



Mise en évidence et caractérisation de l'interaction de la protéine de la nucléocapside (NCp7) du VIH-1 avec des membranes lipidiques

Noémie Kempf

► To cite this version:

Noémie Kempf. Mise en évidence et caractérisation de l'interaction de la protéine de la nucléocapside (NCp7) du VIH-1 avec des membranes lipidiques. Biophysique. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ071 . tel-01233286

HAL Id: tel-01233286

<https://theses.hal.science/tel-01233286>

Submitted on 26 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.

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Biophysique

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Noémie KEMPF

MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE L'INTERACTION DE LA PROTEINE DE LA NUCLEOCAPSIDE (NCp7) DU VIH-1 AVEC DES MEMBRANES LIPIDIQUES

Soutenue le 26 Juin 2014 devant la commission d'examen :

Dr. Carine TISNE

Rapporteur externe

Dr. Olivier MAUFFRET

Rapporteur externe

Dr. Pierre-Emmanuel MILHIET

Examineur externe

Pr. Burkhard BECHINGER

Examineur interne

Dr. Youri ARNTZ

Co-Directeur de thèse

Pr. Yves MELY

Directeur de thèse

Remerciements



Je souhaite tout d'abord remercier le Docteur Carine Tisé et le Docteur Olivier Mauffret pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour avoir accordé du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail. Merci également au Docteur Pierre-Emmanuel Milhiet et au Docteur Burkhard Bechinger pour leur participation à mon jury de thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, le Professeur Yves Mély pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire il y a quatre ans. Merci de m'avoir transmis votre passion pour la Recherche avec patience et confiance.

J'adresse également mes remerciements à mon co-directeur de thèse, le Docteur Youri Arntz pour ses conseils et son soutien tout au long de ma thèse.

Je n'oublie pas Marlyse et Ingrid, nos deux « Super-Secrétaires ». Grâce à vous j'ai retrouvé confiance dans le secrétariat à l'université.

Merci à Hugues de Rocquigny pour sa disponibilité et sa gentillesse. Tu as toujours su répondre avec précision à mes nombreuses questions d'ordre biologique, ton aide à ce niveau fut indispensable à la réalisation de ces travaux.

Un grand merci à Guy pour ses sages conseils tout au long de mes recherches, ainsi que ses « blagues », mais surtout pour avoir remis son départ en vacances dans le but d'assister à la soutenance de ma thèse.

Merci à Pascal pour avoir constamment été disponible, aussi bien pour une filouterie que pour la science.

Merci à Eléonore pour ses conseils au quotidien et pour ces « intrusions furtives » qui ont toujours su me redonner le sourire.

Merci à Nicolas pour m'avoir enseigné la spectroscopie ainsi que la valeur d'une cuvette, pour toutes ces discussions « syndicales » sans oublier les chasses au trésor de pipettes.

Un immense merci à Vanille, ma « grande sœur du labo ». Tu m'as ouvert le chemin, ta passion et ta détermination furent les moteurs de mon travail. Merci pour nos nombreuses discussions. Ton départ pour San Francisco a laissé un grand vide dans le bureau. Je te souhaite de t'épanouir sur le nouveau continent. Et qui sait ? Peut-être qu'on se reverra avant Noël ?...

Un grand merci à mes amis indiens, Kamal et Raj, pour tous ces bons moments, à Shashi et tout particulièrement à Avishek pour son sourire quotidien, pour sa gentillesse et sa bonne humeur sans failles et surtout pour m'avoir fait découvrir la gastronomie à l'indienne et ce délicieux thé. J'attends d'ailleurs la recette...

Merci également à Manuel pour ces petits moments de détente en mode « gossip ». Je regrette que tu sois arrivé si tard au labo car je pense que nous aurions fait une bonne équipe de frenchies. Je te souhaite bon courage pour ta thèse et tout particulièrement pour la suite du projet.

Merci aux thésards du « mini-zoo », Hussein, Nedal et Rémi pour avoir rendu cette pièce agréable et propice au travail (et à la détente).

Je souhaite également remercier chaleureusement tous les membres de mon équipe, Emmanuel, Mayeul, Fred, Andreas, Julien, Ludo, Halina et Andrey ainsi que les collègues du « zoo », encore présents où déjà partis vers de nouvelles aventures, Vika, Zeinab, Marianna, Sarwat, Salah, Katia, Irina, Lesia, Redouane... Je vous souhaite à tous de belles réussites.

Je tiens également à remercier mes amis, Manu et Morgane, qui vont, ou qui sont déjà passés par là. Nos échanges concernant nos différentes expériences et votre soutien m'ont beaucoup apportés.

Un grand merci à mes amis de la musique, à Charline pour nos petites sorties, ainsi qu'à Amaël, Julien, Antoine et Mélanie, Titi et Ryoko, Moni, la bande des « Détéor » et tous les autres. Nos moments de détente furent de bonnes bouffées d'oxygène.

Un immense merci à toute ma famille, à ma marraine et à mes grands-mères pour votre soutien, et surtout à Pascale et Eric, et Fredi et Michou pour vos encouragements incessants, et sans oublier Alexis et ses nombreux sauvetages informatiques.

Je remercie tout particulièrement mon frère, Sylvain, pour avoir «flunché» avec moi de nombreuses fois. Merci d'avoir partagé ces moments et merci pour tes conseils, ton écoute et ton soutien qui sont autant de trésors à mes yeux.

Jérémy, je ne saurais assez te remercier d'avoir été à mes côtés durant ces quatre années. Sans ta présence cette aventure aurait été bien fade. Merci pour ton soutien à l'égard de mes travaux et pour ton enthousiasme quant à notre futur. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second.

Pour finir, je souhaite remercier mes parents, pour leur amour et soutien incondtionnels. Votre présence et vos encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

« Ce n'est pas dans la Science qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la Science »

(Edgar Allan Poe, La puissance de la parole)

Liste des abréviations

ABCE1	ATP-Binding Cassette E1
ADN_v	ADN proviral
AFM	Atomic Force Microscopy
ALEM	Acidic Lipid Enriched Microdomains
ANs	Acides nucléiques
AP	Adaptor Protein
APOBEC -3G	Apolipoprotein B Enzyme Catalytic polypeptid like 3G
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNpII	ARN polymerase II
BAF	Barrier to Autointegration Factor
BMH	Branched Multiple Hairpin
CA	Capside
CA^{Gag}	domaine CA de Gag
CDK9	kinase 9 cycline-dépendante
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRA_t	Complexe de recrutement de l'ARNt ^{Lys,3}
CTD	C-terminal domain
CycT1	Cycline T1
DIS	Dimerization Initiation Site
DLS	Dimer Linkage Structure
DOPC	dioleoylphosphatidylcholine
DOPE	dioleoylphosphatidyletanolamine
DOPG	dioleoylphosphatidylglycerol
DOPS	dioleoylphosphatidylsérine
DSIF	DRB-Sensitivity Inducing Factor
DSIF	DRB-Sensitivity Inducing Factor
dSTORM	direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FDA	Food and Drug Administration

FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HAT	Histone Acetyl Transferase
HBR	Highly Basic Region
HMG	High Mobility Group
HTS	High-Throughput Screening
IDP	Intrinsically Disordered Protein
IN	Intégrase
INSTI	Integrase Strand Transfer Inhibitor
IP6	inositol pentakisphosphate
LDI	Long Distance Interaction
LE	Late endosomes
LTR	Long Terminal Repeat
LUV	Large Unilamellar Vesicle
MA	Matrice
MA^{Gag}	domaine MA de Gag
MHR	Major Homology Region
mODN	methyated Oligo-Nucléotides
MP	Membrane Plasmique
MVB	Multivesicular bodies
NC	Nucléocapside
NC^{Gag}	domaine NC de Gag
NCI	Non-Covalent Inhibitor
Nef	Negative Regulatory Factor
NELF	Negative Elongation Factor
NES	Nuclear Exportation Signal
NLS	Nuuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
nt	nucléotide
NTD	N-terminal domain
p6^{Gag}	domaine p6 de Gag
PALM	Photo-Activation Light Microscopy
PBS	Primer Binding Site

PCAF	p300/CREB binding protein-associated factor
PI	Phosphatidyl inositol
PI(4,5)P₂	Phosphatidyl inositol(4,5)biphosphate
PIC	Pre-Integration Complex
PKR	Protéine Kinase R
PPT	Poly Purine Tract
PR	Protéase
PTEF-b	Positive Transcription Elongation Factor - b
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor
RE	Réticulum Endoplasmique
Rev	Regulatory of Virion Expression
RHA	RNA helicase A
RNase	Ribonucléase
RNP	Ribonucléoprotein
RRE	Rev Responsive Element
RT	Reverse Transcriptase (Transcriptase Inverse)
RTC	Reverse Transcription Complex
SCF	Skp1-cullin-F-box
SIM	Structured Illumination Microscopy
SM	sphingomyeline
SP1	Spacer 1
SP2	Spacer 2
STED	Stimulated Emission Depletion
SV	Synapse Virologique
Tat	TransActivation of Transcription
TEM	Tetraspanin-Enriched Microdomains
TI	Transcription Inverse
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
UTR	Untranslated Region
Vif	Virion Infectivity Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U

ZF	Zinc Finger
Ψ	Packaging Signal

Table des matières

<i>Introduction</i>	15
<i>Chapitre 1 : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>	16
I. Généralités sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine	16
1. Histoire et classification du VIH.....	16
2. Caractéristiques biologiques et cliniques	18
a. La primo-infection.....	18
b. La phase asymptomatique	18
c. La phase symptomatique	19
II. La structure du VIH-1 et de ses composants moléculaires.....	19
1. Le génome viral	20
2. Les protéines issues du clivage du précurseur Env : l'enveloppe virale	23
3. Les protéines issues du clivage du précurseur Gag : protéines de structure.....	25
4. Les protéines enzymatiques	28
5. Les protéines régulatrices.....	32
III. La protéine de la nucléocapside : NCp7	37
1. Du précurseur Gag à la protéine NCp7	37
2. Structure	39
3. La liaison de NCp7 aux acides nucléiques	40
4. Activité chaperonne de la NCp7	42
5. Interactions de NCp7 avec les protéines de la cellule hôte	45
6. Les inhibiteurs de la NCp7.....	47
a. Les éjecteurs de zinc	47
b. Les inhibiteurs de zinc non-covalents (NCI).....	49
IV. Le cycle réplcatif du VIH-1 vu sous l'angle de la NCp7	51
1. Le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte	52
a. De l'attachement du virus à la fusion des membranes	52

b.	L'inhibition de l'entrée.....	53
2.	De l'ARN génomique à l'ADN viral	54
a.	Le désassemblage	54
b.	La transcription inverse	54
c.	L'inhibition de la transcription inverse	60
3.	Le transport de l'ADN viral	61
4.	L'intégration	62
5.	L'expression du génome viral.....	64
a.	La phase précoce	64
b.	La phase tardive	66
6.	L'assemblage des particules virales	67
7.	Le bourgeonnement.....	67
8.	La maturation	68

Chapitre 2 : L'assemblage des particules virales, une chorégraphie dirigée par la protéine Gag..... 71

I.	L'assemblage des particules virales	71
1.	Le domaine NC de Gag : interactions Gag/ARNg	72
2.	Le domaine CA de Gag : interactions Gag/Gag.....	74
3.	Le domaine MA de Gag : interactions Gag/Membrane	76
4.	Aspect dynamique et temporel de l'assemblage	78
II.	Régulation de la liaison de Gag à la membrane plasmique.....	79
III.	L'assemblage du VIH-1 vu de la membrane plasmique.....	82
1.	Organisation de la membrane plasmique cellulaire.....	82
a.	Composition	83
b.	Les micro-domaines membranaires.....	84
2.	Conséquences de l'assemblage du VIH-1 sur l'organisation de la membrane plasmique	86

Objectifs de la thèse..... 89

Matériels et Méthodes 93

I.	Membranes lipidiques modèles	94
1.	Lipides	94
2.	Préparation de liposomes par extrusion	94
3.	Préparation des bicouches lipidiques supportées	96
a.	Support en mica.....	96
b.	Support en verre	97
c.	Préparation des GUVs.....	98
II.	Peptides	98
III.	Acides nucléiques.....	100
IV.	Culture cellulaire	101
1.	Transfections.....	102
2.	Internalisation de NPY.....	103
V.	Spectroscopie de fluorescence.....	103
1.	Expériences de titrage	103
a.	Procédure expérimentale	104
b.	Traitement et analyse des courbes de titrage	104
2.	Transfert d'énergie non-radiatif	106
a.	Principe	106
b.	Procédure expérimentale	109
VI.	Microscopie de fluorescence	109
1.	Microscopie confocale	109
2.	Microscopie biphotonique.....	110
3.	Microscopie TIRF.....	111
4.	Microscopie de haute résolution de fluorescence par détection de molécule unique	113
a.	Principe	113
b.	Mise en œuvre expérimentale.....	115
c.	Analyse et traitement des données	115
VII.	Microscopie à force atomique	116

Résultats.....	118
 <i>PARTIE 1 : Etude de l'interaction de NCp7 avec des membranes lipidiques modèles en spectroscopie de fluorescence</i>	 <i>119</i>
<i>MANUSCRIT 1</i>	<i>123</i>
 <i>PARTIE 2 : Caractérisation de l'interaction de NCp7 avec des membranes lipidiques modèles par microscopie biphotonique et microscopie combinée AFM/TIRF</i>	 <i>170</i>
<i>MANUSCRIT 2.....</i>	<i>174</i>
 <i>PARTIE 3 : Mise en œuvre d'un protocole expérimental permettant l'observation d'évènements membranaires en microscopie super-résolutive.....</i>	 <i>189</i>
I. Le neuropeptide Y et son récepteur Y ₁	191
II. L'endocytose par puits de clathrine.....	193
 <i>MANUSCRIT 3</i>	
Etude de l'internalisation du neuropeptide Y (NPY) par microscopie super-résolutive.....	198
 Conclusions et Perspectives	218
 Références.....	224

Introduction

Chapitre 1 : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. Généralités sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. Histoire et classification du VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), est un membre de la famille des retroviridae du genre lentivirus. Il infecte des cellules des systèmes immunitaire et nerveux central, où il se multiplie, provoquant à long terme une immunodépression et des infections opportunistes. Les premiers cas d'infection du VIH furent observés en 1981 aux Etats Unis. Les symptômes variés des malades avaient comme point commun une diminution de l'activité de leur système de défenses immunitaires, qui se manifestait par une chute de la population de lymphocytes T CD4⁺ et l'apparition de maladies rares telles que la pneumopathie à *Pneumocystis carinii* ou le sarcome de Kaposi. Le stade terminal de cette infection est appelé SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise). En 1983, l'équipe du Pr. Luc Montagnier identifie ce virus, et le révèle au monde grâce à des images de microscopie électronique (1). Ces recherches furent récompensées par le prix Nobel de médecine en 2008. Quelques années après la découverte de VIH-1, en 1986, le VIH-2 est également identifié (2). L'alignement des séquences génomiques de ces virus indique que le VIH-1 et le VIH-2 ne partagent que 40% d'homologie : le VIH-1 est plus proche du VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne) du chimpanzé tandis que le VIH-2 est plus proche du VIS du mangabey. Ces divergences génétiques permettent de supposer que l'origine du VIH est liée à des infections zoonotiques indépendantes de différents virus simiens à l'homme (3, 4).

Au cours du temps, les études d'alignement de séquences virales ont mis en évidence une grande diversité de souches virales (Fig. 1.1). Le VIH-1 est divisé en quatre groupes principaux :

- Le groupe M (main), lui-même divisé en 9 sous-types classés de A à K (5) représente la majorité des infections chez l'homme (> 90%). Ses sous-types sont distribués géographiquement de manière non-aléatoire : le sous-type B est plus représenté dans les régions de l'hémisphère nord ainsi qu'en Australie alors que les autres sous-types sont essentiellement retrouvés en Afrique.

- Le groupe O (outlier), plus rare, est principalement localisé en Afrique centrale (6).
- Le groupe N (non-main, non-outlier), également anecdotique est localisé au Cameroun (7)
- Le groupe P (lettre choisie après M, N et O), récemment découvert (8), est fortement apparenté au SIV du gorille.

Le VIH-2, beaucoup moins pathogène, est principalement localisé en Afrique de l'Ouest. Il est divisé en sept sous-types (de A à G).

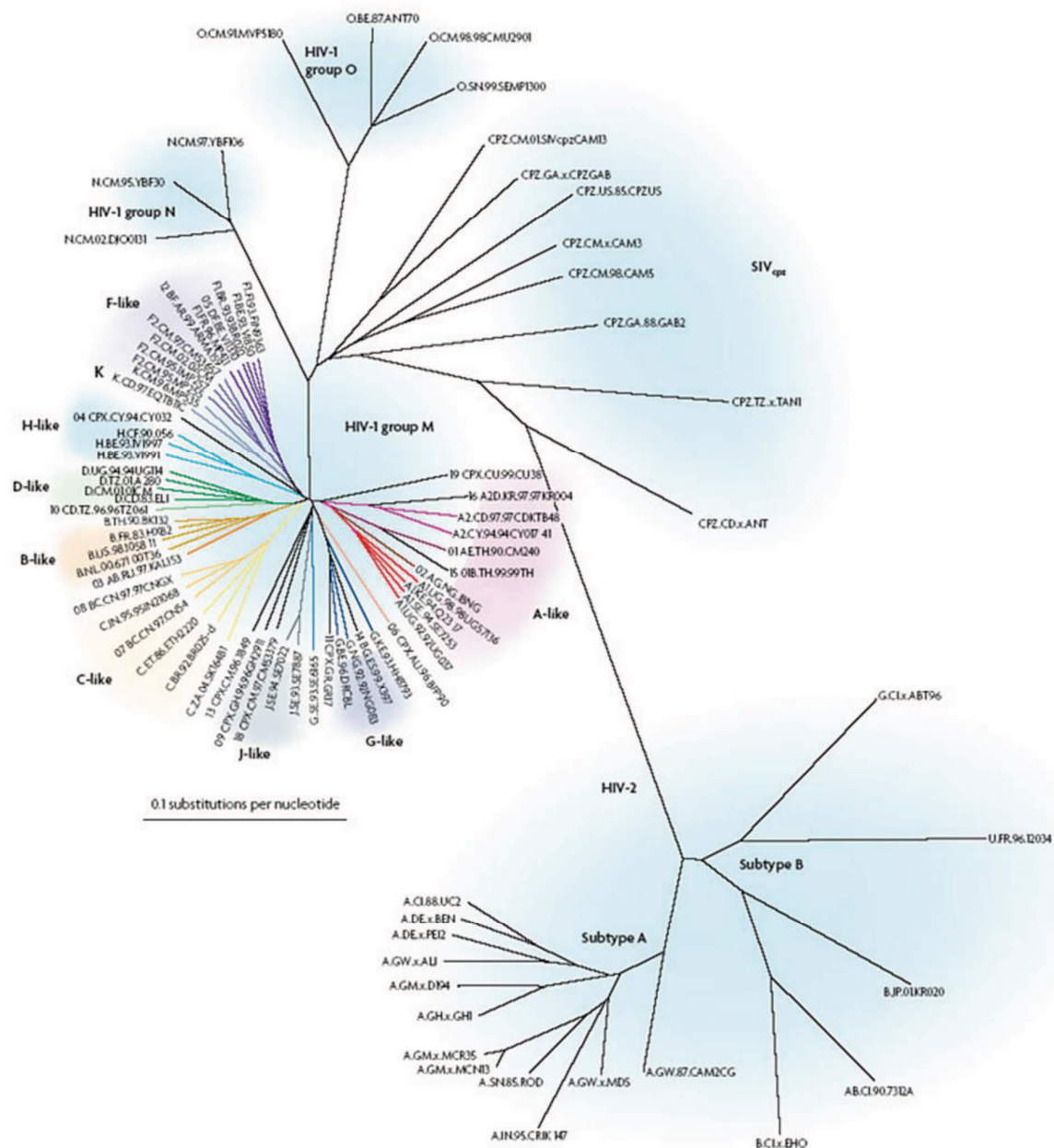


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique des lentivirus de primates. Il est basé sur l'analyse de la séquence Pol. Le VIH-1 est apparenté au VIS du gorille et du chimpanzé alors que le VIH-2 est apparenté au VIS du mangabey (9).

Il existe également des formes recombinantes, résultant de recombinaisons génétiques entre des virus de sous-types différents qui infectent une même cellule. Ces virus sont nommés CRF (Circulating Recombinant Forms).

2. Caractéristiques biologiques et cliniques

L'infection par le VIH-1 se décompose en trois phases cliniques (Fig. 1.2) :

a. La primo-infection

La primo-infection est la phase qui suit la contamination. Elle est caractérisée par une virémie aiguë dans le plasma qui favorise la dispersion du virus dans l'organisme de l'hôte (la production de virus est estimée entre 1 et 10 milliards par jour) (10). Cette phase dure de 3 à 6 semaines et peut s'accompagner, pour 50 à 70% des patients, de symptômes proches de ceux de la grippe ou de la mononucléose. Finalement la réponse immunitaire de l'organisme permet de diminuer le taux de virus plasmique. Le diagnostic de cette phase est important pour prévenir la transmission du virus et faire bénéficier le patient d'une prise en charge précoce.

b. La phase asymptomatique

Durant cette période, aucun symptôme clinique n'est généralement observé. L'infection est latente grâce à un équilibre entre la production virale et la production des cellules CD4+. Dans certains cas le virus peut même se trouver inactif dans des cellules dites « réservoirs » telles que les macrophages ou cellules CD4+ mémoires (11). C'est à cause de ces réservoirs de virus latents qui peuvent se réveiller à tout moment et que les thérapies anti-rétrovirales n'arrivent pas à cibler, que les traitements sont incapables de guérir l'infection et doivent être pris en continu. En effet, bien que la charge virale d'un patient puisse être rendue quasi-indétectable, l'arrêt du traitement provoque aussitôt la reproduction du virus. En l'absence de traitement, cette phase qui peut s'étendre sur plusieurs années (10 ans en moyenne, avec une grande variation inter-patients) s'achève par l'activation de ces réservoirs qui conduit à la diminution des lymphocytes CD4+ et l'apparition de maladies.

c. La phase symptomatique

Le système immunitaire est affaibli (le taux de lymphocytes CD4+ est inférieur à 200 par mL) par l'augmentation de la charge virale, avec pour conséquence l'apparition d'infections opportunistes et/ou de pathologies tumorales qui conduisent au décès du patient. L'efficacité des multi-thérapies aujourd'hui disponibles, a permis de réduire considérablement ces dernières, qui ne sont plus observées que chez des patients séropositifs en échec thérapeutique ou non traités.

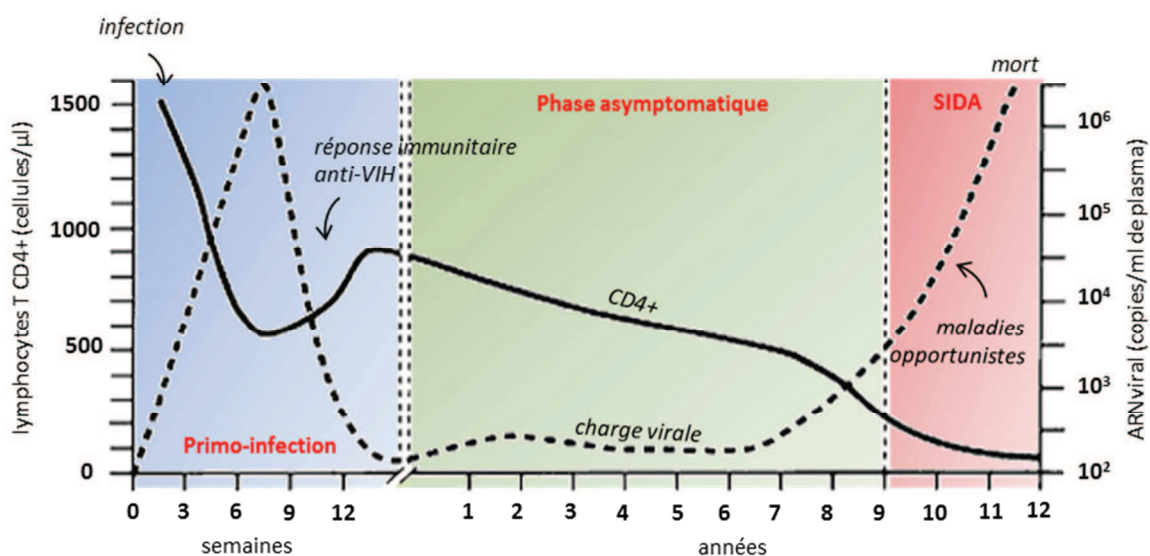


Figure 1.2 : Evolution des signes cliniques suite à une infection par le VIH-1. La ligne pleine correspond à l'évolution du taux de lymphocytes et la courbe en pointillés correspond à la charge virale dans le sang. La progression de l'infection est caractérisée par trois phases : la primo-infection, la phase asymptomatique et la phase symptomatique où le SIDA est déclaré.

II. La structure du VIH-1 et de ses composants moléculaires

La structure des virions matures infectieux fut déterminée grâce à la microscopie électronique dès 1987 (12). Ils apparaissent de forme sphérique avec un diamètre compris entre 110 et 130 nm (Fig. 1.3A). L'enveloppe lipidique d'origine cellulaire renferme une capside de forme conique qui contient un complexe ribonucléoprotéique composé de l'ARN génomique

(ARNg) et de protéines virales (Fig. 1.3B). La particule virale mature est le fruit de la maturation, par la protéase virale, des trois précurseurs polyprotéiques (Env, Gag et Pol) qui s'assemblent tout d'abord en formant une particule virale dite immature.

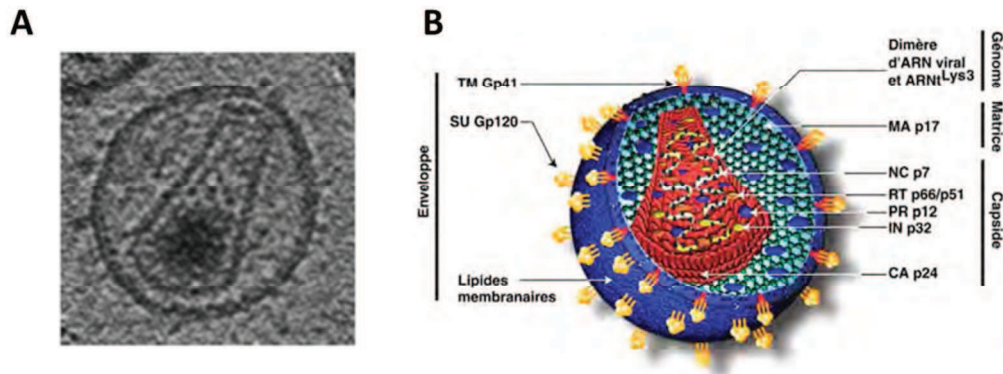


Figure 1.3 : Structure de la particule virale mature du VIH-1. (A) VIH-1 mature observé en microscopie électronique (13). **(B)** Schéma de la particule virale mature du VIH-1.

1. Le génome viral

Sous la protection de la capside virale se trouvent le dimère d'ARN génomique de polarité positive. Longs de 9200 bases, les deux ARNg sont reliés de manière non-covalente au niveau de leur extrémité 5'. A noter que l'architecture et la structure secondaire complète du génome furent récemment résolues (14). Ce génome est organisé en une région centrale, qui code les protéines de structure, les protéines enzymatiques et les protéines de régulation, bordée à ses extrémités de deux régions non-codantes (Fig. 1.4).

La séquence R est dite redondante car présente aux deux extrémités de l'ARN. Elle est composée deux séquences structurées en tige-boucle :

- La séquence TAR (TransActivation Response element) comporte 55 nucléotides. Il s'agit du site d'interaction de Tat, indispensable pour stimuler la transcription de l'ADN proviral intégré par la machinerie transcriptionnelle de la cellule infectée (15). TAR intervient également lors des sauts de brins au moment de la rétrotranscription (16). De plus, il semblerait que TAR participe également à l'encapsidation du génome viral lors l'assemblage des virions (17).

- La séquence poly(A) doit son nom au signal de polyadénylation AAUAAA qu'elle porte. Bien que cette séquence soit présente aux deux extrémités du génome, ce motif n'est fonctionnel qu'en 3'.

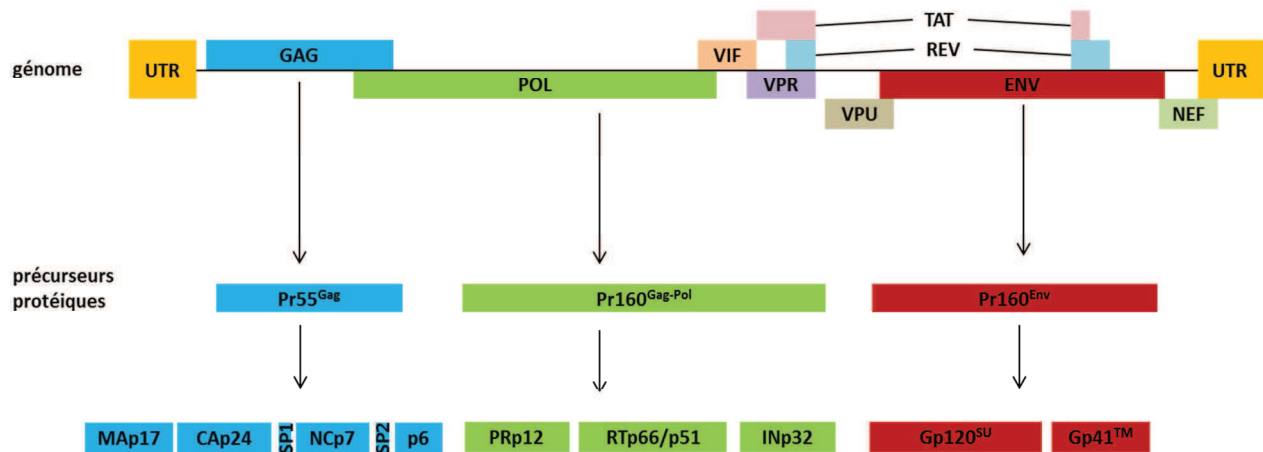


Figure 1.4 : Organisation génétique du VIH-1. Le génome viral est composé d'une région codante encadrée de deux séquences UTR. La partie inférieure montre le devenir des trois précurseurs protéiques protéolysés en protéines de structure, de protéines de l'enveloppe et de protéines enzymatiques.

En 5', la région U5 précède la région PBS (Primer Binding Site) (Fig. 1.5), qui est la première région transcrite lors de la transcription inverse. En effet, la région PBS est une séquence de dix-huit nucléotides dont l'hybridation avec un ARN cellulaire, l'ARNt^{lys3}, permet d'initier la transcription inverse (18).

En 3' du PBS se trouve la région leader, constituée de trois tiges-boucles. Cette région est située entre la région PBS et le codon d'initiation du gène gag (AUG) lui-même situé sur une quatrième tige boucle (Fig. 1.5):

- SL1 est aussi appelée DIS (Dimer Initiation Site). Il s'agit de la séquence associée à la dimérisation de l'ARN génomique (19),
- SL2 qui possède un site donneur d'épissage majeur appelé « SD » (20). C'est l'interaction de ce site avec U1 snRNP qui réprimerait le signal de poly-adénylation situé en 5' (21).

- et enfin SL3 (ou Ψ), qui contient le signal d'encapsidation essentiel à la reconnaissance et à l'encapsidation du génome lors de l'assemblage des particules virales (22),

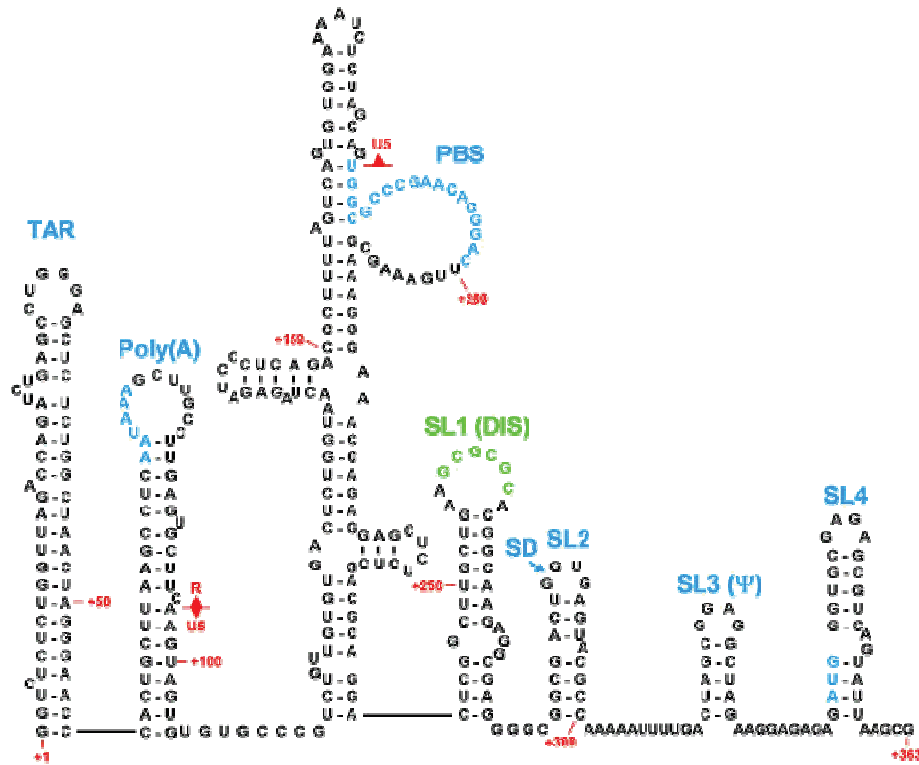


Figure 1.5 : Séquence et structure de la région 5' non codante du génome du VIH-1 (23).

En 3' du génome se trouve la séquence PPT 3' (PolyPurine Tract). Cette séquence riche en purine sert d'amorce à la synthèse du brin d'ADN(+) car elle n'est pas dégradée par l'activité RNase H de la transcriptase inverse. De plus, une copie de cette séquence nommée cPPT (central PolyPurine Tract) se trouve sur le gène pol, servant également d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN(+).

Avant d'arriver à l'extrémité 3', il faut citer la séquence RRE (Rev Responsive Element) (24) également non codante et située sur le gène env. C'est une séquence structurée en plusieurs tiges boucles, sur laquelle la protéine Rev s'oligomérisse, ce qui permet l'export nucléaire de l'ARN non- ou mono-épissé après la transcription (25).

Finalement, la région U3 possède les signaux nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte (26). En 3' de U3 on retrouve la région R identique à celle située en 5' contenant le signal de polyadénylation.

Enfin, lorsque les régions UTR ont été retro-transcrites lors de la transcription inverse elles deviennent les LTR (Long Terminal Repeat). Les LTR sont identiques et leur rôle est crucial pour l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte et de sa transcription (26). Ces régions se divisent alors en trois séquences : 5'-U3 puis R et U5-3'. Il est important de noter que les régions U3 se trouvent aux deux extrémités 5' et 3', prêtes à jouer leur rôle lors de l'intégration.

2. Les protéines issues du clivage du précurseur Env : l'enveloppe virale

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle a la singularité d'être peu fluide, du fait de sa composition particulièrement riche en cholestérol, sphingomyéline, phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PIP_x) (27–29). En effet, Gag, la polyprotéine qui gouverne l'assemblage, s'assemblerait au niveau de micro-domaines membranaires appelés « radeaux lipidiques », suggérant que Gag puisse cibler ces micro-domaines ou recruter ces lipides essentiels au bourgeonnement des particules virales (30, 31).

Des protéines d'origine cellulaire, telles que des tétraspanines et plus particulièrement CD9 en plus des glycoprotéines SUgp120 et TMgp41 sont sélectivement insérées dans l'enveloppe virale (32–35).

SUgp120 et TMgp41 sont issues de la maturation du précurseur Env et s'associent en hétérotrimères à la surface des virions.

La glycoprotéine de surface

La sous-unité de surface SUgp120 permet l'attachement du virion à la cellule cible en s'associant à ses récepteurs CD4 et corécepteurs CCR5 et CXCR4 (36). C'est une protéine composée d'environ 480 acides aminés qui est richement glycosylée : elle comporte 24 sites

potentiels de glycosylation (séquences Asn-X-Ser/Thr) (37) dont 13 sont conservés parmi les très nombreux isolats viraux. Le profil de glycosylation dépend de la cellule infectée, ce qui peut jouer un rôle important dans l'infectiosité du virus. La variabilité de la surface du virus est l'un des facteurs principaux lui permettant d'échapper à la réponse immune spécifique (38). SUgp120 est composée de cinq régions variables (V1 à V5) et de cinq régions conservées (C1 à C5) (Fig. 1.6).

La glycoprotéine transmembranaire

La sous-unité transmembranaire TMgp41, composée de 345 acides aminés, est impliquée dans le processus de fusion des membranes lors de l'entrée de la capside dans la cellule cible. Elle se subdivise en un ectodomaine N-terminal composé du peptide de fusion, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique (Fig. 1.6) (39). Contrairement à la sous-unité de surface, TMgp41 est une protéine bien conservée, notamment au niveau de son domaine de fusion, des régions heptad permettant la trimérisation du domaine transmembranaire indispensable à son insertion dans l'enveloppe virale.

