminaires devront être confirmés avec d'autres mutants de délétion/substitution de la RPL7 afin de déterminer d'une façon plus précise les résidus impliqués dans son interaction avec Gag.

D'autre part, l'interaction de la RPL7 semble être spécifique du Gag du VIH-1, puisque nous avons perdu l'interaction de cette protéine ribosomique avec Gag du RSV. Nous testerons prochainement d'autres constructions exprimant la protéine Gag d'autres virus notamment Gag du MLV. En effet, des travaux récents ont montré que l'interaction d'une protéine cellulaire Lyric avec la NCp7 de Gag du VIH-1 était conservée chez d'autres rétrovirus dont le virus de la leucémie murine (MLV) et le virus de l'anémie infectieuse équine (127).

Dans la littérature, d'autres protéines cellulaires qui interagissent avec le domaine NCp7 de Gag du VIH-1 tels que Staufen (120,124,125), ABCE1 (128-130), Alix (101), Lyric (127) ont été identifiées ainsi que d'autres protéines cellulaires qui ont été décrits par Jäger et al (240). Dans le cas de Lyric, l'absence de la NCp7 est compensée par la protéine de matrice et par l'ARN (127). Dans le cas d'ABCE, les résidus basiques de la NCp7 de Gag interagissent uniquement dans un contexte d'assemblage de Gag. (471). De même, les motifs dactyles de la NCp7 interagissent avec ALIX mais en présence d'ARN (461).

Par contre, une similitude semble exister entre Gag-RPL7 et Gag-Staufen (121). En effet, l'interaction Gag-Staufen, qui serait impliquée dans le contrôle de la polymérisation de Gag et l'encapsidation de l'ARNg (482) est indépendante de l'ARN et de la partie basique N-terminale de la NCp7 mais elle nécessite au moins un de ses motifs dactyles (125).

D'une manière intéressante, d'autres protéines ribosomiques ont été montrées interagissant avec des protéines virales. Par exemple, la RPS19 est recrutée par la protéine de nucléocapside (protéine N) de l'Hantavirus pour initier la traduction coiffe dépendante (134,135). De même, la protéine ribosomique RPL9 interagit avec la capside du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) et l'interaction Gag-RPL9 serait impliquée dans l'assemblage (133).

En se basant sur nos résultats concernant l'interaction de Gag avec la protéine ribosomique RPL7, et le fait que la RPL7 interagit avec la membrane du RE, comme cela a déjà été montré

dans la littérature. Pour cela, nous proposons trois modèles pour l'implication de la RPL7 dans les étapes traductionnelles du cycle viral du VIH-1 (voir figure 1.1).

- Le premier tient compte du fait que la partie C-terminale de la RPL7 permet l'ancrage du ribosome dans le réticulum (439) (étape 1). L'augmentation de la quantité de Gag synthétisé, déclenche son interaction avec la RPL7 (probablement en fonction d'une stœchiométrie et d'une affinité bien définie) ce qui entraîne la formation d'un complexe Gag-RPL7 (étape 2). L'interaction de Gag avec la RPL7 conduit au détachement du ribosome du RE (étape 3), en mimant une phase dans le cycle de traduction où des peptides signaux sont libérés en provoquant le détachement du ribosome du RE ou conduit à un arrêt prématuré de la traduction. Ce détachement est suivi par la dissociation du complexe ribosomal (l'ARNm devient libre) ainsi la dissociation du ribosome en ses petites et grandes sous-unités (étape 4). A cette étape, Gag se lie à la RPL7 soluble (étape 5). Ce complexe Gag/RPL7 ainsi formé, serait en mesure de reconnaître le signal d'encapsidation de l'ARNm libre (étape 6). Cette étape est suivie par la dimération de l'ARN (étape 7) et enfin l'incorporation du complexe Gag/RPL7 et l'ARN génomique dans les particules virales (étape 8).

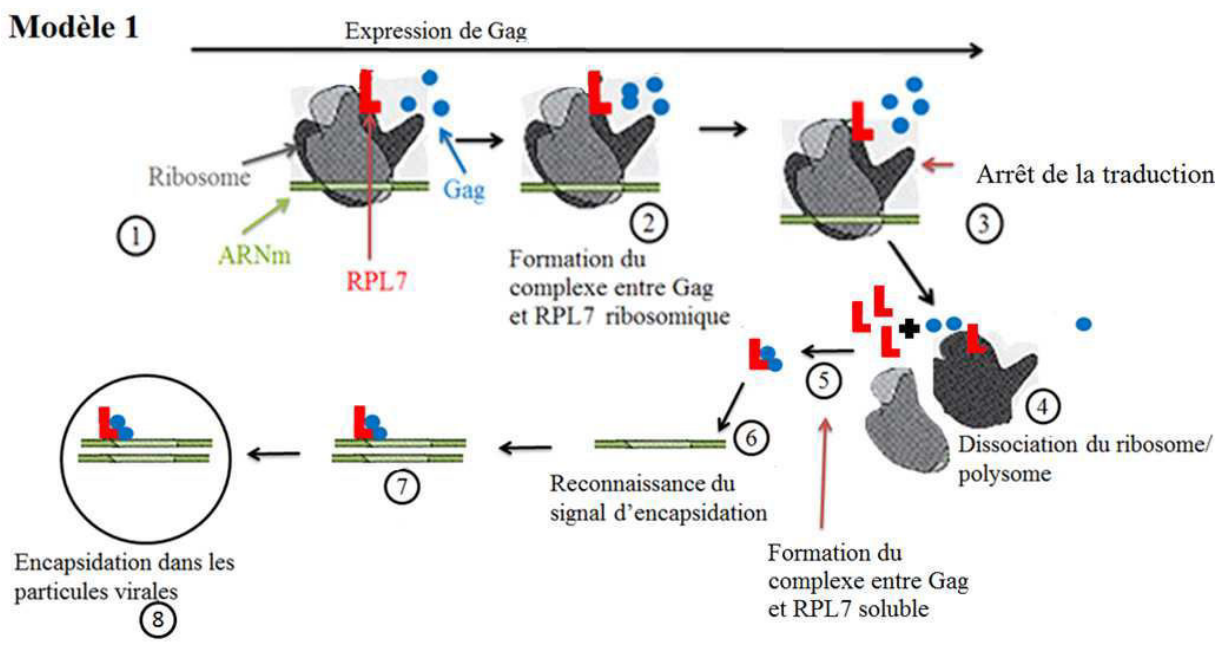

Figure 1.1 : représentation schématique d'un modèle selon lequel l'interaction Gag-RPL7 pourra arrêter la traduction en déstabilisant l'association du ribosome au réticulum et ceci en faveur de l'encapsidation.

- Le deuxième modèle tient compte du fait que le domaine N-terminal de la RPL7 interagit fortement avec les acides nucléiques, probablement sous forme de dimères en utilisant sa séquence leucine zipper (434,450,462,476,483). Ainsi, Gag pourrait recruter la RPL7 soluble pour favoriser son interaction avec l'UTR 5' et en conséquence de stopper la traduction par raison d'encombrement stérique

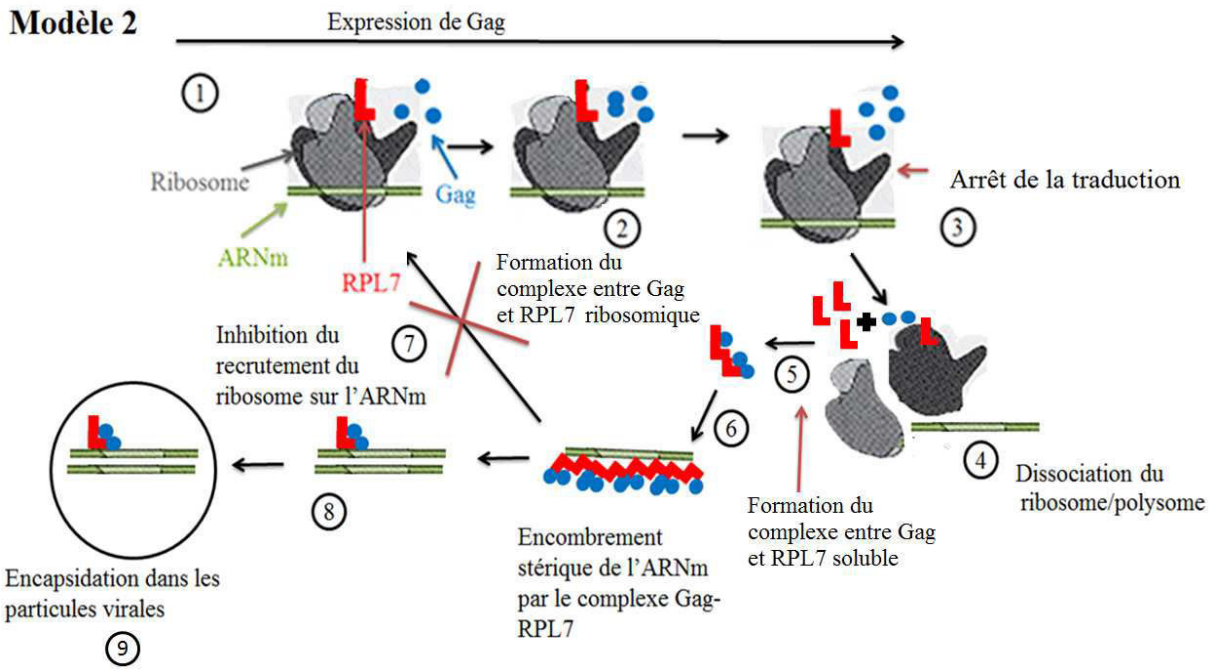

Figure 1.2 : représentation schématique d'un autre modèle selon lequel l'interaction Gag-RPL7 crée un encombrement stérique sur l'ARNm, défavorisant le recrutement du ribosome et en favorisant l'encapsidation.

- Enfin, nous pourrions proposer un modèle selon les résultats obtenus (voir paragraphe X.1). En effet, nous avons constaté une nette réduction de la fraction nucléolaire de la protéine RPL7 dans les cellules sur-exprimant Gag. Sachant que les nucléoles sont le lieu d'assemblage des ribosomes, une déplétion de la RPL7 pourrait se traduire par une modification de la biogénèse des ribosomes et en conséquence affecter l'appareil traductionnel.

Pour décortiquer ces modèles, et pour établir un test fonctionnel en milieu cellulaire de l'interaction Gag-RPL7, nous allons :

1- Transfecter des cellules CEM-SS soit par un plasmide sur-exprimant la RPL7 soit par des si-RNA anti RPL7. Puis ces cellules seront infectées par des virus et nous suivrons

plusieurs paramètres telles que la p24 intracellulaire et la p24 produite dans le surnageant. Parallèlement, les quantités d'ARN intra- et extra- cellulaire seront mesurées par PCR et le pouvoir infectieux des particules dosées par titration sur des cellules TZMbl.

Cependant, l'utilisation d'une surexpression ou d'une sous-expression d'une protéine cellulaire pour suivre la production virale et le pouvoir infectieux présentent des inconvénients. C'est une procédure lourde à mettre en œuvre (préparation des virus, infection, transfection des siRNA). Nous contrôlons avec difficulté l'effet des siRNA ou d'une surexpression sur l'appareil traductionnel… Par ailleurs, cette approche à elle seule n'est pas suffisante, elle nous permet d'avoir une vue globale du modèle selon lequel il y a un effet combiné sur la traduction et l'encapsidation. Pour mieux contrôler l'effet de la formation du complexe sur la traduction, notre projet est donc de développer un test fonctionnel *in vitro*.