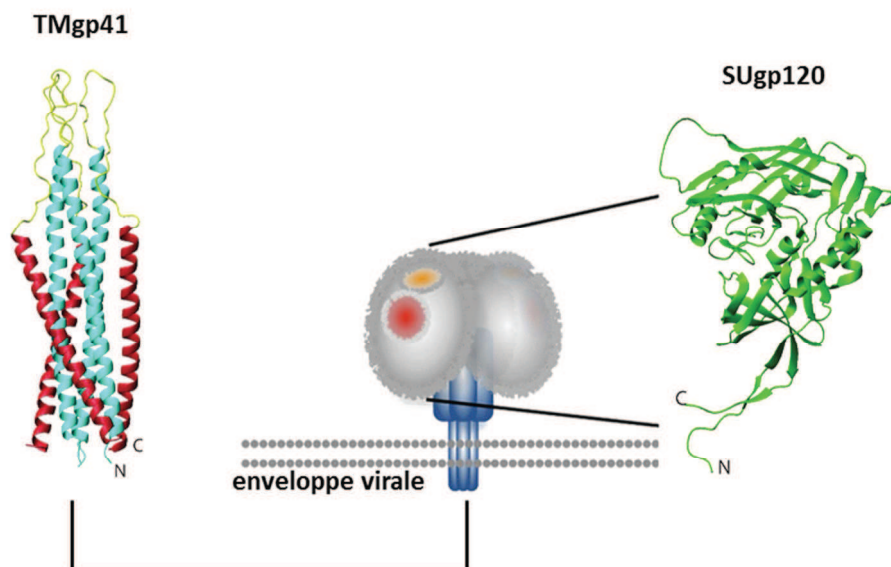


Figure 1.6 : Structure des protéines de l'enveloppe du VIH-1 (adapté de (40, 41). Les protéines membranaires du VIH-1 s'oligomérisent en hétérotrimères. Les structures tridimensionnelles représentent une sous-unité de surface SUgp120 du VIH-1 d'une part et l'ectodomaine de la sous unité transmembranaire TMgp41 du VIS d'autre part.

3. Les protéines issues du clivage du précurseur Gag : protéines de structure

Les protéines de structure du VIH-1 sont issues de la maturation du précurseur protéique Gag. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale se trouvent : la protéine de la matrice (MAp17), la protéine de la capsid (CAp24), le peptide SP1, la protéine de la nucléocapside (NCp7), le peptide SP2 et la protéine p6.

La matrice

La protéine de la matrice ou MA est composée de 132 acides aminés organisés en 5 hélices alpha avec une hélice courte 3_{10} et trois feuillets bêta, et possède une plateforme basique nommée « HBR » (Highly Basic Region) (42) (Fig. 1.7). Elle se situe directement sous l'enveloppe lipidique (43). C'est une protéine multifonctionnelle qui possède plusieurs signaux de ciblage, notamment un signal d'adressage à la membrane plasmique (44), et deux signaux potentiels de localisation nucléaire (45), régulés par des modifications structurales et biochimiques telles que la myristylation du résidu glycine situé en N-terminal (46), la multimérisation (47) ou la phosphorylation (48). En tant que sous-domaine de Gag, MA qui se trouve sous forme de trimère, permet son adressage à la membrane plasmique où a lieu la majorité du processus d'assemblage des particules virales (49). La liaison de Gag au feuillet interne de la membrane plasmique s'effectue par l'ancrage du myristate qui interagit spécifiquement avec le PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol(4,5)biphosphate) (44, 50, 51).

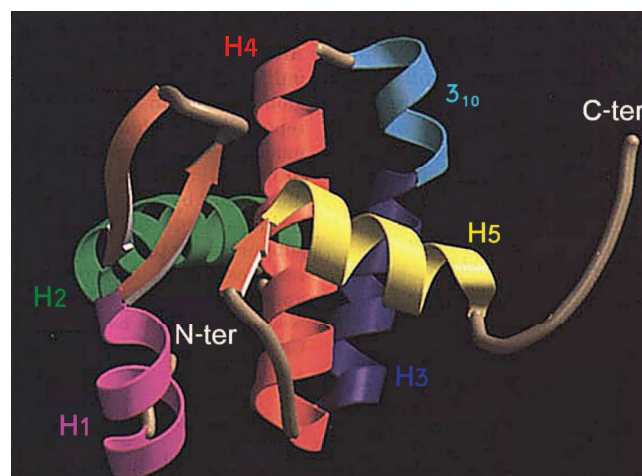


Figure 1.7 : Structure de la matrice du VIH-1 (42). Structure de la matrice non-myristylée. Les cinq hélices α (H1 à H5) et l'hélice 3_{10} sont représentées en couleurs différentes, les trois feuillets β sont représentés en orange.

De plus, le HBR permet à MA de se lier à l'ARNg de manière non-spécifique, indiquant que MA puisse participer au recrutement de l'ARNg durant l'assemblage (52, 53). Finalement, le domaine MA serait également essentiel au recrutement du précurseur Env (54). L'exposition du myristate est inhibée après la maturation protéolytique de la matrice, provoquant la déstabilisation de son oligomérisation (55). Sous forme de monomère, MA serait impliquée dans l'étape de décapsidation, dans le transport du complexe de transcription inverse (RTC pour Reverse Transcription Complexe ») vers le noyau et dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC pour Pre-Integration Complexe ») (48, 56, 57).

La capside

La protéine de la capside ou CA est constituée de 232 acides aminés, répartis en deux sous-domaines. Le corps de CA (appelé CA-NTD car positionné en N-terminal), est structuré en sept hélices alpha et relié par une portion flexible (linker) au domaine fonctionnel de la protéine (appelé CA-CTD car positionné en C-terminal), lui-même composé de quatre hélices alpha (58–60) (Fig. 1.8 A).

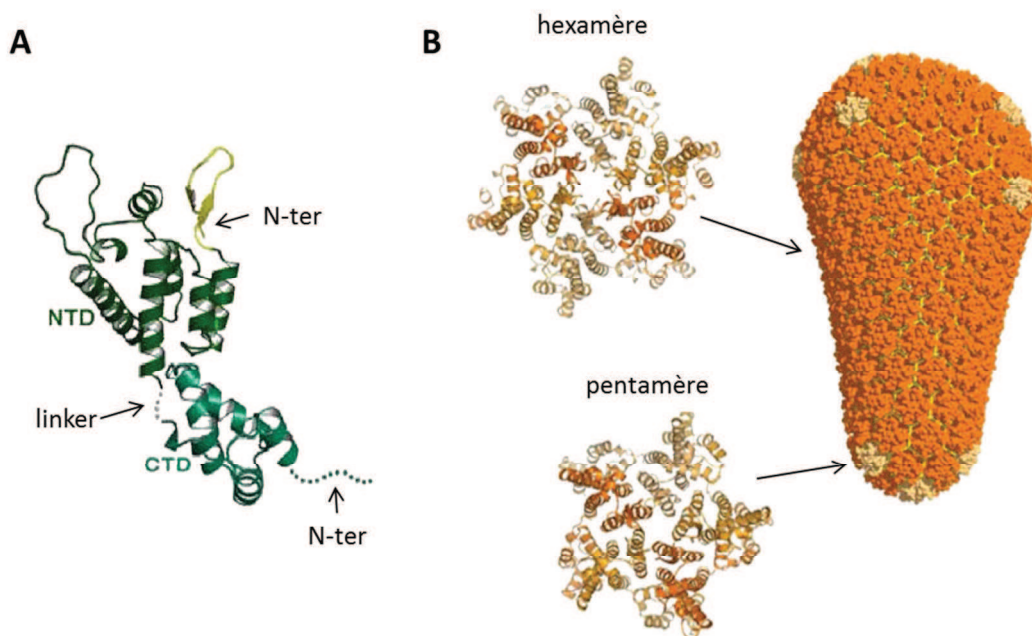


Figure 1.8 : Modèles structuraux de la capside du VIH-1 sous forme monomérique et oligomérisée (adapté de (59, 61)). **(A)** La protéine de la capside est structurée en deux domaines NTD et CTD reliés par un linker. **(B)** La protéine de la capside s'oligomérisse en hexamères et pentamères qui s'assemblent pour former la capside virale de forme isocédrique.

Lors de la maturation des virions, la protéine de la capsid s'organise en hexamères et en pentamères qui s'assemblent entre eux pour former une capsid virale de forme isocaédrique (une capsid est composée d'environ 250 hexamères et d'exactly 12 pentamères) (Fig. 1.8 B et C). C'est le corps de la capsid (CA-NTD) qui est essentiellement impliqué dans la morphogénèse virale (62). De plus, CA-NTD possède également un site de liaison à la cyclophiline A, une protéine cellulaire chaperonne, dont l'implication modifierait la structure de la capsid. Cette interaction pourrait faciliter l'étape de décapsidation (63, 64). Le domaine CA-CTD, quant à lui, est impliqué dans l'assemblage des particules virales, puisqu'il porte le motif MHR (Major Homology Region), clé de la multimérisation de Gag lors de l'assemblage.

La nucléocapsid

La protéine de la nucléocapsid ou NC, est composée de 55 acides aminés et se trouve dans la capsid virale. Elle est caractérisée par ses deux doigts de zinc et son activité chaperonne. Sa structure détaillée ainsi que ses propriétés seront traitées dans la partie III de ce chapitre.

La protéine p6

La protéine p6 est composée de 56 acides aminés. Elle présente deux domaines importants : PTAP et LYPX_nL, situés aux deux extrémités N- et C-terminales. Ces deux domaines sont appelés région L (Late) car ils interviennent dans la phase tardive du cycle rétroviral. En effet, ils recrutent la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), notamment par la reconnaissance du domaine TSG101 d'ESCRT-I (séquence N terminale) et de la protéine AIP1 (Alix) d'ESCRTIII (séquence C terminale) (65), nécessaires à la cytokinèse des particules virales (61, 66). Par ailleurs, la protéine p6 possède aussi une séquence LXXLF reconnue par Vpr lors de son encapsidation (67–69).

Les peptides « spacer » SP1 et SP2

Les deux peptides SP1 et SP2 séparent la capsid de la nucléocapsid (SP1, 14 acides aminés) et la nucléocapsid de p6 (SP2, 16 acides aminés). SP1 porte un motif de multimérisation qui

participe, avec le concours du CA-CTD à la multimérisation de Gag lors de l'assemblage (70, 71). De plus SP1 participe à la sélection des ARNv non épissés au cours de l'encapsidation (23). SP2, quant à lui, jouerait un rôle lors du clivage protéolytique de Gag (72).

4. Les protéines enzymatiques

Les trois enzymes virales sont issues du clivage protéolytique du précurseur Gag-Pol. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale se trouvent : la protéase (PRp12), la transcriptase inverse (RTp66/p51 pour Reverse Transcriptase) et l'intégrase (INp32) (Fig. 1.15). (Revue : (73–75)).

La protéase

La protéase ou PR est une aspartyl-protéase composée de deux sous-unités identiques de 99 acides aminés, générée par un mécanisme d'autocatalyse (76). C'est une enzyme indispensable, qui permet le clivage protéolytique des précurseurs Gag et Gag-Pol conduisant à la maturation du virion. L'inhibition de la protéase conduit à la formation de virus immatures et non-infectieux (77). Les deux sous-unités de l'homodimère interagissent entre elles par les deux extrémités N- et C-terminales ainsi que par une région « flap » (78) (Fig. 1.9).

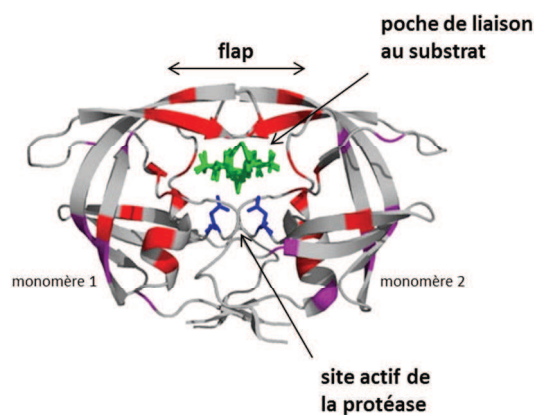


Figure 1.9 : Structure de la protéase du VIH-1 sous sa forme fonctionnelle. (adapté de (74)). Le site catalytique composé des deux résidus Asp est représenté en bleu. Dans la poche de liaison se trouve un substrat polypeptidique représenté en vert.

Chacune des sous-unités comporte un motif Asp-Thr-Gly caractéristique des aspartylprotéases qui constitue le site actif de l'enzyme. Le site catalytique est situé au centre d'une poche de liaison du substrat, au niveau duquel une molécule d'eau assure la protonation alternative des deux résidus Asp, ce qui modifierait la conformation de l'homodimère enzymatique, augmentant l'affinité de la protéase pour son substrat (79). Par ailleurs, la structure de la protéase joue un rôle important pour son activité catalytique puisqu'elle semble reconnaître les sites de clivage par leur conformation, plutôt que par leur séquence (80).

La transcriptase inverse

La transcriptase inverse ou RT est l'ADN polymérase qui assure la transcription inverse en convertissant l'ARNg simple brin en ADN proviral double brin. Elle est composée de deux sous-unités : p66 et p51 qui comportent respectivement 560 et 440 acides aminés. Sa formation s'effectue en deux étapes. Tout d'abord la sous-unité p66 qui est directement issue du clivage du précurseur Gag-Pol, s'homodimérise pour former le peptide p66/p66. Par la suite, l'une des deux sous-unités subit un clivage sélectif interne au niveau de son extrémité C-terminale, donnant lieu à l'hétérodimère fonctionnel RTp66/p51 (81). La sous-unité p66 est structurée en trois parties : le site catalytique de polymérisation et le site d'activité RNase H (Ribonucléase H) se trouvent respectivement aux extrémités N- et C-terminales et sont reliés par un domaine de connexion (Fig. 1.10A). Le site d'activité RNase H est quant à lui absent de la sous-unité p51. Par ailleurs, la structure de p66 est généralement assimilée à une main droite, dont les sous-domaines sont identifiés comme étant les doigts, la paume et le pouce (Fig. 1.10B). Bien que la structure individuelle de ces différents domaines soit très proche sur les deux sous-unités, leur position relative diffère de telle manière que p51 ne possède pas d'activité polymérase (82).

L'activité catalytique de la transcriptase inverse est située dans un sillon de la paume de p66 où l'on trouve une séquence Thr-Met-Asp-Asp très conservée dans les ADN polymérases (83, 84). Par ailleurs, l'activité RNase H portée par le domaine C-terminal de p66, de type endonucléase non spécifique, permet la dégradation progressive de l'ARN par hydrolyse catalytique, lorsqu'il est encore hybridé à l'ADN néosynthétisé lors de la transcription inverse. Ce domaine, qui présente quatre acides aminés conservés, a la particularité de ne fonctionner qu'en présence du domaine polymérase (85). La RT, dont le taux d'erreur est

élevé (de 10^{-3} à 10^{-4} par nucléotide), ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléase qui permettrait leur correction. De ce fait, la RT est en partie à l'origine de la diversité génétique du VIH-1 (86).

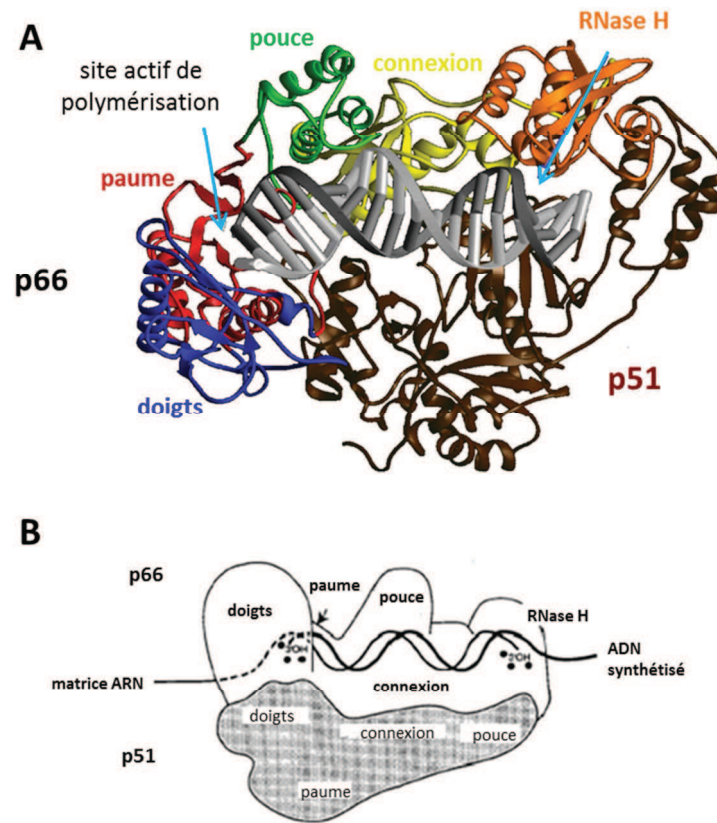


Figure 1.10 : Structure de l'hétérodimère de la transcriptase inverse du VIH-1. (A) Hétérodimère de la transcriptase inverse complexé avec des acides nucléiques. Les différents domaines de la sous-unité p66 sont identifiés par des couleurs différentes (84). **(B)** Schématisation de la structure en « main droite » des différentes régions de la transcriptase inverse. La transcription inverse a lieu entre les doigts et le pouce (87).

L'intégrase

L'intégrase ou IN est composée de 288 acides aminés. Elle n'est fonctionnelle que sous forme de tétramère (Fig. 1.11). Son rôle consiste à intégrer l'ADN proviral au sein du génome de la cellule infectée en catalysant une série de réactions, incluant le 3' processing et le transfert de brin. L'intégrase fut le centre de nombreuses études structurales qui ont permis de révéler l'architecture de cette enzyme liée à ses partenaires, notamment LEDGF et les acides nucléiques (88–91) (Fig. 1.11).

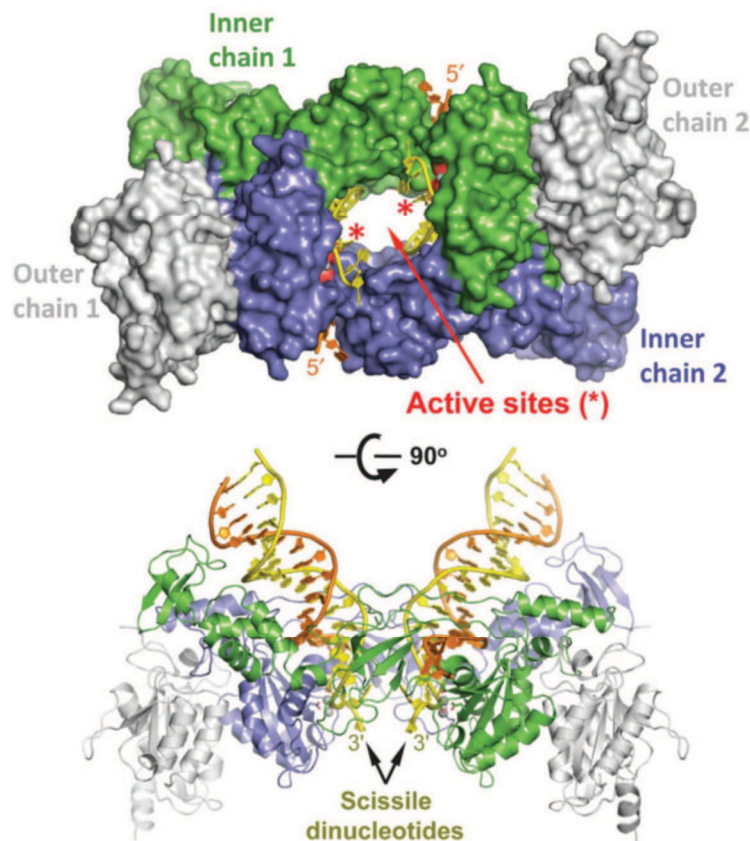


Figure 1.11 : Architecture du tétramère fonctionnel de l'intégrase lié à l'ADN proviral avant le 3'-processing. (89). Les sous-unités internes sont représentées en bleu et en vert, les sous-unités externes sont représentées en gris. Les brins d'ARN allant subir le 3'-processing sont représentés en jaune et les sites actifs de l'intégrase sont représentés par des astérisques rouges.

L'intégrase est divisée en trois domaines distincts. Le premier, en N-terminal, présente un motif Cys-Cys-His-His qui lie le zinc et qui permet la genèse de la forme tétramérique fonctionnelle de l'intégrase (92). Le second domaine est appelé core et possède une triade catalytique hautement conservée (93) nécessaire aux activités 3' processing et transfert de brin (94). Finalement, le troisième domaine positionné en C-terminal est impliqué dans des liaisons non-spécifiques à l'ADN. Bien qu'il soit le moins conservé des trois domaines, il jouerait un rôle important puisqu'il a été observé que des délétions dans cette région abolissent l'activité enzymatique de l'intégrase (95). De plus, l'intégrase comprend un signal de localisation nucléaire nécessaire à l'import nucléaire de l'ADN proviral (96).

5. Les protéines régulatrices

Le génome du VIH-1 code également pour les protéines régulatrices Tat, Rev, Vpu, Vpr, Vif et Nef. La protéine Vpr est encapsidée lors de l'assemblage et les protéines Tat, Vif et Nef ont également été trouvées dans des virions purifiés. Au contraire Rev et Vpu ne se trouvent pas dans les virus matures. Ces protéines, jouent des rôles cruciaux tout au long du cycle réplcatif du VIH-1 (97).

Tat (Transactivator of Transcription)

Tat est une protéine dont la taille, dépendante de la souche virale, varie entre 86 et 101 acides. Elle est issue de la traduction de deux exons (98) et peut être divisée en cinq domaines fonctionnels (Fig. 1.12A). Les trois premiers domaines sont impliqués dans la liaison avec différents partenaires cellulaires (comme la Cycline T1 (99) et HAT (100)). Le quatrième domaine comporte un motif basique qui sert de domaine de liaison à l'ARN (101, 102) ainsi qu'un signal de localisation nucléaire NLS (103, 104). Le cinquième domaine, qui est conservé, bien que non-essentiel à l'activité transactivatrice de Tat en solution, contribuerait à la virulence du virus (105, 106). Essentiellement connue pour son activité de transactivation de l'expression du génome viral en interagissant avec le complexe PTEF-b (107) (Fig. 1.12B), Tat participerait également au bon déroulement de la transcription inverse (108–110). De plus, il a également été montré que Tat promeut l'hybridation de séquences complémentaires cependant sans déstabiliser les acides nucléiques (111–113).

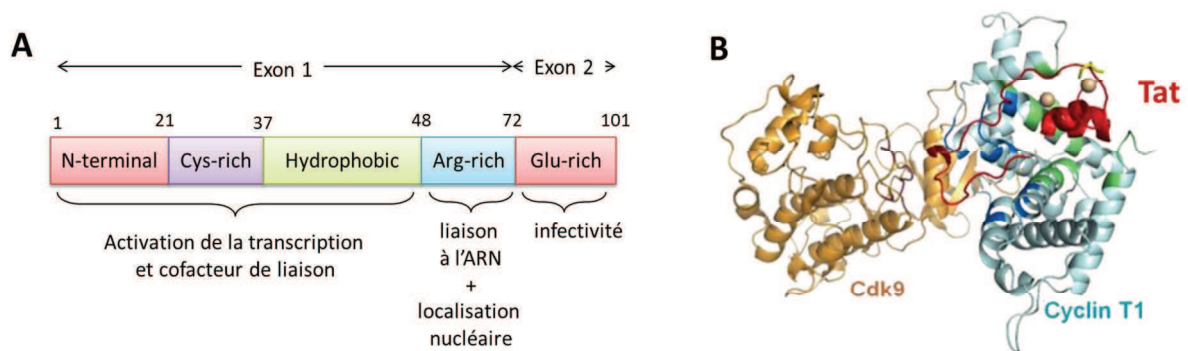


Figure 1.12 : La protéine Tat du VIH-1. (A) Représentation schématique des cinq domaines fonctionnels de la protéine régulatrice Tat du VIH-1. **(B)** Structure de Tat (en rouge) complexée aux protéines Cdk9 (en jaune) et Cycline T1 (en bleue) (114).

Par ailleurs, Tat serait également activement relarguée des cellules hôtes et serait capable de pénétrer dans des cellules non-infectées, provoquant leur apoptose, ou dans des cellules latentes pour activer la transcription du génome viral (115).

Rev (Regulatory of Viral Expression)

La protéine Rev, composée de 116 acides aminés, est un trans-activateur post-transcriptionnel qui assure l'export nucléaire des ARN messagers (ARNm) non-épissés ou mono-épissés (116). Pour ce faire, elle possède un signal de localisation nucléaire (NLS), une région de multimérisation, une région de liaison à la séquence ARN RRE, un signal d'exportation nucléaire (NES) et une région d'interaction avec les protéines de l'hôte, répartis en quatre domaines fonctionnels (Fig. 1.13) (117). Elle garantit, l'export des ARN non- ou mono-épissé dans le cytoplasme et ainsi la production des protéines de structure et enzymatiques conduisant à la formation de virus infectieux.

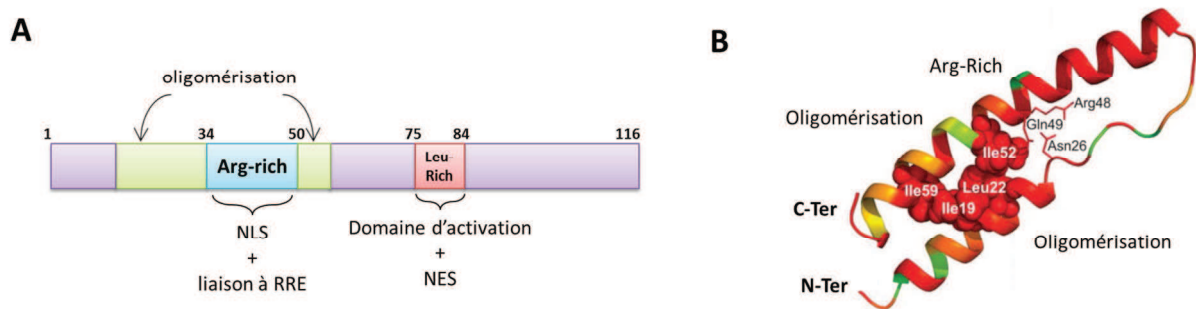


Figure 1.13 : Représentation des domaines fonctionnels de la protéine régulatrice Rev du VIH-1. (A) Schématisation des domaines de Rev mettant en évidence : un domaine conservé riche en arginine (représenté en bleu) comporte le NLS ainsi que le domaine de liaison à l'ARN. Ce domaine est flanqué de deux régions permettant la multimérisation de Rev. Le domaine riche en leucine (représenté en rouge) porte le NES et la région qui permet la liaison aux protéines de l'hôte. **(B)** Structure tridimensionnelle des résidus 9 à 63 qui forment le « core » replié de Rev. Les résidus et domaines importants sont indiqués (118).

Vpu (Viral Protein U)

La protéine Vpu, composée de 81 acides aminés, n'est encodée que dans le génome du VIH-1. Elle présente un domaine N-terminal structuré en une hélice alpha transmembranaire,

suivie d'une région cytoplasmique organisée en deux hélices alpha consécutives séparées par un linker comprenant deux résidus Ser conservés, pouvant être phosphorylées (119) (Fig. 1.14). Vpu a deux rôles importants relatifs au bourgeonnement des particules virales, au cours du cycle rétroviral. Le premier consiste à diminuer le niveau d'expression des récepteurs CD4 colocalisés avec les polyprotéines virales Env au niveau du réticulum endoplasmique (RE), via son domaine cytoplasmique (120). Le second rôle consiste à favoriser le bourgeonnement des particules virales, via son domaine transmembranaire, dans les cellules qui expriment la tetherine. La tetherine est une protéine capable d'empêcher la libération des virions en formant un pont entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale. Cependant en présence de Vpu, l'activité antivirale de la tetherine est inhibée par le biais d'une interaction entre les domaines transmembranaires des deux protéines. Celle-ci conduit au blocage de l'insertion de la tetherine dans l'enveloppe virale et par conséquent permet la libération des virions (121).

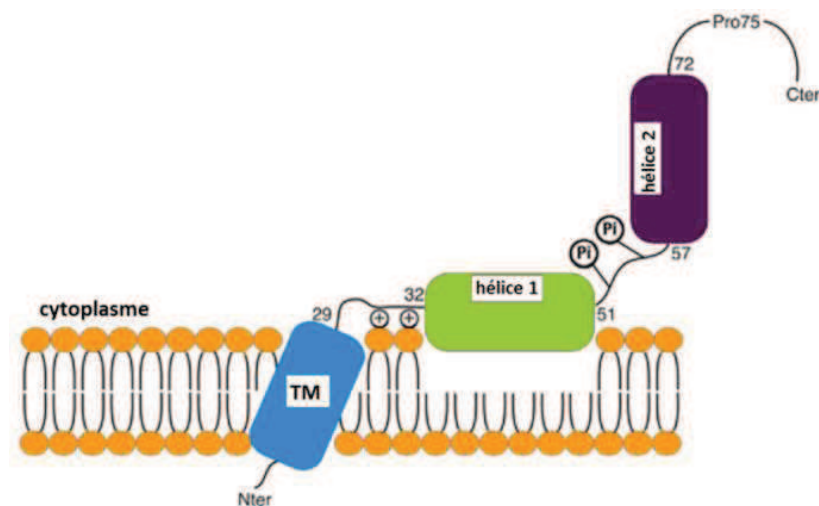


Figure 1.14 : Représentation schématique de la structure de la protéine Vpu du VIH-1 (adapté de (122)). Vpu présente un domaine transmembranaire (TM) ainsi qu'un domaine cytoplasmique composé de deux régions organisées en hélices alpha.

Vpr (Viral protein R)

La protéine Vpr est hautement conservée et composée de 96 acides aminés. Elle est encapsidée dans le virion grâce à son interaction avec le domaine MA de Gag (68). Sa structure, obtenue par RMN (123), se caractérise par trois hélices alpha dont l'organisation 3D permet la formation d'un plateau hydrophobe responsable des interactions Vpr-Vpr (69), et

l'exposition d'un résidu Trp qui intervient dans les interactions avec les protéines cellulaires (124) (Fig. 1.15). Elle se trouve liée à l'ARNg dans la capsid virale (125). Vpr interviendrait au cours de nombreuses étapes du cycle rétroviral, notamment lors de la phase précoce où elle serait impliquée dans la fidélité de la transcription inverse. De plus Vpr fait partie du PIC et participerait au transit de l'ADN proviral vers le noyau grâce à ses deux NLS (126). Bien que le processus d'import nucléaire de l'ADNv soit encore incertain, il semblerait que Vpr y participe, plus particulièrement dans les cellules quiescentes de type macrophages ou cellules latentes, en maintenant le PIC à proximité des pores nucléaires (NPC) via son interaction avec la nucléoporine hCG1 (127). Par ailleurs, il a récemment été montré que Vpr serait capable de réorganiser l'ADN double brin de manière plus compacte (128). Finalement, Vpr possède également la propriété de déstabiliser les membranes nucléaires en milieu cellulaire (129–131), suggérant que Vpr puisse participer au transit passif du PIC au travers des zones perturbées de la membrane nucléaire. Finalement, Vpr induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (132), et conduit à l'apoptose des cellules infectées en interagissant avec les protéines du pore mitochondrial (133).

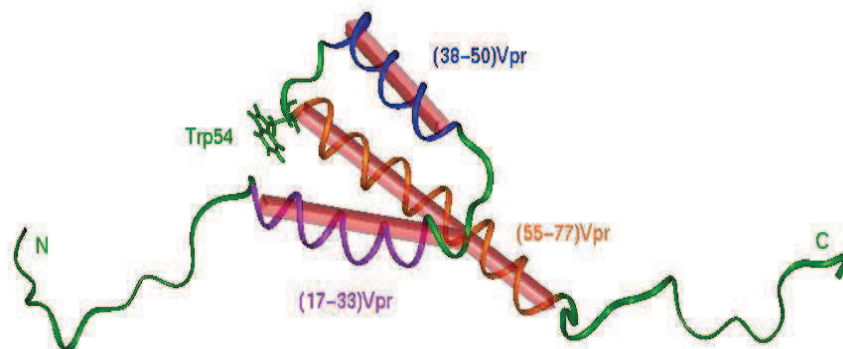


Figure 1.15 : Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr du VIH-1 (134). Les hélices alpha sont représentées en violet, orange et bleu. Le résidu Trp responsable des interactions avec les protéines cellulaires est également mis en évidence.

Vif (Virion Infectivity Factor)

La protéine Vif comporte 192 acides aminés. Sa structure 3D complète n'a pas encore été résolue (135). Elle est intégrée au virion par sa liaison à la région 5' de l'ARNg et/ou la partie C-terminale de Gag (136, 137). Son rôle, essentiel à la réplication virale, consiste à détourner l'enzyme APOBEC-3G (Apolipoprotein B Enzyme Catalytic polypeptide like 3G) de son

activité antivirale (138). En effet, cette enzyme orchestre un mécanisme de défense antivirale innée grâce à une activité cytidine désaminase (hypermutation de l'ADNv) qui induit la formation de protéines virales potentiellement non-fonctionnelles, conduisant ensuite à la formation de virus non-infectieux (139). Vif neutralise APOBEC-3G en s'y liant après avoir recruté plusieurs protéines hôtes pour former le complexe appelé SCF (Skp1-cullin-F-box), qui permet d'adresser APOBEC-3G aux protéasomes (140). En détournant cette machinerie, Vif réduit l'activité cytoplasmique de cette enzyme et empêche son encapsidation lors de l'assemblage des particules virales (141). Enfin, Vif présente également une activité chaperonne tout au long du cycle rétroviral, qui lui permettrait de participer à la transcription inverse et à la dimérisation du génome viral (142). Son rôle serait plutôt régulateur, notamment au niveau de l'initiation de la transcription inverse où Vif préviendrait la formation prématurée du complexe d'initiation ou l'encapsidation précoce des dimères d'ARN (143).

Nef (Negative Factor)

La protéine Nef, composée de 206 acides aminés, est l'une des premières protéines virales exprimées. Elle possède un domaine structuré appelé « core », compris entre deux domaines flexibles. C'est une protéine membranaire qui s'ancre dans le feuillet interne de la membrane plasmique via un myristate situé en son extrémité N-terminale, au niveau d'une séquence conservée (144). Bien que ses mécanismes ne soient pas encore totalement compris, il semblerait que Nef soit impliquée dans la pathogénicité du virus. En effet, les patients infectés par un isolat qui ne code pas Nef ou qui code une protéine Nef mutante, présentent pas ou peu d'évolution vers le SIDA (145). Par ailleurs, Nef est connue pour augmenter la survie des cellules infectées en régulant le nombre de récepteurs CD4 et CD28 à la surface des cellules infectées, en interagissant avec les protéines AP-1 et AP-2 (144, 146, 147) permettant ainsi d'éviter la surinfection des cellules hôtes (Fig. 1.16). Nef régule également les protéines des complexes d'histocompatibilité I et II (CMH-I et CMH-II) impliquées dans la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire (148).

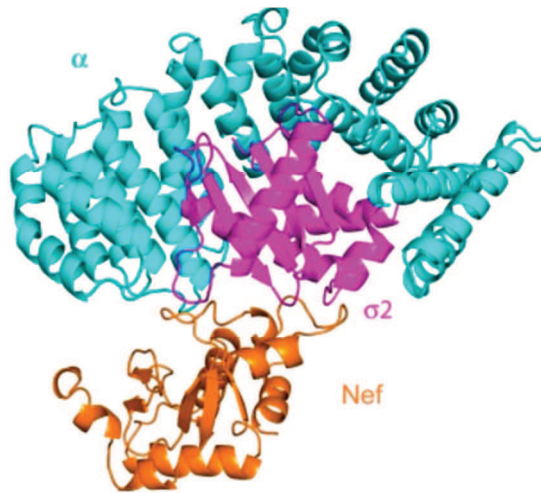


Figure 1.16 : Structure tridimensionnelle du complexe formée entre la protéine Nef du VIH-1 et AP-2 (147).
Nef (orange) se lie aux sous-unités alpha (cyan) et sigma 2 (magenta) de AP-2.

III. La protéine de la nucléocapside : NCp7

Au cours du cycle rétroviral la protéine de la nucléocapside se trouve sous forme mature (durant les étapes précoces), ou sous forme de domaine de la polyprotéine Gag (durant les étapes tardives).

1. Du précurseur Gag à la protéine NCp7

La forme mature de NCp7 est issue de la maturation du précurseur Gag (Fig. 1.17A) par la protéase virale (149). Ce processus, divisé en trois étapes distinctes, implique cinq sites de clivage et permet de générer les trois protéines de structure à savoir, la matrice, la capsid et NCp7 ainsi que les trois peptides SP1, SP2 et p6 (Fig. 1.17B). C'est un processus rapide et efficace, dont chaque étape possède une cinétique propre (76). Durant la maturation, les clivages successifs qui mènent à NCp7, conduisent également la condensation et la stabilisation du dimère d'ARNv dans la capsid virale (150).

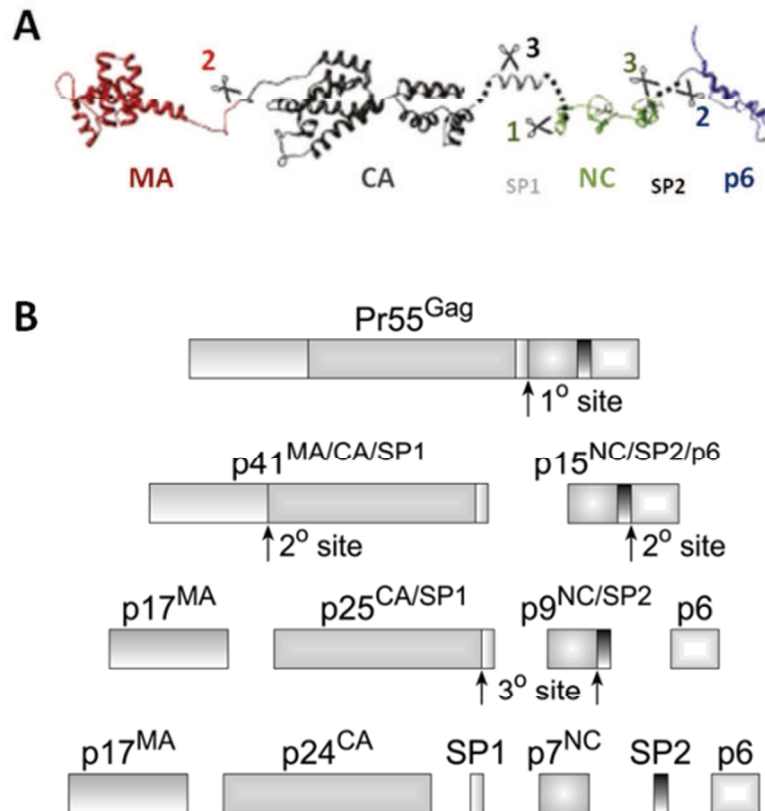


Figure 1.17 : Clivage protéolytique de la polyprotéine Gag de VIH-1. (A) Structure en ruban de Gag. Les cinq sites de maturation sont identifiés par des ciseaux, marqués d'un numéro indiquant l'ordre dans lequel ils sont clivés (adapté de (13)). **(B)** Schématisation du processus de maturation de Gag et de sa chronologie. Le domaine NC est présent sous trois formes : NCp15, NCp9 et NCp7 (151).

L'étape initiale de la maturation de Gag par PR, qui se situe entre SP1 et le domaine NC, conduit à la formation de NCp15, qui comprend NCp7, SP2 et p6. S'ensuit la condensation de l'ARNg sous l'action de NCp15 (152) et la formation du complexe ribonucléoprotéique (RNP) dans les particules virales immatures. La seconde étape de la maturation de NCp7 ne peut avoir lieu qu'à condition que NCp15 se trouve liée à l'ARNg (153). Elle permet la libération des protéines fonctionnelles du VIH-1 et notamment de NCp9 (composé de NCp7 et de SP2). Finalement, NCp7 est libérée de SP2 suite au troisième et dernier clivage qui est plus tardif. Il est à noter que, bien que des mutations au niveau des sites de clivage de NCp7 mènent à la formation de virus non-infectieux (154), chacune des NC produites au cours de la maturation possède une activité chaperonne (155).

A l'issue de l'étape de maturation de Gag, la capside virale renferme 1500 à 2000 copies de NCp7 liées à l'ARNg (156, 157), correspondant à une concentration locale de l'ordre du millimolaire, avec une stœchiométrie d'une NCp7 pour 8-9 nucléotides (nt) (158).

2. Structure

NCp7 est une petite protéine basique de 55 acides aminés dont la structure fut révélée par RMN dans les années 90 (159–161). Elle est caractérisée par la présence de deux motifs C-X₂-C-X₄-H-X₄-C, où X représente des acides aminés variables, (CCHC) qui lient le zinc avec une très forte affinité (de l'ordre de 10⁻¹³ M) (162–164). Ces motifs, également appelés doigts de zinc (ZF pour zinc fingers), sont reliés par un linker basique, et sont flanqués de domaines N- et C-terminaux également riches en résidus basiques (Fig. 1.18B). En l'absence de zinc, NCp7 se présente sous la forme d'un peptide flexible non structuré. Suite à la liaison du zinc, chaque motif dactyle se trouve fortement contraint autour de l'atome de zinc (Fig. 1.18A). De plus, N. Morellet a montré que ces deux doigts se rapprochent dans l'espace via un coude formé par le résidu Pro31 du domaine interdistal, conduisant à la formation d'un plateau hydrophobe constitué des résidus Val13, Phe16, Thr24 et Ala25 (sur ZF1) et Trp37, Gln45 et Met46 (sur ZF2). Celui-ci est indispensable à l'activation des fonctions biologiques de NCp7 (165, 166). Inversement, aucune contrainte structurale ne semble exister dans les parties N- et C-terminales qui balayent l'espace conformationnel et permettent de classer NCp7 dans la famille des IDPs (intrinsically disordered proteins) (158, 167).

NCp7 est une protéine globalement très conservée (Fig. 1.18C), tant au niveau des doigts de zinc, où les mutations ont une répercussion négative sur le cycle rétroviral, qu'au niveau du linker qui sépare les deux doigts de zinc (168–170). Finalement, bien que la région N-terminale soit plus variable, il est à noter que les résidus basiques restent strictement conservés (171–173).

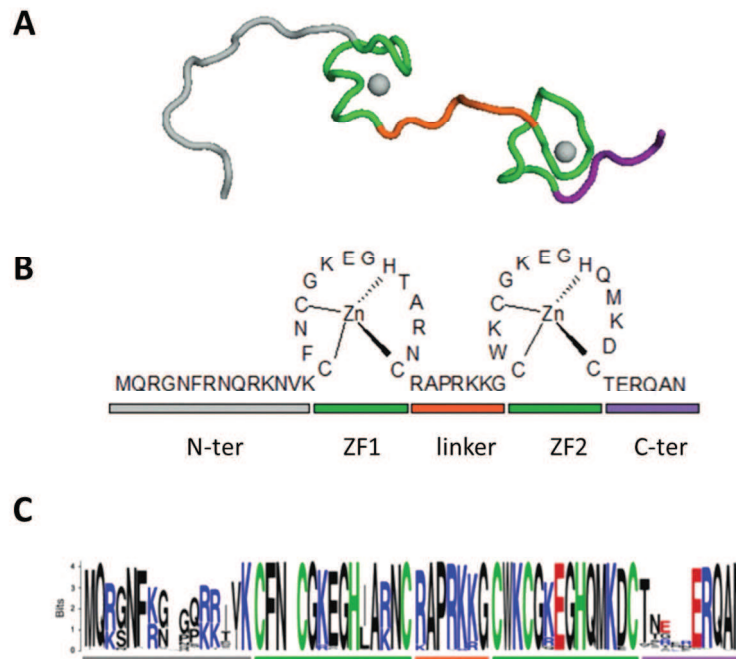


Figure 1.18 : Structure et séquence de de la NCp7 du VIH1 (adapté de (113, 174) **(A)** Structure tridimensionnelle (PDB 1AAF) et **(B)** Séquence de NCp7. Les doigts de zinc (ZF) sont représentés en vert, le linker basique est représenté en orange et les domaines N-ter et C-ter peu structurés sont représentés en gris et magenta respectivement. **(C)** Mise en évidence des résidus variables et conservés de la NCp7 du VIH-1, résultant de l'alignement de 3120 séquences de la base de données Lanl HIV (<http://www.hiv.lanl.gov/>).

3. La liaison de NCp7 aux acides nucléiques

La NCp7 peut se lier à tout type d'ANs avec des affinités variables, de manière spécifique ou non-spécifique. Cette interaction NCp7/ANs est fortement dépendante des conditions salines (175–177).

Les quinze résidus basiques de NCp7 sont responsables des interactions non-spécifiques, qui permettent à NCp7 de se lier à n'importe quelle séquence de 6 nucléotides. Par ailleurs, la liaison spécifique de NCp7 aux ANs, est due au plateau hydrophobe situé à la surface des doigts de zinc repliés. Les interactions spécifiques NCp7/ANs impliquent plus particulièrement les résidus Phe16 (ZF1) et Trp37 (ZF2) qui s'intercalent entre les bases nucléotiques par empilement (159, 178–180). Les liaisons spécifiques de NCp7 avec les ANs s'établissent préférentiellement avec des séquences contenant des résidus guanines exposés, telles que les « bulges », les boucles ou encore les fragments linéaires, et plus précisément

avec les motifs TG, TXG ou GXG, X correspondant à une base quelconque A, C, T ou U (175, 181–183), plutôt qu'à des séquences d'ANs doubles-brin.

Dans le cas d'interactions NCp7/ARN, une guanine s'insère dans chacune des deux poches hydrophobes formées par ZF1 et ZF2 (184–186), alors que pour une liaison NCp7/ADN l'interaction est sensiblement différente puisque seule une guanine s'insère dans la poche hydrophobe de ZF2 (Fig. 1.19) (166, 172, 187). Cette dernière interaction est stabilisée par la présence d'une thymine en 5' de la guanine exposée (188). Ces interactions induisent des changements conformationnels du plateau hydrophobe qui sont stabilisés par des liaisons électrostatiques et hydrogènes portées par les résidus basiques de NCp7.

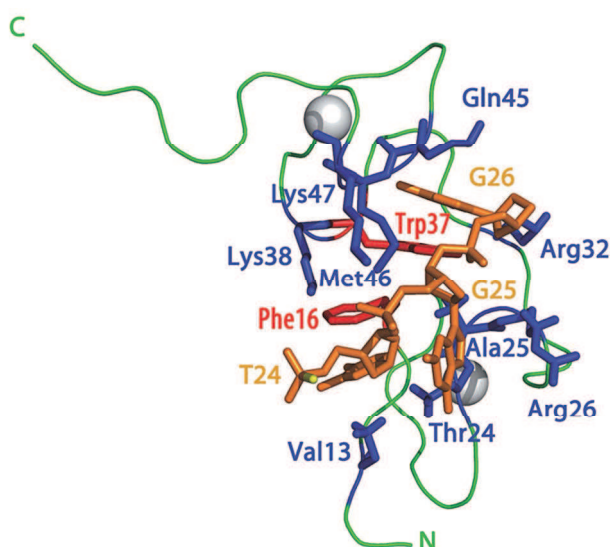


Figure 1.19 : Structure de la NC(11-55) liée à la séquence ADN mini cTAR (187). Structure tridimensionnelle d'un complexe NC(11-55):mini-cTAR. La base G26 interagit avec le doigt de zinc situé en C-terminal (plus particulièrement avec les résidus Trp37 (rouge) et Gln45 (bleu)). Cette interaction est stabilisée par des liaisons hydrogène.

De nombreuses études structurales de la protéine NCp7 liée à différentes séquences ARN et ADN ont permis d'améliorer la compréhension du mécanisme de sélection des séquences d'ANs ciblées par NCp7. Notamment en montrant que l'orientation de la liaison NCp7/ARN est inversée par rapport à la liaison NCp7/ADN (166, 172, 184, 185, 187). Cette inversion de l'orientation serait due aux différences entre les interactions de NCp7 avec les riboses ou désoxyriboses des séquences ARN ou ADN. De plus, les interactions hydrophobiques entre

NCp7 et les sucres participeraient, de concert avec les propriétés dynamiques des guanines exposées, au mécanisme par lequel NCp7 reconnaît spécifiquement les séquences cibles (187–189).

Ainsi, NCp7 possède la capacité de se lier à tout type de séquences. Son affinité pour les ANs dépend largement de la nature et du repliement de la séquence cible. Elle varie de plusieurs ordres de grandeur, conférant à la NCp7 ses différents rôles au cours du cycle rétroviral. Au total, onze sites de liaison spécifique de la NCp7 ont été identifiés sur l'ARNg (190).

4. Activité chaperonne de la NCp7

Les séquences d'ANs adoptent des milliers de conformations différentes, cependant biologiquement inactives (191). De ce fait, pour atteindre une structure, biologiquement active, les ANs doivent surpasser des barrières thermodynamiques (192). Ainsi, le rôle des protéines chaperonnes d'ARN et/ou d'ADN consiste à assister les ANs dans leurs changements conformationnels pour atteindre leur forme biologiquement active (193). Les protéines chaperonnes sont présentes dans tous les organismes vivants, incluant les virus (194, 195) où elles y tiennent des rôles clés, notamment au niveau de leur réplication (196).

Les premières protéines chaperonnes d'ARN d'origine virale mises en lumière sont les nucléocapsides des rétrovirus murins et aviaires, NCp10 de MuLV et NCp12 de RSV (197). Plus tard, une activité chaperonne similaire fut démontrée pour la protéine NCp7 du VIH-1 (198–201). Les propriétés chaperonnes de la NCp7 lui confèrent la capacité de remodeler les ANs en les dirigeant vers leur état thermodynamiquement le plus stable. Ce processus repose sur deux propriétés essentielles de la NCp7 (158): (i) la capacité à déstabiliser partiellement les structures secondaires des ANs de manière ATP-indépendante (171, 172, 202, 203), (ii) la capacité à lier les ANs et d'induire leur agrégation et la formation de complexes nucléoprotéiques (204–206). NCp7 possède ces activités vis-à-vis des ARN et des ADN, il s'agit donc d'une chaperonne d'ARN et d'ADN.

L'activité chaperonne de la NCp7 commence par la déstabilisation des ANs (207). Ce mécanisme est dirigé par ses doigts de zinc et par le plateau hydrophobe induit par leur repliement (171, 208, 209) et permet à la NCp7 de baisser la température de fusion des ANs (173, 208, 210). La capacité de NCp7 à déstabiliser les ANs est faible et grandement liée à

leur structure et à la stabilité (203, 211). De ce fait, les séquences d'ANs double brin qui sont initialement ciblées par la NCp7 présentent généralement des défauts dans leurs structures secondaires tels que des mésappariements ou des « bulges » (202, 203, 212), qui limitent leur stabilité. Ces mésappariements permettent ainsi l'initiation de la déstabilisation des structures double brin telle que la tige boucle TAR et son équivalent ADN cTAR (171, 207). D'autre part, NCp7 peut également déstabiliser les séquences simple brin, telle que la boucle de la séquence PBS, où NCp7 contraint l'exposition des bases nucléotidiques vers le solvant, en modifiant les dynamiques de ces bases et en réduisant leur mobilité. Par ce mécanisme, NCp7 et plus particulièrement ses doigts de zinc, réarrange les ANs de manière à révéler des sites spécifiques d'hybridation initialement dissimulés, et à inhiber l'exposition de sites imparfaits. NCp7 induit ensuite l'ouverture de la boucle PBS par le biais de la déstabilisation de la première paire de base. (167, 172, 182, 213). Ainsi, la capacité de NC à ne déstabiliser que les séquences possédant une stabilité limitée, lui permet de cibler un nombre réduit de séquences, conférant ainsi à la protéine une activité sélective.

Suite à leur déstabilisation, les séquences secondaires se présentent sous forme de régions simple brin où les bases, spécifiquement sélectionnées par NCp7, sont exposées vers le solvant, de sorte à favoriser leur hybridation. Celle-ci est favorisée par l'agrégation non-spécifique des ANs induit par les résidus basiques de NCp7 (205, 214). En effet, les résidus basiques de la NCp7, vont réduire la répulsion électrostatique entre les bases complémentaires en neutralisant les charges négatives des groupements phosphate (206, 215, 216), permettant ainsi d'accélérer considérablement l'hybridation des brins déstabilisés (201). Par ailleurs, bien que l'agrégation des ANs soit nécessaire à l'activité chaperonne de NCp7, elle n'est pas suffisante pour l'hybridation de deux séquences complémentaires, qui nécessite également la capacité de NCp7 à se lier et se dissocier rapidement et dynamiquement des ANs (217).

Cependant, les connaissances concernant le mécanisme de l'activité chaperonne de NCp7, qui est ATP-indépendante, restent encore incomplètes. Un modèle basé sur l'échange d'entropie (218), présente un premier pas dans la compréhension des forces en jeu lors des réactions chaperonnes. Selon ce modèle, la liaison des protéines chaperonnes sur une séquence ARN permettrait à la protéine de se trouver dans une forme plus structurée, induisant une transition d'un état « désordonné » de la protéine vers un état « ordonné ». Au contraire, la molécule d'ARN subit une déstructuration qui peut être considérée comme une transition d'un état « ordonné » de la séquence ARN vers un état « désordonné ». Cet échange d'entropie

permettrait à la molécule d'ARN de balayer son espace conformationnel au rythme des cycles de liaison et dissociation de NCp7 sur la séquence, permettant ainsi à l'ARN d'atteindre son état thermodynamiquement le plus stable (158).

Finalement, il est à noter que la polyprotéine Gag possède également une activité chaperonne envers les acides nucléiques (219, 220) tout comme ses différents produits de clivages NCp15 et NCp9. L'étude comparative de l'activité chaperonne de Gag (ou plutôt de Gag délété du domaine p6) (221) et de NCp15, NCp9 et NCp7 a montré que Gag se lie aux ANs avec une meilleure affinité que NCp7 alors que l'activité chaperonne de NCp15, NCp9 et NCp7 augmente avec l'état de leur maturation (155, 219, 220). Ainsi, l'évolution de l'activité chaperonne de la NC s'opère alors que le virion subit les changements structuraux majeurs dus à sa maturation (222, 223). Par ailleurs, la perte progressive de l'affinité importante de Gag pour les ANs (nécessaire à l'encapsidation du génome viral) au cours de ses clivages successifs conduit à la promotion de liaisons moins spécifiques, qui permettent le réarrangement des ANs nécessaires à l'activité chaperonne de la NCp7 (113).

Parallèlement, il a également été mis en évidence, grâce à la réunion de nombreuses études effectuées dans des conditions physiologiques (194, 214, 224, 225), que le taux d'occupation des différentes NC sur les ANs décroît de manière inversement proportionnelle à leur affinité vis-à-vis des ANs (Fig. 1.20). (158) : (i) avec un taux d'occupation faible (1 NC pour 100 nt), le domaine NC de Gag se lie spécifiquement à des séquences d'ANs avec une affinité élevée et ne permet ni leur agrégation ni d'activité chaperonne de NC vis-à-vis des ANs, (ii) avec un taux d'occupation plus élevé (1 NC pour 15 à 7 nt), l'agrégation ainsi que la restructuration des ANs dans leur conformation thermodynamiquement la plus stable de manière à favoriser l'hybridation de séquences complémentaires par NC devient possible, (iii) avec un taux d'occupation très élevé (1 NC pour 5 à 2 nt) NC recouvre totalement les ANs et forme un complexe nucléoprotéique compacte résistant qui permet à NC de garder une activité chaperonne limitée (*in vitro*).

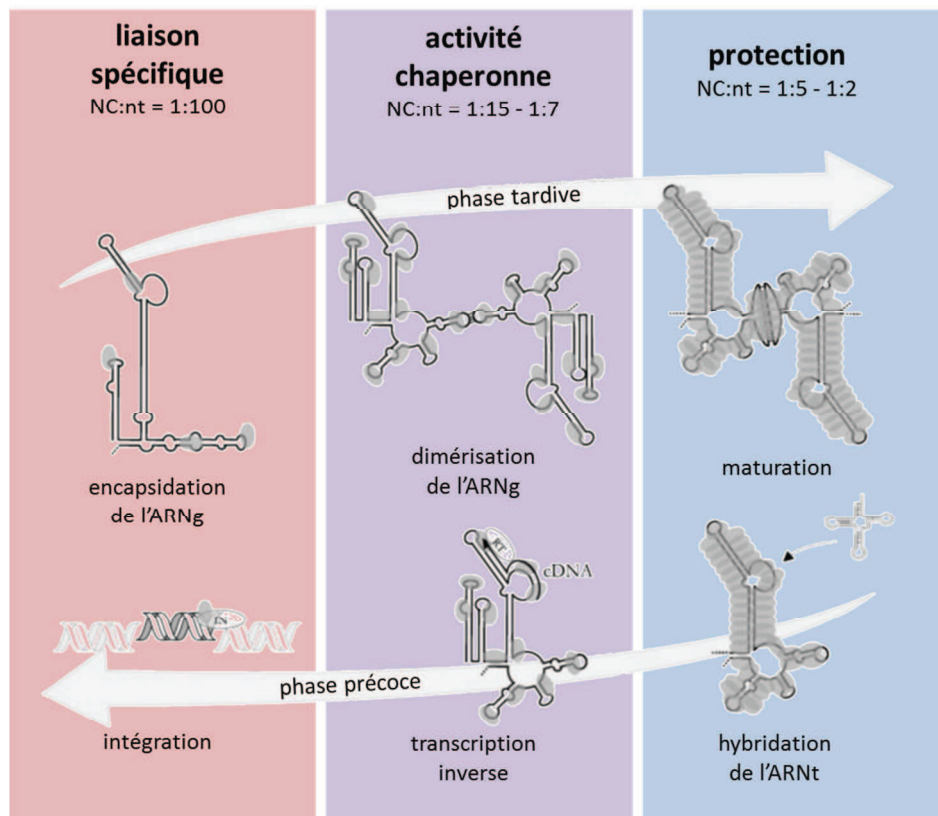


Figure 1.20 : Liaison et affinité de NC pour les acides nucléiques en fonction du taux d'occupation des séquences (adapté de (158)). Le degré d'occupation de NC:nt (mol:mol) allant de 1:100 à 1:2 définit la fenêtre d'activité de la NC allant de la simple liaison, à l'activité chaperonne, et finalement à la protection des acides nucléiques.

5. Interactions de NCp7 avec les protéines de la cellule hôte

La protéine NCp7 interagit avec plusieurs protéines hôtes, notamment au cours de la phase tardive du cycle viral (222, 226–228). On recense notamment la nucléoline (229), ABCE1 (ATP-Binding Cassette E1) (230), Staufen1 (231), le domaine Bro1 d'Alix (232) et l'actine (233).

La nucléoline, généralement localisée dans le compartiment nucléaire, se trouve relocalisée au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées par le VIH-1 (234). De par son rôle de protéine chaperonne d'ARN (235), il est suggéré qu'elle puisse intervenir dans le transport de l'ARNg vers le site de traduction. En interagissant avec le domaine NC de Gag via son extrémité C-terminale, elle pourrait favoriser le bourgeonnement et la libération des particules virales (229).

ABCE1 fait partie de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et participe à la migration de nombreuses protéines vers la membrane plasmique. Elle se lierait rapidement à Gag, après sa traduction (236), via les résidus basiques de son domaine NC (230) et assisterait Gag dans les étapes préliminaires de l'assemblage. De plus ABCE1 bloque l'activité de la RNase L qui inhibe la synthèse de protéines. Cependant, cette protéine n'est pas recrutée dans les virions (237).

Staufen1 est une protéine qui permet le transit d'ARNm dans différents compartiments cellulaires. Elle serait recrutée par le domaine NC de Gag, et plus particulièrement par ses doigts de zinc (231), et participerait à l'encapsidation de l'ARNg, à la multimérisation de Gag et au recrutement de partenaires cellulaires intervenant lors de l'assemblage. De plus, Staufen1 est incorporée dans le virus (238, 239).

La protéine Alix fait partie de la famille des ESCRT et régule le trafic des vésicules cytoplasmiques. Elle interagit avec le domaine L de p6 (66) d'une part et avec le domaine NC de Gag via son domaine Bro1 d'autre part (232, 240). Gag interagit avec Alix dans le but de recruter la machinerie ESCRT qui permettra la libération des virions.

L'actine est incorporée dans les virus (233, 241). Elle interagirait avec le domaine N-terminal de la NC, sous sa forme mature ou en domaine de Gag. Elle interviendrait dans le processus de bourgeonnement des particules virales (242). Cependant l'interaction NC/actine est encore peu connue et mérite d'être approfondie.

Par ailleurs, il apparaîtrait que le domaine NC de Gag puisse également interagir avec des facteurs de restriction, telles que la PrP (Prion Protein) (243), une protéine chaperonne d'ARN qui aurait un impact négatif sur la production de virions (244), ou hDlg1 (human Disc Large protein) qui modifierait la distribution de Gag à la membrane plasmique rendant les virus non-infectieux (245).

Finalement, des criblages génétiques ont permis d'identifier plus de 1000 protéines hôtes susceptibles d'interagir avec les protéines virales, dont NCp7 (246–248), cependant les rôles potentiels de ces interactions restent à définir et à valider.

6. Les inhibiteurs de la NCp7

Etant une protéine très conservée au niveau de sa séquence et de sa structure, avec de nombreux rôles clés lors du cycle rétroviral, NCp7 est une cible thérapeutique intéressante. Il existe deux grandes approches qui permettent de l'inactiver ; les éjecteurs de zinc, d'une part, vont déstructurer la protéine, supprimant son activité chaperonne alors que les inhibiteurs non-covalents d'autre part, vont détourner NCp7 de ses partenaires (249).

a. Les éjecteurs de zinc

Les inhibiteurs de la NCp7 furent dirigés contre ses doigts de zinc. En effet, en se liant aux atomes de zinc nécessaires à la structure conservée de la NCp7, ces molécules induisent la déstructuration de la protéine et par conséquent la perte de l'infectivité du VIH-1.

Le premier éjecteur de zinc, le 3-nitrosobenzamide fut développé dès 1993 (250). Il fut suivi par la conception de nombreuses classes de molécules capables d'éjecter le zinc de NCp7 (revues dans (249, 251–253)) (Fig. 1.21). Les mécanismes empruntés par ces molécules qui permettent l'inactivation des doigts de zinc peuvent être classifiés dans trois groupes : (i) les attaques électrophiles des doigts de zinc, pour la majorité des molécules décrites dans la Figure 1.21, (ii) l'éjection du zinc par chélation, pour le NOV038 (254) et (iii) la liaison covalente des résidus cystéine par une base de platine, dans le cas des trans-chlorobispyridine (9-ethylguanine) platine(II) (255, 256).

Ces différentes molécules exhibent une très bonne activité antirétrovirale sur de nombreuses souches du VIH-1. En effet, en altérant les propriétés chaperonnes de NCp7, les éjecteurs de zinc affectent grandement la transcription inverse (254, 257–260). De plus, il a également été montré que certains de ces inhibiteurs, notamment les DIBAs, SRR-SB3, SAMTs et PATEs, affectent la phase tardive du cycle rétroviral menant à la libération de virus non-infectieux (261–264). Ainsi, en inactivant les virions, les éjecteurs de zinc sont également capables de prévenir leur transmission des cellules infectées vers les cellules saines.

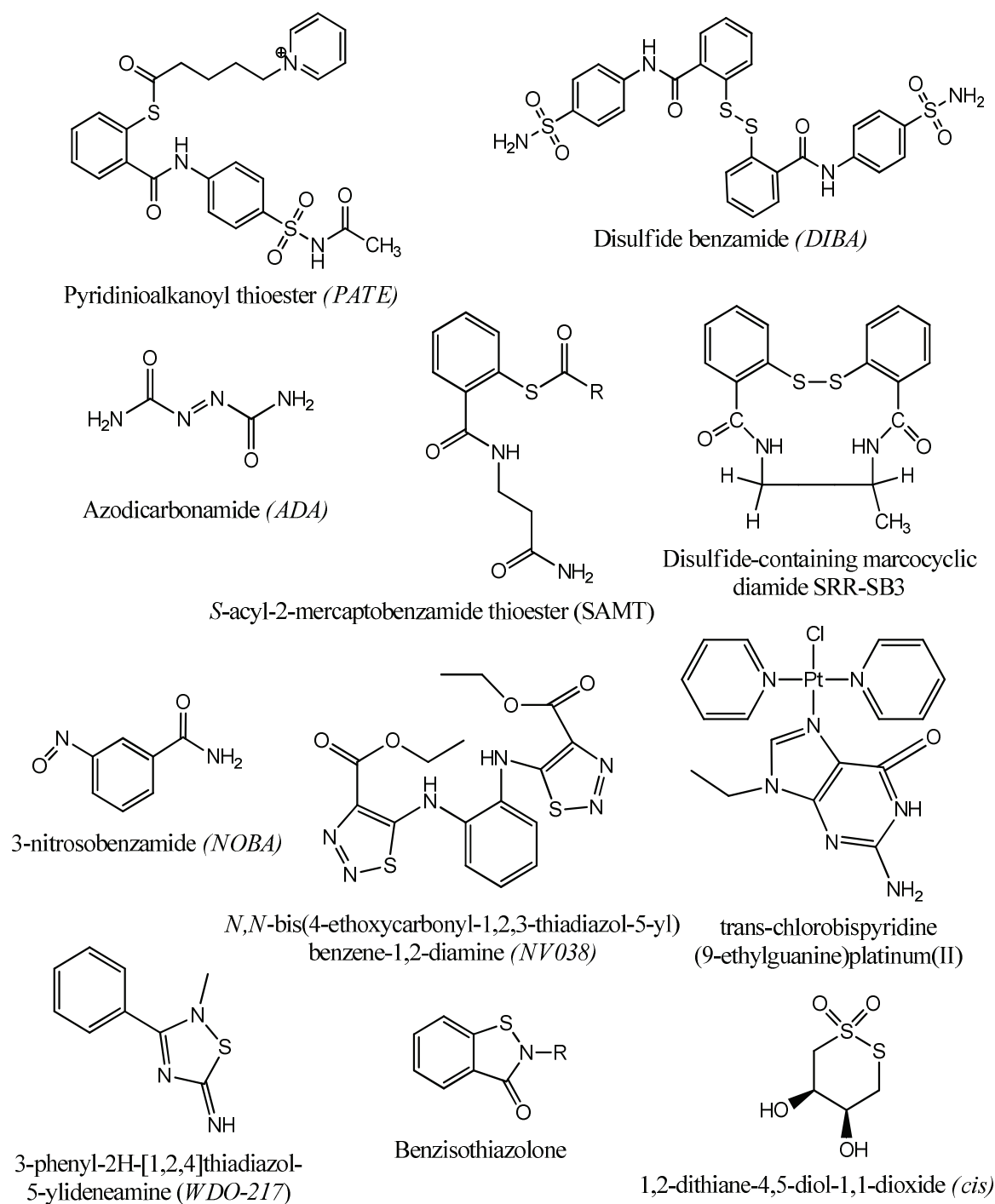


Figure 1.21 : Structures d'éjecteurs de zinc de différentes classes chimiques (Mori et al. 2014, manuscrit soumis). On retrouve les inhibiteurs de la classe des NOBA (265), DIBA (258), SRR-SB3 (266), benzisothiazolones (267), des dithiaheterocyclic (268), des PATE (263), des SAMT (269), des ADA (270), des trans-chlorobispyridine (9-ethylguanine) platinum(II) (255, 256) et les plus récemment identifié NV038 (254) et WDO-217(271).

Par ailleurs, deux de ces molécules (l'ADA et le benzisothiazolone) furent incluses dans des essais cliniques (270, 272, 273). Cependant, bien que peu de souches virales résistantes aient pû être isolées, ces tests ne furent malheureusement pas concluants. En effet, les éjecteurs de zinc présentent malheureusement une toxicité élevée en conséquence du manque de spécificité de ces molécules envers NCp7. Les éjecteurs de zinc interagissent donc non-spécifiquement avec les protéines cellulaires qui lient le zinc. De ce fait, les éjecteurs de zinc étant jusqu'alors trop toxiques pour être ingérés, mais affichant une activité antirétrovirale envers de nombreuses souches du VIH-1, certaines de ces molécules sont à présent étudiées dans le but de développer des microbicides capables de prévenir la transmission du VIH-1 (SAMT (262, 269), WDO-217(271)) (274, 275).

b. Les inhibiteurs de zinc non-covalents (NCI)

Au cours de la dernière décennie, de nombreux inhibiteurs de zinc non-covalents furent identifiés et utilisés aussi bien pour promouvoir la compréhension des fonctions biologiques et pathologiques de NCp7, qu'en tant que candidats potentiels au développement de traitements anti-VIH innovants. Ces molécules exhibent une meilleure spécificité vis-à-vis de NCp7 que les éjecteurs de zinc, ce qui en fait des candidates moins toxiques prometteuses. Les NCIs peuvent être divisés en deux classes de molécules : (i) celles qui se lient à NCp7 et (ii) celles qui se lient aux différents partenaires de NCp7.

L'étude des NCIs qui se lient à NCp7 s'est largement effectuée via des criblages moléculaires à haut débit qui ont permis d'identifier de petites molécules capables d'inhiber la liaison de NCp7 aux ANs (276, 277) ainsi que ses propriétés chaperonnes (278). Cependant, bien que les molécules issues de ces criblages se lient à NCp7 avec une affinité de l'ordre du micromolaire, seule une activité anti-VIH réduite a pu être observée, indiquant que des efforts supplémentaires doivent être fournis pour optimiser ces molécules. La résolution de la structure tridimensionnelle de d'un complexe NCp7/NCI (279) a permis de mieux comprendre ces interactions, et notamment que les NCIs peuvent se comporter comme une guanine interagissant avec le résidu Trp37 de NCp7, qu'ils altèrent localement la flexibilité de NCp7 ou encore qu'ils forment des complexes avec NCp7 avec une stœchiométrie de 2:1.

Par ailleurs, après une étude conformationnelle détaillée des complexes NCp7/ANs par des simulations dynamiques (280, 281), un criblage virtuel fut effectué, à l'issu duquel dix

molécules, potentiellement porteuses d'une activité anti-NCp7 furent identifiées, parmi les 390000 proposées (282). Les tests *in vitro* de ces molécules ont permis d'en isoler deux qui présentent, une activité antirétrovirale en se liant à la poche hydrophobe de NCp7.

En parallèle, les criblages à haut débit ont également mis en évidence l'activité anti-NCp7 de NCIs sous forme de petits oligonucléotides méthylés (mODNs) imitant de courtes séquences des LTR. L'un de ces mODNs exhiba une activité anti-VIH, agissant au niveau de la transcription inverse. L'étude approfondie de cette interaction a par la suite permis de montrer que les mODNs qui présentent des motifs répétés GU ou GT se lient à NCp7 par le biais d'interaction non-électrostatiques et sont capables de rivaliser avec les ANs pour s'insérer dans la poche hydrophobe de NCp7 (283, 284), en accord avec les données RMN de Goudreau et al. (279). Malheureusement, des souches résistantes des mODNs sont apparues, conduisant à l'arrêt de leur développement.

La seconde stratégie d'inhibition de l'activité de NCp7 dans le cycle du VIH-1 consiste à cibler les différents partenaires cellulaires de la protéine. Ces molécules, réparties dans plusieurs classes (aminoglycosides, intercalateurs, anthraquinones et petits peptides) imitent les propriétés chaperonnes de NCp7 notamment via des interactions électrostatiques qui leur permettent de se lier aux sites de liaison préférentiels de NCp7 sur l'ARNg, tels que la tige boucle SL1 (285, 286), la tige boucle SL3 (287) ou encore les séquences TAR et PBS (288, 289). L'étude de ces molécules a montré qu'elles sont capables d'inhiber l'interaction de NCp7 envers ces séquences d'ANs cibles et/ou de dissocier des complexes déjà formés. Cependant leur activité anti-VIH reste très limitée (289–292)

Ainsi, de même que pour les NCIs qui se lient directement à NCp7, ces molécules méritent des études approfondies permettant l'identification des déterminants structuraux et des mécanismes de leurs interactions avec la NCp7 *in vivo* dans le but de concevoir une nouvelle génération de molécules antirétrovirales.

IV. Le cycle réplcatif du VIH-1 vu sous l'angle de la NCp7

Le VIH-1 détourne la machinerie cellulaire de son hôte pour se répliquer. Son cycle est divisé en deux phases : la phase précoce et la phase tardive, durant lesquelles des mécanismes complexes sont mis en œuvre pour produire des virus infectieux, notamment : l'entrée du virus dans la cellule hôte, la synthèse de l'ADNv, l'intégration de l'ADNv dans le génome de la cellule infectée, la transcription de l'ADNv en ARNm et la synthèse des protéines virales puis finalement l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation des particules virales (Fig. 1.22).

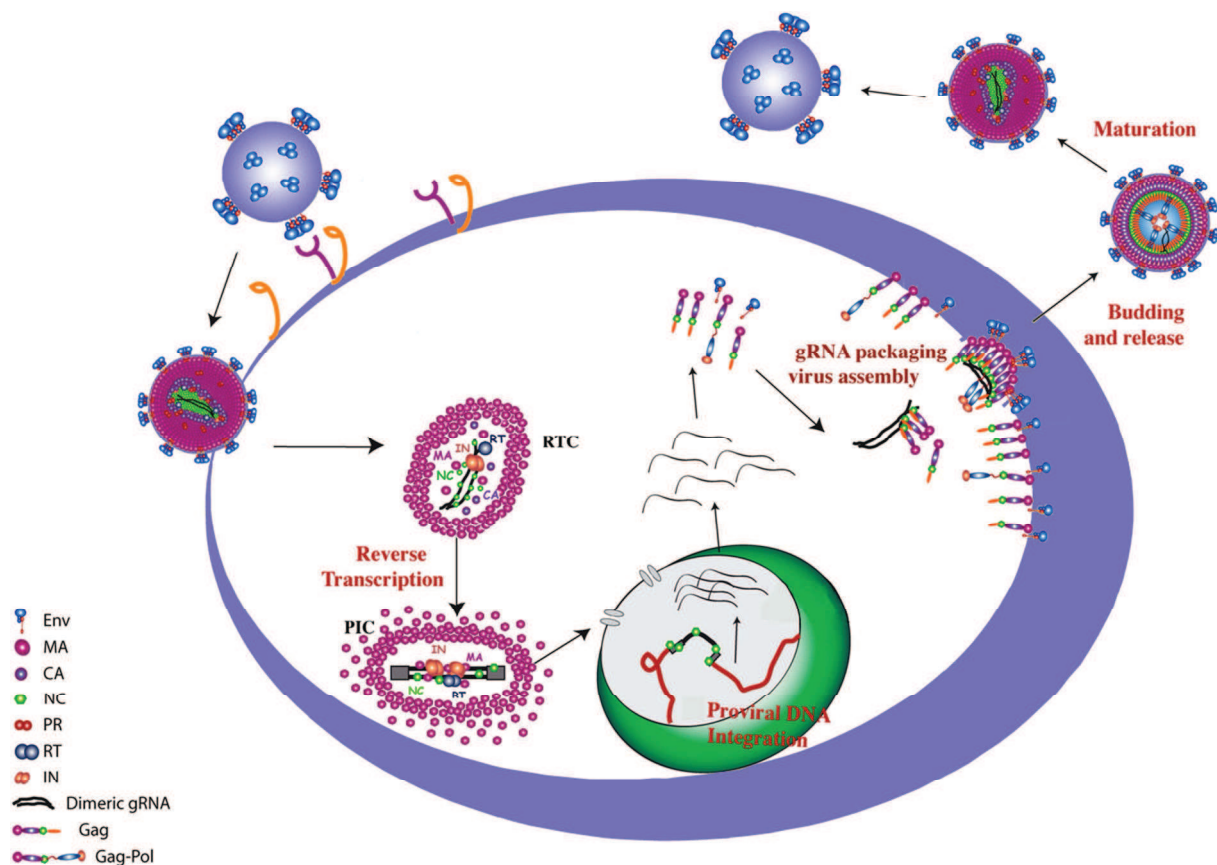


Figure 1.22 : Le cycle rétroviral du VIH-1 (249). Les étapes de la phase précoce sont : l'entrée du virus dans la cellule hôte, la reverse transcription, l'import nucléaire et l'intégration. Les étapes de la phase tardive sont : la transcription de l'ARNg, la traduction des protéines virales, l'assemblage, le bourgeonnement et finalement la maturation des virions.