2- Nous disposons au laboratoire d'un plasmide exprimant un fragment de Gag du VIH-1 conjugué à la *Renilla* sous le contrôle de la région 5'UTR du VIH-1. Cette construction possède aussi un promoteur T7 ce qui permet la production *in vitro* de l'ARN 5'UTR+ (Ribomax RNA). Après purification de l'ARN messager néo transcrit, nous utiliserons des lysats de réticulocytes de lapin permettant sa traduction (Rabbit Reticulocyte Lysate Translation Systems, Promega) (405,484,485).

La production de la protéine Gag-*Renilla* luciférase sera suivie par western blot et par mesure de l'activité *Renilla* en utilisant le système *Renilla* Luciferase Assay (Promega Co., Madison, WI, USA). Nous ajouterons de manière séquentielle ou combinée la RPL7 recombinante (collaboration avec le Dr. G. Dieci, Italie), la NCp7 synthétique et/ou la protéine Gag recombinante (en cours de production dans notre laboratoire). Nous serons particulièrement attentifs au temps d'incubation et à l'ordre dans lequel les différents partenaires seront ajoutés car cela pourrait avoir une influence sur les deux mécanismes d'inhibition/activation. L'ajout de la RPL7 au test pourrait se traduire par une diminution de la quantité de Gag-*Renilla* luciférase selon ses propriétés lors de la traduction d'ARN structuré (438,439). Inversement, par leur propriété de chaperonne, Gag et/ou NCp7 pourraient activer la traduction du gène rapporteur (419).

3- Ainsi, pour renforcer nos résultats obtenus sur l'interaction Gag-RPL7 en milieu cellulaire, nous proposons d'étudier des paramètres biophysiques comme l'affinité et la stœchiométrie de liaison de la RPL7 en présence et en absence de Gag grâce à l'utilisation des techniques biophysiques tels que l'anisotropie de fluorescence, FCS, FRET etc… La même expérience pourra être envisagée en présence de l'ARN. Pour cela, nous utiliserons NCp7 et Gag couplées à des fluorophores tels que la fluorescéine, tétraméthyl rhodamine, etc. Ces protéines marquées par des fluorophores seront titrées en ajoutant des incréments de RPL7 (27 KDa) et la formation du complexe sera suivie par anisotropie, un paramètre photophysique lié à la mobilité de l'espèce marquée donc à sa masse moléculaire. De plus, les complexes formés seront étudiés par Fluorescence Corrélation Spectroscopie (FCS) qui nous permet d'obtenir des paramètres thermodynamiques du complexe tels que sa taille, sa vitesse de diffusion et sa stœchiométrie. D'autre part, l'interaction de la RPL7 avec le RE pourra être aussi suivie par l'utilisation de membranes libellées à des fluorophores avec le modèle membranaire (mimant la composition du RE selon (439)). Pour développer ce test, la RPL7 et des liposomes de diamètre différent (100, 200 et 1000 nm) peuvent être marqués avec des fluorophores pour le donneur et l'accepteur afin d'effectuer des expériences de FRET. L'affinité de la liaison des liposomes avec la RPL7 en présence et en absence de Gag peut être mesurée par titrage de la quantité croissante de liposomes marqués. En outre, le même test peut être utilisé pour savoir si un triplex de RPL7-Gag-liposome existe dans le cycle viral ou non et sous quelles conditions ce complexe peut être dissocié.

Enfin, pour vérifier l'hypothèse émis dans le modèle 3, nous allons quantifier le taux de synthèse des ARNs ribosomaux et des protéines ribosomiques pour savoir si cette déplétion affecte effectivement la biogénèse des ribosomes.

Références Bibliographiques

1. De Clercq, E. (2009) Another ten stories in antiviral drug discovery (part C): "Old" and "new" antivirals, strategies, and perspectives. *Med Res Rev*, **29**, 611-645.
2. Abbink, T.E. and Berkhout, B. (2007) HIV-1 reverse transcription: close encounters between the viral genome and a cellular tRNA. *Adv Pharmacol*, **55**, 99-135.
3. Temin, H.M. and Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
4. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, **226**, 1209-1211.
5. Ellermann, V. and Bang, O. (1908) Experimentelle Leukämie bei hühnern. *Zentralbl. Backteriol.*, **46**, 595-609.
6. Rous, P. (1911) A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine*, **13**, 397-411.
7. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
8. Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983) Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiotics and chemotherapy*, **32**, 48-53.
9. Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7415-7419.
10. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. *et al.* (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.
11. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. *et al.* (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, **233**, 343-346.
12. van Regenmortel, M.H. (2000) The recognition of proteins and peptides by antibodies. *Journal of immunoassay*, **21**, 85-108.
13. Mayo, M.A. and van Regenmortel, M.H. (2000) ICTV and the Virology Division News. *Archives of virology*, **145**, 1985-1988.
14. Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G. and Koch, M.A. (1987) Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*, **156**, 171-176.
15. Stebbing, J., Gazzard, B. and Douek, D.C. (2004) Where does HIV live? *N Engl J Med*, **350**, 1872-1880.
16. Sleasman, J.W. and Goodenow, M.M. (2003) 13. HIV-1 infection. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **111**, S582-592.
17. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M. *et al.* (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, **397**, 436-441.
18. Gaschen, B., Kuiken, C., Korber, B. and Foley, B. (2001) Retrieval and on-the-fly alignment of sequence fragments from the HIV database. *Bioinformatics*, **17**, 415-418.
19. Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L. and Hayami, M. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J Virol*, **73**, 6810-6820.

20. Simon, F., Mauclere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F. and Brun-Vezinet, F. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, **4**, 1032-1037.
21. Lemey, P., Pybus, O.G., Rambaut, A., Drummond, A.J., Robertson, D.L., Roques, P., Worobey, M. and Vandamme, A.M. (2004) The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics*, **167**, 1059-1068.
22. Coffin, J.M. (1979) Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol*, **42**, 1-26.
23. Bender, W. and Davidson, N. (1976) Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell*, **7**, 595-607.
24. Berkhout, B. (1996) Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **54**, 1-34.
25. Das, A.T., Klaver, B. and Berkhout, B. (1998) The 5' and 3' TAR elements of human immunodeficiency virus exert effects at several points in the virus life cycle. *J Virol*, **72**, 9217-9223.
26. Klaver, B. and Berkhout, B. (1994) Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol*, **68**, 3830-3840.
27. Klaver, B. and Berkhout, B. (1994) Evolution of a disrupted TAR RNA hairpin structure in the HIV-1 virus. *EMBO J*, **13**, 2650-2659.
28. Rana, T.M. and Jeang, K.T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Archives of biochemistry and biophysics*, **365**, 175-185.
29. Das, A.T., Klaver, B., Klasens, B.I., van Wamel, J.L. and Berkhout, B. (1997) A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol*, **71**, 2346-2356.
30. Marquet, R., Isel, C., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1995) tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie*, **77**, 113-124.
31. Kleiman, L. (2002) tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB life*, **53**, 107-114.
32. Mak, J. and Kleiman, L. (1997) Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol*, **71**, 8087-8095.
33. Clever, J.L. and Parslow, T.G. (1997) Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol*, **71**, 3407-3414.
34. Harrison, G.P. and Lever, A.M. (1992) The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol*, **66**, 4144-4153.
35. Paillart, J.C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1994) Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Biol Chem*, **269**, 27486-27493.
36. O'Reilly, M.M., McNally, M.T. and Beemon, K.L. (1995) Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology*, **213**, 373-385.
37. Gaynor, R. (1992) Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS*, **6**, 347-363.
38. Charneau, P., Alizon, M. and Clavel, F. (1992) A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol*, **66**, 2814-2820.
39. Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. and Pavlakis, G.N. (1989) rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1495-1499.
40. Salghetti, S., Mariani, R. and Skowronski, J. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 349-353.

41. Connell, B.J. and Lortat-Jacob, H. (2013) Human Immunodeficiency Virus and Heparan Sulfate: From Attachment to Entry Inhibition. *Frontiers in immunology*, **4**, 385.
42. Brooke, S., Chan, R., Howard, S. and Sapolsky, R. (1997) Endocrine modulation of the neurotoxicity of gp120: implications for AIDS-related dementia complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9457-9462.
43. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, **89**, 263-273.
44. Prabakaran, P., Dimitrov, A.S., Fouts, T.R. and Dimitrov, D.S. (2007) Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Adv Pharmacol*, **55**, 33-97.
45. Tritel, M. and Resh, M.D. (2000) Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol*, **74**, 5845-5855.
46. Tung, H.Y., De Rocquigny, H., Zhao, L.J., Cayla, X., Roques, B.P. and Ozon, R. (1997) Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr. *FEBS Lett*, **401**, 197-201.
47. Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Hoglund, S. and Gottlinger, H.G. (1994) Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **68**, 8180-8187.
48. Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A. and Gottlinger, H.G. (1994) Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol*, **68**, 1689-1696.
49. Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M. and Sundquist, W.I. (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3099-3104.
50. Balasubramaniam, M. and Freed, E.O. (2011) New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)*, **26**, 236-251.
51. Gamble, T.R., Vajdos, F.F., Yoo, S., Worthylake, D.K., Houseweart, M., Sundquist, W.I. and Hill, C.P. (1996) Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*, **87**, 1285-1294.
52. Dietrich, L., Ehrlich, L.S., LaGrassa, T.J., Ebbets-Reed, D. and Carter, C. (2001) Structural consequences of cyclophilin A binding on maturational refolding in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol*, **75**, 4721-4733.
53. Saphire, A.C., Bobardt, M.D. and Gallay, P.A. (2002) Cyclophilin a plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation. *J Virol*, **76**, 4671-4677.
54. Saphire, A.C., Bobardt, M.D. and Gallay, P.A. (2002) trans-Complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent of its isomerase activity. *J Virol*, **76**, 2255-2262.
55. Agresta, B.E. and Carter, C.A. (1997) Cyclophilin A-induced alterations of human immunodeficiency virus type 1 CA protein in vitro. *J Virol*, **71**, 6921-6927.
56. Bosco, D.A., Eisenmesser, E.Z., Pochapsky, S., Sundquist, W.I. and Kern, D. (2002) Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5247-5252.
57. Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I. and Hill, C.P. (1997) Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, **278**, 849-853.
58. Arhel, N. (2010) Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, **7**, 96.
59. Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F. and Bukrinsky, M. (2006) Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology*, **3**, 4.