Tout au long de cette partie, les rôles de la NCp7 au cours des différentes étapes du cycle seront mis en valeur. Les différents traitements existants seront également traités au niveau de l'étape où ils interviennent.

1. Le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte

A ce stade du cycle réplcatif du VIH-1, la protéine NCp7 est confinée dans la capside virale où elle forme un complexe ribonucléoprotéique dense dont le rôle, alors passif, consiste à protéger l'ARNg (293). Les acteurs principaux de l'entrée du VIH-1 sont les protéines virales SUgp120 et TMgp41 ainsi que les récepteurs membranaires des lymphocytes T CD4⁺ : CD4, CCR5 et CXCR4 (294).

a. De l'attachement du virus à la fusion des membranes

Le VIH-1 commence par se lier de manière non-spécifique à la membrane plasmique de la cellule cible, via des interactions dirigées par son enveloppe lipidique. Lorsque le virus se trouve à proximité d'un récepteur CD4 (Fig. 1.21 étape 2), la protéine SUgp120 subit un changement conformationnel qui permet sa liaison aux corécepteurs CXCR4 ou CCR5 (Fig. 1.23 étape 3). SUgp120 se lie à CD4 grâce à un domaine conservé (295), alors qu'elle se lie aux corécepteurs CXCR4 et CCR5 via une région variable (loop V3) (296). Cette seconde liaison induit un changement structural qui permet la libération du domaine de fusion de TMgp41 qui s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible (Fig. 1.23 étape 3) (297). Chaque monomère de TMgp41 possède alors un domaine C-terminal inséré dans l'enveloppe virale, qui s'enroule autour du domaine N-terminal inséré dans la membrane plasmique de la cellule cible. Ce mécanisme donne naissance au 6HB (6-helices bundle) et permet la fusion des membranes (Fig. 1.23, étape 4) (298).

Bien que l'entrée du virus dans la cellule cible suive majoritairement le processus décrit précédemment, il a également été montré que le VIH-1 peut utiliser des récepteurs membranaires cellulaires qu'il a précédemment incorporés dans son enveloppe lors de l'assemblage (299).

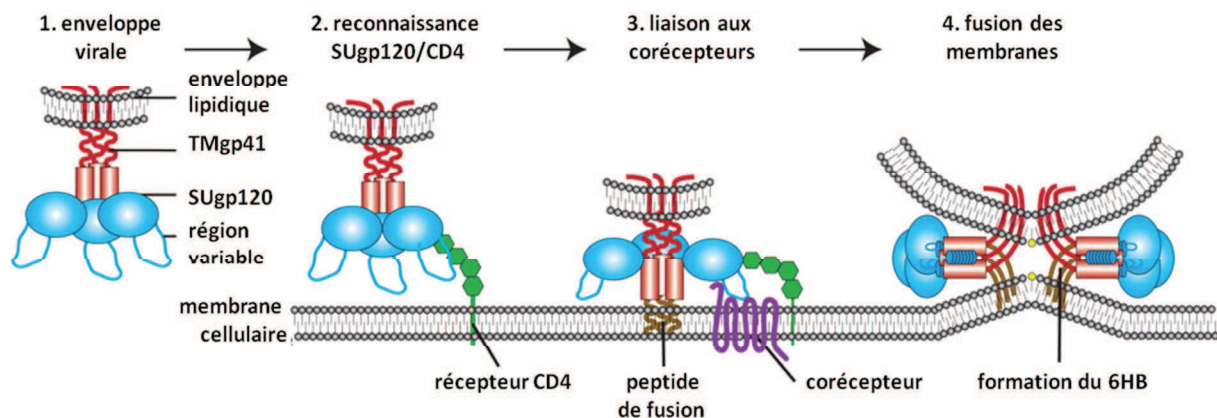


Figure 1.23 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 (adapté de (294)) : Les récepteurs viraux composés des sous-unités SUgp120 et TMgp41 **(1)** s'attachent à la cellule hôte et reconnaissent le récepteur CD4 **(2)** causant un réarrangement conformationnel du récepteur viral et permettant la liaison de la région variable de SUgp120 au corécepteur d'une part et l'insertion du peptide de fusion issu de TMgp41 dans la membrane de la cellule hôte d'autre part **(3)**, ce qui initie la formation du 6HB et la fusion des membranes virale et cellulaire **(4)**.

La fusion des membranes est suivie de la libération de la capside virale dans le cytoplasme de la cellule cible.

b. L'inhibition de l'entrée

L'entrée du virus étant composée de plusieurs étapes distinctes, plusieurs types d'inhibiteurs d'entrée furent développés (300) :

- Les **inhibiteurs d'attachement** sont des molécules qui se lient à SUgp120 dans le but d'empêcher la reconnaissance des récepteurs CD4 et donc l'attachement à la cellule cible.
- Les **inhibiteurs post-attachement** sont des anticorps qui, au contraire des inhibiteurs d'attachement, se lient aux récepteurs CD4. Ils n'empêchent pas la liaison CD4/SUgp120 mais modifient la flexibilité de CD4 bloquant indirectement l'accès de SUgp120 aux corécepteurs CCR5 et CXCR4.
- Les **antagonistes du corécepteur CCR5** visent à bloquer directement l'interaction de SUgp120 avec les corécepteurs CCR5.
- Les **antagonistes du corécepteur CXCR4** visent à bloquer directement l'interaction de SUgp120 avec les corécepteurs CXCR4.

- Les **inhibiteurs de fusion**, sont des molécules qui se lient à TMgp41 dans le but de prévenir l'insertion de son domaine de fusion dans la membrane plasmique de la cellule cible, et de bloquer la fusion des membranes.

Bien que de nombreuses molécules soient en cours d'essai clinique, seules deux sont actuellement accessibles sur le marché : l'enfuvirtide (T-20) (301) commercialisé sous le nom de Pentafuside[®] ou Fusiron[®], qui est un inhibiteur de fusion, et le maraviroc (302) commercialisé sous le nom de Celsentri[®], qui est un antagoniste compétitif du corécepteur CCR5.

2. De l'ARN génomique à l'ADN viral

a. Le désassemblage

Longtemps considérées comme deux étapes séquentielles, le désassemblage de la capside virale et la transcription inverse (TI) sont aujourd'hui considérées comme deux étapes complémentaires (303). Le rôle principal de la capside virale consiste à fournir un environnement adéquat au complexe de la transcription inverse (RTC), au sein duquel le processus de TI a lieu. Le mécanisme et la cinétique de la décapsidation restent un mystère (304). Néanmoins il semblerait que la cyclophiline A, recrutée par Gag, lors de l'assemblage, joue un rôle dans le mécanisme de décapsidation (305). Par ailleurs, il apparaît que la décapsidation commencerait dans le cytoplasme et s'achèverait avant la fin de la TI, à proximité des pores nucléaires (NPC) (306, 307).

b. La transcription inverse

Durant la TI, l'ARNg simple brin est converti en ADNv double brin, par le biais d'un mécanisme complexe orchestré par la transcriptase inverse (RT) et facilité par NCp7. Le RTC est donc composé de l'ARNg recouvert de 1500 à 2000 NCp7, de la RT ainsi que de MA, Vpr et IN (57). C'est durant cette étape du cycle rétroviral que les propriétés chaperonnes de NCp7 sont le mieux mises en valeur, notamment lors de l'initiation de la TI et des transferts de brin.

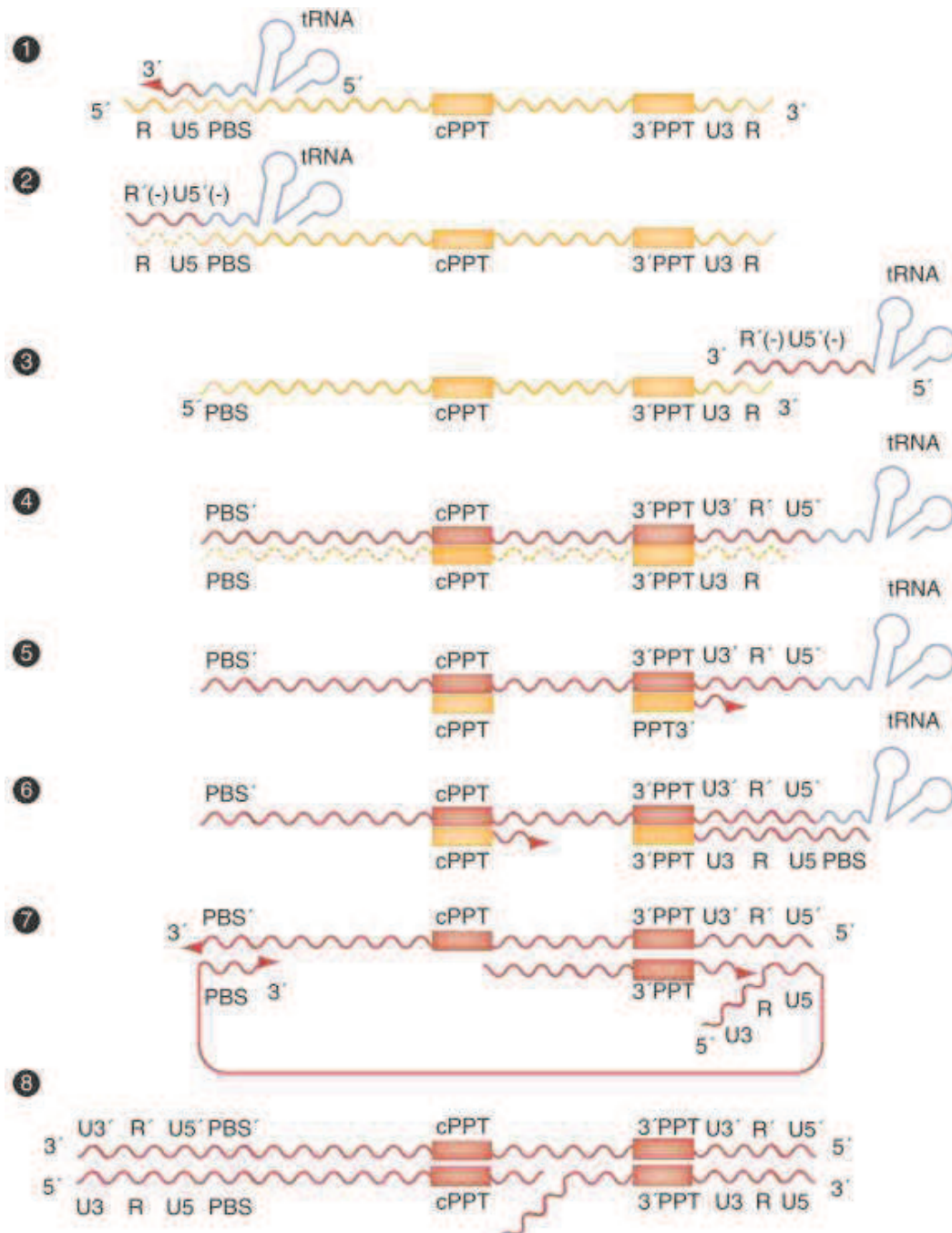


Figure 1.24 : Transcription inverse du VIH-1 (249). La matrice ARN est représentée en jaune, l'ARNt^{Lys}₃ est représenté en bleu, les brins d'ADN(-) et d'ADN(+) néosynthétisés sont représentés en rouge (**Etape 1**) Initiation de la TI par l'hybridation de l'ARNt^{Lys}₃ sur PBS. (**Etape 2**) Synthèse de l'ADN strong-stop (-) et dégradation de la matrice ARN (pointillés). (**Etape 3**) Transfert de l'ADN strong-stop (-) à l'extrémité 3' de l'ARNg par hybridation des séquences cTAR et TAR. (**Etape 4**) Synthèse de l'ADN (-) et dégradation de la matrice ARN à l'exception des séquences PPT3' et cPPT. (**Etape 5**) La synthèse de l'ADN(+) s'initie au niveau de la séquence PPT3' (**Etape 6**) La synthèse de l'ADN(+) s'initie également au niveau de la séquence cPPT. (**Etape 7**) Second transfert de brin : hybridation de la séquence d'ADN(+) PBS avec la séquence d'ADN(-) PBS. (**Etape 8**) ADN viral double brin final exhibant la séquence DNAflap.

L'initiation de la synthèse du brin d'ADN (-)

La TI débute avec l'hybridation des 18 nt 3'-terminaux de l'amorce ARNt^{Lys}₃ cellulaire, sélectivement encapsidée (18, 308), sur la séquence PBS (Primer Binding Site) (Fig. 1.25 A et B, Fig. 1.24, Etape 1) située proche de l'extrémité 5' du génome viral. La séquence double brin ARN/ARN, appelée complexe d'initiation (18 nt), est reconnue par la RT et induit l'initiation de la synthèse du brin d'ADN(-) (ADN strong-stop(-)). Cette étape se déroule dans la capside virale, alors que le virus n'est pas encore fixé sur les récepteurs de la cellule cible.

La génération du complexe d'initiation nécessite le réarrangement conformationnel de la séquence PBS ainsi que celui de l'ARNt^{Lys}₃, dont la forme en L est très stable. L'ARNt^{Lys}₃ ne s'hybride pas spontanément sur la séquence PBS lorsque seules les deux espèces sont présentes *in vitro* à des températures physiologiques (309, 310).

En fait, il a été montré que la génération du complexe d'initiation est stimulée par la présence du domaine NC de Gag (155, 311) ou de NCp7 sous sa forme mature (200, 310, 312–315), et plus particulièrement par les résidus basiques de NCp7 qui permettent l'agrégation des ANs. La réaction d'hybridation nécessite également l'interaction spécifique des doigts de zinc de NCp7 avec la boucle TΨC pour induire la fusion partielle de la structure de PBS et de l'ARNt^{Lys}₃ (310, 316) (Fig. 1.25C). Le taux de l'hybridation ARNt^{Lys}₃/PBS se trouve augmentée d'un facteur 10⁵ en présence de la NCp7 (314).

Toutefois l'interaction des 18 nt situés en 3' de l'ARNt^{Lys}₃ avec PBS ne permettent pas la formation d'un complexe stable ARNt/ARNg. Des interactions supplémentaires seraient impliquées, notamment l'interaction entre la boucle riche en bases A en amont du PBS et la boucle anti-codon de l'ARNt^{Lys}₃ (317–320), et l'interaction de la partie 5' de la tige du bras TΨC avec la région PAS (Primer Activation Signal) située en amont de PBS. Cette dernière semblerait nécessaire à l'activation de la synthèse de l'ADNv (321–324) (Fig. 1.25, A et B).

La synthèse du brin d'ADN(-) par l'activité polymérase de la RT démarre à l'extrémité 3' de l'ARNt et se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNg, tandis que l'activité RNase H de la RT dégrade la matrice ARN correspondant à l'ADN alors néosynthétisé. Ce fragment est appelé ADN strong-stop (-). A noter que le duplex ARN/ARN contenant l'ARNt^{Lys}₃ résiste à la RNase H, permettant à PBS d'être réutilisé lors une étape plus avancée (Fig. 1.24, Etape 2).

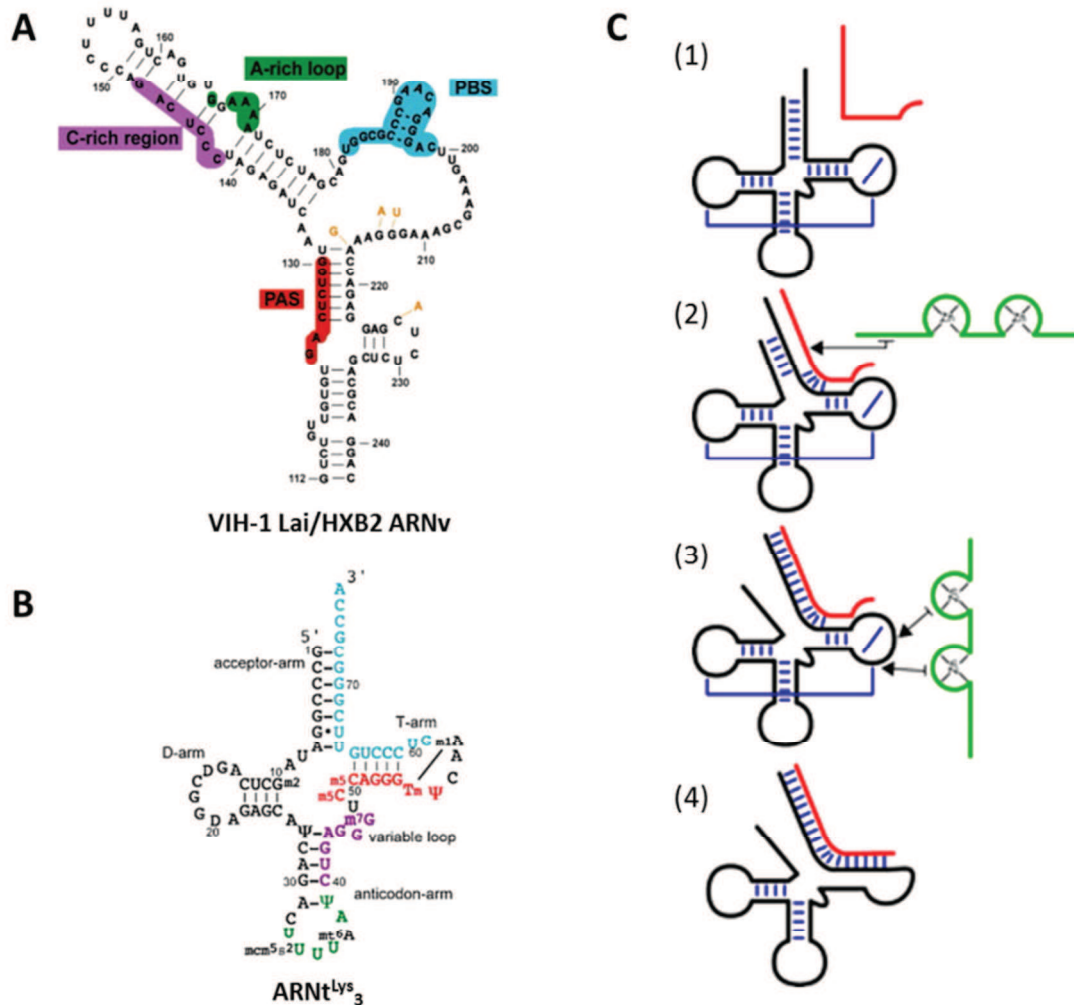


Figure 1.25 : Initiation de la transcription inverse (adapté de (309, 310) **(A)** Structure secondaire de la séquence ARN de l'isolat VIH-1 HXB2 (nt 125-223) (325) **(B)** Structure secondaire de l'ARNt^{Lys}. Les séquences complémentaires PBS/ARNt^{Lys} sont présentées dans des couleurs identiques. **(C)** Mécanisme de l'hybridation de l'ARNt^{Lys} sur PBS. **(Etape 1)** ARNt^{Lys} (noir) et PBS (rouge). **(Etape 2)** hybridation de la séquence PBS le long de la tige de l'ARNt^{Lys} facilitée par les domaines basiques de NC. **(Etape 3)** les doigts de zinc interagissent avec la boucle TΨC. **(Etape 4)** produit final.

Le premier transfert de brin

Cette étape repose sur le transfert de l'ADN strong-stop (-) vers l'extrémité 3' de l'ARNg (Fig. 1.24, Etape 3) rendue possible par la présence des séquences redondantes R aux deux extrémités du génome. Plus précisément, c'est la séquence en tige boucle cTAR de l'ADN strong-stop (-) en 5' qui va s'hybrider à la séquence TAR de l'extrémité 3' de la matrice ARN (326). TAR et cTAR sont deux séquences qui sont structurées en tiges boucles imparfaites,

présentant des mésappariements et des « bulges » (189, 317). La structure et la stabilité de ces séquences apparaissent comme des éléments clés de ce transfert de brin (189, 203, 327). Le duplex TAR/cTAR peut se former de lui-même avec une cinétique extrêmement lente, cependant NCp7 joue un rôle crucial lors de cette étape, en augmentant la vitesse d'hybridation du duplex TAR/cTAR par un facteur 3000 dans des conditions de température et de sels physiologiques (288, 328). En effet, en absence de NCp7, les deux séquences complémentaires s'hybrident via une interaction boucle/boucle peu efficace (216, 329) (Fig. 1.26, partie rouge). Au contraire, la présence des doigts de zinc de NCp7 induit la déstabilisation de l'extrémité de la séquence cTAR (171, 207). NCp7 interagit préférentiellement avec des guanines non-appariées et exposées au solvant de la tige de TAR, par contact hydrophobe avec les doigts de zinc (167, 187, 208). Cette interaction provoque alors l'ouverture de la tige (202, 330, 331), permettant l'hybridation avec la séquence TAR ARN complémentaire par leurs extrémités et la formation du duplexe TAR/cTAR stable (zipper, Fig. 1.26, partie bleue).

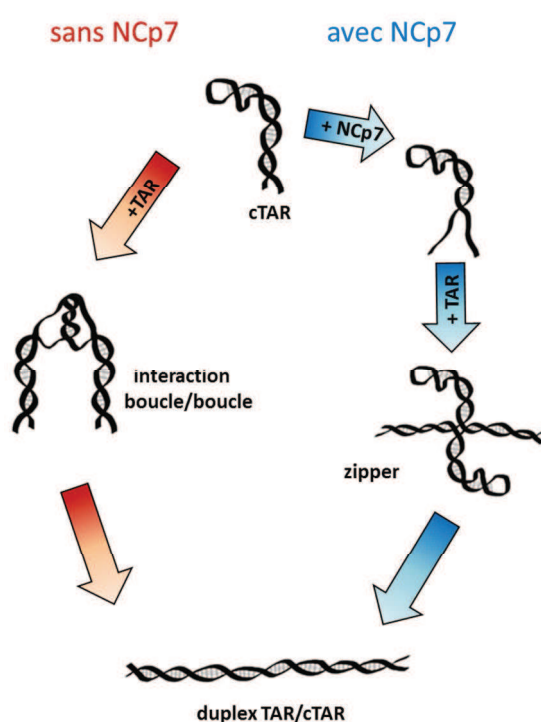


Figure 1.26 : Mécanisme d'hybridation des séquences TAR et cTAR en absence et présence de NC lors du 1^{er} transfert de brin. (A) En absence de NC la formation du duplex TAR/cTAR est initiée par une interaction boucle/boucle qui est finalement convertie en duplex stable. En présence de NC, cTAR est déstabilisé en son extrémité ce qui induit une liaison au brin complémentaire par l'extrémité de leur tige boucle (zipper) (adapté de (113)).

Lorsque les séquences TAR et cTAR sont hybridées, la RT reprend la synthèse du brin d'ADN(-) jusqu'à la région PBS située en 5', alors que l'activité RNase H dégrade la matrice ARN, à l'exception de deux séquences riches en purines de 15 nt appelées PPT3' et cPPT ((central) Poly Purine Tract) (Fig. 1.24, Etape 4). Les séquences PPT3' et cPPT servent d'amorce à la synthèse du brin d'ADN (+) (332) (Fig. 1.24, Etapes 5 et 6). Après la synthèse de la séquence PBS PBS (+), le duplex ARN/ARN formé par l'ARNt^{Lys}₃ et PBS encore accrochés au brin d'ADN(-) sont dégradés (Fig. 1.24, Etape 6).

Le second transfert de brin

Le second transfert de brin implique la séquence PBS(+).qui est transférée à l'extrémité 5' du brin d'ADN(-) où les 18 nt de la séquence PBS(+) s'hybrident sur ceux du PBS (-) (Fig. 1.24, Etape 7). Cette étape permet de reconstituer la séquence du LTR 5' et d'achever la synthèse du brin d'ADN(+).

L'activité RNase H de la RT est indispensable pour ce transfert de brin qui est inhibé sans la dégradation du duplex ARNt^{Lys}₃/PBS (333). Le rôle de NCp7 lors de cette étape est à nouveau important puisqu'elle assiste et stimule l'hybridation des copies (+) et (-) de PBS. En présence de la NCp7, la vitesse de réaction est accélérée d'un facteur 60. Cependant, contrairement au premier transfert de brin, le rôle de NCp7 ne consiste pas à déstabiliser la tige de PBS (173), mais induire l'exposition de ses bases nucléotidiques (172). Ainsi en présence de NCp7, l'hybridation PBS(-)/(+) est facilitée et stimulée par une interaction boucle/boucle, alors qu'en absence de NCp7 leur hybridation se fait via leurs extrémités protrudentes par une interaction de type zipper (Fig. 1.27) (167).

S'ensuit l'achèvement de la synthèse du brin d'ADN(+). La RT poursuit sa synthèse jusqu'à la séquence de terminaison centrale (CTS) située en 3' de la région cPPT, tout en déplaçant une partie du brin synthétisé, laissant un morceau d'ADN de 99 nt appelé le DNAflap (334, 335). Il en résulte donc un ADN double brin linéaire qui possède en plus un fragment simple brin dans sa région centrale (Fig. 1.24, Etape 8).

De manière générale, la protéine NCp7 assiste tout le processus de la TI de par ses propriétés chaperonnes en induisant une augmentation de l'efficacité de la synthèse de l'ADN proviral (336) ainsi qu'une augmentation de la fidélité de la RT (337, 338).

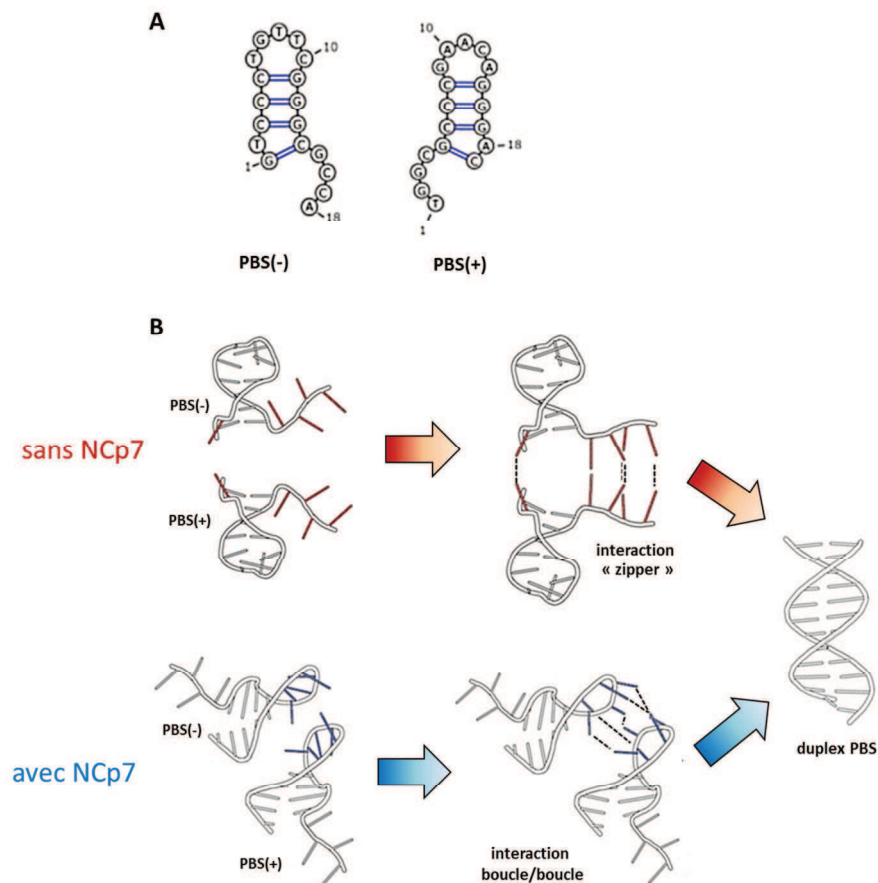


Figure 1.27 : Mécanisme d'hybridation des séquences PBS(-)/(+) en absence et présence de NC lors du 2nd transfert de brin (adapté de (113, 167)). **(A)** Séquences PBS(-) et PBS(+) **(B)** En l'absence de NCp7, la formation du duplex PBS(-)/(+) est initiée par la liaison des séquences protrudentes (zipper). En présence de NCp7, la formation du duplex PBS(-)/(+) est initiée par une interaction boucle/boucle.

c. L'inhibition de la transcription inverse

Il existe plusieurs classes de molécules pouvant inhiber la transcription inverse, dont un grand nombre déjà commercialisées.

- **Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI/INTI).** Ces molécules qui constituent des analogues de nucléosides sont incorporées par la RT lors de la synthèse de l'ADNv. Leur insertion bloque l'élongation de l'ADN, et par conséquent le cycle viral. Il s'agit donc d'inhibiteurs compétitifs de la TI. D'un point de vue historique, l'AZT qui est la première molécule anti-rétrovirale approuvée par la FDA (Food and Drug Administration), est un INTI. De nombreux autres INTIs sont aujourd'hui disponibles (Zalcitabine, Stavudine ...)

- **Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).** Ces molécules se fixent à proximité du site catalytique de la RT et induisent des changements conformationnels qui inactivent l'activité polymérase de la RT. On trouve la Névirapine, l'Efavirenz ou encore la Delavirdine.
- **Les inhibiteurs de la RNase H.** Ce sont des molécules qui agissent en se liant soit directement sur le domaine de la RNase H, soit en se liant sur le domaine de l'ADN polymérase. Plusieurs molécules sont actuellement en cours de développement, mais leur toxicité est élevée (339).

3. Le transport de l'ADN viral

L'achèvement de la TI donne naissance à un complexe nucléoprotéique appelé complexe de pré-intégration (PIC). Sa composition, bien que toujours discutée, est différente de celle du RTC, et comprend l'ADNv, IN, Vpr et MA ainsi que des protéines cellulaires telles que HMG-I(Y) (High Mobility Group), BAF (Barrier to Autointegration Factor) ou encore LEDGF/p75 (340–342). Il est à noter qu'en dépit de son affinité élevée pour les ANs, la présence de NCp7 dans le PIC reste débattue (151), bien qu'elle soit retrouvée dans le noyau des cellules infectées, et suspectée de participer à l'import nucléaire du PIC (343). Toutefois, un modèle récent propose que NCp7 se détache du RTC au rythme où l'ADN double brin est synthétisé, et ne reste finalement liée que de manière non-spécifique à l'ADN flap car son affinité est meilleure pour l'ADN simple brin que pour l'ADN double brin (128, 223, 335). Ainsi le PIC ne contiendrait qu'une faible quantité de NCp7, pouvant expliquer à la fois sa présence dans le noyau des cellules infectées et la difficulté de la détecter dans le PIC (151).

Afin d'être intégré dans le génome de la cellule hôte, l'ADNv néosynthétisé doit transiter du cytoplasme vers le noyau. Il est à noter que le VIH-1 possède la propriété de pouvoir infecter les cellules ne se divisant pas telles que les macrophages.

Bien que le trafic cytoplasmique du génome du VIH-1 ne soit que partiellement connu, il semblerait qu'il résulte d'une coordination spatiotemporelle entre le remodelage du RTC en PIC et le désassemblage de la capsid (306). Etant trop imposants pour une diffusion passive, ces complexes nucléoprotéiques doivent détourner les voies de transports cellulaires pour traverser le cytoplasme. En effet, des observations microscopiques ont pu montrer que le transit de ces complexes est d'abord dirigé par les microtubules (344), permettant au génome

de se retrouver à proximité du noyau. Toutefois, le mécanisme du transport du PIC allant des microtubules vers les NPCs reste mal connu. La première possibilité consisterait à utiliser les protéines cargos et la seconde possibilité à utiliser le réseau de microfilaments (345). Une fois à proximité d'un NPC, le PIC serait importé grâce à un mécanisme impliquant les importines α et β , ainsi que les protéines Ran-GTP qui interagiraient avec les signaux de localisation nucléaire (NLS pour nuclear localization signal) situés sur MA, IN et Vpr. Par ailleurs l'ADN flap semble également être un déterminant majeur du mécanisme d'import nucléaire, puisque sa synthèse déclencherait le signal de décapsulation (307, 346).

Cependant, bien que l'hypothèse de l'import nucléaire du PIC via un transit actif à travers les NPC soit actuellement privilégiée, celle de la diffusion passive rendue possible par la déstabilisation de la membrane nucléaire par Vpr ne peut pas être exclue (129).

4. L'intégration

Une fois que l'ADNv a traversé la membrane nucléaire il est intégré au génome de la cellule cible. L'étape de l'intégration s'effectue en trois parties. La première réaction appelée le 3'-processing est catalysée par l'intégrase (IN) qui reconnaît spécifiquement les deux LTR situés aux extrémités du génome viral. Le 3'-processing repose sur le clivage d'un dinucléotide GT à chaque extrémité 3' du génome, libérant un dinucléotide CA fortement conservé, et porteur d'une extrémité 3'-hydroxyl (347) (Fig. 1.28, Etape 1). Ensuite, la seconde étape appelée transfert de brin, consiste en l'insertion de l'extrémité CA-OH 3' dans le génome cellulaire par une réaction de trans-estérification également catalysée par IN. Le transfert de brin conduit à l'insertion partielle de l'ADNv au sein de l'ADN cellulaire (348) (Fig. 1.28, Etape 2). Finalement, les enzymes de maintien du génome réparent les discontinuités obtenues au niveau des sites de liaison (349) (Fig. 1.28, Etape 3). Les sites d'insertions généralement choisis par le VIH-1 sont des sites activement transcrits appelés hotspots (350). *In vitro*, les seuls trois composants indispensables à cette réaction sont l'ADN cellulaire, l'ADNv contenant les LTR et IN (151). Cependant il a été montré que d'autres protéines cellulaires ou virales peuvent augmenter l'efficacité de l'intégration. On recense notamment LEGDF et HMG-I(Y) (351), ou encore NCp7 qui stimulerait significativement le transfert de brin *in vitro* et dont un mutant inhibe l'intégration *in cellulo* (352–355). Suite à l'intégration, il existe

une étape de latence de durée variable dont les mécanismes demeurent mal connus. L'intégration marque la fin de la phase précoce du cycle réplcatif du VIH-1.

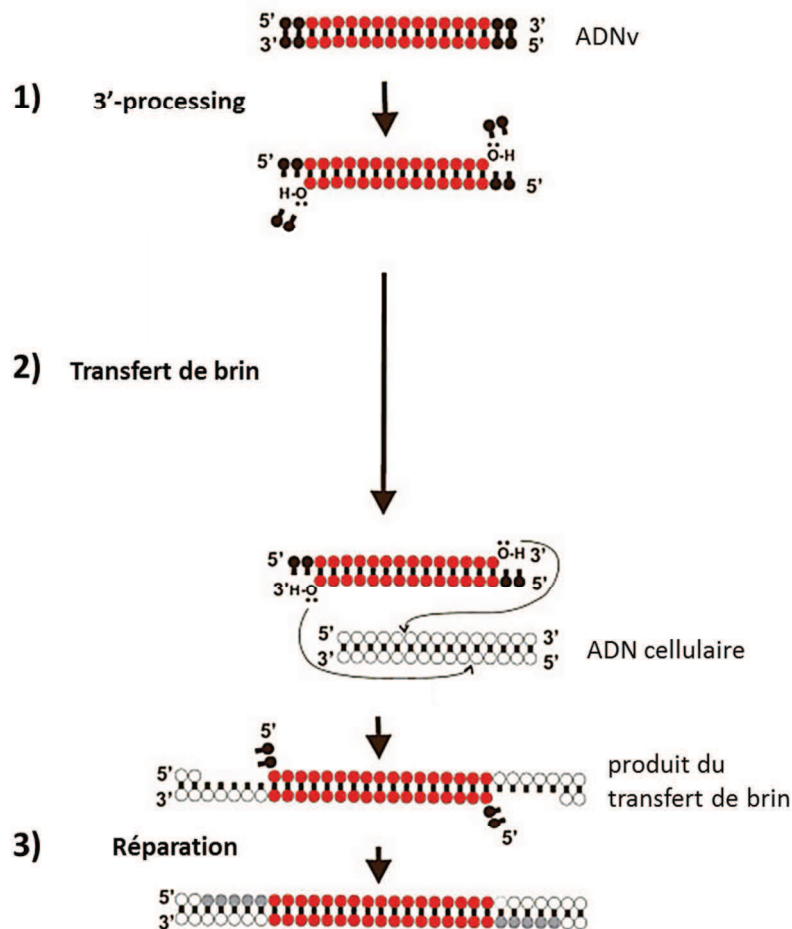


Figure 1.28 : Mécanisme de l'intégration de l'ADNv dans le génome de la cellule hôte (adapté de (356)). Les trois étapes de l'intégration : le 3'-processing et le transfert de brin sont catalysés par IN, alors que la réparation de l'ADN est effectuée par les enzymes cellulaires.

N'ayant pas d'homologue cellulaire capable de catalyser l'incorporation de l'ADNv dans le génome de la cellule hôte, l'intégrase est une cible de choix pour un traitement antirétroviral (357). A la fois des inhibiteurs du 3'-processing et du transfert de brin, INSTIs (Integrase Strand Transfer Inhibitor) ont montré des activités *in vitro*, mais seuls des INSTIs ont exhibé leur efficacité *in vivo*, menant à la commercialisation des INSTIs de première génération tel que le Raltegravir en 2007. Puis les INSTIs de seconde génération tel que le dolutegravir furent développés (358). L'action inhibitrice des INSTIs est portée à la fois par leur capacité à

se lier entre l'intégrase et l'ADNv, et par la chélation des ions Mg^{2+} qui agissent en cofacteurs de l'intégrase (359). Par ailleurs, des avancées récentes en matière d'inhibition de l'intégration ont mis en évidence de petites molécules appelées LEGDINs, qui ciblent l'interaction IN-LEDGF/p75 (360).

5. L'expression du génome viral

L'expression du génome ADNv s'effectue en deux temps. Les protéines régulatrices sont tout d'abord exprimées au cours de la phase précoce alors que les protéines structurales et enzymatiques sont produites plus tard, au cours de la phase tardive.

a. La phase précoce

Le VIH-1 ne possède pas de machinerie transcriptionnelle et traductionnelle et utilise donc celle de son hôte. Son génome proviral fonctionnant comme un gène eucaryote, il utilise des promoteurs transcriptionnels qui favorisent le positionnement de l'ARN polymérase II (ARNpII) au niveau du site d'initiation de la transcription. La faible processivité de l'ARNpII est due à son association à la protéine DSIF (DRB-Sensitivity Inducing Factor) qui affecte négativement la transcription en recrutant le facteur répresseur de transcription NELF (Negative Elongation Factor) (361), et qui entraîne la production de transcrits courts, non polyadénylés (362). De ce fait une quantité minimale d'ARNv est transcrite, puis multi-épissée, lui permettant d'être exportée dans le cytoplasme par les mécanismes cellulaires classiques de transport des ARNm et finalement d'être traduit par la machinerie cellulaire. Les protéines de régulation Tat et Rev, ainsi que la protéine auxiliaire Nef sont issues de cette phase précoce. Bien que l'intégration et la transcription soient généralement décrites comme séquentielles, il a été montré que la phase précoce de la transcription peut avoir lieu alors que l'ADNv n'est pas encore intégré dans le génome de son hôte (363).

Lorsque Tat est produite en quantité suffisante pour exercer son activité de transactivation de la transcription, elle se fixe sur la séquence TAR en 5' de l'ARNv en cours de transcription et recrute la kinase 9 cycline-dépendante (CDK9) ainsi que la Cycline T1 (CycT1) (364). Ces deux protéines font partie du complexe activateur de l'élongation de la transcription appelé PTEF-b (Transcription Elongation Factor) (99) (Fig. 1.29 A). Grâce à son activité kinase,

CDK9 phosphoryle l'extrémité C-terminale de l'ARNpII, promouvant sa processivité (365), ainsi que DSIF et NELF, permettant la séparation de NELF de l'ARNpII et le commencement l'élongation (Fig. 1.29 B) (366). L'acétylation de Tat provoque ensuite la dissociation du complexe Tat/TAR et marque la fin de la phase précoce de la transcription (367). Tat acétylée interagit ensuite avec la protéine PCAF (p300/CREB binding protein-associated factor) (368), ce qui permet la synthèse de transcrits longs et polyadénylés.

A partir de cet unique transcrit, le VIH-1 est capable de générer plus de 30 ARNm viraux de taille variable par un mécanisme d'épissage alternatif (369). La présence de plusieurs sites donneurs et accepteurs d'épissage permet la génération de trois classes d'ARN :

- L'ARNm non-épissé : il code pour Gag et Pol et peut également être encapsidé,
- Les ARN mono-épissés : ils codent pour les protéines Env, Vif, Vpr et Vpu,
- Les ARN multi-épissés : ils codent pour les protéines Tat, Rev et Nef.

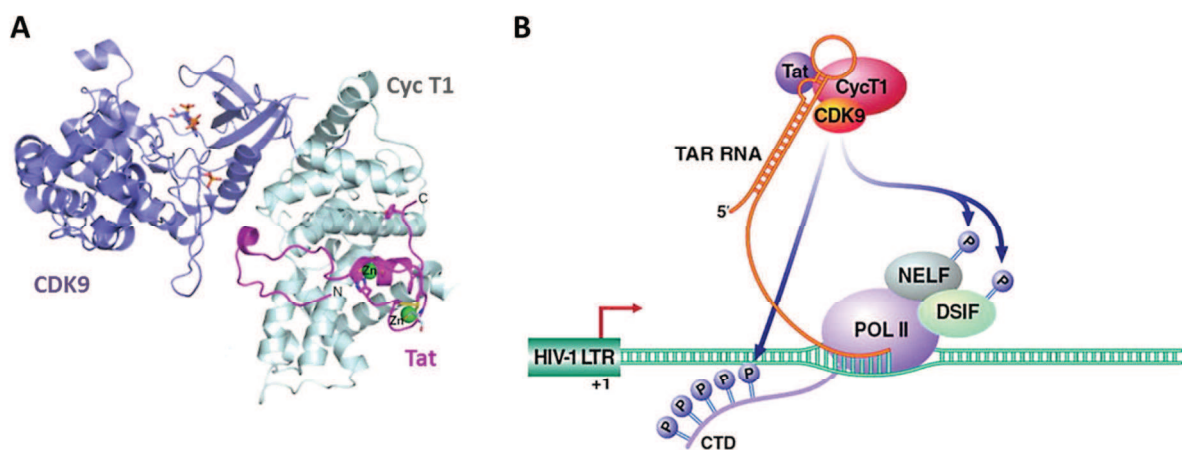


Figure 1.29 : Le rôle de Tat dans la transcription de l'ADN génomique (adapté de (370)). **(A)** Structure du complexe P-TEFb (114) – PDB 3MIA). Tat est représentée en magenta, ses doigts de zinc sont représentés en vert, CycT1 est représentée en gris et CDK9 est représentée en violet. **(B)** Tat se lie à la séquence TAR de l'ARN encours de transcription et recrute CycT1 et CDK9. Le complexe Tat/CycT1/CDK9 active la transcription en phosphorylant le domaine C-terminal de l'ARN Pol II ainsi que les facteurs répresseurs de transcription DSIF et NELF.

b. La phase tardive

La phase tardive de l'expression du génome proviral est essentiellement régulée par la protéine Rev. En effet, contrairement aux ARNm multi-épissés qui peuvent transiter en empruntant les mêmes voies que les ARNm cellulaires, les ARNm mono- ou non-épissés nécessitent l'implication de Rev pour être exportés hors du compartiment nucléaire (371). La protéine régulatrice Rev, traduite dans le cytoplasme lors de la phase précoce, est au centre d'un cycle d'import/export permettant d'adresser les ARNm non- ou mono-épissés vers le cytoplasme de la cellule hôte (Fig. 1.30) (117) grâce aux deux signaux NLS et NES portés par Rev (Fig. 1.13). Lorsque la quantité de Rev exprimée dans le cytoplasme est suffisante, son NLS situé sur un domaine riche en arginine, recrute les facteurs d'import nucléaire (importines α et β , Ran-GDP) (372), permettant à Rev de pénétrer dans le noyau. Par la suite, cette même région riche en arginine reconnaît spécifiquement la séquence RRE de 250 nt qui est localisée sur le gène *env* des ARNm (24). C'est une séquence structurée en plusieurs tiges boucles entre lesquelles Rev se multimérise de manière à masquer son NLS et à exposer son NES, situé sur une région riche en leucine (25). L'exposition du NES de Rev conduit à son interaction avec les facteurs d'export nucléaire tels que CRM1 (Chromosome Maintenance gene 1) et Ran-GTP (373).

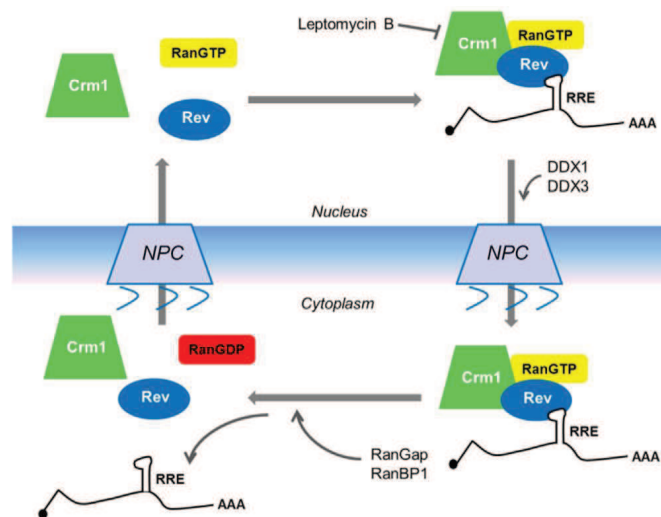


Figure 1.30 : Export nucléaire des ARNm viraux au moyen des cycles d'import/export répétés de la protéine Rev (374). Lorsqu'elle est située dans le cytoplasme Rev recrute les importines ainsi que Ran GDP pour être transférée dans le noyau. Lorsqu'elle est dans le noyau, Rev se multimérise sur la séquence RRE de l'ARNm viral spécifiquement. Le NES de Rev permet son export vers le cytoplasme par le biais d'interactions avec des facteurs d'export nucléaire et de Ran GTP. L'hydrolyse du GTP permet le relargage de l'ARNm dans le cytoplasme.

Finalement, pour la traduction de ses ARNm, le VIH-1 dépend uniquement de la machinerie cellulaire. La synthèse des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol se fait à partir du même transcrit, tout comme la synthèse des protéines d'enveloppe et de Vpu. Cette expression se tient par une voie originale dite IRES-dépendante.

6. L'assemblage des particules virales

La formation des particules virales matures requiert le transport du précurseur protéique Gag au niveau de la membrane plasmique et son association avec différents partenaires viraux et cellulaires. Cette étape est essentiellement dirigée par la multimérisation de Gag et son interaction avec l'ARNg. Le processus d'assemblage du VIH-1 sera détaillé dans le second chapitre de l'introduction

7. Le bourgeonnement

Une fois que les virions contiennent toutes les composantes nécessaires pour former des virus infectieux, ceux-ci doivent se détacher de la cellule hôte pour infecter de nouvelles cellules. Ne possédant pas la machinerie nécessaire à cette étape, le VIH-1 détourne une fois de plus celle de son hôte lors du bourgeonnement.

Le mécanisme de bourgeonnement du VIH-1 est dirigé par la machinerie ESCRT cellulaire qui est recrutée par le domaine p6 du précurseur Gag ($p6^{\text{Gag}}$) (66, 375). « ESCRT » désigne une famille composée de plus de 30 protéines cellulaires. Dans le contexte d'une cellule saine, les protéines de la famille des ESCRTs vont diriger les mécanismes de fusion des membranes lipidiques qui conduisent à la libération de vésicules endosomiques ou encore à la séparation des cellules filles lors de l'abscission de la cytokinèse (376).

$p6^{\text{Gag}}$ comprend deux domaines importants pour le recrutement de la machinerie ESCRT : le domaine PTAP qui se lie spécifiquement à la sous-unité TSG101 du complexe ESCRT-I (377) d'une part, et le domaine YPXL (Tyr-Pro-X-Lys, où X désigne un résidu quelconque) qui se lie spécifiquement à la protéine Alix (65) d'autre part. Les protéines TSG101/ESCRT-I et Alix vont permettre le recrutement des complexes ESCRT-III et VPS4. Le complexe ESCRT-III utilisé par le VIH-1 correspond à la sous-famille de protéines comprenant CHMP-

2 et CHMP-4 (378). L'interaction TSG101/ESCRT-III n'est pas encore bien décrite, alors que l'interaction Alix/ESCRT-III est mieux comprise (Fig. 1.31). Lorsque $p6^{Gag}$ recrute Alix, il induit un changement conformationnel d'Alix permettant alors sa dimérisation. Le dimère de protéines Alix se lie alors à la membrane plasmique et recrute CHMP-4 via son domaine Bro1 (379). CHMP-4 copolymérise de concert avec CHMP-2 sous forme de filaments à la base du virion (380) et recrute le complexe VPS4 (381), pour permettre la réunion des deux extrémités de la membrane plasmique et la libération du virion de la cellule infectée.

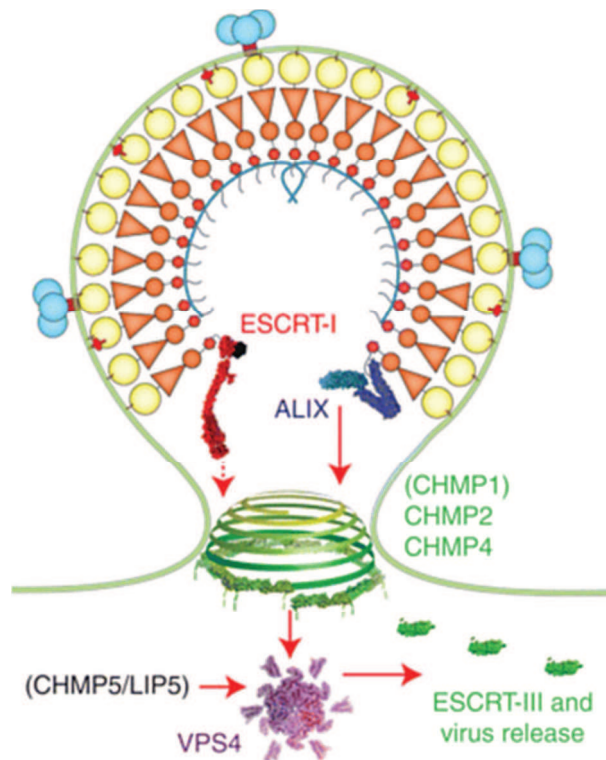


Figure 1.31 : Mécanisme du bourgeonnement des virions (61). Illustration de la machinerie ESCRT détournée par le VIH-1 lors de l'étape de bourgeonnement. Le domaine p6 de Gag recrute la sous-unité TSG101 d'ESCRT-I (en rouge), l'ubiquitine (en noir) et Alix (en bleu). De ces interactions résulte le recrutement du complexe ESCRT-III (en vert) qui se polymérise sous forme de dôme, permettant le rapprochement des membranes, ainsi que le recrutement de VPS4 (en violet) qui catalyse la fission des membranes. La machinerie ESCRT-III est relâchée dans le cytoplasme.

8. La maturation

La maturation des virus commence alors que le bourgeonnement n'est pas achevé. La protéase, s'auto-dimérise grâce à son domaine Flap (Fig. 1.9) alors que chaque monomère se trouve encore attaché à l'extrémité C-terminale du précurseur Pol (382). Ce positionnement

lui permet de se libérer par un clivage auto-catalytique pour ensuite délivrer les différentes protéines enzymatiques et structurales. Au cours de la maturation, le virion subit un important réarrangement structural, dû à trois séries de clivage de Gag, qui génèrent finalement des particules virales matures et infectieuses (Fig. 1.32). L'ordre d'apparition des protéines est défini par les différentes efficacités de clivage de la protéase pour le site considéré (383). Le premier site à être clivé est situé entre les domaines SP1 et NCp7 et génère NCp15 (NCp7 liée à SP2 et p6) qui permet la libération et la condensation du génome au centre du virion (Fig. 1.30, Etape c). Par la suite, la protéase libère CA-SP1, laissant MA ancrée dans l'enveloppe lipidique (Fig. 1.30, Etape d), et finalement NCp7 est délestée de SP2 et CA de SP1, permettant la genèse de la capsid virale de forme conique (59) tout autour du génome viral protégé par NC (Fig. 1.30, Etape e).

L'étape de la maturation faisant le lien entre des particules virales immatures non-infectieuses et des virus matures infectieux, constitue une cible évidente pour le développement d'antiviraux. Neuf inhibiteurs de la protéase ont déjà été développés et approuvés (le saquinavir, le ritonavir, l'indinavir...). Ce sont majoritairement des inhibiteurs compétitifs qui imitent le substrat naturel de la protéase virale et se lient avec une grande affinité à son site actif. Malheureusement, ces molécules entraînent trop souvent des résistances dues aux multiples mutations de la protéase. Toutefois l'infectivité du virus peut tout de même être réduite suite à des mutations qui affecteraient le site de liaison de la protéase et qui, par conséquent, réduirait l'affinité de l'enzyme virale pour les sites de clivage (384).

Des inhibiteurs de la maturation sont également en cours d'essais cliniques. Contrairement aux inhibiteurs de la protéase, ils se lient aux précurseurs protéiques Gag et GagPol. Les molécules les plus prometteuses de cette nouvelle classe d'inhibiteurs empêchent la maturation de la capsid virale, soit en se liant directement au domaine CA de Gag, soit en inhibant le clivage CA/SP1 (384).

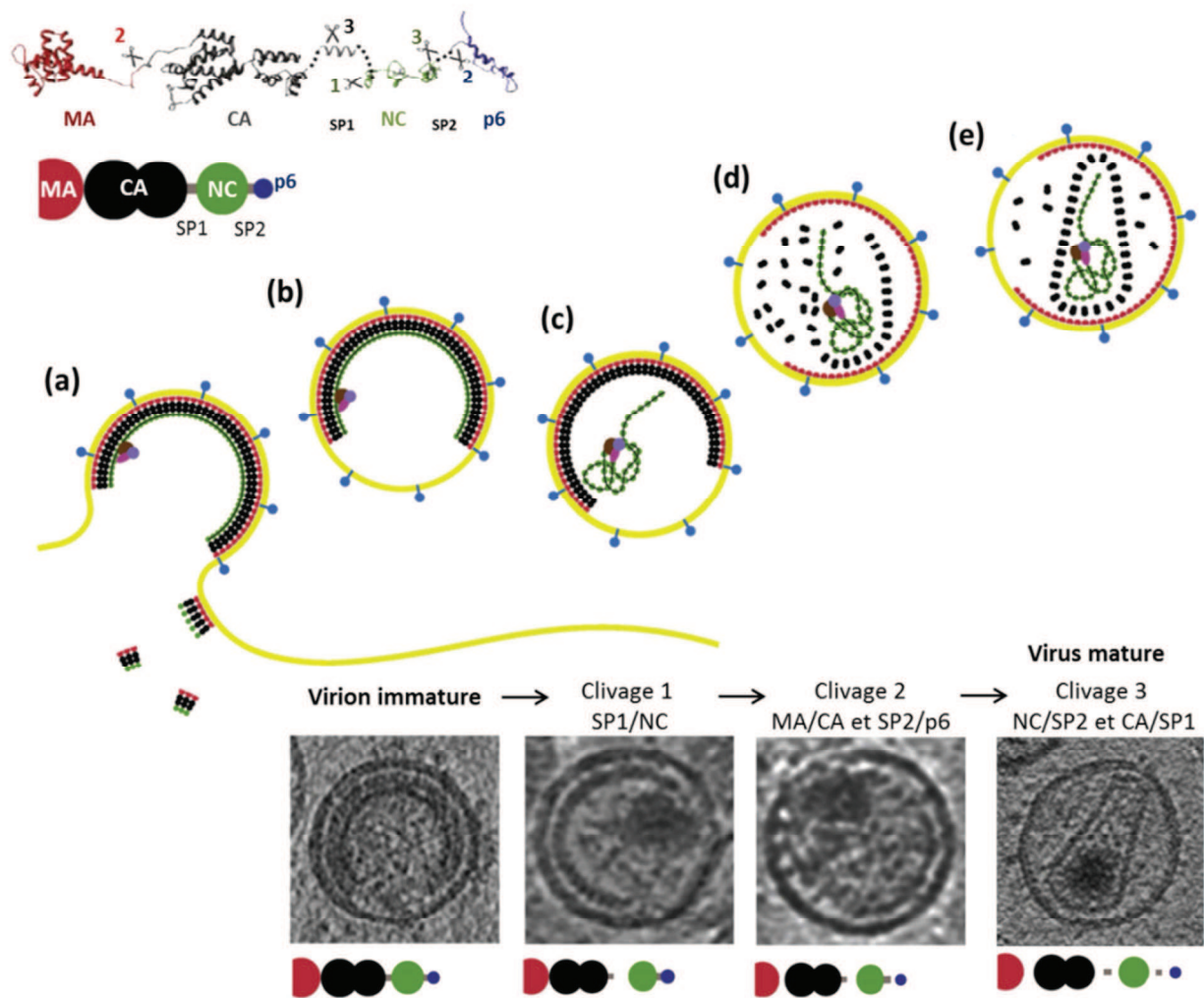


Figure 1.32 : Maturation du précurseur Gag de VIH-1 (adapté de(13)). Illustration des différentes étapes de la maturation du VIH-1. **(a)** bourgeonnement du virion, **(b)** virion immature, **(c)** 1^{er} site de clivage : libération de NCp15 et de l'ARNg, **(d)** 2^{èmes} sites de clivage : libération de p6 et séparation de CA-SP2 de MA qui reste ancrée dans l'enveloppe lipidique, **(e)** 3^{ème} sites de clivage : libération de toutes les protéines de Gag et obtention de virus matures. Les différents sites de clivage sont représentés sur la structure en ruban de Gag

Chapitre 2 : L'assemblage des particules virales, une chorégraphie dirigée par la protéine Gag

La formation des virions est essentiellement dirigée par la polyprotéine Gag. Ses différents domaines collaborent pour donner naissance à des virions infectieux en permettant à la fois la sélection de l'ARN génomique (ARNg), l'oligomérisation de Gag et sa liaison à la membrane plasmique (MP). La coordination spatiotemporelle de ces événements est encore mal connue. L'étude chronologique de l'assemblage est d'autant plus compliquée qu'il a récemment été montré que la suppression de l'un des trois domaines essentiels de Gag (NC pour la liaison Gag/ARN, CA pour la liaison Gag/Gag et MA pour la liaison Gag/MP) ne suffit pas à inhiber totalement l'assemblage (385), indiquant une redondance de chaque fonction et l'existence de mécanismes alternatifs permettant de préserver la formation de virions. La durée de l'assemblage a toutefois pu être estimée : elle serait de l'ordre de 5 à 10 minutes (386, 387).

I. L'assemblage des particules virales

L'assemblage de la particule virale nécessite l'oligomérisation de la protéine Gag. Cette oligomérisation dépend des différents domaines de Gag et s'organise autour de deux plateformes appelées « plateformes d'assemblages ». Il s'agit d'une part des acides nucléiques (ARNg ou ARN cellulaires) et d'autre part de membranes lipidiques (membrane plasmique ou membranes internes).

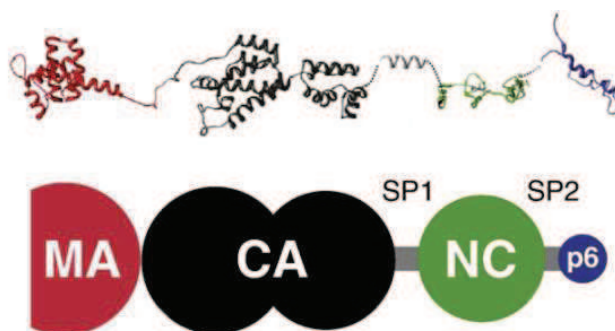


Figure 2.1 : Structure et représentation schématique de la polyprotéine Gag (13). Gag est composée des protéines de structure : la matrice (MA en rouge), la capside (CA en noir), la nucléocapside (NC en vert) et p6 (en bleu) ainsi que des deux spacers SP1 et SP2 (en gris).

De récents travaux ont montré que l'assemblage serait initié par le recrutement de l'ARNg dans le cytoplasme. Alors que ce complexe nucléoprotéique se dirige vers la membrane plasmique, l'oligomérisation de Gag commence sur l'ARNg dans le cytoplasme, et s'achève après stabilisation du complexe par la liaison de Gag au niveau du feuillet interne de la MP (388–390).

La description de l'assemblage sera effectuée en trois parties qui évoqueront indépendamment les interactions de Gag avec ses partenaires : (i) l'interaction entre le domaine NC de Gag et l'ARNg, (ii) l'oligomérisation de Gag via le domaine CA et (iii) l'interaction du domaine MA de Gag avec la MP.

1. Le domaine NC de Gag : interactions Gag/ARNg

Pour pouvoir se reproduire, chaque virion doit posséder deux copies du génome viral. Le VIH-1 a donc mis au point une stratégie lui permettant de sélectionner spécifiquement son ARNg parmi les nombreux ARN cellulaires présents dans le cytoplasme.

Le domaine NC de Gag (NC^{Gag}) joue un rôle essentiel dans le recrutement de l'ARNg en reconnaissant la région leader située sur la région 5' non-codante du génome viral et notamment la séquence Ψ , située sur SL3 (317, 391). La séquence Ψ est la plus conservée de la région leader et comporte une boucle GGAG spécifiquement reconnue par NC^{Gag} (185, 392) (Fig 2.2). A noter que NC^{Gag} se lie à SL3 avec une meilleure affinité que NCp7 (393,

394). Les doigts de zinc (notés ZF1 et ZF2, respectivement situés en N- et C-terminal) ainsi que les acides aminés basiques sont largement impliqués dans la sélection de l'ARNg, puisque des mutations à ces niveaux (sur des protéines Gag ne possédant pas de domaine p6) conduisent à des réductions importantes de l'efficacité de l'encapsidation (395, 396).

La partie spécifique de l'interaction entre NC^{Gag} et SL3 est dirigée par les doigts de zinc qui reconnaissent deux guanines initialement exposées, présentant des conditions de mobilité et d'accessibilité idéales pour une liaison avec NC^{Gag} (Fig. 2.2 A) (188). En effet, les bases G9 et G7 interagissent spécifiquement avec ZF1 et ZF2 respectivement, en s'insérant dans les zones hydrophobes formées par les résidus Val13, Phe16, Ile24 et Ala25 pour G9 et Trp37, Gln45 et Met46 pour G7. La base A8 interagit également avec les résidus Ala25, Phe16 et Asn17 du ZF1, et avec le résidu Arg32 très conservé (Fig. 2.2 B). Cette dernière liaison semble importante pour l'encapsidation, car la substitution de cette arginine par une glycine conduit à la formation de virus non-infectieux (397). Les acides aminés basiques, quant à eux, stabilisent la conformation des doigts de zinc sur SL3, par le biais d'interactions de type pont salin intra- ou intermoléculaires, ou électrostatiques avec les groupements phosphodiester de SL3.

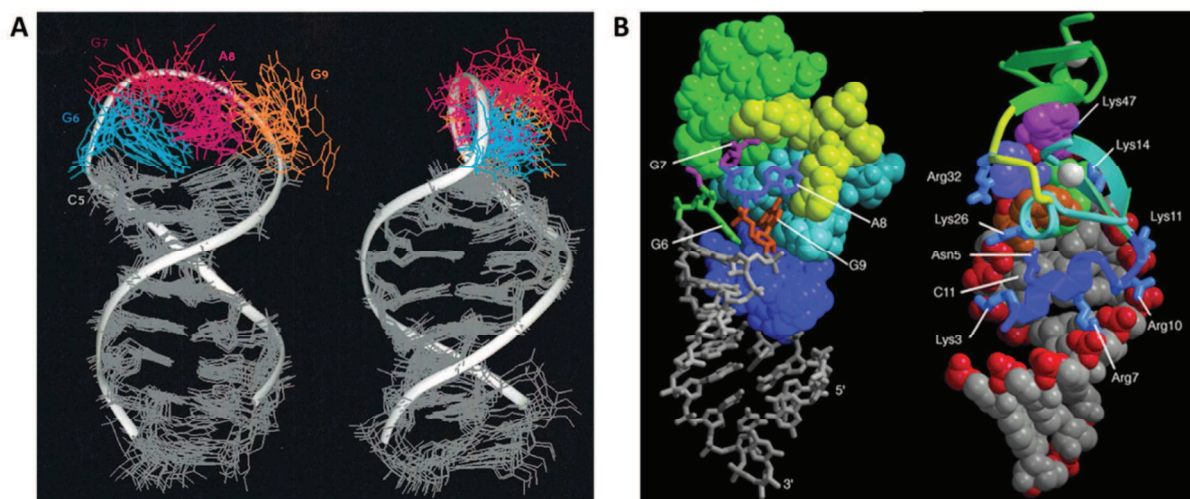


Figure 2.2 : Structure tridimensionnelle de SL3 en absence et en présence de NC (adapté de (185, 398)). **(A)** Structure de SL3 obtenue en RMN. Les quatre bases conservées GGAG de la séquence Ψ sont représentées en bleu, rouge, magenta et orange. **(B)** Structure du complexe NC/SL3 obtenue en RMN. La représentation de NC en mode « space-filling » permet de mettre en évidence l'interaction du ZF1 (cyan) avec les bases G9 (orange) et A8 (violet) et du ZF2 (vert) avec la base G7. La représentation de NC en ruban met en évidence la proximité entre ses résidus basiques (bleu) et les groupements phosphodiester de l'ARN (rouge).

Cependant, la délétion de NC^{Gag}, ou celle de la séquence Ψ n'aboutissent pas à l'inhibition de l'encapsidation. En effet, le domaine MA de Gag (MA^{Gag}) pourrait également recruter de manière non-spécifique un ARNm cellulaire ou viral, suffisant pour l'assemblage et la genèse de virions (52, 53).

Le recrutement de l'ARNg est essentiel à l'assemblage des virions : il sert de plateforme qui permet l'initiation et la promotion de l'oligomérisation de Gag (399).

2. Le domaine CA de Gag : interactions Gag/Gag

La multimérisation de Gag dépend essentiellement du domaine CA de Gag (CA^{Gag}) (400) La structure de CA, déterminée par cristallographie, et composée de deux domaines, CA_{NTD} et CA_{CTD} qui sont reliés par un linker flexible (Fig. 2.3A) (401, 402).

CA_{CTD} est composé d'une hélice 3₁₀ courte, suivie de quatre hélices α (Fig. 2.3, H8 à H11) qui adoptent une conformation globulaire. H8 constitue une région de 20 acides aminés très conservés, également appelé MHR (Major Homology Region) car elle est retrouvée dans la plupart des rétrovirus (403). Ce domaine est essentiel à la multimérisation de Gag, puisque des mutations de cette région inhibent totalement l'assemblage des particules virales (404, 405).

La multimérisation de Gag commence donc avec sa dimérisation par le biais d'une interaction entre les hélices α H9 des deux monomères ou à une interaction via le MHR (59). En solution, CA_{CTD} forme deux sortes de dimères (406) : le premier dimère est formé par une interaction symétrique de type hydrophobe entre les deux hélices α H9 qui se placent en parallèle l'une de l'autre (Fig. 2.3B, en haut)(407), le second dimère est plus complexe car il s'étend sur plusieurs hélices dont le MHR (H8) et interagit de manière non symétrique avec les hélices 10 et 11 d'un autre monomère (Fig. 2.3B, en bas) (408). Le premier dimère dirigerait des interactions « inter-hexamères » et le second dimère dirigerait des interactions « intra-hexamères » (390, 406).

La jonction CA_{CTD}-SP1, est également indispensable à la formation des particules virales. Cette jonction est structurée en hélice α (71), et permet de stabiliser la liaison Gag/Gag conduisant à la formation de multimères ordonnés.

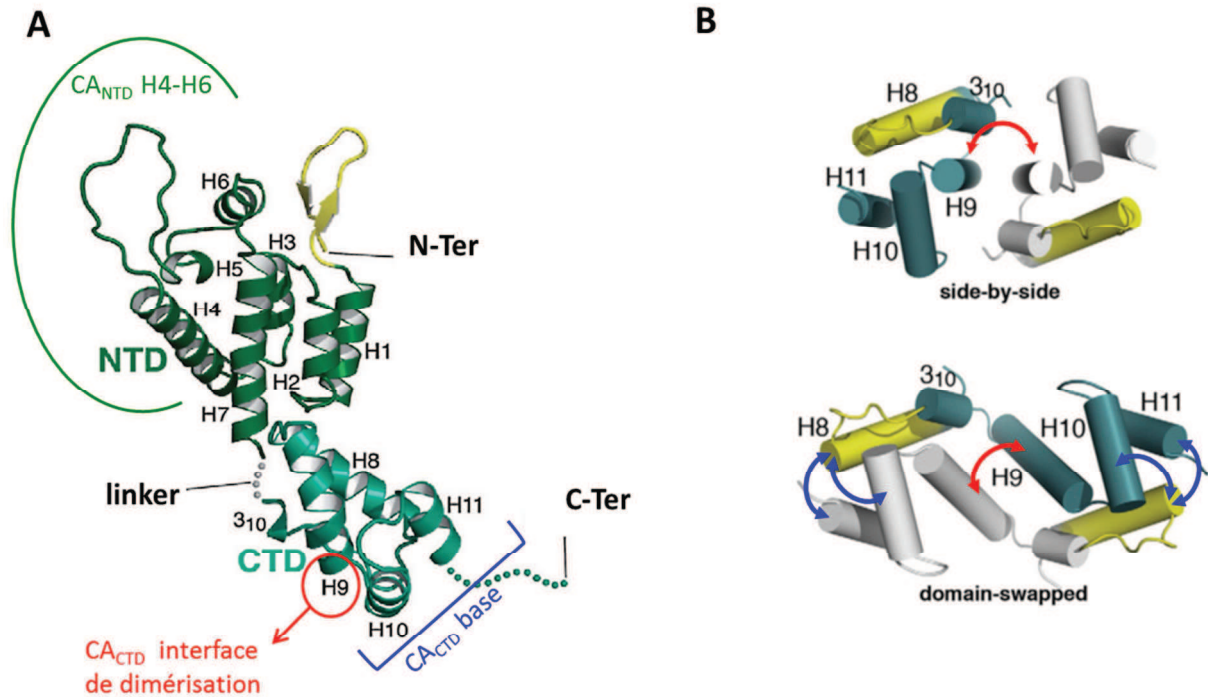


Figure 2.3 : Structure et interaction de la protéine de la capside (Adapté de (59, 390)). **(A)** Les hélices α sont numérotées de H1 à H7 pour le domaine N-terminal et de H8 à H11 pour le domaine C-terminal. H4 et H5 sont séparées par un domaine flexible avec lequel interagit la cyclophiline A. Le domaine structuré en « β -hairpin » est représenté en jaune, le linker flexible est en pointillés gris. Les domaines nécessaires à l'oligomérisation sont indiqués : le domaine CA_{NTD} incluant les hélices H4 à H6 (en vert), l'interface de dimérisation H9 (en rouge), et l'interface de dimérisation située à la base de CA_{CTD} qui inclut des résidus de H8 (MHR) ainsi que des résidus des hélices H10 et H11 (en bleu) **(B)** Structure des deux types d'interactions CA_{CTD} - CA_{CTD} . Le MHR de chaque monomère est représenté en jaune. Les autres hélices α sont représentées en bleu pour le premier monomère et en gris pour le second monomère. L'interaction entre les hélices α H9 sont mises en évidence par les flèches rouges, l'interaction entre le MHR et les hélices H10 et H11 sont représentées par les flèches bleues.

Le domaine CA_{NTD} est composé de 7 hélices α , de deux feuillets β et d'une boucle non structurée reliant les hélices H4 et H5 (Fig. 2.3A). C, cette boucle est impliquée dans la reconnaissance de la Cyclophiline A (Cyp-A) dont le rôle lors de la réplication virale reste peu connu (63, 64). CA_{NTD} ne jouerait pas de rôle majeur dans le processus de multimérisation. Cependant les hélices α H4 à H6 permettraient de stabiliser CA^{Gag} avant le bourgeonnement (59, 60, 390).

3. Le domaine MA de Gag : interactions Gag/Membrane

Le domaine MA de Gag (MA^{Gag}) forme une structure compacte. Il est composé de cinq hélices α , d'une hélice courte 3_{10} et de trois feuillets β (Fig. 2.4A) (42, 49). Schématiquement, MA est divisée en un domaine C-terminal globulaire connecté au domaine de la capside (CA) et en un domaine N-terminal étendu et exposé, qui interagit avec les membranes lipidiques (Fig. 2.4B à D). Elle existe sous forme monomérique en solution, et cristallise sous forme de trimère (409). MA^{Gag} n'est pas directement impliquée dans l'interaction Gag/Gag mais est indispensable à l'interaction de Gag à la membrane plasmique (MP).

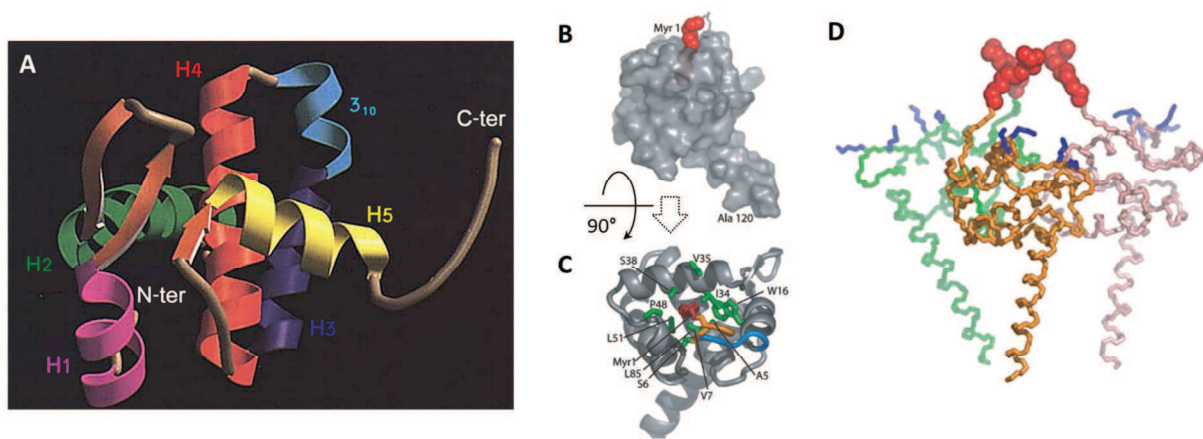


Figure 2.4 : Structures tridimensionnelles du domaine MA de Gag non-myristylé et myristylé (adapté de 42, 410) **(A)** Structure de la matrice non-myristylée. Les cinq hélices α (H1 à H5) et l'hélice 3_{10} sont représentées en couleurs différentes, les trois feuillets β sont représentés en orange. **(B-C)** Structure de la matrice myristylée (myristate en rouge). La structure globulaire de la matrice est mise en évidence. De plus le myristate (en rouge), est séquestré dans la poche hydrophobe formée par les hélices α H1 à H4 (B). Visualisation du HBR (C). Le myristate (rouge) est exposé lorsque la matrice est sous forme de trimère (chacun des monomères est représenté dans une couleur différente) (D).

Cette interaction Gag/MP nécessite le concours d'un acide myristique (une chaîne saturée de 14 carbones) qui est attaché par liaison covalente au résidu Gly2 en fin de traduction. Cette réaction est catalysée par la N-myristyltransférase (411). Cet acide myristique (Fig. 2.4B à D, représenté en rouge) permet l'interaction spécifique de MA avec la MP en reconnaissant un lipide particulier : le phosphatidyl inositol(4,5)biphosphate (PI(4,5)P₂).