60. Warrilow, D., Tachedjian, G. and Harrich, D. (2009) Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. *Rev Med Virol*, **19**, 324-337.
61. Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S. and Charneau, P. (2006) Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods*, **3**, 817-824.
62. Mascarenhas, A.P. and Musier-Forsyth, K. (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS J*, **276**, 6118-6127.
63. Yeager, M. (2011) Design of in vitro symmetric complexes and analysis by hybrid methods reveal mechanisms of HIV capsid assembly. *J Mol Biol*, **410**, 534-552.
64. Roques, B.P., Morellet, N., de Rocquigny, H., Demene, H., Schueler, W. and Jullian, N. (1997) Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie*, **79**, 673-680.
65. Mely, Y., Jullian, N., Morellet, N., De Rocquigny, H., Dong, C.Z., Piemont, E., Roques, B.P. and Gerard, D. (1994) Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, **33**, 12085-12091.
66. Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1992) Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *Embo J*, **11**, 3059-3065.
67. Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., Jr., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., 3rd, Hare, D.R. *et al.* (1992) Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci*, **1**, 563-574.
68. Demene, H., Dong, C.Z., Ottmann, M., Rouyez, M.C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., Saragosti, S. *et al.* (1994) 1H NMR structure and biological studies of the His23-->Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. *Biochemistry*, **33**, 11707-11716.
69. Demene, H., Jullian, N., Morellet, N., de Rocquigny, H., Cornille, F., Maigret, B. and Roques, B.P. (1994) Three-dimensional 1H NMR structure of the nucleocapsid protein NCp10 of Moloney murine leukemia virus. *J Biomol NMR*, **4**, 153-170.
70. Gorelick, R.J., Fu, W., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Rein, A., Henderson, L.E. and Arthur, L.O. (1999) Characterization of the block in replication of nucleocapsid protein zinc finger mutants from moloney murine leukemia virus. *J Virol*, **73**, 8185-8195.
71. Gorelick, R.J., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Wiltrout, T.A., Coren, L.V., Chabot, D.J., Lifson, J.D., Henderson, L.E. and Arthur, L.O. (1999) Strict conservation of the retroviral nucleocapsid protein zinc finger is strongly influenced by its role in viral infection processes: characterization of HIV-1 particles containing mutant nucleocapsid zinc-coordinating sequences. *Virology*, **256**, 92-104.
72. Tanchou, V., Decimo, D., Pechoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M. and Darlix, J.L. (1998) Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication. *J Virol*, **72**, 4442-4447.
73. Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A. and Gottlinger, H.G. (1993) Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol*, **67**, 6159-6169.
74. Godet, J., de Rocquigny, H., Raja, C., Glasser, N., Ficheux, D., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2006) During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem. *J Mol Biol*, **356**, 1180-1192.

75. Ramalanjaona, N., de Rocquigny, H., Millet, A., Ficheux, D., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2007) Investigating the mechanism of the nucleocapsid protein chaperoning of the second strand transfer during HIV-1 DNA synthesis. *J Mol Biol*, **374**, 1041-1053.
76. Darlix, J.L., Garrido, J.L., Morellet, N., Mely, Y. and de Rocquigny, H. (2007) Properties, functions, and drug targeting of the multifunctional nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus. *Adv Pharmacol*, **55**, 299-346.
77. Beltz, H., Clauss, C., Piemont, E., Ficheux, D., Gorelick, R.J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J.L., de Rocquigny, H. and Mely, Y. (2005) Structural determinants of HIV-1 nucleocapsid protein for cTAR DNA binding and destabilization, and correlation with inhibition of self-primed DNA synthesis. *J Mol Biol*, **348**, 1113-1126.
78. De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B. and Darlix, J.L. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6472-6476.
79. Williams, M.C., Rouzina, I., Wenner, J.R., Gorelick, R.J., Musier-Forsyth, K. and Bloomfield, V.A. (2001) Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6121-6126.
80. Rein, A. (2010) Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA Biol*, **7**, 700-705.
81. Wu, T., Datta, S.A., Mitra, M., Gorelick, R.J., Rein, A. and Levin, J.G. (2010) Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications. *Virology*, **405**, 556-567.
82. Cruceanu, M., Urbaneja, M.A., Hixson, C.V., Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J., Casas-Finet, J.R. *et al.* (2006) Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res*, **34**, 593-605.
83. Godet, J., Boudier, C., Humbert, N., Ivanyi-Nagy, R., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2012) Comparative nucleic acid chaperone properties of the nucleocapsid protein NCp7 and Tat protein of HIV-1. *Virus Res*, **169**, 349-360.
84. Mirambeau, G., Lyonnais, S. and Gorelick, R.J. (2010) Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA Biol*, **7**, 724-734.
85. Krishnamoorthy, G., Duportail, G. and Mely, Y. (2002) Structure and dynamics of condensed DNA probed by 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-diazaundecamethylene)bis[4-[[3- methylbenz-1,3-oxazol-2-yl]methylidine]-1,4-dihydroquinolinium] tetraiodide fluorescence. *Biochemistry*, **41**, 15277-15287.
86. Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H., Van Gent, D., Roques, B., Plasterk, R. and Darlix, J.L. (1993) Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res*, **21**, 831-839.
87. Berkowitz, R.D. and Goff, S.P. (1994) Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein. *Virology*, **202**, 233-246.
88. Clever, J., Sassetti, C. and Parslow, T.G. (1995) RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **69**, 2101-2109.
89. Aldovini, A. and Young, R.A. (1990) Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol*, **64**, 1920-1926.
90. Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Jr., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Henderson, L.E. and Rein, A. (1990) Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol*, **64**, 3207-3211.
91. Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Harvin, D. and Rein, A. (2002) Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *J Virol*, **76**, 11405-11413.

92. Poon, D.T., Wu, J. and Aldovini, A. (1996) Charged amino acid residues of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p7 protein involved in RNA packaging and infectivity. *J Virol*, **70**, 6607-6616.
93. Schmalzbauer, E., Strack, B., Dannull, J., Guehmann, S. and Moelling, K. (1996) Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J Virol*, **70**, 771-777.
94. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. and Summers, M.F. (1998) Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science*, **279**, 384-388.
95. Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3195-3199.
96. Hurley, J.H. and Hanson, P.I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 556-566.
97. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L. *et al.* (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55-65.
98. Herbert, S., Soares, H., Zimmer, C. and Henriques, R. (2012) Single-molecule localization super-resolution microscopy: deeper and faster. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, **18**, 1419-1429.
99. VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. and Carter, C.A. (2001) Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7724-7729.
100. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689-699.
101. Usami, Y., Popov, S. and Gottlinger, H.G. (2007) Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J Virol*, **81**, 6614-6622.
102. Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoude, G., Jadwin, J.A., de La Cruz, J., Nagashima, K. and Bouamr, F. (2009) The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog*, **5**, e1000339.
103. Popov, S., Popova, E., Inoue, M. and Gottlinger, H.G. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J Virol*, **82**, 1389-1398.
104. Popov, S., Popova, E., Inoue, M. and Gottlinger, H.G. (2009) Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *J Virol*, **83**, 7185-7193.
105. Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I. and Sundquist, W.I. (2011) ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*, **9**, 235-242.
106. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N. and Weissenhorn, W. (2011) Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci*, **36**, 199-210.
107. Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W. and H, G.G. (2009) The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society transactions*, **37**, 181-184.
108. Im, Y.J. and Hurley, J.H. (2008) Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev Cell*, **14**, 902-913.
109. Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Krausslich, H.G., Eils, R., Rohr, K., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D.C. (2009) Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog*, **5**, e1000652.

110. Jouvenet, N., Bieniasz, P.D. and Simon, S.M. (2008) Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature*.
111. Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P.W., Krausslich, H.G., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D.C. (2011) Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol*, **13**, 469-474.
112. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D. and Simon, S.M. (2011) Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol*, **13**, 394-401.
113. Fossen, T., Wray, V., Bruns, K., Rachmat, J., Henklein, P., Tessmer, U., Maczurek, A., Klinger, P. and Schubert, U. (2005) Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Biol Chem*, **280**, 42515-42527.
114. Salgado, G.F., Marquant, R., Vogel, A., Alves, I.D., Feller, S.E., Morellet, N. and Bouaziz, S. (2009) Structural Studies of HIV-1 Gag p6ct and Its Interaction with Vpr Determined by Solution Nuclear Magnetic Resonance (dagger) (,) (double dagger). *Biochemistry*, **48**, 2355-2367.
115. Accola, M.A., Hoglund, S. and Gottlinger, H.G. (1998) A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly. *J Virol*, **72**, 2072-2078.
116. Datta, S.A., Temeselew, L.G., Crist, R.M., Soheilian, F., Kamata, A., Mirro, J., Harvin, D., Nagashima, K., Cachau, R.E. and Rein, A. (2011) On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J Virol*, **85**, 4111-4121.
117. Morellet, N., Druillennec, S., Lenoir, C., Bouaziz, S. and Roques, B.P. (2005) Helical structure determined by NMR of the HIV-1 (345-392)Gag sequence, surrounding p2: implications for particle assembly and RNA packaging. *Protein Sci*, **14**, 375-386.
118. O'Carroll, I.P., Soheilian, F., Kamata, A., Nagashima, K. and Rein, A. (2013) Elements in HIV-1 Gag contributing to virus particle assembly. *Virus Res*, **171**, 341-345.
119. Ott, D.E., Coren, L.V., Kane, B.P., Busch, L.K., Johnson, D.G., Sowder, R.C., 2nd, Chertova, E.N., Arthur, L.O. and Henderson, L.E. (1996) Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*, **70**, 7734-7743.
120. Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L. and Mouland, A.J. (2004) Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol*, **24**, 2637-2648.
121. Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L. and Cohen, E.A. (2000) The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol*, **74**, 5441-5451.
122. Ptak, R.G., Fu, W., Sanders-Beer, B.E., Dickerson, J.E., Pinney, J.W., Robertson, D.L., Rozanov, M.N., Katz, K.S., Maglott, D.R., Pruitt, K.D. *et al.* (2008) Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **24**, 1497-1502.
123. Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clement, J.F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M. *et al.* (2010) Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci*, **123**, 369-383.
124. Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A.J. and DesGroseillers, L. (2007) The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol*, **81**, 6216-6230.
125. Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J. and Desgroseillers, L. (2008) The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*, **5**, 41.
126. Milev, M.P., Ravichandran, M., Khan, M.F., Schriemer, D.C. and Mouland, A.J. (2012) Characterization of staufen1 ribonucleoproteins by mass spectrometry and biochemical analyses reveal the presence of diverse host proteins associated with human immunodeficiency virus type 1. *Frontiers in microbiology*, **3**, 367.

127. Engeland, C.E., Oberwinkler, H., Schumann, M., Krause, E., Muller, G.A. and Krausslich, H.G. (2011) The cellular protein lyric interacts with HIV-1 Gag. *J Virol*, **85**, 13322-13332.
128. Lingappa, J.R., Dooher, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K. and Klein, K.C. (2006) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem*, **281**, 3773-3784.
129. Dooher, J.E., Schneider, B.L., Reed, J.C. and Lingappa, J.R. (2007) Host ABCE1 is at plasma membrane HIV assembly sites and its dissociation from Gag is linked to subsequent events of virus production. *Traffic*, **8**, 195-211.
130. Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C. and Lingappa, J.R. (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*, **415**, 88-92.
131. Goff, S.P. (2007) Host factors exploited by retroviruses. *Nature reviews*, **5**, 253-263.
132. Liu, B., Dai, R., Tian, C.J., Dawson, L., Gorelick, R. and Yu, X.F. (1999) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol*, **73**, 2901-2908.
133. Beyer, A.R., Bann, D.V., Rice, B., Pultz, I.S., Kane, M., Goff, S.P., Golovkina, T.V. and Parent, L.J. (2013) Nucleolar trafficking of the mouse mammary tumor virus gag protein induced by interaction with ribosomal protein L9. *J Virol*, **87**, 1069-1082.
134. Cheng, E., Haque, A., Rimmer, M.A., Hussein, I.T., Sheema, S., Little, A. and Mir, M.A. (2011) Characterization of the Interaction between hantavirus nucleocapsid protein (N) and ribosomal protein S19 (RPS19). *J Biol Chem*, **286**, 11814-11824.
135. Haque, A. and Mir, M.A. (2010) Interaction of hantavirus nucleocapsid protein with ribosomal protein S19. *J Virol*, **84**, 12450-12453.
136. Pettit, S.C., Everitt, L.E., Choudhury, S., Dunn, B.M. and Kaplan, A.H. (2004) Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J Virol*, **78**, 8477-8485.
137. Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M. and Sigal, I.S. (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4686-4690.
138. Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, **67**, 1-25.
139. Goff, S.P. (1990) Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **3**, 817-831.
140. Anastassopoulou, C.G. and Kostrikis, L.G. (2006) Global genetic variation of HIV-1 infection. *Curr HIV Res*, **4**, 365-373.
141. Gotte, M., Rausch, J.W., Marchand, B., Sarafianos, S. and Le Grice, S.F. (2010) Reverse transcriptase in motion: conformational dynamics of enzyme-substrate interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1804**, 1202-1212.
142. Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992) Crystal structure at 3.5 A resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **256**, 1783-1790.
143. Das, K., Bandwar, R.P., White, K.L., Feng, J.Y., Sarafianos, S.G., Tuske, S., Tu, X., Clark, A.D., Jr., Boyer, P.L., Hou, X. *et al.* (2009) Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *J Biol Chem*, **284**, 35092-35100.
144. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **282**, 1669-1675.
145. Lansdon, E.B., Samuel, D., Lagpacan, L., Brendza, K.M., White, K.L., Hung, M., Liu, X., Boojamra, C.G., Mackman, R.L., Cihlar, T. *et al.* (2010) Visualizing the molecular interactions of a nucleotide analog, GS-9148, with HIV-1 reverse transcriptase-DNA complex. *J Mol Biol*, **397**, 967-978.