Le groupement myristate est initialement séquestré dans la poche hydrophobe formée par les quatre premières hélices α (Fig. 2.4B et C) (410). La modification conformationnelle conduisant à l'exposition du myristate a lieu lorsque MA se trouve sous forme de trimère, ou en cas d'acidification du milieu, ou encore lors de l'interaction de MA avec le PI(4,5)P₂ (Fig. 2.4D) (44, 410, 412)). Une substitution de la Gly2, ou des mutations inhibant l'exposition du myristate conduisent au blocage du bourgeonnement, indiquant que la myristilation de MA^{Gag} d'une part, et le switch du myristate d'autre part, sont indispensables à l'ancrage de Gag dans la MP (413–416).

De plus, la liaison de Gag à la MP nécessite l'interaction spécifique de MA^{Gag} avec le PI(4,5)P₂. Le motif ³⁰KLKH³⁴ reconnaît spécifiquement la chaîne 2' insaturée du PI(4,5)P₂ (Fig. 2.5A) et l'entraîne dans la poche hydrophobe, d'où le myristate initialement séquestré, est expulsé. Celui-ci s'insère alors dans la MP (Fig. 2.5B) (44). Cette interaction MA^{Gag}/PI(4,5)P₂ est bidirectionnelle et contribue largement à l'ancrage de Gag dans le feuillet cytoplasmique de la MP. Mais cette interaction n'est pas suffisante pour une liaison Gag/MP stable (417).

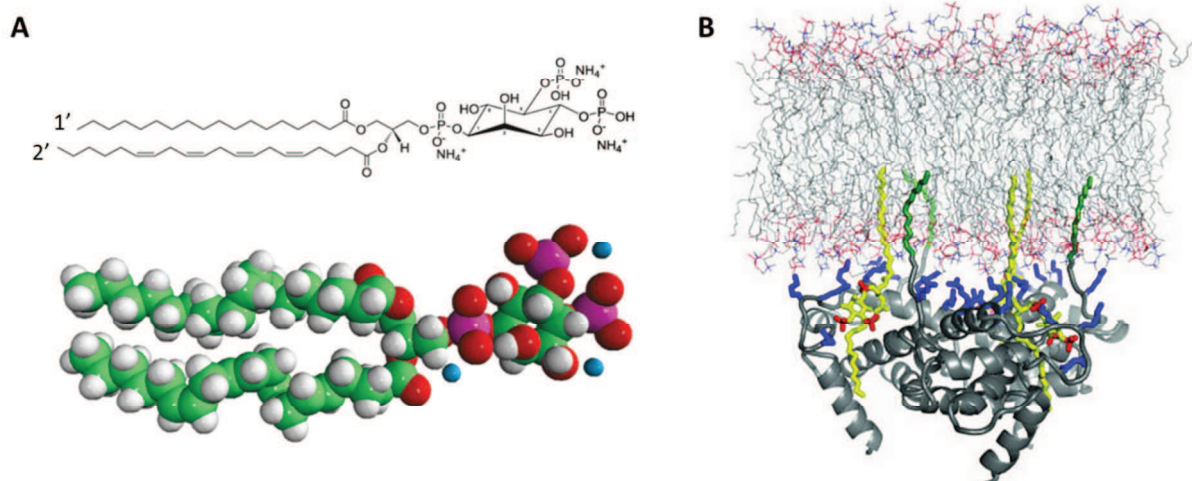


Figure 2.5 : Interaction spécifique entre la matrice et le PI(4,5)P₂ (A) Structure du PI(4,5)P₂ : il possède une tête inositol polaire phosphorylée en positions D4 et D5 ainsi que deux chaînes acyl 1' et 2' respectivement saturée et insaturée. (B) Illustration de l'interaction MA-PI(4,5)P₂-membrane. La chaîne 2' du PI(4,5)P₂ (jaune) se trouve dans la poche hydrophobe de MA et le groupement myristate (vert) est ancré dans la membrane plasmique. L'interaction MA-MP est stabilisée par les résidus Arg et Lys du HBR (en bleu) (44).

Le HBR (Highly Basic Region) est le second élément important de la liaison Gag/MP. C'est un motif, situé à proximité du myristate, qui est riche en résidus lysine et arginine (¹⁵KWEKIRLRPGGKKQYKLK³², Fig. 2.5B représentés en bleu), et qui forme une plateforme basique capable de se lier à la MP par le biais d'interactions électrostatiques avec les lipides acides qui se trouvent en abondance dans le feuillet cytoplasmique de la MP (418, 419). La liaison Gag/MP implique donc une interaction hydrophobe entre le myristate de MA^{Gag} et le PI(4,5)P₂ de la MP, et une interaction électrostatique entre le HBR et les lipides acides de la MP. Ces interactions permettent alors à MA de s'organiser en hexamères ordonnés et stables sur les membranes contenant du PI(4,5)P₂ (observé *in vitro*) (47, 420). Ces membranes lipidiques constituent ainsi la deuxième « plateforme d'assemblage » nécessaire à l'oligomérisation de Gag.

4. [Aspect dynamique et temporel de l'assemblage](#)

De récentes études biochimiques ou de microscopie de fluorescence ont permis d'établir un modèle chronologique de l'assemblage du VIH-1. La Figure 2.6 illustre la chronologie des interactions de Gag avec ses partenaires au cours de l'assemblage des virions. L'assemblage commencerait dans le cytoplasme où Gag se trouve sous forme d'oligomères de faible masse moléculaire (389, 421) qui s'accumuleraient progressivement à la membrane plasmique ou au niveau de membranes internes. Cette polymérisation est facilitée par le recrutement de l'ARNg comme le montre les colocalisations Gag/ARNg, soit dans des vésicules intracytoplasmiques (32, 422) soit au niveau de la MP (386, 387). De plus cette oligomérisation provoquerait une modification conformationnelle importante de Gag en exposant à sa surface le myristate et permettant son interaction avec les membranes lipidiques. A ce niveau les contacts Gag/Gag s'effectuent par le biais de l'interface de dimérisation située sur l'hélice CA_{CTD} (Fig. 2.3 et 2.6, en rouge). Après la liaison à la MP, les contacts intra-hexamères, portés par la base de CA_{CTD} (en bleu), permettent la multimérisation de Gag, et finalement, le contact inter-hexamère entre les domaines CA_{NTD} H4-H6 (en vert), concluent la formation de la capside immature (390).

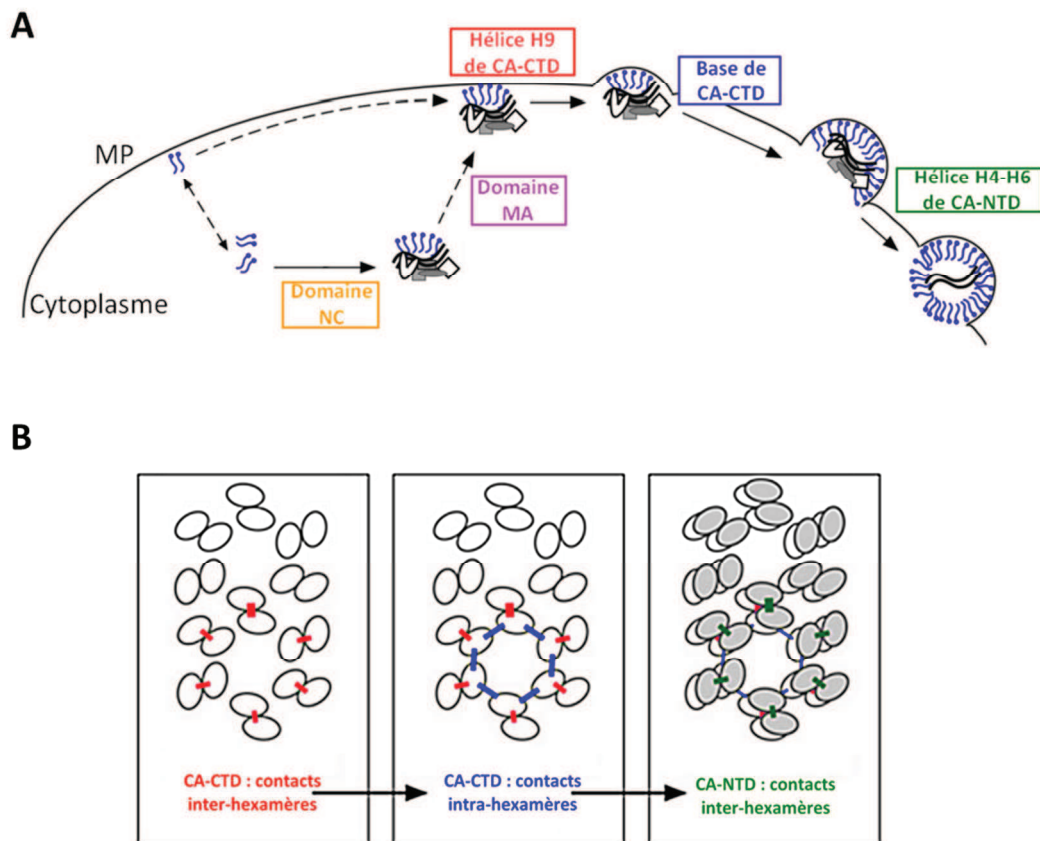


Figure 2.6 : Chronologie de l'assemblage du VIH-1 (390). (A) Carte spatiotemporelle de l'assemblage du VIH-1 indiquant où les différents domaines de Gag interviennent lors de la progression de l'assemblage (B) Schématisation des différentes interactions Gag/Gag. Les ovals blancs représentent le CA_{CTD} et les ovals gris représentent le CA_{NTD}. Les différentes interfaces formées par les interactions Gag/Gag sont représentées par des traits de couleur différente (les couleurs correspondent aux interfaces mis en évidence dans la Figure 2.3A.)

II. Régulation de la liaison de Gag à la membrane plasmique

Dans la famille des PIs (phosphatidyl inositol) trouvés dans les membranes cellulaires, le PI(4,5)P₂ est le plus abondant, et présente la particularité d'être localisé uniquement dans le feuillet interne de la MP (412). Il a récemment été montré que l'interaction Gag/MP est PI(4,5)P₂-dépendante. Ce mécanisme de liaison spécifique implique les résidus basiques du HBR. Le rôle de chacun de ces résidus fut étudié en solution ainsi qu'en milieu cellulaire (423). Les travaux de Chukkappalli et al. (2010) ont permis de pointer à la fois le rôle

important des résidus Lys17, Lys29 et Lys31 qui promeuvent la liaison MA^{Gag}/MP, et celui des résidus Lys25 et Lys26 qui la bloquent, principalement en empêchant le basculement du myristate.

Ces travaux ont également révélé le rôle important des ANs dans la liaison Gag/MP. En effet, contrairement aux complexes Gag/ARN qui se lient sélectivement aux membranes contenant du PI(4,5)P₂, en absence d'ARN, Gag n'est plus capable de sélectionner les membranes contenant du PI(4,5)P₂, et par conséquent se lie avec tout type de membranes lipidiques, qu'elle soit composée de phospholipides négatifs et/ou neutres. Ces données permettent d'impliquer l'ARN comme facteur de régulation de la liaison Gag/MP (423).

Ainsi la liaison MA^{Gag}/ARNg pourrait masquer les résidus de Gag qui interviennent dans la liaison avec les lipides négatifs (52, 424, 425), et bloquer le basculement du myristate. Comme le seul lipide capable d'entrer en compétition avec l'ARNg pour interagir avec MA^{Gag} est le PI(4,5)P₂, Gag ne peut alors interagir qu'avec la MP où ce lipide est présent (426, 427).

Par ailleurs, des études structurales (à noter qu'elles ont été effectuées sur des Gag non-fonctionnels) ont montré que Gag adopterait une conformation compacte lorsqu'elle est en solution, où ses deux extrémités, MA^{Gag} et NC^{Gag} sont très proches l'une de l'autre (428). Cette conformation en [U] (notée Gag_[U]) fut observée en absence et en présence d'ARN (Fig. 2.7 (a) et (c) respectivement). De plus, il a également été montré *in vitro* qu'en absence d'ARN, les deux domaines NC^{Gag} et MA^{Gag} peuvent se lier aux membranes lipidiques chargées négativement, en conservant la conformation Gag_[U] (Fig. 2.7 (b)).

In vitro comme *in vivo*, les complexes Gag_[U]/ARN ou Gag_[U]/lipides forment des particules de taille incompatible (~ 25-30 nm de diamètre) avec celle des virus matures infectieux (~ 120 nm de diamètre) (429–431). Ces différences de taille n'apparaissent plus *in vitro* lorsque les trois partenaires sont présents (Gag, lipides et ANs). En effet, Gag retrouve sa conformation droite (notée Gag_[I]) (430, 432), lorsque les complexes Gag_[U]/ARN sont en présence d'IP6 (inositol pentakisphosphate), un lipide dont la tête phosphorylée ressemble à celle des phospholipides trouvés dans la MP (Fig. 2.7 (d)). Par conséquent, ces travaux mettent en évidence des changements conformationnels de Gag au cours de l'assemblage qui dépendent de la nature de ses ligands (Fig 2.10) (433). Ces travaux sont donc en accord avec le modèle de régulation de la liaison Gag/MP décrit ci-dessus.

Cependant, il faut prendre en compte que ces études, effectuées par Datta et al. (2007), utilisent un Gag Δ p6 ainsi qu'un Gag Δ G2, ce dernier pour inhiber la myristilation de Gag. De même Munro et al. (2014) a mis un polyHis (très basique) en N-terminal du Gag étudié qui ne possède pas non plus de domaine p6, suggérant que d'autres modèles notamment en milieu cellulaires puissent être proposés.

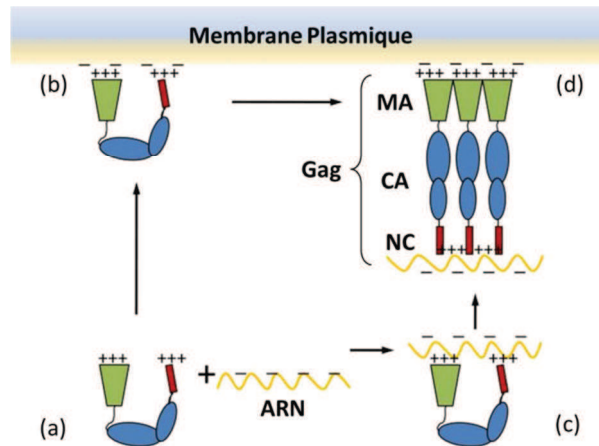


Figure 2.7 : Changements conformationnels supposés de Gag lors de l'assemblage (433) (a) Les deux extrémités NTD et CTD de Gag sont proches l'une de l'autre *in vitro*, conduisant à une conformation compacte de Gag en [U] (Gag_[U]). Les deux domaines basiques interagissent avec les acides nucléiques et les lipides acides. MA^{Gag} interagit avec les lipides avec une meilleure affinité que pour les acides nucléiques et inversement pour NC. (b) La conformation compacte de Gag est maintenue en présence d'une membrane lipidique chargée négativement (c) et en présence d'ARN. (d) Lorsque les deux ligands de Gag sont là, Gag adopte une conformation droite en [I] (Gag_[I]). (A noter que ces travaux furent effectués avec Gag Δ p6, un Gag privé de son domaine p6)

Ces récentes avancées ont toutefois permis d'établir un modèle de liaison de Gag_[U] à la MP des cellules infectées, décrit dans la Figure 2.8. Le complexe Gag_[U] se lierait à l'ARNg via son domaine NC et par le HBR du domaine MA, alors que le myristate est séquestré à l'intérieur de MA^{Gag} (a). Lorsque le complexe Gag_[U]/ARNg se lie à une membrane qui contient du PI(4,5)P₂, celui-ci remplace l'ARNg (b), ce qui induit le basculement et l'insertion du myristate dans la MP. Comme l'ARNg se sépare de MA^{Gag} (c), Gag se redresse et adopte sa conformation droite. Dans la conformation Gag_[I], les liaisons NC^{Gag}/ARNg et MA^{Gag}/MP forment des complexes stables qui favorisent la multimérisation conduisant finalement au bourgeonnement des virions (52, 434).

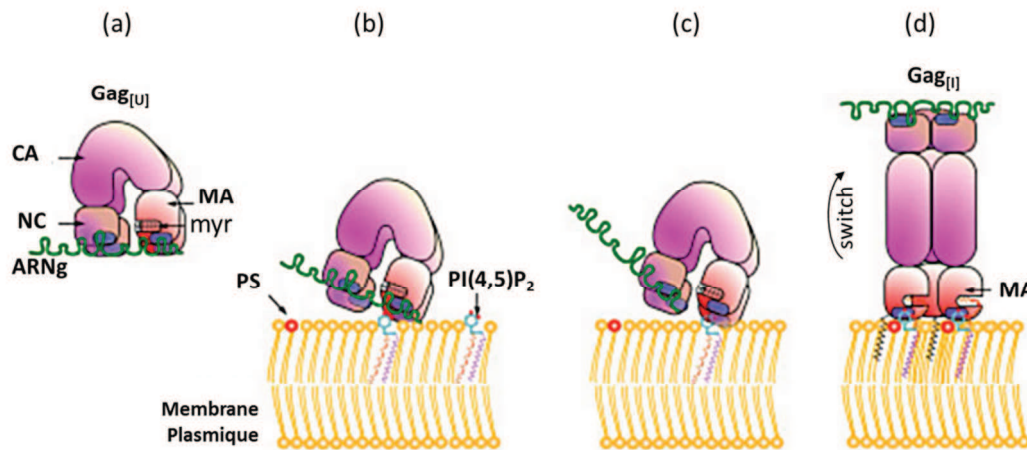


Figure 2.8 : Modèle de la liaison de Gag à la membrane plasmique lors de l'assemblage (50) (a) Gag se lie à l'ARN par le biais de ses deux extrémités (b) Le complexe Gag/ARN s'ancre à la membrane plasmique par le biais de l'interaction entre MA^{Gag} et le PI(4,5)P₂ (c) MA^{Gag} ayant une meilleure affinité pour les lipides, se détache de l'ARNg (d) et induit le redressement de Gag dans sa conformation droite [I] (Gag_[I]).

Par ailleurs, la conformation Gag_[U] nécessite le concours de domaines flexibles tels que le linker qui sépare CA_{NTD} et CA_{CTD} (Fig. 2.5) ou encore le domaine SP1. Ce dernier est flexible en solution à de faibles concentrations de Gag, et peut se structurer en hélice α lorsque la concentration de Gag augmente ou lorsque le milieu devient apolaire (435). Ainsi les changements environnementaux dus à l'arrivée des complexes Gag_[U]/ARNg au niveau de la MP induiraient des modifications de la structure de SP1 qui pourraient participer au redressement de Gag.

III. L'assemblage du VIH-1 vu de la membrane plasmique

1. Organisation de la membrane plasmique cellulaire

La membrane plasmique est un film hydrophobe qui protège les différents organites cellulaires (le noyau, le reticulum endoplasmique, les mitochondries...) de l'environnement extracellulaire. Elle a de nombreux rôles au cours de la vie d'une cellule notamment celui de gérer le trafic de différents matériels entre le milieu cellulaire et le milieu extracellulaire.

a. Composition

La membrane plasmique est organisée en bicouche lipidique (436). Elle est composée de lipides, de protéines et de glucides (Fig. 2.9). Les lipides, de par leur propriété amphiphile, s'auto-assemblent de manière non-covalente en milieu aqueux avec les protéines membranaires, alors que les glucides sont liés par l'extérieur de la membrane par des liaisons covalentes avec les protéines membranaires ou les lipides. La MP est composée de nombreux lipides différant par la longueur de leurs chaînes carbonées qui peuvent être saturées ou insaturées, ainsi que par leur tête polaire (437).

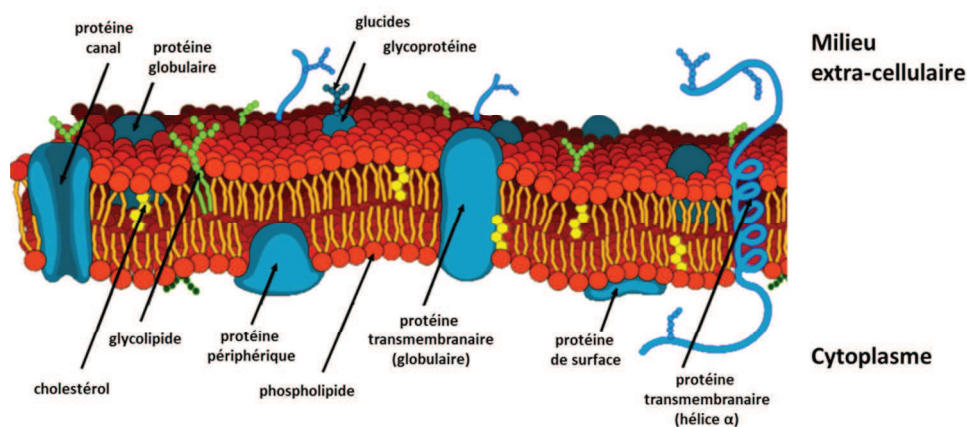


Figure 2.9 : Schéma de la membrane plasmique. La membrane plasmique est une bicouche lipidique asymétrique, essentiellement composée de phospholipides, dans laquelle sont insérées de nombreuses protéines.

On recense trois types principaux de lipides (426). (i) Les glycérophospholipides sont les lipides les plus présents dans la MP. Ils sont composés d'un résidu diacylglycérol (un glycérol relié à deux acides gras) qui porte un résidu phosphate estérifié à une molécule polaire telle que la choline, la sérine, l'éthanolamine ou l'inositol, donnant respectivement le PC (phosphatidyl choline), le PS (phosphatidyl sérine), le PE (phosphatidyl éthanolamine) et le PI (phosphatidyl inositol). (ii) Les sphingolipides, polaires, sont dérivés de la sphingosine avec une chaîne d'acides gras liée par un phosphate telle que la sphingomyéline (SM). (iii) Le cholestérol, un lipide de la famille des stérols, est composé de quatre cycles carbonés et d'une tête polaire constituée d'une courte chaîne hydrocarbonnée et d'un groupement hydroxyl.

La distribution des phospholipides qui composent chacun des feuillets de la MP est asymétrique (Fig. 2.10A) : le feuillet externe est majoritairement composé de SM et de PC, alors que le feuillet cytoplasmique contient plus de PS et de PE (438, 439). Cette asymétrie doit être maintenue tout au long de la vie de la cellule. L'enzyme ATP-dépendante appelée flippase, permet le transport de lipides d'un feuillet à l'autre et contribue au maintien cette asymétrie (Fig. 2.10B) (440).

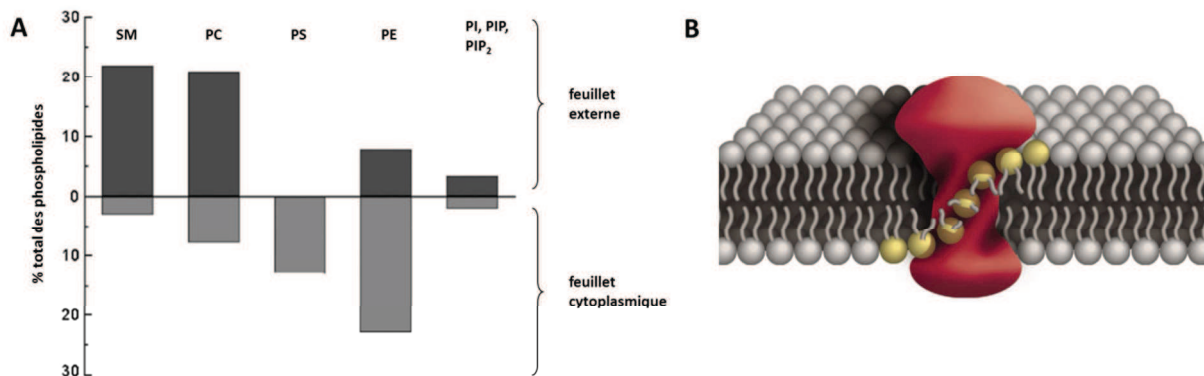


Figure 2.10 : Distribution asymétrique des phospholipides de la membrane plasmique. (A) Composition lipidique des feuillets externes et cytoplasmique de la membrane plasmique (441). **(B)** Schéma du mécanisme de la flippase (de A. Steinberg pour A. Menon).

b. [Les micro-domaines membranaires](#)

Les avancées des vingt dernières années en matière de biologie cellulaire ont révélé que la MP est hétérogène et composée de micro-domaines de différentes compositions protéo-lipidiques. Parmi ces micro-domaines se trouvent les radeaux lipidiques et les TEM (tetraspanin-enriched microdomains) qui ont été impliqués dans l'assemblage du VIH-1 (31, 423, 442).

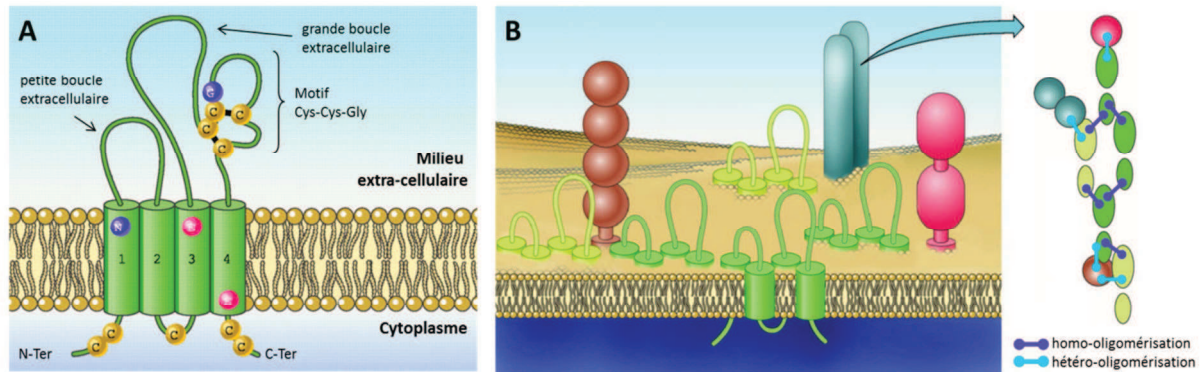
Le concept de **radeaux lipidiques** repose sur la capacité qu'auraient les lipides de la MP à former des micro-domaines en phase liquide ordonnée (L_o) qui 'flotteraient' dans une 'mer' de lipides en phase liquide désordonnée (L_d) (443). Ils peuvent être assimilés à des plateformes mobiles, situées au niveau du feuillet externe de la MP, composées de sphingolipides saturés maintenus entre eux par des molécules de cholestérol (444). Ces radeaux seraient capables de recruter certaines protéines, telles que les protéines présentant un

GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) ou les protéines doublement acétylées (445, 446). Les radeaux lipidiques sont suspectés de participer à de nombreuses fonctions dans les cellules, telles que la signalisation cellulaire, le trafic de protéines ou encore la polarité des cellules. Cependant, leur implication dans ces événements et même leur existence est encore débattue car en plus d'être de taille inférieure à la limite de la résolution (le diamètre des radeaux lipidiques est estimé inférieur à 50 nm) (447, 448), il semblerait que les radeaux lipidiques soient très dynamiques et donc capables de se remodeler rapidement (449), rendant leur observation et leur séparation très difficiles (450). Toutefois, la présence de micro-domaines composés de cholestérol semble être à présent acceptée (451) avec une définition établie lors du Symposium de Keystone en 2006 « *Lipid rafts are small, heterogeneous, highly dynamic sterol- and sphingo-lipids enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein and protein-lipid interactions* » (452).

Les **tétraspanines** sont des protéines membranaires de taille moyenne (environ 250 acides aminés) qui possèdent quatre domaines transmembranaires, deux domaines extracellulaires et des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques (Fig. 2.11A). Elles sont présentes en grande quantité dans les MP et forment par le biais d'interactions protéine/protéine des homo- ou hétéro-oligomères qui s'organisent en unités appelées TEMs. Ces micro-domaines enrichis en tétraspanines recrutent également un éventail de récepteurs, choisis en fonction de leurs activités biologiques (Fig. 2.11B) (453). Ces TEMs ont pu être observés en microscopie de fluorescence et en microscopie électronique : ce sont des clusters hautement dynamiques qui peuvent mesurer jusqu'à 400 nm² (34, 454). Les TEMs sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la signalisation intra- et inter-cellulaire, la fusion inter-cellulaire ou encore la migration cellulaire (455).

Ces micro-domaines membranaires seraient impliqués dans l'assemblage des virions, dans le recrutement du précurseur Env et dans des mécanismes d'autodéfense cellulaires qui inhiberaient les étapes finales du cycle. On trouve notamment la protéine associée aux radeaux lipidiques BST-2/Tetherin, qui retiendrait physiquement les virions en formant un lien entre la MP et les virions (121). Finalement ces micro-domaines membranaires pourraient également jouer un rôle dans la transmission des virus de cellule à cellule. En effet, des observations microscopiques ont mis en évidence la présence de zones de contact entre une

cellule infectée et une cellule saine appelées « synapse virologique » (SV), qui permettraient d'augmenter l'efficacité de la transmission des virus (456, 457).



2. Conséquences de l'assemblage du VIH-1 sur l'organisation de la membrane plasmique

Bien que le VIH-1 s'assemble au niveau de la MP, la composition lipidique de son enveloppe virale diffère significativement de celle de la MP (27–29), présentant une bicouche lipidique en phase ordonnée, probablement du fait d'une plus grande proportion de cholestérol présente dans l'enveloppe virale (2.5 fois plus).

De cette découverte est née l'hypothèse selon laquelle Gag s'assemblerait au niveau de radeaux lipidiques. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs observations. En microscopie de fluorescence, des colocalisations entre Gag et des marqueurs de radeaux lipidiques sont observées (459–461). Par ailleurs, les analyses de l'enveloppe virale confirment la présence de protéines associées aux radeaux lipidiques telles que les protéines ancrées dans la MP par un GPI, ou encore les protéines CD55, Thy-1 et CD59 (462) et en excluent d'autres, telle que CD45, qui n'est pas associée aux radeaux lipidiques (460). En outre, la déplétion en cholestérol de la MP qui réduit la présence de phases ordonnées dans la MP, et donc de

radeaux lipidiques, est suivie d'une réduction importante de l'infectivité (463–465), qui a été reliée à la perte de mobilité de Gag et/ou de liaison Gag/MP et/ou de liaison Gag/Gag (421, 466) montrant l'importance de domaines riches en lipides saturés lors de l'assemblage. Finalement, la substitution du myristate (qui est une chaîne carbonée saturée) par une chaîne insaturée, inhibe la liaison de Gag aux radeaux lipidiques et conduit à une baisse drastique de la production virale, indiquant que la chaîne saturée qu'est le myristate, joue un rôle clé dans la localisation de Gag sur ces microdomaines. En effet, la chaîne 2' insaturée du PI(4,5)P₂ s'insérerait dans la poche hydrophobe de MA^{Gag}, alors que la chaîne 1' et le myristate saturé seraient ancrés dans la MP (Fig. 2.12A) (44), menant au remplacement dans la MP d'une chaîne insaturée (1') par une chaîne saturée (myristate). Ainsi MA^{Gag} serait à l'interface entre Gag et les radeaux lipidiques (Fig. 2.12B).

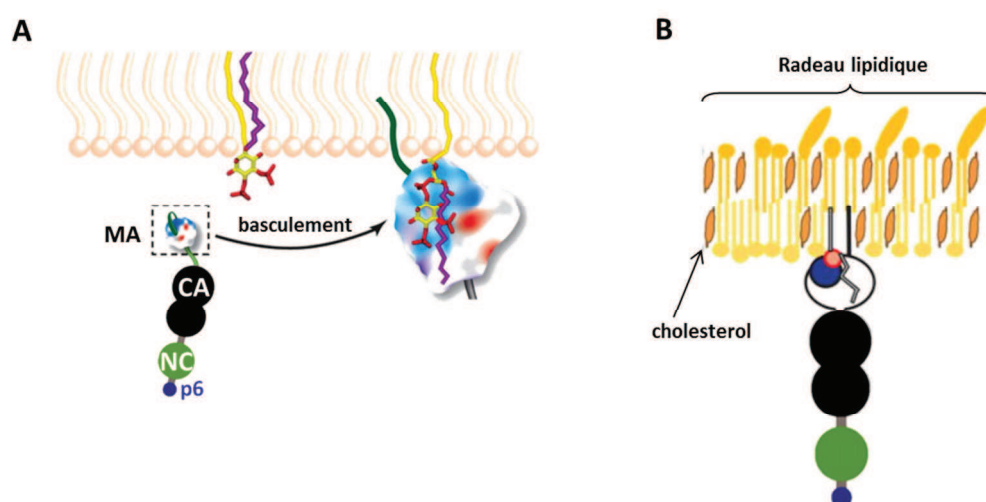


Figure 2.12 : Liaison de Gag au niveau de radeaux lipidiques. (A) Le basculement du myristate (en vert) conduit à la séquestration de la chaîne 2' insaturée (en violet) du PI(4,5)P₂ alors que la chaîne 1' du PI(4,5)P₂ (en jaune) reste bien insérée dans la MP (adapté de(467)). **(B)** Grâce aux deux chaînes saturées (chaîne 1' et myristate) qui lient Gag à la MP, Gag peut cibler les radeaux lipidiques (adapté de (468)). La tête polaire du PI(4,5)P₂ et le HBR sont respectivement représentés en rouge et bleu.

Cependant, en dépit de ces nombreuses évidences en faveur de ce modèle d'assemblage au niveau de radeaux lipidiques, deux contradictions demeurent : (i) la taille des radeaux (20-2000 nm² en surface) n'est pas en accord avec la taille de la surface des virions (~ 1 μm²)

(447) d'une part et (ii) les radeaux lipidiques sont principalement situés sur le feuillet externe de la MP et sont donc inaccessibles à Gag.

Par ailleurs, il a également été montré que Gag colocalise avec les TEMs comprenant CD9, CD63, CD81 et CD82 (469–471). Ces observations sont appuyées par la présence de tétraspanines dans l'enveloppe virale en plus grande proportion que dans la MP. En fait, Gag interagirait plus particulièrement avec CD9, puisqu'une étude récente a montré que la multimérisation de Gag au niveau de la MP conduit à la séquestration de CD9 au niveau du domaine de l'assemblage et non l'inverse, c'est-à-dire à la séquestration de Gag par des TEMs déjà existants (33). Ces données suggèrent que, contrairement à ce qui fut précédemment décrit, Gag pourrait s'assembler au niveau de la MP sans cibler de micro-domaines particuliers, et recruter les protéines membranaires nécessaires au bourgeonnement des virions (30). En étendant cette hypothèse aux lipides, on obtient le modèle d'assemblage décrit en Figure 2.13, où Gag réorganise les micro-domaines membranaires et recrute le DOPS et le PI(4,5)P₂ pour former un ALEM (acidic lipid enriched microdomains) et bourgeonner.

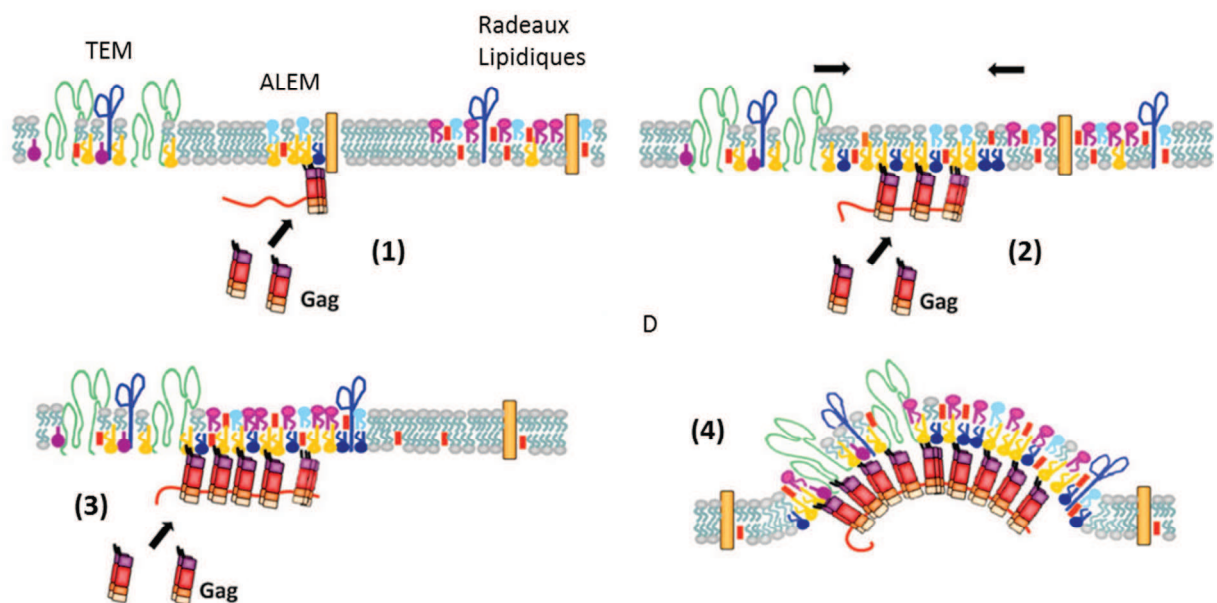


Figure 2.13 : Réorganisation de la MP par Gag (31). Gag cible la MP(1) et commence à s'assembler (2) ce qui conduit au recrutement des protéines appartenant aux TEMs et aux lipides nécessaires à son assemblage (à savoir le DOPS et le PI(4,5)P₂ pour former son propre micro-domaine appelé ALEM) (3) et finalement bourgeonner (4). Couleurs des lipides : DOPS en jaune, PI(4,5)P₂ en bleu, cholestérol en rouge, sphingomyéline en cyan, phospholipides composant les radeaux lipidiques en mauve.

Objectifs de la thèse

Le VIH-1 possède la capacité de développer des résistances aux différents antirétroviraux mis au point. La mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire pour la mise au point de nouveaux médicaments susceptibles de générer peu ou pas de résistances. La protéine de la nucléocapside NCp7, est une cible thérapeutique intéressante de par sa structure extrêmement conservée et son implication dans de nombreuses étapes clés du cycle rétroviral. De nombreux travaux dont ceux du laboratoire se sont intéressés aux interactions de NCp7 avec ses différents partenaires cellulaires, notamment en étudiant son activité chaperonne vis-à-vis des acides nucléiques. Plus récemment, les interactions avec un nombre croissant de protéines cellulaires ont également suscité un fort intérêt, permettant d'identifier de nouvelles fonctions de NCp7, au cours du cycle rétroviral. Par contre, très peu de données existent à l'heure actuelle sur une interaction potentielle de NCp7 avec les membranes lipidiques.

Le cycle rétroviral du VIH-1 sollicite les membranes lipidiques à plusieurs niveaux : lors de l'entrée du virus, lors de l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et finalement lors des étapes d'assemblage et bourgeonnement des virions. Alors que l'entrée du virus est dirigée par l'interaction entre les glycoprotéines de surface et transmembranaire et les récepteurs cellulaires, l'import nucléaire et l'assemblage nécessitent des mécanismes moléculaires, jusqu'alors moins bien définis, qui impliquent des protéines virales, des protéines hôtes et les membranes nucléaires ou plasmiques de l'hôte.

Lors de la formation des virions, la protéine Gag orchestre l'étape de l'assemblage. Son domaine NC recrute l'ARNg, son domaine CA promeut l'oligomérisation et son domaine MA s'ancore au feuillet interne de la membrane plasmique grâce à l'interaction spécifique entre un groupement myristate situé en position N-terminale et le PI(4,5)P₂ présent dans le feuillet interne de la MP. De manière intéressante, MA doit se trouver au sein du précurseur Gag pour interagir avec la membrane, car la MA sous sa forme mature n'est pas suffisante pour cibler la MP. Ceci suggère qu'un mécanisme complémentaire tel que l'oligomérisation de Gag ou le concours d'autres domaines de la polyprotéine puisse promouvoir cet ancrage. Un modèle d'assemblage récemment décrit suggère que le complexe Gag-ARNg puisse adopter une conformation repliée en U lors de l'assemblage. Cette conformation met le domaine NC en position favorable pour une liaison avec la MP.

L'objectif de cette thèse consiste tout d'abord à mettre en évidence la possibilité d'une interaction de NCp7 avec les membranes lipidiques, puis à caractériser cette dernière dans le

but de pouvoir compléter le mécanisme de liaison de Gag à la MP en y ajoutant le concours du domaine NC. Pour nous affranchir des effets indirects qui pourraient être induits par les autres domaines de Gag, notre étude *in vitro* porte uniquement sur la protéine NCp7 sous sa forme mature.

Ainsi nous nous sommes tout d'abord employés à caractériser l'interaction NCp7/membrane. Au moyen de la spectroscopie de fluorescence et d'une NCp7 marquée par une sonde fluorescente sensible à la polarité et à l'hydratation de son environnement, nous avons pu déterminer les paramètres de liaison de la NCp7 sur des membranes modèles. NCp7 étant une protéine majoritairement liée à des acides nucléiques au cours du cycle rétroviral, nous avons également étudié la liaison des complexes NCp7/ADN avec des membranes lipidiques modèles. La combinaison de ces travaux a mis en évidence la capacité de la protéine NCp7 libre ou complexée à une séquence ADN à se lier aux membranes lipidiques modèles chargées négativement par le biais d'interactions électrostatiques de forte affinité (de l'ordre du micromolaire). Cette étude nous a permis de compléter le modèle d'assemblage précédemment établi en suggérant un rôle possible du domaine NC dans ce mécanisme.

Dans une deuxième partie nous avons poursuivi la caractérisation de cette interaction en observant l'effet de NCp7 sur des GUVs en microscopie biphotonique et sur des bicouches lipidiques supportées en utilisant un microscope qui combine l'observation en fluorescence en mode TIRF et la microscopie à force atomique (AFM). Grâce à ces techniques d'imagerie nous avons pu confirmer la liaison de NCp7, libre ou complexée avec une séquence ADN, avec les membranes lipidiques chargées négativement et mettre en évidence la propriété déstabilisatrice de NCp7 vis-à-vis de ces membranes lipidiques d'autre part.

Finalement, la dernière partie de ces travaux a consisté à mettre au point les outils qui permettront par la suite d'étudier qualitativement et quantitativement le rôle du domaine NC de Gag dans l'assemblage, par le biais de la microscopie haute-résolution de type PALM ou STORM. Un des points clés de ces microscopies est de parvenir à maintenir des concentrations limitées de sondes fluorescentes activables, de sorte à exciter à chaque instant un nombre restreint de ces sondes et éviter ainsi tout recouvrement spatial des signaux de fluorescence émis par ces sondes. Ces conditions ne sont pas aisément réalisables avec les protéines Gag, dont la production dans la cellule, suite à une transfection est difficilement contrôlable. En outre, ces protéines s'accumulent en grandes quantités et de manière très

compacte au niveau des membranes plasmiques, pour former les nouvelles particules virales. De ce fait, pour mettre au point les conditions d'utilisation de la microscopie PALM/STORM récemment implantée au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser un système récepteur membranaire/ligand bien connu, pour lequel les sondes fluorescentes activables sont portées par le ligand extracellulaire, dont la concentration est aisément maîtrisable. Ces travaux préliminaires nous ont permis de suivre de manière quantitative l'internalisation par endocytose du récepteur Y_1 lié au neuropeptide Y et donc de vérifier la validité d'un modèle cinétique préalablement établi.

Matériels et Méthodes

I. Membranes lipidiques modèles

1. Lipides

Le dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), le dioleoylphosphatidylserine (DOPS), le dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) et le dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) proviennent de chez Sigma-Aldrich. La sphingomyeline (SM) et le phosphatidylinositol(4,5)biphosphate et le DOPE-Rhodamine proviennent de chez Avanti Polar Lipids. La concentration des solutions stocks de lipides dans du chloroforme est déterminée à partir de la masse des lipides à l'état sec. Les solutions stocks sont conservées à -20°C.

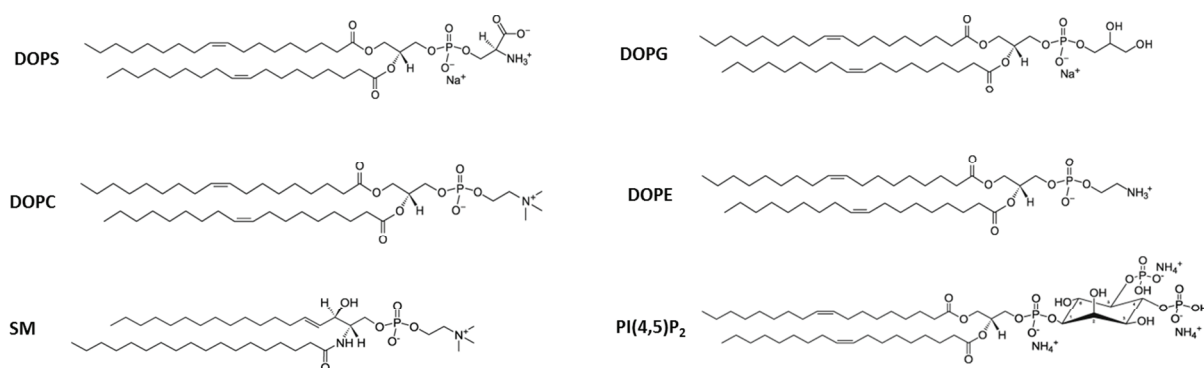


Figure 1 : Structure chimique des lipides utilisés.

2. Préparation de liposomes par extrusion

Les vésicules lipidiques de 100 nm de diamètre (LUVs) peuvent être composées d'une ou plusieurs sortes de lipides. Leur préparation commence par leur dissolution dans un solvant organique (chloroforme), qui est ensuite évaporé sous vide avec rotation dans un bain chauffé durant 30 minutes de manière à retirer la totalité du solvant. Il en résulte un film homogène de lipides secs déposés sur la surface du ballon. Les lipides sont ensuite réhydratés avec un volume préalablement déterminé de solution tampon (dans ces travaux : Phosphate 20 mM, pH 7.4, 150/30 mM NaCl ou Hepes 20 mM, 150/30 mM NaCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) durant 30 minutes, puis vortexée pendant 2 minutes, afin de former des vésicules multilamellaires de tailles relativement inhomogènes. Finalement l'extrusion permet d'obtenir une solution de

vésicules lipidiques en suspension avec une taille homogène de 107 nm de diamètre en moyenne (déterminé par DLS) (Fig. 2).

L'extrusion de lipides est une technique qui consiste à faire passer sous pression d'azote une solution de lipides en suspension par un film de polycarbonate dont la taille des pores est bien définie. Pour ce faire un extrudeur (Lipex Biomembrane Inc.) ainsi que des filtres polycarbonates à pores calibrés (Nucleopore) sont utilisés. La taille des vésicules est réduite dans un premier temps en les faisant traverser un filtre avec des pores de 0.2 µm de diamètre (7 passages), puis ajustée à 100 nm en traversant un filtre avec des pores de 0.1 µm (10 passages).

A noter que ce protocole est réalisé à une température supérieure à celle de la transition de phase cristalline gel/liquide (T_m) des lipides (55°C pour les lipides composés de chaînes alkyl saturées). Les concentrations de lipides préparés au cours de ces travaux se trouvent entre 200 et 800 µM.

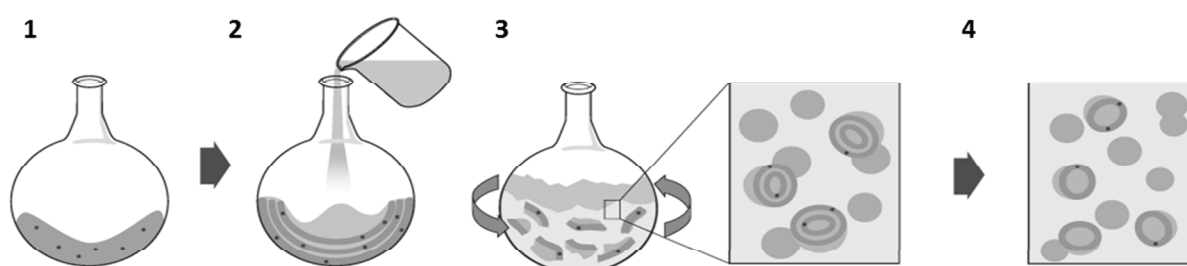


Figure 2 : Schéma représentant les principales étapes du protocole de formation de liposomes par extrusion : **(1)** évaporation du solvant **(2)** hydratation des lipides **(3)** vortex **(4)** extrusion.

A noter également qu'il est possible de marquer les liposomes en utilisant du DOPE-Rhodamine en très faible proportion (0.2 – 1%).

Pour calculer la concentration en vésicules de la suspension, on détermine tout d'abord le nombre de lipides composant une vésicule lipidique unilamellaire :

$$n = \frac{4\pi \cdot (R^2 + (R - t)^2)}{d} = 9.84 \cdot 10^4 \text{ lipides/vésicules} \quad (1)$$

Où :

R ($= 535 \text{ \AA}$) correspond au rayon d'un liposome (déterminé en DLS),

t ($= 40 \text{ \AA}$) correspond à l'épaisseur de la bicouche lipidique (472),

d ($= 70 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$) correspond à la densité surfacique de lipides (472).

Enfin la concentration de liposomes est déterminée avec la formule suivante :

$$C(\text{vesicules}) = \frac{C(\text{lipides})}{n} \quad (2)$$

3. Préparation des bicouches lipidiques supportées

a. Support en mica

La fusion des vésicules lipidiques sur des supports solides est la méthode la plus simple et la plus utilisée pour la formation de bicouches lipidiques supportées (SLBs) (473). Pour l'étude des SLBs en AFM, le support de référence est le mica. Ainsi, une pièce carrée de mica ($\sim 7 \times 7 \text{ mm}$) est clivée sur ses deux faces à l'aide d'un ruban adhésif, dans le but d'obtenir une surface plane. L'étape de fusion se produit simplement lorsque le mica est plongé dans un tube eppendorf contenant un volume de $700 \mu\text{l}$ composé de $200 \mu\text{M}$ de lipides et 1.5 mM de CaCl_2 , le tout dans un tampon Hepes 20 mM , $\text{pH } 7.4$, 150 mM NaCl , et laissé à l'abri de la lumière durant 45 à 60 minutes à température ambiante. C'est grâce aux ions Ca^{2+} présents dans la solution que les vésicules s'adsorbent sur la surface de mica et se rompent pour former une SLB.

Le mica est ensuite abondamment rincé dans le tampon Hepes (sans CaCl_2). Il peut être conservé plusieurs heures à condition d'être recouvert de solution tampon dans un tube eppendorf et placé à l'obscurité.

Le temps de formation de la SLB ainsi que sa morphologie dépendent des compositions et concentrations des lipides utilisés, de la température, des effets électrostatiques (ici nous travaillons avec du mica qui est chargé négativement), de la géométrie du support et de la présence de cations divalents (Richter, 2005, BiophysJ – Richter, 2006, Langmuir).

Il fut parfois nécessaire au cours de ces travaux d'observer les SLBs en microscopie de fluorescence. Pour marquer les bicouches nous avons utilisé de l'octadécylrhodamine, qui se

lie spécifiquement aux bicouches lipidiques via une chaîne hydrophobe. Pour ce faire, la lamelle de mica sur laquelle la bicouche est adsorbée, est déposée sur une lame de verre. Puis une goutte ($\sim 100\text{-}150\ \mu\text{l}$) de tampon Hepes contenant $1\ \mu\text{M}$ de sonde est elle-même déposée sur le mica. Celle-ci est abondamment rincée après 5 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

b. Support en verre

Les SLBs furent également observées en microscopie combinée AFM/TIRF (Atomic Force Microscopy/Total Internal Reconstruction Fluorescence). Dans ce cas, l'échantillon doit être compatible avec les deux approches : il doit à la fois se trouver accessible au champ évanescent et posséder une surface de faible rugosité. L'utilisation d'une surface de verre, idéale pour l'illumination TIRF, n'est malheureusement pas compatible avec la microscopie AFM du fait de sa rugosité élevée. La solution mise en œuvre pour pouvoir combiner les deux approches consiste alors à coller une feuille de mica sur une lamelle de verre. Il est important d'avoir une épaisseur totale de l'échantillon situé au-dessus du verre de très faible épaisseur pour qu'elle soit compatible avec une illumination par le champ évanescent du microscope TIRF.

Le protocole détaillé ci-dessous fut optimisé au laboratoire :

Les lamelles de verre sont nettoyées par sonication dans un premier bain composé d'eau milliQ et de 1% du détergent Microson (Fisher Scientific) durant 20 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées abondamment à l'eau milliQ et soniquées une seconde fois dans un bain contenant uniquement de l'eau milliQ. Finalement les lamelles sont rincées une dernière fois et peuvent être conservées plusieurs jours dans de l'eau milliQ.

La lamelle de verre est séchée sous flux d'azote filtré et une goutte de colle (Epotecny, FRANCE) y est déposée ($\sim 10\ \mu\text{l}$). Une pastille de mica (10 mm de diamètre) est immédiatement posée sur la colle. Une pression homogène doit être appliquée sur toute la pastille de manière à évacuer les bulles d'air ainsi que l'excès de colle présents entre la lamelle et le mica. La couche de colle doit être la plus fine possible pour pouvoir être traversée par le champ évanescent. Le tout est mis sous UV durant 10 minutes afin de polymériser la colle. Il s'agit ensuite de réduire au minimum l'épaisseur de la pastille de mica,

tout d'abord grossièrement en utilisant une lame de rasoir pour séparer les couches et finalement plus finement en utilisant du ruban adhésif pour obtenir une surface atomiquement plate. Dans ces conditions (474), on peut déposer la solution contenant les vésicules, le CaCl_2 et le tampon Hepes sur la pastille (goutte de 100 μl) en suivant les temps d'incubation et les rinçages indiqués précédemment.

c. Préparation des GUVs

Les GUVs furent générées par électro-formation dans une cellule liquide (Université d'Odense, Danemark) (475). Une goutte de lipides dissouts dans du chloroforme (1mM) est déposé sur les fils en platinium de la chambre. Le solvant est évaporé sous vide durant 30 minutes. La chambre est ensuite remplie avec une solution de sucrose (300 mM) et une tension de 2V est appliquée avec un courant alternatif (10Hz) durant 1h et 30min. On obtient alors une solution stock de GUVs en suspension dans une solution de glucose.

Pour la microscopie, 50 μl de cette solution de GUVs sont dilués dans 200 μl de solution de glucose (300 mM). Les GUVs sont marqués avec 400 nM de la sonde membranaire F2N12SM développée au laboratoire (non-publiée). Son spectre possède une unique bande d'émission à 480 nm.

II. Peptides

La protéine NCp7 ainsi que ses mutants NC(11-55), NC_{H23C} et NC_{SSHS} (Fig. 3) ont été synthétisés en phase solide (476) sur un synthétiseur 433A (ABI, Foster City, CA), purifiés par HPLC et caractérisés par spectroscopie de masse, et finalement conservés lyophilisés à -20°C. Une partie de la NCp7 fut marquée en son extrémité N-terminale par une 3-hydroxyflavone (MFL) ou par la Lissamine Rhodamine (Rh). hNPY fut également synthétisé en phase solide puis marqué en position N-terminale par de la Cyanine 5, purifié par HLPC et conservé lyophilisé à -20°C.

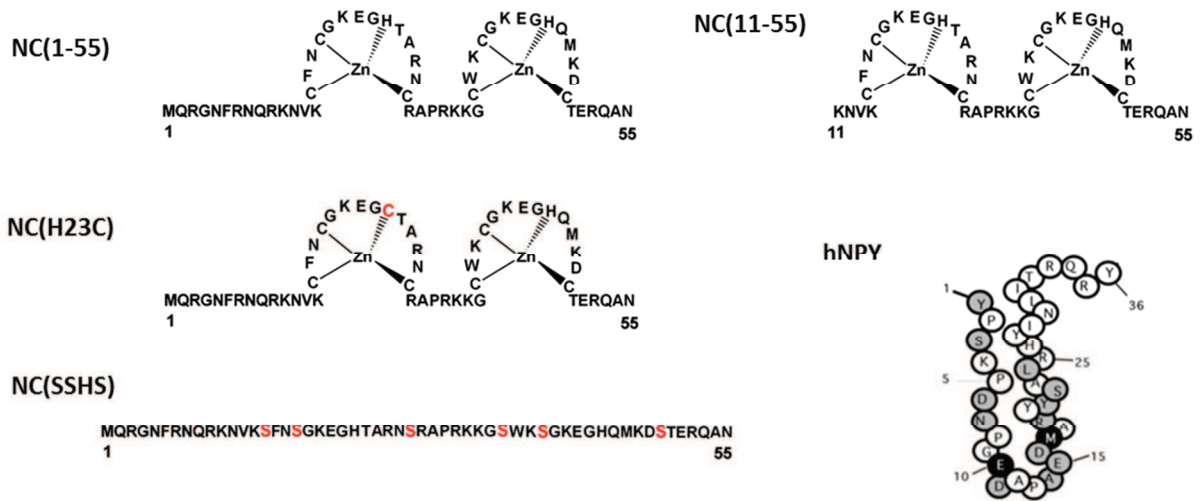


Figure 3 : Peptides utilisés au cours de ces travaux

La conservation à -20°C en solution de la NCp7 et de ses mutants possédant les doigts de zinc nécessite au préalable leur stabilisation par addition de zinc. En effet, la liaison du zinc va induire le repliement des doigts de zinc de la protéine, lui permettant d'acquérir ses propriétés biologiques et photophysiques. Pour ce faire, la protéine lyophilisée est tout d'abord dissoute dans de l'eau MiliQ ($\sim 100 \mu\text{L}$ pour 0.1 mg) puis les concentrations des peptides soit non marqués, soit marqués par MFL ou Rh sont déterminées par absorption à 280 nm , 400 nm ou 544 nm respectivement. Cette étape doit être effectuée rapidement dans le but de prévenir l'oxydation des cystéines. Le coefficient d'extinction molaire de NCp7 et de ses mutants (déterminé par celui du résidu tryptophane $\epsilon_{\text{NC}} = 5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ainsi que ceux de la MFL ($\epsilon_{\text{MFL}} = 33000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et du (TRITC $\epsilon_{\text{Rh}} = 100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) permettent de déterminer la concentration de la solution en utilisant la loi de Beer-Lambert. Une fois la concentration déterminée, la quantité de zinc à ajouter peut être déterminée.

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l} \times F \quad (3)$$

Où :

$C \text{ (M)}$ correspond à la concentration,

A correspond à l'absorbance de la solution,

$\epsilon \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$ correspond au coefficient d'extinction molaire,

l (cm) correspond à la largeur de la cuve (1 cm),

F correspond au facteur de dilution (volume total/volume prélevé).

La complexation du zinc par la protéine est réalisée par addition d'une solution concentrée de $ZnCl_2$. Environ 2,5 moles de Zn^{2+} sont ajoutées par mole de protéine non marquée de manière à saturer les sites de liaison au zinc et 2 moles de Zn^{2+} sont ajoutées par mole de protéine marquée afin d'éviter la liaison de l'excès de zinc à la sonde MFL (celle-ci adopterait alors sa forme anionique, dont le spectre d'émission est modifié). Ensuite, un tampon Phosphate ou Hépès 20 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl est ajouté, et enfin la concentration finale de la solution de protéine est contrôlée (à nouveau par absorbance).

La liaison du zinc par la protéine peut être vérifiée par la variation du rendement quantique de fluorescence du Tryptophane induite par l'addition d'un excès d'EDTA agissant comme chélateur de zinc. Le rapport des rendements quantiques entre la forme « holo » et la forme « apo » sera comparé à ceux publiés (Mély 1994 biochemistry; Mély 1996 Biochemistry).

La conservation en solution à $-20^{\circ}C$ de hNPY se fait simplement dans un tampon PBS et la concentration de peptide est également déterminée par absorbance à 649 nm ($\epsilon_{Cy5} = 250000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) à l'aide de l'équation 3.

III. Acides nucléiques

Les oligonucléotides (marqués et non marqués) TAR(ARN) et dTAR (Fig. 3) utilisés au cours de ces travaux sont synthétisés par voie chimique par IBA GmbH Acids Product Supply (Göttingen, Allemagne). Livrés sous forme lyophilisée, ils sont ensuite dissous dans de l'eau milliQ pour être stockés à haute concentration ($> 100 \mu\text{M}$) à $-20^{\circ}C$. Leur concentration en solution est déterminée grâce à leur absorbance à 260 nm et à l'équation 3. Les coefficients d'extinction molaire sont donnés par le fournisseur. Dans le cadre des expériences menées au cours de cette thèse, les oligonucléotides ont été dilués dans un tampon Phosphate 20 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl.

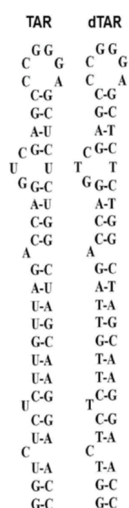


Figure 4 : Séquences et structure des oligonucléotides utilisés pour ces travaux.

IV. Culture cellulaire

Les cellules HeLa et HEK293 sont cultivées dans des flasques de 75 cm² dans du milieu « Dubblecco's modified eagle medium + Glutamax » (D-MEM, Gibco Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et de 1% d'antibiotique (penicilline/streptomycine).

Obtention des plasmides utilisés (Gag-TC, Gag-eGFP, GagΔNC-eGFP, NC-eGFP, eGFP-NC) : les codons humains optimisés Gag-TC et pNL4-3^{EGFP} ont été fournis par David Ott (National Cancer Institute at Frederick, Maryland) et Barbara Muller (Abteilung Virologie, Universitatklinikum Heidelberg, Germany) (477, 478). Le plasmide pNL4-3^{EGFP} a été utilisé pour amplifier la séquence codant pour Gag-eGFP tel que décrit dans Fritz et al. (2008 et 2010) (68, 69). Le produit ADN obtenu fut inséré dans un primer pcDNA sous contrôle d'un promoteur CMV. Les mutants de Gag avec un domaine NC fut délété furent construits par mutagenèse dirigée par PCR en suivant le protocole du kit utilisé (Stratagene) et en utilisant les substrats Gag-eGFP ou Gag-TC. Le plasmide codant pour NC fut également amplifié à partir du codon humain optimisé Gag-TC fourni par David Ott. Le produit NC-eGFP fut inséré dans un promoteur pcDNA3-eGFP (Addgene, 13031). Les plasmides furent ensuite amplifiés après transformation dans des bactéries compétentes DH5alpha et purifiés en suivant les instructions du kit utilisé (NucleoBond Xtra Midi Plus, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Les séquences ADN furent contrôlées par séquençage ADN.

1. Transfections

Les transfections sont effectuées à l'aide du kit Polyplus contenant une solution de polyéthylène imine (jetPEI™) et de NaCl 150 mM. Le JetPEI est un agent polycationique qui se lie à l'ADN et réalise le transport des plasmides à travers la membrane plasmique.

10⁴ cellules HeLa sont déposées dans des boîtes 6 ou 12 puits 24 heures avant la transfection. Pour pouvoir observer les cellules en microscopie, celles-ci doivent se trouver sur une lamelle de 18 mm de diamètre qui est préalablement déposée au fond de chaque puits, stérilisée avec de l'éthanol 70% pendant 5 minutes et finalement rincée avec du PBS 1X et tamponnée avec du milieu DMEM. Les expériences sur cellules vivantes sont effectuées dans des boîtes Ibidi (Biovalley) qui ne nécessitent pas de stérilisation. Les cellules sont placées à 37°C (5% de CO₂) pendant 24 heures.

Lors de la transfection, deux tubes eppendorfs sont préparés pour chaque puits : le premier contient le volume nécessaire de la solution de plasmides (1 µg en général, complété par du pcDNA si la quantité du plasmide d'intérêt y est inférieure) dilué dans du NaCl et le second contient le JetPEI également dilué dans du NaCl. Le volume de JetPEI correspond au double de la masse de plasmide transfecté (ex : pour 1 µg de plasmide il faut 2µl de JetPEI). Après avoir vortexé et centrifugé les deux tubes, le volume de JetPEI est ajouté sur les plasmides. Le tout est vortexé durant 15 secondes puis centrifugé et laissé à incuber durant 20 minutes à température ambiante. Finalement, le mélange est ajouté sur les cellules qui sont placées à 37°C (5% de CO₂) pendant 24 heures. Afin de diminuer la toxicité cellulaire due au JetPEI, le milieu de culture est remplacé 6 heures après la transfection.

Les cellules transfectées sont finalement lavées avec du PBS 1X à 37°C et fixées avec du paraformaldéhyde 4% sous agitation à l'obscurité durant 15 minutes. Suivent 2 lavages de 10 minutes au PBS 1X (température ambiante) et le montage des lamelles sur lames de verre. Une goutte de milieu de montage (ProLong Gold, Invitrogen) est déposée sur la lame puis la lamelle est elle-même déposée sur la goutte. L'ensemble est laissé à l'obscurité durant quelques heures, le temps que le milieu de montage polymérise.

2. Internalisation de NPY

Les cellules HEK293 sont cultivées jusqu'à 80% de confluence dans des boîtes ibidy (biovalley) avec un fond en verre (la microscopie TIRF). Après rinçage du milieu de culture avec du PBS 1X à 37°C, un tampon de Krebs-Ringer contenant 100 nM de cy5-NPY et les antagonistes en large excès (BIBP3226 et BIIE0246), sont ajoutés. Les cellules sont mises sous agitation à 37°C durant le temps nécessaire (de 1 à 60 minutes selon le cas) et ensuite rincées avec du PBS 1X à 37°C. L'excès de peptide à la surface des cellules est ensuite éliminé par un lavage à la trypsine 0.01% (30 secondes sous agitation à 37°C).

Finalement les cellules sont fixées avec un mélange de glutaraldéhyde 0.05% et de paraformaldéhyde 4% sous agitation à l'obscurité durant 12 minutes. Après un premier rinçage au PBS 1X, l'autofluorescence du glutaraldéhyde est supprimée par deux rinçages de 10 minutes par une solution de NaBH₄ (10mg/ml dans du PBS 1X, préparée au dernier moment). Les cellules sont conservées à 4°C dans du PBS 1X.

V. Spectroscopie de fluorescence

Les expériences de spectroscopie furent effectuées sur les spectrofluotimètres FluoroMax-3 ou FluoroMax-4 (Jobin Yvon Instrument SA Inc.) équipés d'un porte-cuve thermostaté. La source d'excitation est une lampe à Xénon. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont sélectionnées par deux monochromateurs simple réseau identiques à fentes ajustables. Le signal d'émission est corrigé de l'instabilité du faisceau d'excitation due aux fluctuations de la lampe grâce à une photodiode calibrée. Les réponses du monochromateur et du photomultiplicateur à l'émission en fonction de la longueur d'onde sont corrigées par des courbes de calibration fournies par le constructeur.

1. Expériences de titrage

L'objectif des titrages effectués est de déterminer la stœchiométrie et l'affinité de la NCp7 pour des membranes lipidiques de différentes compositions. A cette fin, la fluorescence de la MFL va être suivie en fonction de concentrations croissantes de liposomes. La MFL est caractérisée par deux états excités, normal N* et tautomère T* résultant d'une réaction ESIPT

(Excited State Intramolecular Proton Transfer). Ces deux états ne possèdent pas la même sensibilité à la polarité et à l'hydratation de leur environnement (479). Cette propriété fait de la MFL une sonde idéale pour étudier la liaison de la NCp7 aux membranes lipidiques.

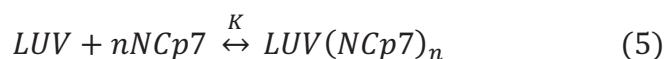
a. Procédure expérimentale

Les dilutions de liposomes et de NCp7 sont préparées juste avant la mesure dans un tampon Phosphate 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, à volumes équivalents (420 µl) dans deux tubes eppendorf à partir de leurs solutions mères respectives (celles-ci sont conservées dans la glace et à l'obscurité). Après homogénéisation par vortex et centrifugation, 410 µl de chacune des solutions sont prélevés pour être mélangés dans un 3^{ème} tube eppendorf. Après une nouvelle homogénéisation par vortex et centrifugation, 800 µl de cette préparation sont transférés dans une cuve en quartz. Enfin, un spectre d'émission est enregistré entre 420 et 700 nm, la longueur d'onde d'excitation étant de 400 nm. Chaque point du titrage est effectué dans une nouvelle cuvette. Par ailleurs, les lignes de base de chacune des solutions de lipides (sans MFL-NCp7) sont également mesurées.

b. Traitement et analyse des courbes de titrage

La première étape du traitement des données consiste à soustraire la ligne de base au spectre d'émission, puis la valeur de l'intégrale du spectre d'émission est mise sur un graphique en fonction de la concentration des lipides.

La courbe de titrage obtenue est ensuite traitée suivant le modèle de Scatchard, considérant que la liaison NCp7-liposome fait intervenir n sites de liaison équivalents et indépendants. La formation du complexe NCp7-liposome peut être modélisée par l'équilibre suivant :



Avec :

$$K = \frac{[LUV(NCp7)_n]}{[LUV][NCp7]^n} \quad (6)$$

Où :

K est la constante macroscopique d'affinité de la liaison NCp7-liposome,

n est le nombre de sites de liaison portés par une LUV pour la NCp7.

L'hypothèse des sites équivalents et indépendants permet l'utilisation de la constante microscopique d'affinité K_μ , caractérisant la liaison de la protéine sur un site de fixation donné d'un liposome. Par conséquent, le nombre moyen de protéines liées par liposome peut être exprimé selon l'équation :

$$\nu = \frac{[NCp7]_{liée}}{[LUVs]_{tot}} = \frac{nK_\mu[NCp7]}{1 + K_\mu[NCp7]} \quad (7)$$

Où :

$[NCp7]_{liée}$ représente la concentration en protéines liées aux liposomes,

$[LUVs]_{tot}$ représente la concentration totale en acides nucléiques,

n représente le nombre de sites de liaison d'une LUV pour la NCp7,

$[NCp7]$ représente la concentration de protéine libre,

K_μ (M^{-1}) correspond à la constante microscopique d'affinité caractérisant la liaison de la NCp7 pour un site de liaison donné.

Au cours du titrage, l'intensité de fluorescence évolue en fonction des concentrations respectives en $[NCp7]_{libres}$ et $[NCp7]_{liée}$ suivant la relation :

$$I = I_0 \frac{[NCp7]}{[NCp7]_{tot}} + I_f \frac{[NCp7]_{liée}}{[NCp7]_{tot}} \quad (8)$$

Où :

I correspond à l'intensité de fluorescence,

I_0 et I_f correspondent respectivement à l'intensité de fluorescence associée à la protéine libre et liée à une LUV,

$[NCp7]_{tot}$ correspond à la concentration totale de NCp7,

$[NCp7]$ et $[NCp7]_{liée}$ correspondent respectivement à la concentration en NCp7 libre et liée aux liposomes.

En combinant les équations 5 et 6 on peut déduire l'expression de l'intensité de fluorescence globale en fonction de la concentration de liposomes ajoutés :

$$I = I_0 - \frac{I_0 - I_f}{[NCp7]_{tot}} \times \frac{(1 + K_\mu([NCp7]_{tot} + n[LUVS]_{tot})) - \sqrt{(1 + K_\mu([NCp7]_{tot} + n[LUVS]_{tot}))^2 - 4nK_\mu^2[NCp7]_{tot}[LUVS]_{tot}}}{2K_\mu} \quad (9)$$

Les courbes expérimentales sont ajustées par ce modèle afin de retrouver les valeurs de K_μ et n .

2. Transfert d'énergie non-radiatif

a. Principe

Le FRET (Fluorescent/Förster Resonance Energy Transfer) correspond à un transfert d'énergie non radiatif, c'est-à-dire sans émission de photon, par couplage dipôle-dipôle de deux molécules fluorescentes. Il s'agit d'un phénomène observé lorsqu'une molécule fluorescence à l'état excité (le donneur), transmet son énergie à une seconde molécule fluorescente (l'accepteur) (Fig. 5A), à condition que la distance qui sépare les deux molécules soit inférieure à 10 nm d'une part et que le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur d'autre part (Fig 5B). Le FRET est donc une technique couramment utilisée pour étudier des interactions au niveau moléculaire.

L'observation du FRET se caractérise par la diminution du rendement quantique du donneur, et par l'augmentation de celui de l'accepteur (Fig. 5C). La constante cinétique de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur est décrite de la manière suivante :

$$k_T = \frac{1}{\tau_d^0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (10)$$

Où :

k_T représente la constante cinétique de transfert d'énergie,

τ_d^0 correspond au temps de vie de fluorescence du donneur en absence de l'accepteur,

R est la distance qui sépare les deux chromophores,

R_0 correspond au rayon de Förster.

Le rayon de Förster, R_0 , est la distance donneur/accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%. Il est calculé de la manière suivante :

$$R_0 = (8.79 \times 10^{23} n^{-4} Q_D \kappa^2 J_{AD})^{1/6} \quad (11)$$

Où :

n désigne l'indice de réfraction du milieu,

Q_D représente le rendement quantique du donneur,

J_{AD} correspond à la valeur de l'intégrale du recouvrement des spectres (Fig. 5B),

κ^2 est un facteur dont la valeur dépend de l'orientation relative entre les dipôles du donneur et de l'accepteur. Ce facteur varie entre 0 (si les dipôles sont perpendiculaires) et 4 (si les dipôles sont parallèles). La valeur de $\kappa^2 = 2/3$ est généralement utilisée, ce qui correspond à la moyenne obtenue dans le cas de molécules mobiles.

Les valeurs de R_0 se situent généralement entre 20 et 60 Å (Fig. 5D).

D'autre part, l'efficacité de FRET peut être mesurée de manière indépendante, par l'observation de la diminution du rendement quantique du donneur en présence de l'accepteur :

$$E = 1 - \frac{\phi_{DA}}{\phi_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (12)$$

Où :

ϕ_D et ϕ_{DA} sont les rendements quantiques du donneur en absence et en présence de l'accepteur, respectivement,

I_D et I_{DA} sont les intensités de fluorescence du donneur en absence et en présence de l'accepteur, respectivement.

Finalement, la distance entre les sondes fluorescentes peut être déterminée à partir de E et de R_0 en utilisant la relation suivante :

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} \quad (13)$$

L'équation 13, traduit la dépendance entre l'efficacité de transfert (E) et la distance inter-moléculaire (fig. 2.5 D) (480).

Bien que cette technique comporte quelques inconvénients tels que le rapport signal/bruit limité à faible concentration et le photoblanchiment du donneur, elle reste couramment utilisée pour l'étude des interactions protéine/protéine ou protéine/membrane.