146. Sarafianos, S.G., Clark, A.D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J.J., Ilankumaran, P., Ramesha, A.R., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Boyer, P.L. *et al.* (2002) Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J*, **21**, 6614-6624.
147. Sarafianos, S.G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A.D., Jr., Ding, J., Whitcomb, J.M., Boyer, P.L., Hughes, S.H. and Arnold, E. (2001) Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J*, **20**, 1449-1461.
148. Tu, X., Das, K., Han, Q., Bauman, J.D., Clark, A.D., Jr., Hou, X., Frenkel, Y.V., Gaffney, B.L., Jones, R.A., Boyer, P.L. *et al.* (2010) Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 1202-1209.
149. Tuske, S., Sarafianos, S.G., Clark, A.D., Jr., Ding, J., Naeger, L.K., White, K.L., Miller, M.D., Gibbs, C.S., Boyer, P.L., Clark, P. *et al.* (2004) Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 469-474.
150. Lapkouski, M., Tian, L., Miller, J.T., Le Grice, S.F. and Yang, W. (2013) Reply to "Structural requirements for RNA degradation by HIV-1 reverse transcriptase". *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 1342-1343.
151. Lapkouski, M., Tian, L., Miller, J.T., Le Grice, S.F. and Yang, W. (2013) Complexes of HIV-1 RT, NNRTI and RNA/DNA hybrid reveal a structure compatible with RNA degradation. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 230-236.
152. Kalinin, S., Peulen, T., Sindbert, S., Rothwell, P.J., Berger, S., Restle, T., Goody, R.S., Gohlke, H. and Seidel, C.A. (2012) A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nat Methods*, **9**, 1218-1225.
153. Rothwell, P.J., Berger, S., Kensch, O., Felekyan, S., Antonik, M., Wohrl, B.M., Restle, T., Goody, R.S. and Seidel, C.A. (2003) Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase:primer/template complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1655-1660.
154. Liu, S., Abbondanzieri, E.A., Rausch, J.W., Le Grice, S.F. and Zhuang, X. (2008) Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Science*, **322**, 1092-1097.
155. Abbondanzieri, E.A., Bokinsky, G., Rausch, J.W., Zhang, J.X., Le Grice, S.F. and Zhuang, X. (2008) Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. *Nature*, **453**, 184-189.
156. Rice, P., Craigie, R. and Davies, D.R. (1996) Retroviral integrases and their cousins. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 76-83.
157. Cai, M., Zheng, R., Caffrey, M., Craigie, R., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1997) Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol*, **4**, 567-577.
158. Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Engelman, A., Craigie, R. and Davies, D.R. (1994) Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science*, **266**, 1981-1986.
159. Deprez, E., Tauc, P., Leh, H., Mouscadet, J.F., Auclair, C., Hawkins, M.E. and Brochon, J.C. (2001) DNA binding induces dissociation of the multimeric form of HIV-1 integrase: a time-resolved fluorescence anisotropy study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10090-10095.
160. Maroun, R.G., Gayet, S., Benleulmi, M.S., Porumb, H., Zargarian, L., Merad, H., Leh, H., Mouscadet, J.F., Troalen, F. and Fermandjian, S. (2001) Peptide inhibitors of HIV-1 integrase dissociate the enzyme oligomers. *Biochemistry*, **40**, 13840-13848.
161. Eijkelenboom, A.P., Lutzke, R.A., Boelens, R., Plasterk, R.H., Kaptein, R. and Hard, K. (1995) The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nat Struct Biol*, **2**, 807-810.
162. Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J.A., Hehl, E., Kalpana, G.V., Prasad, V. and Kappes, J.C. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol*, **73**, 2126-2135.

163. Ao, Z., Danappa Jayappa, K., Wang, B., Zheng, Y., Kung, S., Rassart, E., Depping, R., Kohler, M., Cohen, E.A. and Yao, X. (2010) Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *J Virol*, **84**, 8650-8663.
164. Hendrix, J., Gijsbers, R., De Rijck, J., Voet, A., Hotta, J., McNeely, M., Hofkens, J., Debyser, Z. and Engelborghs, Y. (2011) The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. *Nucleic Acids Res*, **39**, 1310-1325.
165. Mousnier, A., Kubat, N., Massias-Simon, A., Segeral, E., Rain, J.C., Benarous, R., Emiliani, S. and Dargemont, C. (2007) von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13615-13620.
166. Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*, **266**, 2002-2006.
167. Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z. (2003) HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 372-381.
168. Christ, F., Thys, W., De Rijck, J., Gijsbers, R., Albanese, A., Arosio, D., Emiliani, S., Rain, J.C., Benarous, R., Cereseto, A. *et al.* (2008) Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol*, **18**, 1192-1202.
169. Cribier, A., Segeral, E., Delelis, O., Parissi, V., Simon, A., Ruff, M., Benarous, R. and Emiliani, S. (2011) Mutations affecting interaction of integrase with TNPO3 do not prevent HIV-1 cDNA nuclear import. *Retrovirology*, **8**, 104.
170. Van Maele, B. and Debyser, Z. (2005) HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev*, **7**, 26-43.
171. Van Maele, B., Van Eylen, L., Pluymers, W. and Debyser, Z. (2005) Evaluation of the activity of HIV-1 integrase over-expressed in eukaryotic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **327**, 261-267.
172. Engelman, A. and Cherepanov, P. (2008) The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog*, **4**, e1000046.
173. Poeschla, E.M. (2008) Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1403-1424.
174. Cherepanov, P. (2007) LEDGF/p75 interacts with divergent lentiviral integrases and modulates their enzymatic activity in vitro. *Nucleic Acids Res*, **35**, 113-124.
175. Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P.A. and Engelman, A. (2004) Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, **279**, 48883-48892.
176. Cherepanov, P., Ambrosio, A.L., Rahman, S., Ellenberger, T. and Engelman, A. (2005) Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17308-17313.
177. Cherepanov, P., Sun, Z.Y., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G. and Engelman, A. (2005) Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 526-532.
178. Accola, M.A., Ohagen, A. and Gottlinger, H.G. (2000) Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag). *J Virol*, **74**, 6198-6202.
179. Kotov, A., Zhou, J., Flicker, P. and Aiken, C. (1999) Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol*, **73**, 8824-8830.
180. Camaur, D. and Trono, D. (1996) Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol*, **70**, 6106-6111.
181. Isel, C. and Karn, J. (1999) Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol*, **290**, 929-941.

182. Karn, J. (1999) Tackling Tat. *J Mol Biol*, **293**, 235-254.
183. Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R. and Rosch, P. (1995) Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol*, **247**, 529-535.
184. Rubartelli, A., Poggi, A., Sitia, R. and Zocchi, M.R. (1998) HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunology today*, **19**, 543-545.
185. Long, K.S. and Crothers, D.M. (1999) Characterization of the solution conformations of unbound and Tat peptide-bound forms of HIV-1 TAR RNA. *Biochemistry*, **38**, 10059-10069.
186. Seewald, M.J., Metzger, A.U., Willbold, D., Rosch, P. and Sticht, H. (1998) Structural model of the HIV-1 Tat(46-58)-TAR complex. *J Biomol Struct Dyn*, **16**, 683-692.
187. Barillari, G., Sgadari, C., Fiorelli, V., Samaniego, F., Colombini, S., Manzari, V., Modesti, A., Nair, B.C., Cafaro, A., Sturzl, M. *et al.* (1999) The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood*, **94**, 663-672.
188. Barillari, G., Sgadari, C., Palladino, C., Gendelman, R., Caputo, A., Morris, C.B., Nair, B.C., Markham, P., Nel, A., Sturzl, M. *et al.* (1999) Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. *J Immunol*, **163**, 1929-1935.
189. Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M.G., Proudfoot, A.E., Alouani, S., Wells, T.N., Mariani, G. *et al.* (1998) HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13153-13158.
190. Trinh, D.P., Brown, K.M. and Jeang, K.T. (1999) Epithelin/granulin growth factors: extracellular cofactors for HIV-1 and HIV-2 Tat proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, **256**, 299-306.
191. Alimonti, J.B., Ball, T.B. and Fowke, K.R. (2003) Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol*, **84**, 1649-1661.
192. Shojania, S. and O'Neil, J.D. (2006) HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, **281**, 8347-8356.
193. Dosztanyi, Z., Chen, J., Dunker, A.K., Simon, I. and Tompa, P. (2006) Disorder and sequence repeats in hub proteins and their implications for network evolution. *Journal of proteome research*, **5**, 2985-2995.
194. Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W. *et al.* (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*, **19**, 26-59.
195. Kuciak, M., Gabus, C., Ivanyi-Nagy, R., Semrad, K., Storchak, R., Chaloin, O., Muller, S., Mely, Y. and Darlix, J.L. (2008) The HIV-1 transcriptional activator Tat has potent nucleic acid chaperoning activities in vitro. *Nucleic Acids Res*, **36**, 3389-3400.
196. Kameoka, M., Morgan, M., Binette, M., Russell, R.S., Rong, L., Guo, X., Mouland, A., Kleiman, L., Liang, C. and Wainberg, M.A. (2002) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J Virol*, **76**, 3637-3645.
197. Boudier, C., Storchak, R., Sharma, K.K., Didier, P., Follenius-Wund, A., Muller, S., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2010) The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *J Mol Biol*, **400**, 487-501.
198. Apolloni, A., Meredith, L.W., Suhrbier, A., Kiernan, R. and Harrich, D. (2007) The HIV-1 Tat protein stimulates reverse transcription in vitro. *Curr HIV Res*, **5**, 473-483.
199. Harrich, D., Ulich, C., Garcia-Martinez, L.F. and Gaynor, R.B. (1997) Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J*, **16**, 1224-1235.

200. Ulich, C., Dunne, A., Parry, E., Hooker, C.W., Gaynor, R.B. and Harrich, D. (1999) Functional domains of Tat required for efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol*, **73**, 2499-2508.
201. Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C. and Price, D.H. (2010) Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature*, **465**, 747-751.
202. Meyer, B.E. and Malim, M.H. (1994) The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, **8**, 1538-1547.
203. Battiste, J.L., Tan, R., Frankel, A.D. and Williamson, J.R. (1995) Assignment and modeling of the Rev Response Element RNA bound to a Rev peptide using 13C-heteronuclear NMR. *J Biomol NMR*, **6**, 375-389.
204. Bartel, D.P., Zapp, M.L., Green, M.R. and Szostak, J.W. (1991) HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell*, **67**, 529-536.
205. Malim, M.H., McCarn, D.F., Tiley, L.S. and Cullen, B.R. (1991) Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol*, **65**, 4248-4254.
206. Hammarskjold, M.H. and Rekosh, D. (2011) A long-awaited structure is rev-ealed. *Viruses*, **3**, 484-492.
207. Campbell, E.M., Nunez, R. and Hope, T.J. (2004) Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol*, **78**, 5745-5755.
208. Luo, T., Livingston, R.A. and Garcia, J.V. (1997) Infectivity enhancement by human immunodeficiency virus type 1 Nef is independent of its association with a cellular serine/threonine kinase. *J Virol*, **71**, 9524-9530.
209. Pizzato, M., Helander, A., Popova, E., Calistri, A., Zamborlini, A., Palu, G. and Gottlinger, H.G. (2007) Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6812-6817.
210. Chowers, M.Y., Spina, C.A., Kwoh, T.J., Fitch, N.J., Richman, D.D. and Guatelli, J.C. (1994) Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol*, **68**, 2906-2914.
211. Das, S.R. and Jameel, S. (2005) Biology of the HIV Nef protein. *The Indian journal of medical research*, **121**, 315-332.
212. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*, **2**, 338-342.
213. Yang, O.O., Nguyen, P.T., Kalams, S.A., Dorfman, T., Gottlinger, H.G., Stewart, S., Chen, I.S., Threlkeld, S. and Walker, B.D. (2002) Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*, **76**, 1626-1631.
214. Malim, M.H. and Emerman, M. (2008) HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*, **3**, 388-398.
215. Grzesiek, S., Bax, A., Hu, J.S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S.J., Tjandra, N. and Wingfield, P.T. (1997) Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Sci*, **6**, 1248-1263.
216. Mandal, D., Exline, C.M., Feng, Z. and Stoltzfus, C.M. (2009) Regulation of Vif mRNA splicing by human immunodeficiency virus type 1 requires 5' splice site D2 and an exonic splicing enhancer to counteract cellular restriction factor APOBEC3G. *J Virol*, **83**, 6067-6078.
217. Reingewertz, T.H., Benyamini, H., Lebendiker, M., Shalev, D.E. and Friedler, A. (2009) The C-terminal domain of the HIV-1 Vif protein is natively unfolded in its unbound state. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, **22**, 281-287.
218. Henriet, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol*, **354**, 55-72.

219. Bouyac, M., Courcoul, M., Bertoia, G., Baudat, Y., Gabuzda, D., Blanc, D., Chazal, N., Boulanger, P., Sire, J., Vigne, R. *et al.* (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J Virol*, **71**, 9358-9365.
220. Park, I.W., Myrick, K. and Sodroski, J. (1994) Effects of vif mutations on cell-free infectivity and replication of simian immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **7**, 1228-1236.
221. Fisher, A.G., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petteway, S., Ratner, L., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1987) The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science*, **237**, 888-893.
222. Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A. and Sodroski, J. (1992) Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*, **66**, 6489-6495.
223. Madani, N. and Kabat, D. (1998) An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol*, **72**, 10251-10255.
224. Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T. and Martin, M.A. (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*, **328**, 728-730.
225. Zou, J.X. and Luciw, P.A. (1996) The requirement for Vif of SIVmac is cell-type dependent. *J Gen Virol*, **77 (Pt 3)**, 427-434.
226. Zou, J.X. and Luciw, P.A. (1996) The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 326-330.
227. Farrow, M.A. and Sheehy, A.M. (2008) Vif and Apobec3G in the innate immune response to HIV: a tale of two proteins. *Future microbiology*, **3**, 145-154.
228. Franca, R., Spadari, S. and Maga, G. (2006) APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **12**, RA92-98.
229. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C. and Malim, M.H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, **9**, 1404-1407.
230. Carr, J.M., Davis, A.J., Feng, F., Burrell, C.J. and Li, P. (2006) Cellular interactions of virion infectivity factor (Vif) as potential therapeutic targets: APOBEC3G and more? *Curr Drug Targets*, **7**, 1583-1593.
231. Bergeron, J.R., Huthoff, H., Veselkov, D.A., Beavil, R.L., Simpson, P.J., Matthews, S.J., Malim, M.H. and Sanderson, M.R. (2010) The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex. *PLoS Pathog*, **6**, e1000925.
232. Bernacchi, S., Mercenne, G., Tournaire, C., Marquet, R. and Paillart, J.C. (2011) Importance of the proline-rich multimerization domain on the oligomerization and nucleic acid binding properties of HIV-1 Vif. *Nucleic Acids Res*, **39**, 2404-2415.
233. Marcsisin, S.R., Narute, P.S., Emert-Sedlak, L.A., Kloczewiak, M., Smithgall, T.E. and Engen, J.R. (2011) On the solution conformation and dynamics of the HIV-1 viral infectivity factor. *J Mol Biol*, **410**, 1008-1022.
234. Reingewertz, T.H., Shalev, D.E. and Friedler, A. (2010) Structural disorder in the HIV-1 Vif protein and interaction-dependent gain of structure. *Protein Pept Lett*, **17**, 988-998.
235. Wolfe, L.S., Stanley, B.J., Liu, C., Eliason, W.K. and Xiong, Y. (2010) Dissection of the HIV Vif interaction with human E3 ubiquitin ligase. *J Virol*, **84**, 7135-7139.
236. Bernacchi, S., Freisz, S., Maechling, C., Spiess, B., Marquet, R., Dumas, P. and Ennifar, E. (2007) Aminoglycoside binding to the HIV-1 RNA dimerization initiation site: thermodynamics and effect on the kissing-loop to duplex conversion. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7128-7139.
237. Dettenhofer, M., Cen, S., Carlson, B.A., Kleiman, L. and Yu, X.F. (2000) Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol*, **74**, 8938-8945.

238. Zhang, H., Pomerantz, R.J., Dornadula, G. and Sun, Y. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol*, **74**, 8252-8261.
239. Hultquist, J.F., Lengyel, J.A., Refsland, E.W., LaRue, R.S., Lackey, L., Brown, W.L. and Harris, R.S. (2011) Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J Virol*, **85**, 11220-11234.
240. Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K. *et al.* (2012) Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*, **481**, 365-370.
241. Wang, J., Zhang, W., Lv, M., Zuo, T., Kong, W. and Yu, X. (2011) Identification of a Cullin5-ElonginB-ElonginC E3 complex in degradation of feline immunodeficiency virus Vif-mediated feline APOBEC3 proteins. *J Virol*, **85**, 12482-12491.
242. Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. and Yu, X.F. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, **302**, 1056-1060.
243. Yu, Y., Xiao, Z., Ehrlich, E.S., Yu, X. and Yu, X.F. (2004) Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev*, **18**, 2867-2872.
244. Donahue, J.P., Vetter, M.L., Mukhtar, N.A. and D'Aquila, R.T. (2008) The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology*, **377**, 49-53.
245. Batisse, J., Guerrero, S., Bernacchi, S., Sleiman, D., Gabus, C., Darlix, J.L., Marquet, R., Tisne, C. and Paillart, J.C. (2012) The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res*, **169**, 361-376.
246. Balaji, S., Kalpana, R. and Shapshak, P. (2006) Paradigm development: comparative and predictive 3D modeling of HIV-1 Virion Infectivity Factor (Vif). *Bioinformation*, **1**, 290-309.
247. Lv, W., Liu, Z., Jin, H., Yu, X., Zhang, L. and Zhang, L. (2007) Three-dimensional structure of HIV-1 VIF constructed by comparative modeling and the function characterization analyzed by molecular dynamics simulation. *Organic & biomolecular chemistry*, **5**, 617-626.
248. Stanley, B.J., Ehrlich, E.S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.F. and Xiong, Y. (2008) Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *J Virol*, **82**, 8656-8663.
249. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. and Wain-Hobson, S. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, **345**, 356-359.
250. Bour, S., Geleziunas, R. and Wainberg, M.A. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological reviews*, **59**, 63-93.
251. Schubert, U., Anton, L.C., Bacik, I., Cox, J.H., Bour, S., Bennink, J.R., Orlowski, M., Strebel, K. and Yewdell, J.W. (1998) CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol*, **72**, 2280-2288.
252. Margottin, F., Benichou, S., Durand, H., Richard, V., Liu, L.X., Gomas, E. and Benarous, R. (1996) Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation. *Virology*, **223**, 381-386.
253. Neil, S.J., Zang, T. and Bieniasz, P.D. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, **451**, 425-430.
254. Van Damme, N. and Guatelli, J. (2008) HIV-1 Vpu inhibits accumulation of the envelope glycoprotein within clathrin-coated, Gag-containing endosomes. *Cellular microbiology*, **10**, 1040-1057.
255. Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A. and Banting, G. (2003) Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic*, **4**, 694-709.

256. Strebel, K. (2007) HIV accessory genes Vif and Vpu. *Adv Pharmacol*, **55**, 199-232.
257. Muller, B., Tessmer, U., Schubert, U. and Krausslich, H.G. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol*, **74**, 9727-9731.
258. Paxton, W., Connor, R.I. and Landau, N.R. (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*, **67**, 7229-7237.
259. Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. and Krausslich, H.G. (2000) Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **74**, 1168-1177.
260. Zhang, S., Pointer, D., Singer, G., Feng, Y., Park, K. and Zhao, L.J. (1998) Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene*, **212**, 157-166.
261. Kino, T. and Pavlakis, G.N. (2004) Partner molecules of accessory protein Vpr of the human immunodeficiency virus type 1. *DNA and cell biology*, **23**, 193-205.
262. Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1990) Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **3**, 11-18.
263. Sawaya, B.E., Khalili, K., Mercer, W.E., Denisova, L. and Amini, S. (1998) Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem*, **273**, 20052-20057.
264. Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. and Zhao, L.J. (1995) Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem*, **270**, 25564-25569.
265. Kino, T., Gragerov, A., Kopp, J.B., Stauber, R.H., Pavlakis, G.N. and Chrousos, G.P. (1999) The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of experimental medicine*, **189**, 51-62.
266. Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, **273**, 13347-13352.
267. Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F. and Malim, M.H. (1998) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol*, **72**, 6004-6013.
268. Muthumani, K., Choo, A.Y., Hwang, D.S., Dayes, N.S., Chattergoon, M., Mayilvahanan, S., Thieu, K.P., Buckley, P.T., Emmanuel, J., Premkumar, A. *et al.* (2005) HIV-1 Viral protein-r (Vpr) protects against lethal superantigen challenge while maintaining homeostatic T cell levels in vivo. *Mol Ther*, **12**, 910-921.
269. Muthumani, K., Hwang, D.S., Choo, A.Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N.S., Thieu, K.P. and Weiner, D.B. (2005) HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *International immunology*, **17**, 103-116.
270. Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K.F., Vieira, H.L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J.P. *et al.* (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of experimental medicine*, **191**, 33-46.
271. Selig, L., Pages, J.C., Tanchou, V., Preveral, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L.X., Erdtmann, L., Darlix, J., Benarous, R. and Benichou, S. (1999) Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol*, **73**, 592-600.
272. de Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem*, **272**, 30753-30759.
273. Li, M.S., Garcia-Asua, G., Bhattacharyya, U., Mascagni, P., Austen, B.M. and Roberts, M.M. (1996) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to nucleocapsid protein p7 in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, **218**, 352-355.

274. Sato, A., Yoshimoto, J., Isaka, Y., Miki, S., Suyama, A., Adachi, A., Hayami, M., Fujiwara, T. and Yoshie, O. (1996) Evidence for direct association of Vpr and matrix protein p17 within the HIV-1 virion. *Virology*, **220**, 208-212.
275. Bischerour, J., Tauc, P., Leh, H., de Rocquigny, H., Roques, B. and Mouscadet, J.F. (2003) The (52-96) C-terminal domain of Vpr stimulates HIV-1 IN-mediated homologous strand transfer of mini-viral DNA. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2694-2702.
276. de Rocquigny, H., Caneparo, A., Delaunay, T., Bischerour, J., Mouscadet, J.F. and Roques, B.P. (2000) Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus. *Eur J Biochem*, **267**, 3654-3660.
277. De Rocquigny, H., Caneparo, A., Dong, C.Z., Delaunay, T. and Roques, B.P. (2000) Generation of monoclonal antibodies specifically directed against the proximal zinc finger of HIV type 1 NCp7. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **16**, 1259-1267.
278. Wecker, K. and Roques, B.P. (1999) NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr. *Eur J Biochem*, **266**, 359-369.
279. Schuler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J. and Roques, B.P. (1999) NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol*, **285**, 2105-2117.
280. Wecker, K., Morellet, N., Bouaziz, S. and Roques, B.P. (2002) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H2O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domains. *Eur J Biochem*, **269**, 3779-3788.
281. Bruns, K., Fossen, T., Wray, V., Henklein, P., Tessmer, U. and Schubert, U. (2003) Structural characterization of the HIV-1 Vpr N terminus: evidence of cis/trans-proline isomerism. *J Biol Chem*, **278**, 43188-43201.
282. Votteler, J., Studtrucker, N., Sorgel, S., Munch, J., Rucker, E., Kirchhoff, F., Schick, B., Henklein, P., Fossen, T., Bruns, K. *et al.* (2007) Proline 35 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr regulates the integrity of the N-terminal helix and the incorporation of Vpr into virus particles and supports the replication of R5-tropic HIV-1 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol*, **81**, 9572-9576.
283. Arunagiri, C., Macreadie, I., Hewish, D. and Azad, A. (1997) A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4+ lymphocytes. *Apoptosis*, **2**, 69-76.
284. Coeytaux, E., Coulaud, D., Le Cam, E., Danos, O. and Kichler, A. (2003) The cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J Biol Chem*, **278**, 18110-18116.
285. Henklein, P., Bruns, K., Sherman, M.P., Tessmer, U., Licha, K., Kopp, J., de Noronha, C.M., Greene, W.C., Wray, V. and Schubert, U. (2000) Functional and structural characterization of synthetic HIV-1 Vpr that transduces cells, localizes to the nucleus, and induces G2 cell cycle arrest. *J Biol Chem*, **275**, 32016-32026.
286. Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. and Roques, B.P. (2003) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol*, **327**, 215-227.
287. Morellet, N., Roques, B.P. and Bouaziz, S. (2009) Structure-function relationship of Vpr: biological implications. *Curr HIV Res*, **7**, 184-210.
288. Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (1997) In Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, H. E. (eds.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
289. Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C.T., Sodroski, J. and Gottlinger, H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 363-365.
290. Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A. and Holmes, E.C. (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews. Genetics*, **5**, 52-61.
291. Jolly, C. and Sattentau, Q.J. (2004) Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic*, **5**, 643-650.

292. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. and Charneau, P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, **101**, 173-185.
293. Sherman, M.P. and Greene, W.C. (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **4**, 67-73.
294. Zaitseva, L., Cherepanov, P., Leyens, L., Wilson, S.J., Rasaiyaah, J. and Fassati, A. (2009) HIV-1 exploits importin 7 to maximize nuclear import of its DNA genome. *Retrovirology*, **6**, 11.
295. Sherman, P.A. and Fyfe, J.A. (1990) Human immunodeficiency virus integration protein expressed in Escherichia coli possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5119-5123.
296. Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. (1991) HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*, **67**, 1211-1221.
297. Vink, C., van Gent, D.C., Elgersma, Y. and Plasterk, R.H. (1991) Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. *J Virol*, **65**, 4636-4644.
298. Vink, C., Yeheskiely, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. and Plasterk, R.H. (1991) Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6691-6698.
299. Carteau, S., Gorelick, R.J. and Bushman, F.D. (1999) Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *J Virol*, **73**, 6670-6679.
300. Poljak, L., Batson, S.M., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. and Kas, E. (2003) Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *J Mol Biol*, **329**, 411-421.
301. Azoulay, J., Clamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P. and Mely, Y. (2003) Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *J Mol Biol*, **326**, 691-700.
302. Beltz, H., Azoulay, J., Bernacchi, S., Clamme, J.P., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2003) Impact of the terminal bulges of HIV-1 cTAR DNA on its stability and the destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol*, **328**, 95-108.
303. Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2002) HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of TAR and its complementary sequence. *J Mol Biol*, **317**, 385-399.
304. Tsuchihashi, Z. and Brown, P.O. (1994) DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol*, **68**, 5863-5870.
305. Hope, T.J. (1999) The ins and outs of HIV Rev. *Archives of biochemistry and biophysics*, **365**, 186-191.
306. Huffman, K.M. and Arrigo, S.J. (1997) Identification of cis-acting repressor activity within human immunodeficiency virus type 1 protease sequences. *Virology*, **234**, 253-260.
307. Butsch, M. and Boris-Lawrie, K. (2000) Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol*, **74**, 11531-11537.
308. Dorman, N. and Lever, A. (2000) Comparison of viral genomic RNA sorting mechanisms in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and Moloney murine leukemia virus. *J Virol*, **74**, 11413-11417.
309. Levin, J.G. and Rosenak, M.J. (1976) Synthesis of murine leukemia virus proteins associated with virions assembled in actinomycin D-treated cells: evidence for persistence of viral messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1154-1158.
310. Griffin, S.D., Allen, J.F. and Lever, A.M. (2001) The major human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) packaging signal is present on all HIV-2 RNA species: cotranslational RNA encapsidation and limitation of Gag protein confer specificity. *J Virol*, **75**, 12058-12069.

311. Ni, N., Nikolaitchik, O.A., Dilley, K.A., Chen, J., Galli, A., Fu, W., Prasad, V.V., Ptak, R.G., Pathak, V.K. and Hu, W.S. (2011) Mechanisms of human immunodeficiency virus type 2 RNA packaging: efficient trans packaging and selection of RNA copackaging partners. *J Virol*, **85**, 7603-7612.
312. Cullen, B.R. (2005) Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature*, **433**, 26-27.
313. Schwartz, O., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J.M. and Danos, O. (1992) Activation pathways and human immunodeficiency virus type 1 replication are not altered in CD4+ T cells expressing the nef protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **8**, 545-551.
314. Schwartz, O., Virelizier, J.L., Montagnier, L. and Hazan, U. (1990) A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene*, **88**, 197-205.
315. Adamson, C.S. and Freed, E.O. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol*, **55**, 347-387.
316. Cimarelli, A. and Darlix, J.L. (2002) Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1166-1184.
317. Waheed, A.A. and Freed, E.O. (2009) Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res*, **143**, 162-176.
318. Wills, J.W. and Craven, R.C. (1991) Form, function, and use of retroviral gag proteins. *Aids*, **5**, 639-654.
319. Berthoux, L., Pechoux, C., Ottmann, M., Morel, G. and Darlix, J.L. (1997) Mutations in the N-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein affect virion core structure and proviral DNA synthesis. *J Virol*, **71**, 6973-6981.
320. Cimarelli, A. and Luban, J. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 virion density is not determined by nucleocapsid basic residues. *J Virol*, **74**, 6734-6740.
321. Cimarelli, A., Sandin, S., Hoglund, S. and Luban, J. (2000) Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol*, **74**, 3046-3057.
322. Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V. and Spearman, P. (2000) Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol*, **74**, 7238-7249.
323. Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D. and Rein, A. (2001) RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5246-5251.
324. Derdowski, A., Ding, L. and Spearman, P. (2004) A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol*, **78**, 1230-1242.
325. Grigorov, B., Decimo, D., Smagulova, F., Pechoux, C., Mougel, M., Muriaux, D. and Darlix, J.L. (2007) Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology*, **4**, 54.
326. Didierlaurent, L., Houzet, L., Morichaud, Z., Darlix, J.L. and Mougel, M. (2008) The conserved N-terminal basic residues and zinc-finger motifs of HIV-1 nucleocapsid restrict the viral cDNA synthesis during virus formation and maturation. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4745-4753.
327. Houzet, L., Morichaud, Z., Didierlaurent, L., Muriaux, D., Darlix, J.L. and Mougel, M. (2008) Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2311-2319.
328. Gomez, C.Y. and Hope, T.J. (2006) Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J Virol*, **80**, 8796-8806.
329. Lee, Y.M., Liu, B. and Yu, X.F. (1999) Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol*, **73**, 5654-5662.
330. Bieniasz, P.D. (2009) The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, **5**, 550-558.

331. Jouvenet, N., Neil, S.J., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M. and Bieniasz, P.D. (2006) Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS biology*, **4**, e435.
332. Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.L. and Muriaux, D. (2006) Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol*, **359**, 848-862.
333. Molle, D., Segura-Morales, C., Camus, G., Berlioz-Torrent, C., Kjems, J., Basyuk, E. and Bertrand, E. (2009) Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *J Biol Chem*, **284**, 19727-19743.
334. Finzi, A., Orthwein, A., Mercier, J. and Cohen, E.A. (2007) Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J Virol*, **81**, 7476-7490.
335. Welsch, S., Keppler, O.T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J. and Krausslich, H.G. (2007) HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog*, **3**, e36.
336. Ono, A., Waheed, A.A., Joshi, A. and Freed, E.O. (2005) Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay. *J Virol*, **79**, 14131-14140.
337. Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M. and Mothes, W. (2003) Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic*, **4**, 785-801.
338. Carlton, J.G., Agromayor, M. and Martin-Serrano, J. (2008) Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10541-10546.
339. Muller, B., Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., Zentgraf, H. and Krausslich, H.G. (2004) Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol*, **78**, 10803-10813.
340. Larson, D.R., Johnson, M.C., Webb, W.W. and Vogt, V.M. (2005) Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15453-15458.
341. Hubner, W., Chen, P., Del Portillo, A., Liu, Y., Gordon, R.E. and Chen, B.K. (2007) Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol*, **81**, 12596-12607.
342. Rudner, L., Nydegger, S., Coren, L.V., Nagashima, K., Thali, M. and Ott, D.E. (2005) Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol*, **79**, 4055-4065.
343. Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R. and Tsien, R.Y. (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol*, **23**, 1308-1314.
344. Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E. and Freed, E.O. (2008) Real-Time Visualization of HIV-1 GAG Trafficking in Infected Macrophages. *PLoS Pathog*, **4**, e1000015.
345. Perlman, M. and Resh, M.D. (2006) Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic*, **7**, 731-745.
346. Nguyen, D.H. and Hildreth, J.E. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*, **74**, 3264-3272.
347. Nydegger, S., Khurana, S., Krementsov, D.N., Foti, M. and Thali, M. (2006) Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol*, **173**, 795-807.
348. Orenstein, J.M. (1998) The Warthin-Finkeldey-type giant cell in HIV infection, what is it? *Ultrastructural pathology*, **22**, 293-303.
349. Bukrinskaya, A.G. (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology*, **149**, 1067-1082.
350. Ramakrishnan, V. (2011) Molecular biology. The eukaryotic ribosome. *Science*, **331**, 681-682.

351. Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2009) Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 435-443.
352. Liljas, A. (1999) Function is structure. *Science*, **285**, 2077-2078.
353. Holcik, M. and Pestova, T.V. (2007) Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on translational control and non-coding RNA. *EMBO reports*, **8**, 639-643.
354. Ivanova, N., Lindell, M., Pavlov, M., Holmberg Schiavone, L., Wagner, E.G. and Ehrenberg, M. (2007) Structure probing of tmRNA in distinct stages of trans-translation. *RNA*, **13**, 713-722.
355. Kapp, L.D. and Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem*, **73**, 657-704.
356. Pisarev, A.V., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, **131**, 286-299.
357. Taylor, D.J., Nilsson, J., Merrill, A.R., Andersen, G.R., Nissen, P. and Frank, J. (2007) Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *EMBO J*, **26**, 2421-2431.
358. Pisarev, A.V., Unbehaun, A., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2007) Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods in enzymology*, **430**, 147-177.
359. Pisareva, V.P., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2007) Kinetic analysis of the interaction of guanine nucleotides with eukaryotic translation initiation factor eIF5B. *Biochemistry*, **46**, 2622-2629.
360. Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, **35**, 235-241.
361. Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M. and Siliciano, R.F. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol*, **75**, 181-191.
362. Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Guttler, T. and Gorlich, D. (2009) Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *Embo J*, **28**, 2541-2553.
363. Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2007) Translational control of retroviruses. *Nature reviews*, **5**, 128-140.
364. Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D. and Ohlmann, T. (2009) Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 542-557.
365. Jackson, R.J., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 113-127.
366. Shatkin, A.J. (1976) Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, **9**, 645-653.
367. Shatkin, A.J. and Both, G.W. (1976) Reovirus mRNA: transcription and translation. *Cell*, **7**, 305-313.
368. Prevot, D., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, **95**, 141-156.
369. Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C.H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2003) Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *Embo J*, **22**, 1909-1921.
370. Miele, G. and Lever, A.M. (1996) Expression of mutant and wild-type gag proteins for gene therapy in HIV-1 infection. *Gene therapy*, **3**, 357-361.
371. Ricci, E.P., Soto Rifo, R., Herbreteau, C.H., Decimo, D. and Ohlmann, T. (2008) Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochemical Society transactions*, **36**, 690-693.
372. Filbin, M.E. and Kieft, J.S. (2009) Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 267-276.
373. Fitzgerald, K.D. and Semler, B.L. (2009) Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 518-528.
374. Fraser, C.S. and Doudna, J.A. (2007) Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature reviews*, **5**, 29-38.

375. Hanson, P.J., Zhang, H.M., Hemida, M.G., Ye, X., Qiu, Y. and Yang, D. (2012) IRES-Dependent Translational Control during Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Frontiers in microbiology*, **3**, 92.
376. Jackson, R.J. (2005) Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochemical Society transactions*, **33**, 1231-1241.
377. Lopez-Lastra, M., Rivas, A. and Barria, M.I. (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res*, **38**, 121-146.
378. Martinez-Salas, E. (2008) The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol*, **16**, 230-237.
379. Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. and Lopez de Quinto, S. (2001) Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol*, **82**, 973-984.
380. Pacheco, A. and Martinez-Salas, E. (2010) Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2010**, 458927.
381. Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourenco, L. and Vagner, S. (2003) IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res*, **31**, 427-428.
382. Bonnal, S., Schaeffer, C., Creancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A.C. and Vagner, S. (2003) A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem*, **278**, 39330-39336.
383. Mokrejs, M., Masek, T., Vopalensky, V., Hlubucek, P., Delbos, P. and Pospisek, M. (2010) IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*, **38**, D131-136.
384. Baril, M. and Brakier-Gingras, L. (2005) Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1474-1486.
385. Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C.H., Ohlmann, T. and Sargueil, B. (2010) A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res*, **38**, 1367-1381.
386. Berlioz, C. and Darlix, J.L. (1995) An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol*, **69**, 2214-2222.
387. Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V.M. and Morley, S.J. (1996) The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J*, **15**, 1371-1382.
388. Pestova, T.V., Borukhov, S.I. and Hellen, C.U. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature*, **394**, 854-859.
389. Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J. and Hellen, C.U. (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*, **12**, 67-83.
390. Bakhshesh, M., Groppelli, E., Willcocks, M.M., Royall, E., Belsham, G.J. and Roberts, L.O. (2008) The picornavirus avian encephalomyelitis virus possesses a hepatitis C virus-like internal ribosome entry site element. *J Virol*, **82**, 1993-2003.
391. de Breyne, S., Bonderoff, J.M., Chumakov, K.M., Lloyd, R.E. and Hellen, C.U. (2008) Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases. *Virology*, **378**, 118-122.
392. de Breyne, S., Yu, Y., Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (2008) Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site. *RNA*, **14**, 367-380.
393. Deniz, N., Lenarcic, E.M., Landry, D.M. and Thompson, S.R. (2009) Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA*, **15**, 932-946.
394. Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E. and Sarnow, P. (2000) Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol*, **20**, 4990-4999.

395. Komar, A.A. and Hatzoglou, M. (2011) Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle*, **10**, 229-240.
396. Lewis, S.M. and Holcik, M. (2008) For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene*, **27**, 1033-1035.
397. Attal, J., Theron, M.C., Taboit, F., Cajero-Juarez, M., Kann, G., Bolifraud, P. and Houdebine, L.M. (1996) The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Lett*, **392**, 220-224.
398. Deffaud, C. and Darlix, J.L. (2000) Characterization of an internal ribosomal entry segment in the 5' leader of murine leukemia virus env RNA. *J Virol*, **74**, 846-850.
399. Deffaud, C. and Darlix, J.L. (2000) Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J Virol*, **74**, 11581-11588.
400. Lopez-Lastra, M., Gabus, C. and Darlix, J.L. (1997) Characterization of an internal ribosomal entry segment within the 5' leader of avian reticuloendotheliosis virus type A RNA and development of novel MLV-REV-based retroviral vectors. *Hum Gene Ther*, **8**, 1855-1865.
401. Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L. and Sonenberg, N. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol*, **77**, 3939-3949.
402. Chamond, N., Locker, N. and Sargueil, B. (2010) The different pathways of HIV genomic RNA translation. *Biochemical Society transactions*, **38**, 1548-1552.
403. Herbreteau, C.H., Weill, L., Decimo, D., Prevot, D., Darlix, J.L., Sargueil, B. and Ohlmann, T. (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1001-1007.
404. Nicholson, M.G., Rue, S.M., Clements, J.E. and Barber, S.A. (2006) An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform. *Virology*, **349**, 325-334.
405. Abbink, T.E., Ooms, M., Haasnoot, P.C. and Berkhout, B. (2005) The HIV-1 leader RNA conformational switch regulates RNA dimerization but does not regulate mRNA translation. *Biochemistry*, **44**, 9058-9066.
406. Purzycka, K.J., Pachulska-Wieczorek, K. and Adamiak, R.W. (2011) The in vitro loose dimer structure and rearrangements of the HIV-2 leader RNA. *Nucleic Acids Res*, **39**, 7234-7248.
407. Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. and Mak, J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature reviews*, **2**, 461-472.
408. Yilmaz, A., Bolinger, C. and Boris-Lawrie, K. (2006) Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res*, **4**, 131-139.
409. Andersen, J.L. and Planelles, V. (2005) The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res*, **3**, 43-51.
410. Pyronnet, S., Pradayrol, L. and Sonenberg, N. (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular cell*, **5**, 607-616.
411. Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med*, **4**, 65-71.
412. Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S.J. and Darlix, J.L. (2002) In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol*, **318**, 9-20.
413. Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. and Carrasco, L. (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12966-12971.
414. Camerini, V., Decimo, D., Balvay, L., Pistello, M., Bendinelli, M., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2008) A dormant internal ribosome entry site controls translation of feline immunodeficiency virus. *J Virol*, **82**, 3574-3583.

415. Lawrence, D.C., Stover, C.C., Noznitsky, J., Wu, Z. and Summers, M.F. (2003) Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol*, **326**, 529-542.
416. Liang, C., Hu, J., Russell, R.S. and Wainberg, M.A. (2002) Translation of Pr55(gag) augments packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA in a cis-acting manner. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **18**, 1117-1126.
417. Poon, D.T., Chertova, E.N. and Ott, D.E. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 preferentially encapsidates genomic RNAs that encode Pr55(Gag): functional linkage between translation and RNA packaging. *Virology*, **293**, 368-378.
418. Anderson, J.L., Johnson, A.T., Howard, J.L. and Purcell, D.F. (2007) Both linear and discontinuous ribosome scanning are used for translation initiation from bicistronic human immunodeficiency virus type 1 env mRNAs. *J Virol*, **81**, 4664-4676.
419. Anderson, E.C. and Lever, A.M. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol*, **80**, 10478-10486.
420. Butsch, M. and Boris-Lawrie, K. (2002) Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion? *J Virol*, **76**, 3089-3094.
421. Cimarelli, A. and Luban, J. (1999) Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol*, **73**, 5388-5401.
422. Wilson, S.A., Sieiro-Vazquez, C., Edwards, N.J., Iourin, O., Byles, E.D., Kotsopoulou, E., Adamson, C.S., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. and Martin-Rendon, E. (1999) Cloning and characterization of hIF2, a human homologue of bacterial translation initiation factor 2, and its interaction with HIV-1 matrix. *Biochem J*, **342 (Pt 1)**, 97-103.
423. Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 651-674.
424. Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E. and Hellen, C.U. (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, **403**, 332-335.
425. Abbink, T.E. and Berkhout, B. (2003) A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon. *J Biol Chem*, **278**, 11601-11611.
426. Anger, A.M., Armache, J.P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N. and Beckmann, R. (2013) Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*, **497**, 80-85.
427. Lin, A., Chan, Y.L., McNally, J., Peleg, D., Meyuhas, O. and Wool, I.G. (1987) The primary structure of rat ribosomal protein L7. The presence near the amino terminus of L7 of five tandem repeats of a sequence of 12 amino acids. *J Biol Chem*, **262**, 12665-12671.
428. Stoykova, A.S., Dabeva, M.D., Dimova, R.N. and Hadjiolov, A.A. (1985) Ribosome biogenesis and nucleolar ultrastructure in neuronal and oligodendroglial rat brain cells. *Journal of neurochemistry*, **45**, 1667-1676.
429. Tsurugi, K., Collatz, E., Wool, E.G. and Lin, A. (1976) Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins L4, L5, L7, L9, L11, L12, L13, L21, L22, L23, L26, L27, L30, L33, L35', L37, and L39. *J Biol Chem*, **251**, 7940-7946.
430. Kasai, H., Nadano, D., Hidaka, E., Higuchi, K., Kawakubo, M., Sato, T.A. and Nakayama, J. (2003) Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem*, **51**, 567-574.
431. Ko, J.R., Wu, J.Y., Kirby, R., Li, I.F. and Lin, A. (2006) Mapping the essential structures of human ribosomal protein L7 for nuclear entry, ribosome assembly and function. *FEBS Lett*, **580**, 3804-3810.
432. Lin, A. (1991) Localization of surface peptide from ribosomal protein L7 on 80 S ribosome by biotinylation. *FEBS Lett*, **287**, 121-124.
433. Tsai, Y.J., Lee, H.I. and Lin, A. (2012) Ribosome distribution in HeLa cells during the cell cycle. *PLoS One*, **7**, e32820.

434. Hemmerich, P., von Mikecz, A., Neumann, F., Sozeri, O., Wolff-Vorbeck, G., Zoebelein, R. and Krawinkel, U. (1993) Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents. *Nucleic Acids Res*, **21**, 223-231.
435. Tropsha, A., Bowen, J.P., Brown, F.K. and Kizer, J.S. (1991) Do interhelical side chain-backbone hydrogen bonds participate in formation of leucine zipper coiled coils? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9488-9492.
436. Kizer, J.S. and Tropsha, A. (1991) A motif found in propeptides and prohormones that may target them to secretory vesicles. *Biochemical and biophysical research communications*, **174**, 586-592.
437. Wool, I.G., Chan, Y.L. and Gluck, A. (1995) Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **73**, 933-947.
438. Neumann, F., Hemmerich, P., von Mikecz, A., Peter, H.H. and Krawinkel, U. (1995) Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 195-202.
439. Wu, W.C., Liu, H.W. and Lin, A. (2007) Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS Lett*, **581**, 651-657.
440. Huo, J., Luo, R.H., Metz, S.A. and Li, G. (2002) Activation of caspase-2 mediates the apoptosis induced by GTP-depletion in insulin-secreting (HIT-T15) cells. *Endocrinology*, **143**, 1695-1704.
441. Johnson, A.E. and van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 799-842.
442. Neuhof, A., Rolls, M.M., Jungnickel, B., Kalies, K.U. and Rapoport, T.A. (1998) Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell*, **9**, 103-115.
443. Nicchitta, C.V. and Zheng, T. (1997) Regulation of the ribosome-membrane junction at early stages of presecretory protein translocation in the mammalian endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **139**, 1697-1708.
444. Potter, M.D., Seiser, R.M. and Nicchitta, C.V. (2001) Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol*, **11**, 112-115.
445. McLaren, M., Marsh, K. and Cochrane, A. (2008) Modulating HIV-1 RNA processing and utilization. *Front Biosci*, **13**, 5693-5707.
446. Clamme, J.P., Azoulay, J. and Mely, Y. (2003) Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, **84**, 1960-1968.
447. Clamme, J.P., Krishnamoorthy, G. and Mely, Y. (2003) Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1617**, 52-61.
448. Lemay, J., Maidou-Peindara, P., Bader, T., Ennifar, E., Rain, J.C., Benarous, R. and Liu, L.X. (2008) HuR interacts with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, and modulates reverse transcription in infected cells. *Retrovirology*, **5**, 47.
449. Lemay, J., Maidou-Peindara, P., Cancio, R., Ennifar, E., Coadou, G., Maga, G., Rain, J.C., Benarous, R. and Liu, L.X. (2008) AKAP149 binds to HIV-1 reverse transcriptase and is involved in the reverse transcription. *J Mol Biol*, **383**, 783-796.
450. Witte, S., Neumann, F., Krawinkel, U. and Przybylski, M. (1996) Mass spectrometric identification of leucine zipper-like homodimer complexes of the autoantigen L7. *J Biol Chem*, **271**, 18171-18175.
451. Levesque, K., Halvorsen, M., Abrahamyan, L., Chatel-Chaix, L., Poupon, V., Gordon, H., DesGroseillers, L., Gatignol, A. and Mouland, A.J. (2006) Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. *Traffic*, **7**, 1177-1193.

452. Benichou, S., Bomsel, M., Bodeus, M., Durand, H., Doute, M., Letourneur, F., Camonis, J. and Benarous, R. (1994) Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem*, **269**, 30073-30076.
453. Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B.L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M.C. and Benarous, R. (1999) Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol*, **73**, 1350-1361.
454. Busschots, K., Voet, A., De Maeyer, M., Rain, J.C., Emiliani, S., Benarous, R., Desender, L., Debyser, Z. and Christ, F. (2007) Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. *J Mol Biol*, **365**, 1480-1492.
455. Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. and Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular cell*, **1**, 565-574.
456. Rain, J.C., Cribier, A., Gerard, A., Emiliani, S. and Benarous, R. (2009) Yeast two-hybrid detection of integrase-host factor interactions. *Methods*, **47**, 291-297.
457. Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U. and Malim, M.H. (1997) HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J*, **16**, 4531-4539.
458. Simon, J.H., Fouchier, R.A., Southerling, T.E., Guerra, C.B., Grant, C.K. and Malim, M.H. (1997) The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *J Virol*, **71**, 5259-5267.
459. Darlix, J.L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fosse, P., Mauffret, O. and Mely, Y. (2011) Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J Mol Biol*, **410**, 565-581.
460. Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H. and Bieniasz, P.D. (2004) APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol*, **78**, 12058-12061.
461. Sette, P., Dussupt, V. and Bouamr, F. (2012) Identification of the HIV-1 NC binding interface in Alix Bro1 reveals a role for RNA. *J Virol*, **86**, 11608-11615.
462. von Mikecz, A., Neu, E., Krawinkel, U. and Hemmerich, P. (1999) Human ribosomal protein L7 carries two nucleic acid-binding domains with distinct specificities. *Biochemical and biophysical research communications*, **258**, 530-536.
463. Boutant, E., Didier, P., Niehl, A., Mely, Y., Ritzenthaler, C. and Heinlein, M. (2010) Fluorescent protein recruitment assay for demonstration and analysis of in vivo protein interactions in plant cells and its application to Tobacco mosaic virus movement protein. *Plant J*.
464. Fritz, J.V., Dujardin, D., Godet, J., Didier, P., De Mey, J., Darlix, J.L., Mely, Y. and de Rocquigny, H. (2010) HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag. *J Virol*, **84**, 1585-1596.
465. Griffin, B.A., Adams, S.R. and Tsien, R.Y. (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, **281**, 269-272.
466. Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J. and Tsien, R.Y. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc*, **124**, 6063-6076.
467. Ott, D.E., Coren, L.V. and Shatzer, T. (2009) The nucleocapsid region of human immunodeficiency virus type 1 Gag assists in the coordination of assembly and Gag processing: role for RNA-Gag binding in the early stages of assembly. *J Virol*, **83**, 7718-7727.
468. van Maarseveen, N.M., Andersson, D., Lepsik, M., Fun, A., Schipper, P.J., de Jong, D., Boucher, C.A. and Nijhuis, M. (2012) Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity. *Retrovirology*, **9**, 29.
469. Fritz, J.V., Briant, L., Mely, Y., Bouaziz, S. and de Rocquigny, H. (2010) HIV-1 Viral Protein R : from structure to function. *Future Virol*, **5**, 607-625.

470. Crist, R.M., Datta, S.A., Stephen, A.G., Soheilian, F., Mirro, J., Fisher, R.J., Nagashima, K. and Rein, A. (2009) Assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag-leucine zipper chimeras: implications for retrovirus assembly. *J Virol*, **83**, 2216-2225.
471. Klein, K.C., Reed, J.C., Tanaka, M., Nguyen, V.T., Giri, S. and Lingappa, J.R. (2011) HIV Gag-leucine zipper chimeras form ABCE1-containing intermediates and RNase-resistant immature capsids similar to those formed by wild-type HIV-1 Gag. *J Virol*, **85**, 7419-7435.
472. Zhang, Y., Qian, H., Love, Z. and Barklis, E. (1998) Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol*, **72**, 1782-1789.
473. Liang, C., Hu, J., Russell, R.S., Roldan, A., Kleiman, L. and Wainberg, M.A. (2002) Characterization of a putative alpha-helix across the capsid-SP1 boundary that is critical for the multimerization of human immunodeficiency virus type 1 gag. *J Virol*, **76**, 11729-11737.
474. Bryant, M. and Ratner, L. (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 523-527.
475. Lochmann, T.L., Bann, D.V., Ryan, E.P., Beyer, A.R., Mao, A., Cochrane, A. and Parent, L.J. (2013) NC-mediated nucleolar localization of retroviral gag proteins. *Virus Res*, **171**, 304-318.
476. Witte, S. and Krawinkel, U. (1997) Specific interactions of the autoantigen L7 with multi-zinc finger protein ZNF7 and ribosomal protein S7. *J Biol Chem*, **272**, 22243-22247.
477. Campos-Olivas, R., Newman, J.L. and Summers, M.F. (2000) Solution structure and dynamics of the Rous sarcoma virus capsid protein and comparison with capsid proteins of other retroviruses. *J Mol Biol*, **296**, 633-649.
478. Turner, B.G. and Summers, M.F. (1999) Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, **285**, 1-32.
479. Feng, Y.X., Copeland, T.D., Henderson, L.E., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Levin, J.G. and Rein, A. (1996) HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7577-7581.
480. Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K.K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Duportail, G. and Mely, Y. (2011) Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. *Nucleic Acids Res*.
481. Hamard-Peron, E. and Muriaux, D. (2011) Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology*, **8**, 15.
482. Milev, M.P., Brown, C.M. and Mouland, A.J. (2010) Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology*, **7**, 41.
483. Hemmerich, P., Bosbach, S., von Mikecz, A. and Krawinkel, U. (1997) Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *Eur J Biochem*, **245**, 549-556.
484. Ka, W.H., Jeong, Y.Y. and You, J.C. (2012) Identification of the HIV-1 packaging RNA sequence (Psi) as a major determinant for the translation inhibition conferred by the HIV-1 5' UTR. *Biochemical and biophysical research communications*, **417**, 501-507.
485. Soto-Rifo, R., Limousin, T., Rubilar, P.S., Ricci, E.P., Decimo, D., Moncorge, O., Trabaud, M.A., Andre, P., Cimarelli, A. and Ohlmann, T. (2012) Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res*, **40**, 2653-2667.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Hala EL MEKDAD

CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE GAG (NCp7) ET LA PROTEINE CELLULAIRE RPL7. Aspects moléculaire et fonctionnel

Résumé

Mon travail de thèse a été basé sur la caractérisation de l'interaction entre Gag (NCp7) et la RPL7 en milieu cellulaire et *in vitro* ainsi sur son rôle fonctionnel dans le cycle viral. La polyprotéine Gag du VIH-1 orchestre l'assemblage de la particule virale, en favorisant l'encapsidation de l'ARN génomique viral par son domaine NCp7, et en recrutant des protéines virales et cellulaires. Notre hypothèse est de savoir, si Gag peut contrôler sa propre synthèse et par conséquence la transition entre traduction et encapsidation de l'ARN génomique dans les particules naissantes. Nous avons étudié les protéines cellulaires, identifiées par double hybride, qui peuvent interagir avec Gag et NCp7. La RPL7 humaine est l'une de ces protéines de la grande sous-unité 60S ribosomique. Elle se compose de 248 acides aminés et a la capacité d'inhiber la traduction. Cette fonction peut expliquer le «switch» entre la traduction et de l'encapsidation de l'ARN génomique. Les résultats ont montré que Gag était capable d'interagir avec d'autres protéines que la RPL7 de la sous-unité 60S, par son domaine NCp7.

Mots clés: VIH-1, interaction, traduction, RPL7, encapsidation, Gag, ARN génomique

Résumé en anglais

Thesis work was based on characterization of interaction between Gag (NCp7) and RPL7 in cellular environment and *in vitro* and its functional role in the viral cycle.

Gag polyprotein of HIV-1 orchestrates assembly of the virus particle, especially by driving packaging of the viral genomic RNA through its NCp7 domain, and by the recruitment of viral and cellular protein partners. Our hypothesis was to know, whether Gag can control its own synthesis and consequently the transition between translation and packaging of the genomic RNA into nascent particles. We investigated cellular proteins, identified by a two-hybrid assay, which can interact with Gag and NCp7. Human RPL7 is one such protein from large ribosomal subunit 60S. It consists of 248 amino acids and has the ability to inhibit translation. This function can explain the 'switch' between translation and packaging of the genomic RNA. Results showed that Gag was capable of interacting with RPL7 and other proteins from 60S subunit, through its NCp7 domain.

Key words: HIV-1, interaction, translation, RPL7, packaging, Gag, genomic RNA