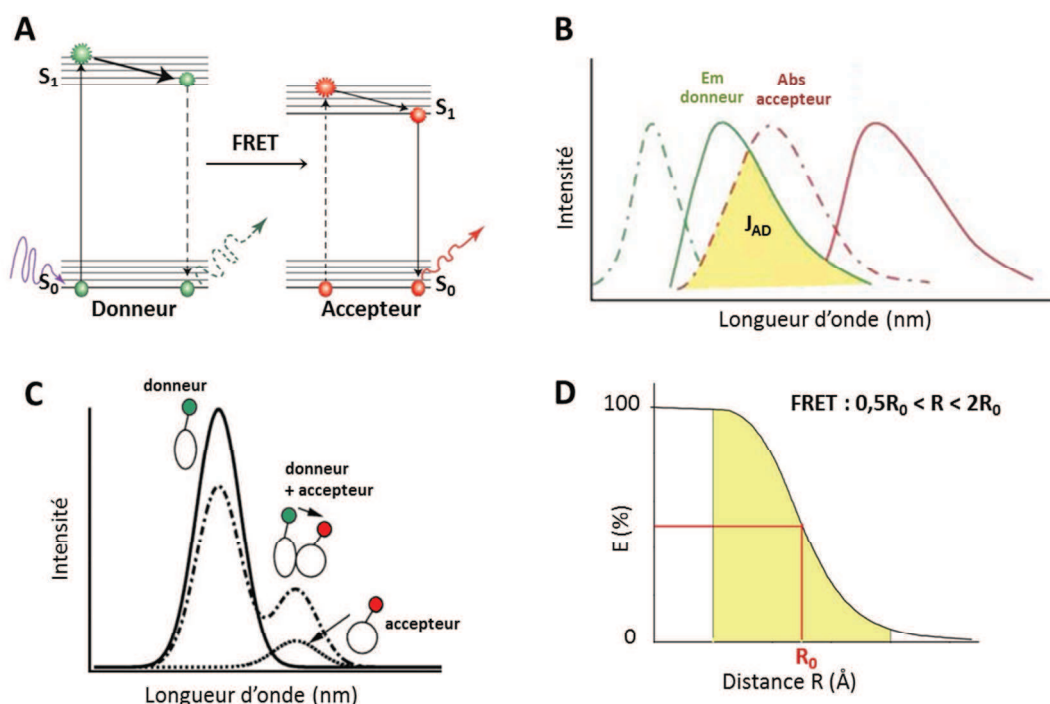


Figure 5 : Fluorescence Resonance Energy Transfer. **(A)** Principe du FRET entre couple donneur/accepteur. Après excitation le donneur cède son énergie de manière non-radiative à l'accepteur. **(B)** Recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. J_{AD} correspond à la valeur de l'intégrale de l'overlap de ces deux spectres. **(C)** Exemple de spectres d'émission d'un couple donneur/accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur en présence de FRET. Lorsque les deux espèces sont en solution l'intensité de l'accepteur augmente et celle du donneur diminue. **(D)** Variation de l'efficacité de transfert en fonction de la distance inter-fluorophore. La gamme des distances mesurables est comprise entre $0.5R_0$ et $2R_0$.

b. Procédure expérimentale

Les mesures de FRET en solution sont réalisées dans des cuves en quartz. Tout d'abord les lignes de base correspondant aux spectres du tampon et de la solution de liposomes (non marqués) sont mesurées. Les échantillons de protéine, d'oligonucléotide et de liposomes marqués et non-marqués sont préparés à l'avance.

Les dilutions de liposomes, de NCp7 et de complexes NCp7/ADN sont préparées au dernier moment dans un tampon Phosphate 20 mM, pH 7.4, NaCl 150/30 mM, à volumes équivalents (420 µl) dans deux tubes eppendorfs distincts à partir des solutions mères (celles-ci sont conservées dans la glace et à l'obscurité). Après homogénéisation par vortex et centrifugation, 410 µl de chacune des solutions sont prélevés pour être mélangés dans un 3^{ème} tube eppendorf. Il s'ensuit une nouvelle homogénéisation par vortex et centrifugation, puis un volume de 800 µl de cette préparation est prélevé et transféré dans la cuve de mesure. Enfin, un spectre d'émission est enregistré.

Pour mettre en évidence une interaction, trois spectres d'émission à la même longueur d'onde d'excitation sont nécessaires (Fig. 5C): celui du donneur seul, celui de l'accepteur seul et celui des deux espèces en interaction. Ces expériences furent effectuées pour mettre en évidence l'existence d'un complexe ternaire. Dans cette perspective la troisième espèce (non marquée) est également présente pour chacun des trois spectres d'émission.

VI. Microscopie de fluorescence

1. Microscopie confocale

Décrite pour la première fois par Marvin Minsky en 1957 (481), la microscopie confocale représente une avancée technologique importante pour l'imagerie des échantillons biologiques en permettant d'améliorer considérablement la résolution des images. Le principe de cette technique repose sur la présence d'un diaphragme (pinhole), placé avant le détecteur. Il permet de s'affranchir de la fluorescence des plans optiques autres que le plan focal, dont les molécules fluorescentes sont également excitées par le faisceau laser, et d'obtenir des coupes optiques d'une épaisseur de 400 nm dans les échantillons (Fig. 7).

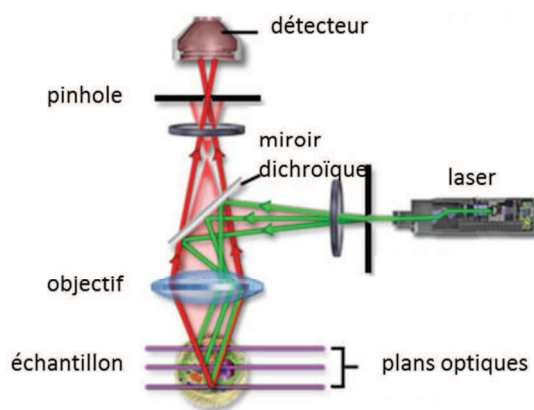


Figure 7 : Schématisation du trajet optique des photons en microscopie confocale.

Les images confocales furent effectuées avec un microscope confocal Leica SPE II. Ce système est composé de lasers qui génèrent 4 longueurs d'onde d'excitation 405, 488, 561 et 635 nm. Le faisceau laser est focalisé par un objectif HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS. La puissance du laser fut ajustée de manière à optimiser l'excitation des fluorophores, en évitant le photoblanchiment et la saturation du détecteur.

2. Microscopie biphotonique

La microscopie de fluorescence par absorption à deux photons repose sur le processus d'absorption quasi-simultanée de deux photons dont l'énergie est divisée par deux par rapport à une excitation mono-photonique. Leur arrivée quasi-simultanée fait transiter la molécule de son état fondamental à l'état excité en passant par un niveau transitionnel virtuel dont la durée de vie faible ($\sim 10^{-15}$ s) contraint les photons à arriver au même point dans un délai de l'ordre de l'attoseconde ($\sim 10^{-18}$ s). Bien que la désexcitation du fluorophore soit identique à celle qui suit l'excitation mono-photonique, l'excitation à deux photons a l'avantage d'être un phénomène non linéaire avec une probabilité d'exciter une molécule très élevée dans le volume focal ($\sim 10^{-15}$ l) qui décroît très rapidement en s'en éloignant, réduisant le phénomène de photoblanchiment au seul point focal. Cette technique permet d'utiliser des photons d'énergie réduite (domaine IR) dont l'impact sur les tissus biologiques est réduit. Par ailleurs, la netteté des images est améliorée puisque l'émission de fluorescence défocalisée est inexistante.

L'imagerie à deux photons a été réalisée avec un microscope Olympus IX70 équipé d'un objectif Olympus 60x/1.2 à eau. Le faisceau d'un laser pulsé femtoseconde (120 fs, 82 Mhz) SpectraPhysics Tsunami (750–920 nm) titane-Sapphire (830 nm) est déplacé physiquement sur l'échantillon par rotation de miroirs galvanométriques qui balayent une zone dont le côté maximum est de 70 μm . La fluorescence émise par l'échantillon est envoyée vers des photodiodes à avalanche (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin-Elmer) couplé à une carte d'acquisition PCI (PCI6602, National Instrument).

Le filtre dichroïque en place est un passe bande de longueur d'onde de coupure 700 nm et le cube filtre est également muni d'un miroir dichroïque passe-bande à la longueur d'onde de coupure de 585 nm. Le temps d'acquisition communément utilisé est de 20 ms/pixel avec une puissance d'excitation de 40 mW ($\lambda = 830 \text{ nm}$).

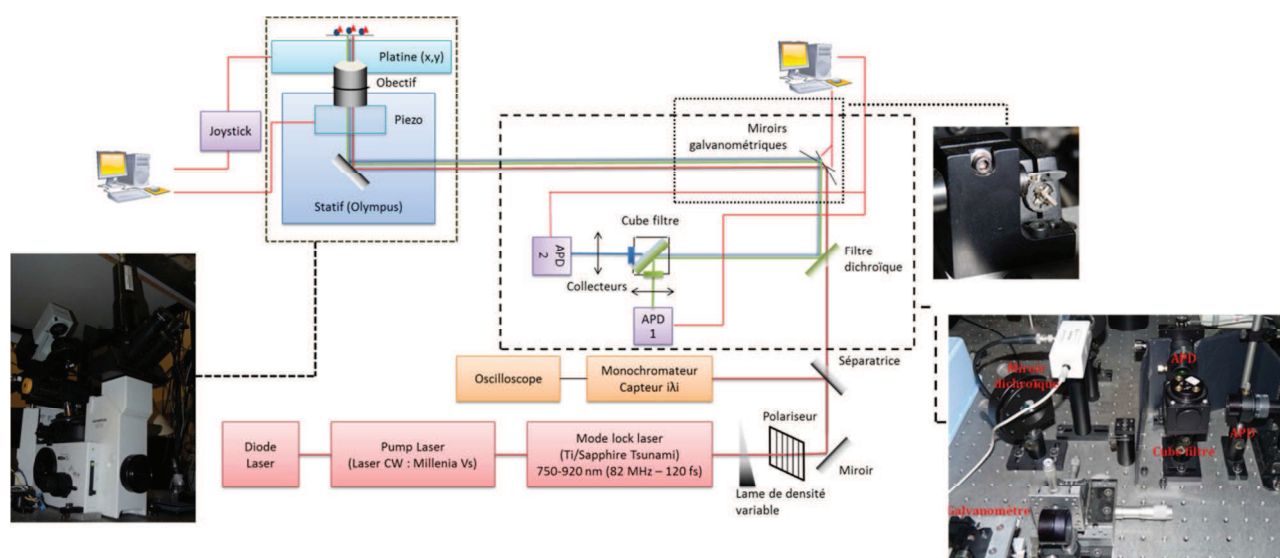


Figure 8 : Schéma simplifié du montage optique du microscope 2-photon.

3. Microscopie TIRF

La microscopie à onde évanescence dite microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) s'est développée aux Etats-Unis dès 1984 (482). Cette technique est basée sur le principe de la réflexion totale. Lorsqu'un rayon lumineux rencontre un dioptré, le changement d'indice de réfraction induit une déviation et la réflexion de ce-dernier, conduisant à la naissance d'un rayon réfracté et d'un rayon réfléchi. Selon la loi de Snell-

Descartes (équation 15) l'angle de réfraction (θ_2) dépend à la fois de l'angle d'incidence et des indices de réfraction.

$$n_1 \cdot \sin(\theta_1) = n_2 \cdot \sin(\theta_2) \quad (17)$$

De ce fait, dans la mesure où n_1 est supérieur à n_2 et que l'angle d'incidence a une valeur précise, l'onde réfractée n'existe plus, c'est le phénomène de réflexion totale (Fig. 9A). Il persiste cependant une onde lumineuse qui ne se propage pas à proximité du dioptré. De plus son intensité diminue exponentiellement avec la distance : c'est l'onde évanescente qui s'étend sur 100 à 200 nm. Ce phénomène trouve une application en microscopie optique.

Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'imagerie des surfaces (telles que les membranes plasmiques) puisque sa profondeur de champ est de 200 nm, ce qui permet d'augmenter considérablement le rapport signal sur bruit (et par conséquent la résolution axiale), car la fluorescence recueillie ne provient que d'une surface en contact avec la lamelle de 0,2 μm d'épaisseur. L'application principale de cette technique d'imagerie est l'observation des membranes cellulaires (étude des protéines membranaires, des canaux ioniques, des récepteurs membranaires, des mécanismes d'endocytose et d'exocytose...) (Fig. 9B).

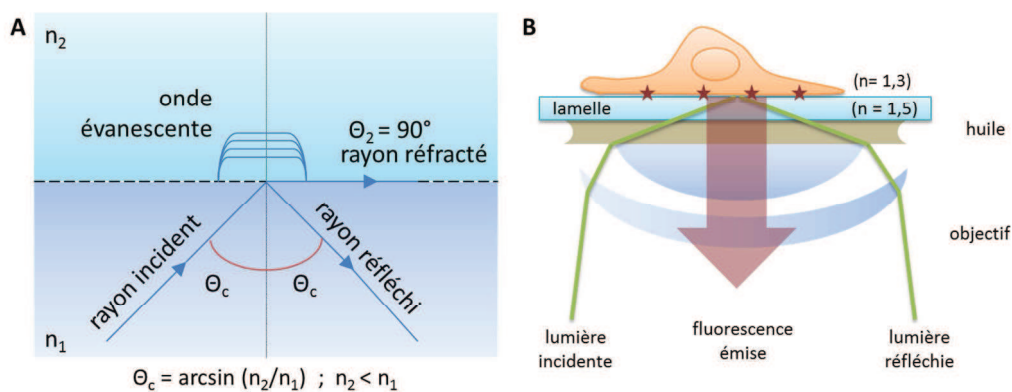


Figure 9 : Principe de la microscopie TIRF

Les cellules ($n_{\text{eau}} = 1,3$) sont cultivées sur un support en verre ($n_{\text{verre}} = 1,5$). En faisant arriver le laser sur la lamelle selon l'angle d'incidence critique, les conditions sont réunies pour faire de la microscopie TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence). L'imagerie TIRF a été

réalisée avec un microscope Olympus IX71 équipé d'un objectif TIRF Olympus 100x/1.49 à huile et d'une caméra EMCCD (ImagEM, Hamamatsu). Les échantillons sont excités avec des diodes lasers 488 nm (50 mW, spectraPhysics) et 532 nm (100 mW, Cobolt). Pour améliorer le rapport signal/bruit, une moyenne sur 100 images est effectuée.

4. Microscopie de haute résolution de fluorescence par détection de molécule unique

a. Principe

L'enjeu majeur du 21ème siècle pour la microscopie de fluorescence, consiste à franchir la limite de la résolution optique, imposée par la diffraction des rayons lumineux (483). Un premier pas fut franchi dès 1994 avec l'apparition de la microscopie à balayage STED (Stimulated Emission Depletion), dont le principe est d'« éteindre » les molécules fluorescentes situées en périphérie du point focal, grâce au phénomène d'émission stimulée (484, 485) (Fig. 10A). En 2000, la microscopie SIM (Structured-Illuminated Microscopy) y parvient également : l'image est reconstruite informatiquement grâce à la traduction de l'effet Moiré, observée entre la fluorescence de l'échantillon et une illumination dite « structurée », dont le motif périodique est connu (486, 487) (Fig. 10B). Plus récemment, les techniques telles que le F-PALM (Fluorescence Photo-Activation Localization Microscopy) et le (d)STORM ((direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), qui consistent à détecter la fluorescence de photon unique sont apparues (488–491).

Toutes les méthodes de détection de photon unique reposent sur l'utilisation de sondes fluorescentes activables, qui permettent de contraindre la majorité des fluorophores à se trouver dans leur « dark-state » (où « état noir »), où ils n'émettent pas de photons. Ainsi seule une faible proportion des fluorophores (déterminée aléatoirement à chaque instant) pourra émettre des photons, l'enregistrement de la PSF (Point Spread Function, représentant le nombre de photons arrivés sur le détecteur en fonction de la position) sera possible pour chaque point lumineux individuel. En ajustant cette PSF par une gaussienne bidimensionnelle (492), il est possible de déterminer le centre de la courbe et donc la position précise de l'émetteur (Fig. 10C). Pour reconstruire l'image complète de structures cellulaires, cette opération doit être effectuée sur un grand nombre de fluorophores considérés individuellement, il est donc nécessaire d'acquérir plusieurs milliers d'images. De plus,

comme la PSF est la conséquence de la diffraction, les molécules qui émettent de la fluorescence doivent se trouver à une distance supérieure de la limite de diffraction. Si cette condition n'est pas respectée, les PSF de deux fluorochromes peuvent se superposer et le calcul des coordonnées est alors erroné.

Au cours de nos travaux, hNPY fut marqué par une Cyanine 5 et sa localisation cellulaire fut étudiée à l'aide de la technique de dSTORM (493).

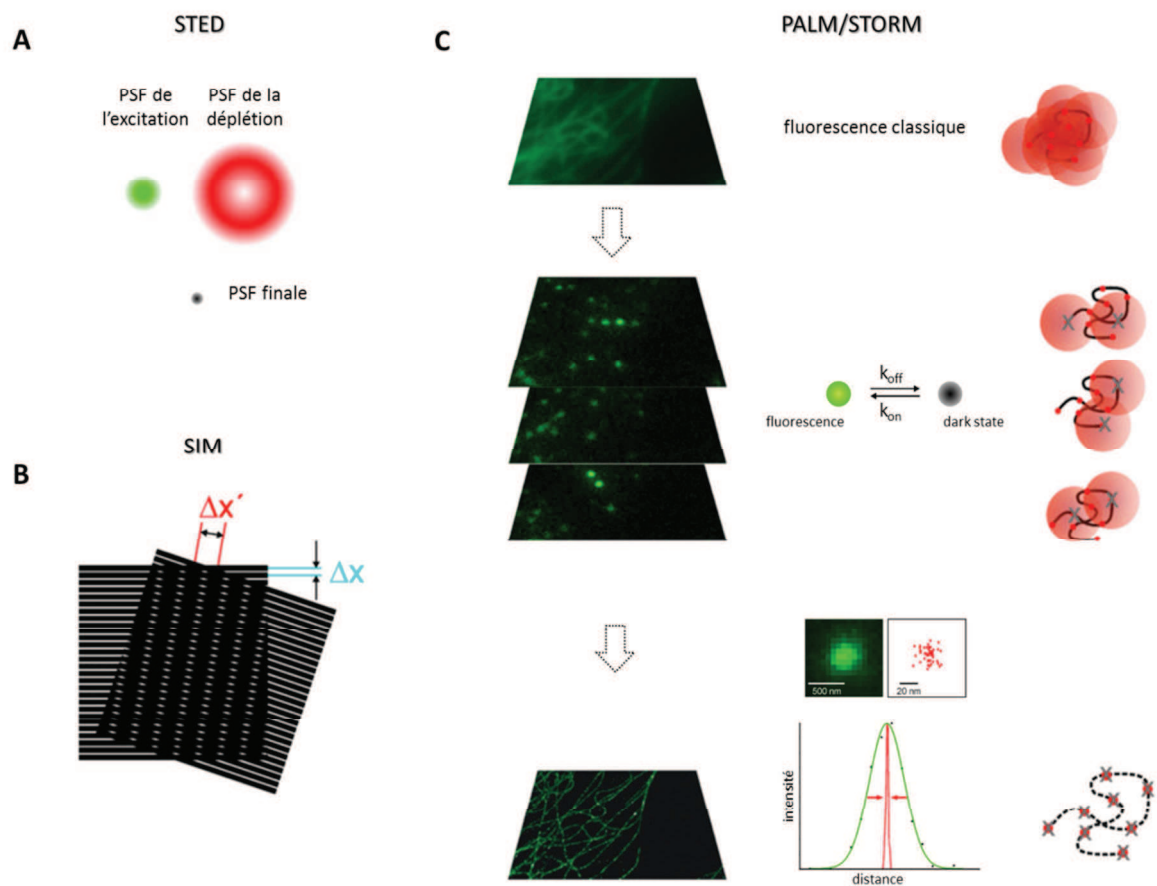


Figure 10 : Principes des techniques de microscopie de fluorescence à haute résolution **(A)** Microscopie STED : superposition de deux faisceaux lasers : le premier est de forme normale alors que le second à une forme de « donut » qui permet de réduire la fluorescence de la périphérie. **(B)** Microscopie SIM : l'échantillon est excité avec une illumination structurée dont le motif périodique connu permet l'observation de structures non résolues par le biais des franges de Moiré. **(C)** Microscopies de type PALM ou STORM fonctionnent avec des sondes fluorescentes qui peuvent se trouver en deux états distincts, le premier permettant l'émission de photons (fluorescence) et le second ne le permettant pas (dark state). La transition entre ces deux états est contrôlée. L'acquisition de plusieurs milliers d'images permet la reconstruction d'une image avec une résolution accrue en retrouvant le centre des PSF de chaque point lumineux.

b. Mise en œuvre expérimentale

Pour augmenter la photostabilité de la Cyanine 5, un cocktail appelé « oxygen scavenger » est ajouté sur les cellules durant les acquisitions. Cette solution se compose de PBS 1X supplémenté de 0.2% de glucose à laquelle on ajoute une solution de catalase et de glucose oxydase (au dernier moment avant les acquisitions). Dans la boîte ibidy les concentrations de catalase et de glucose oxydase sont de 0.02 mg/ml et 0.1 mg/ml respectivement (volume : 1 ml). La réaction d'oxygen scavenger est efficace environ durant 30 minutes. Il est ensuite nécessaire de la renouveler.

L'imagerie dSTORM a été réalisée avec un microscope Olympus IX71 équipé d'un objectif TIRF Olympus 100x/1.49 à huile et d'une caméra EMCCD (ImagEM, Hamamatsu). Les échantillons sont excités avec un laser Hélium/Néon 632.8 nm (20 mW, ThorLabs). Chaque image dSTORM est reconstruite à partir d'une série de 5000 images.

c. Analyse et traitement des données

Les fluorophores sont individuellement localisés avec le logiciel rapidSTORM 3. A partir de l'image reconstruite en haute résolution (HR) (vésicules contenant le Cy5-hNPY) il est possible de retrouver la taille des vésicules après plusieurs traitements. La procédure utilisée sous imageJ pour chacune des images est la suivante :

Image TIRF (cellules marquées à la GFP) : la taille de l'image TIRF est ajustée à celle de l'image HR de manière à pouvoir être superposées. Après avoir retiré le bruit de fond de l'image TIRF, la surface de la cellule d'intérêt est calculée pour pouvoir par la suite normaliser le nombre de vésicules identifiées.

Image HR : Après avoir retiré le bruit de l'image HR, l'image est binarisée par seuillage et le diamètre de chaque vésicule est retrouvée grâce à l'outil analyze particles (process > analyze particles...) qui répertorie l'aire de chacune des vésicules dans un fichier. Les paramètres (circularité et taille) sont ajustés pour ne sélectionner que les objets ayant des paramètres cohérents à ceux des vésicules.

A partir du fichier contenant les données sur les vésicules il est possible de retrouver leur diamètre et leur densité pour chaque image et chaque condition.

VII. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) est une méthode d'imagerie indirecte, qui s'appuie sur les interactions entre une pointe-sonde et la surface d'un échantillon, pour reconstituer une image de la topographie de l'échantillon.

Une pointe ayant une terminaison nanométrique (5-20nm), située à l'extrémité libre d'un cantilever ($L \times l \times h = 135 \times 30 \times 1.5 \mu\text{m}$) ayant une constante de raideur k , approche la surface de l'échantillon à une distance de l'ordre de 10 à 20 nm. Avec ce type de distances, la pointe du cantilever est sensible aux forces de champ proche (de l'ordre de 10^{-9} N) lorsqu'elle est en interaction avec la surface (494). Suivant les conditions de mesures (phase gazeuse, liquide ou vide) les résolutions axiales obtenues en AFM sont, sous certaines conditions, de l'ordre de la molécule, voire de l'atome.

Trois modes d'imagerie sont possibles en AFM : (i) le mode contact où la pointe est physiquement en contact avec la surface (distance pointe-échantillon $\sim \text{\AA}$) et sonde des forces de courte portée répulsives ($10^{-9} < F_{\text{contact}} < 10^{-7}$ N) (ii) le mode non-contact où le levier vibre à sa fréquence de résonance à une distance de ~ 10 nm de la surface permettant ainsi de sonder les forces faibles attractives ($10^{-15} < F_{\text{non-contact}} < 10^{-10}$ N), et finalement (iii) le mode contact intermittent (ou tapping mode), qui constitue un compromis entre le mode contact et le mode non-contact où le levier vibre à sa fréquence de résonance et entre en contact avec la surface par intermittence. Cette dernière approche est privilégiée dans le cas d'échantillons biologiques en phases aqueuses, du fait de son caractère moins invasif.

Les paramètres qui dépendent de la distance pointe-échantillon sont : la force exercée sur le cantilever (en mode contact), la fréquence de résonance (en mode non-contact) ou l'amplitude de vibration (en mode contact-intermittent). Ces paramètres peuvent être asservis et maintenus constants via une boucle de rétroaction contrôlant le cristal piézo-électrique (Fig. 11). Suivant les modes d'imageries précédemment cités, le maintien de cette consigne permet de fixer la distance pointe échantillon et de reconstituer, section par section, la surface de l'échantillon grâce aux mouvements du cristal piézo électrique.

Les bicouches lipidiques supportées ($h = 4$ nm) sont des surfaces qui se prêtent parfaitement à l'observation en AFM. Elles sont préparées sur une surface plane de mica, elle-même collée sur un saphir avant d'être mis en place sur l'instrument. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un AFM SolverPro NT-MDT (Moscou) (Fig. 12A) et de cantilever NSG-03 NT-MDT (1,2

N/m) en mode contact intermittent (en milieu aqueux) avec des fréquences de balayage allant de 1 à 3 Hz.

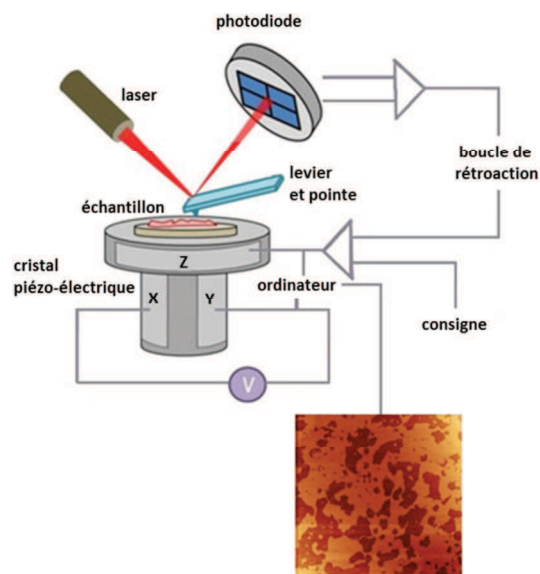


Figure 11 : Schématisation du fonctionnement d'un microscope à force atomique. L'échantillon est mis en place sur un cristal piézo-électrique. Il est scanné par une pointe à terminaison nanométrique. Les déflexions du cantilever sont mesurées par une photodiode. La distance pointe-échantillon est asservie par une consigne qui est mise en application via une boucle de rétroaction qui contrôle le cristal piézo-électrique (Z).

Pour ces travaux, des images combinées AFM/TIRF ont également été effectuées sur des bicouches lipidiques marquées. Ces acquisitions sont effectuées à l'aide d'un statif TIRF (Olympus IX71 – objectif TIRF olympus 100x/1.49 oil) surmonté d'une tête AFM (SolverPro NT-MDT, Moscou) (Fig. 12B) et équipé d'une caméra EMCCD camera Andor IXON.

Les images AFM sont analysées avec le logiciel Gwyddyon[®].

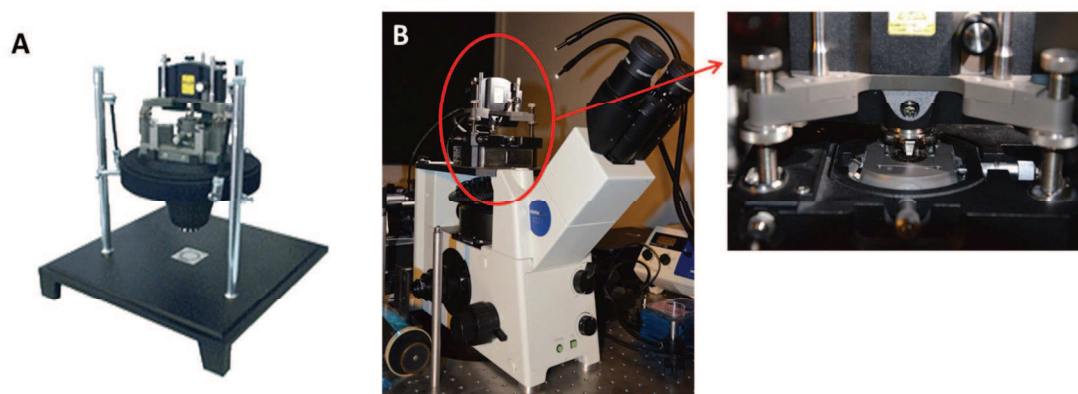


Figure 12 : (A) AFM SolverPro NT-MDT. (B) Statif TIRF Olympus IX71 surmonté de la tête AFM SolverPro NT-MDT.

Résultats

PARTIE 1 :

***Etude de l'interaction de NCp7 avec
des membranes lipidiques modèles en
spectroscopie de fluorescence***

Des études récentes ont établi un modèle d'assemblage qui suggère que le domaine NC de la polyprotéine Gag puisse se trouver en contact avec la membrane plasmique. Ce modèle est fondé sur la possibilité que les domaines MA et NC de Gag puissent tous deux se lier à l'ARNg, conférant à Gag une conformation repliée. Cependant, lorsque MA se lie à l'ARNg, le groupement myristate qui doit se déployer pour s'ancrer dans la membrane, reste séquestré dans la poche hydrophobe de MA. La liaison Gag/MP étant mise en défaut, nous souhaitons évaluer la possibilité que le domaine NC, alors en position favorable pour une liaison à la MP, puisse assister le domaine MA dans le processus de liaison de Gag à la MP. En premier lieu nous avons comparé par microscopie confocale la localisation cellulaire de la polyprotéine Gag sauvage avec celle d'un mutant dont le domaine NC fut délété (Gag Δ NC). L'insertion d'une eGFP en N-terminal du domaine MA de ces deux protéines chimères, nous a permis d'observer qu'à l'inverse de Gag qui est majoritairement localisée au niveau de la MP, Gag Δ NC se trouve diffuse dans le cytoplasme. De plus, l'observation de la localisation membranaire de la NC mature, marquée avec une eGFP, suggère que NC soit capable de se lier à la MP indépendamment de la contribution des autres domaines de Gag.

Ainsi, l'objectif de cette première partie du travail a été de mettre en évidence la liaison de NC aux membranes lipidiques *in vitro*, puis de la caractériser quantitativement par spectroscopie de fluorescence.

Pour que nos résultats ne soient pas perturbés par les autres domaines de Gag, nous avons choisi d'étudier le domaine NC sous sa forme mature. Tout d'abord, nous avons mis en évidence l'interaction NC/membrane en utilisant un peptide synthétisé au laboratoire et des liposomes de composition contrôlée, utilisés comme membranes modèles. Cette interaction a pu être suivie grâce à une sonde fluorescente de la famille des 3-hydroxyflavones (MFL). La sensibilité de cette sonde à la polarité et à l'hydratation de son environnement nous a permis de mettre en évidence la liaison de NC aux membranes lipidiques chargées négativement (composées de DOPS ou de DOPG) et l'absence de liaison aux membranes neutres (composées uniquement de DOPC). Ensuite, en utilisant des LUVs composées de différents rapports DOPC/DOPS, nous avons observé l'apparition de la liaison NC/membrane pour des LUVs constituées d'un minimum de 20% de DOPS. Ce premier résultat met en lumière la capacité de NC à lier les membranes lipidiques dans la mesure où celles-ci contiennent un minimum de 20 % de lipides chargés négativement. Ces résultats sont en adéquation avec la

possibilité d'une liaison de NC au feuillet interne de la MP qui comprend environ 30% de ce type de lipides.

Pour évaluer l'affinité de NC pour les membranes lipidiques, nous avons effectué des titrages de MFL-NC par des liposomes composés de rapport variable de DOPC et de DOPS. Les affinités mesurées de l'ordre du micromolaire ne varient pas pour des proportions de DOPS comprises entre 100% et 30%. Par contre, le nombre de sites de liaison sur chaque LUVs diminue linéairement avec la quantité de DOPS qui la compose, allant de 1500 (± 150) à 380 (± 50) sites pour des LUVs contenant de 100% à 30 % de DOPS, respectivement. Ces données suggèrent que la NC est capable de réorganiser les membranes lipidiques, en recrutant les lipides chargés négativement dans son environnement proche, pour s'y lier. Par comparaison avec le domaine MA de Gag qui interagit spécifiquement avec le PI(4,5)P₂ nous avons également évalué l'influence de ce lipide sur les paramètres de la liaison NC/membrane, en remplaçant 5% de DOPS (sur des LUVs en contenant initialement 30%) par 5% de PI(4,5)P₂. La constante de liaison de la NC pour ces LUVs ne fut pas affectée alors que nous avons observé une augmentation du nombre de sites de liaison. Cette augmentation peut s'expliquer par la présence de 3 charges négatives sur la tête polaire du PI(4,5)P₂ contre une seule pour le DOPS. Ainsi, à cause des charges, un PI(4,5)P₂ remplacerait 3 DOPS indiquant qu'au contraire de MA, NC n'interagit pas préférentiellement avec ce lipide.

En utilisant différentes protéines NC mutantes, notamment au niveau de ses doigts de zinc (NC_{H23C} dont la formation du plateau hydrophobe est inhibée et NC_{SSHs} qui ne possède pas les doigts de zinc) et de l'extrémité N-terminale (NC(11-55), une NC délestée de ses 10 premiers résidus), nous avons également montré que l'interaction NC/membrane est essentiellement de type électrostatique et que la partie N-terminale riche en acides aminés basiques joue un rôle important dans cette liaison.

NC étant généralement liée à des acides nucléiques lors de la réplication du VIH-1, nous avons également étudié la possibilité que les complexes NC/ADN puissent interagir avec des LUVs. La séquence modèle utilisée est la séquence dTAR, l'équivalent ADN de la séquence de transactivation du génome du VIH-1. En utilisant la technique de FRET en solution nous avons mis en évidence l'existence du complexe ternaire NC/ADN/LUV et ainsi montré que les complexes NC/ADN peuvent se lier aux LUVs, chargés négativement. Enfin, par des titrages similaires à ceux effectués dans le cas de la NC libre, nous avons trouvé une constante de liaison des complexes NC/ADN pour les membranes lipidiques du même ordre de

grandeur que celle de la NC libre, avec cependant un nombre de sites de liaison inférieur. Ces données indiquent que les complexes NC/ADN sont également capables de se lier avec une forte affinité aux membranes lipidiques chargées négativement.

Ces données associées à l'hypothèse selon laquelle Gag adopte une forme repliée nous amènent à compléter le modèle d'assemblage précédemment proposé. Lorsque dans la forme repliée de Gag, les domaines NC et MA recrutent et lient l'ARN, le domaine NC se retrouve en position favorable pour une liaison à la membrane plasmique. Alors que le groupement myristate de MA reste séquestré dans sa poche hydrophobe inhibant la liaison de Gag à la MP, nos données suggèrent que le domaine NC de Gag puisse interagir avec la membrane plasmique et recruter les lipides, tels que le DOPS et le PI(4,5)P₂. Par la suite, le PI(4,5)P₂ serait capable de promouvoir l'exposition puis l'ancrage du groupement myristate dans la MP. Cet ancrage induirait alors la dissociation de la liaison ADN/MA, conduisant au redressement de Gag dans sa conformation allongée, qui est thermodynamiquement plus stable.

MANUSCRIT 1

Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to lipid membranes

Kempf Noémie*, Postupalenko Viktoriia*, Bora Saurabh, El Meshri Salah, Didier Pascal, Arntz Youri, de Rocquigny Hugues, Mély Yves[#]

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Cedex, Fr., 67401 Illkirch, France

*NK and VP equally contributed to this work

Running Head: HIV-1 nucleocapsid binding to lipid membranes

[#]Corresponding author: Yves Mély, yves.mely@unistra.fr, tel: 33368854263

ABSTRACT

The nucleocapsid protein (NC) plays multiples roles in HIV-1 replication, mainly through interactions with nucleic acids. Since deleting or mutating the NC domain of the Gag polyprotein precursor was found to reduce the binding of Gag to the plasma membrane (PM), we hypothesized that NC could also interact with lipid membranes. Using eGFP-labeled Gag proteins and confocal microscopy, we confirmed that deleting the NC domain drastically reduced Gag binding to the PM. We also observed a significant binding of eGFP-labeled mature NC to the PM. To further characterize the binding of NC to membranes, we investigated by fluorescence spectroscopy the binding of a synthetic NC protein fluorescently labeled at its N-terminus to large unilamellar vesicles (LUVs), used as membrane models. We found that NC, either in its free form or bound to an oligonucleotide, was binding with high affinity ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) to negatively charged LUVs, notably to LUVs with a composition that mimics the PM internal leaflet. The number of NC binding sites but not the binding constant, were found to decrease with the percentage of negatively charged lipids in the LUV composition, suggesting that NC and NC/oligonucleotide complexes were able to recruit negatively charged lipids to ensure optimal binding. Moreover, in contrast to the matrix protein, NC did not exhibit a preference for phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. These findings lead us to propose a new HIV-1 assembly model where the NC domain participates in the initial binding of the bent form of Gag to the inner leaflet of the PM.

INTRODUCTION

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein (NC) is a small basic nucleic acid binding protein with two strictly conserved zinc fingers that strongly bind zinc (1). The mature NC protein results from the cleavage of the Gag polyprotein, and is critically involved in HIV-1 replication (2–5). During the early steps, NC acts as a cofactor of the reverse transcriptase (RT), to promote the initiation of reverse transcription (6–8), as well as the two obligatory strand transfers (9, 10). Moreover, NC also reduces RT pauses at the initiation step (11–13), increases the overall RT processivity (14, 15), promotes synthesis through pause sites (16–19), helps removing the RNA fragments resulting from the RT RNaseH activity (20) and may contribute to the protection of the viral DNA (vDNA) during its transport to the nucleus (21). Therefore, NC is thought to play a central role in the production of full length vDNA, as well as in its integration into the host cell genome (22–25). The late steps of the viral life cycle are mainly driven by the Gag polyproteins, composed of four major structural domains, namely the matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC) and p6. While the MA domain (26) is essential for efficient binding to the assembly sites at the inner leaflet of the plasma membrane (PM), through a myristoyl group at its N-terminus and a highly basic region (HBR) (27–31), the NC domain recognizes specifically the genomic RNA (gRNA) among the large excess of cellular RNAs. This recognition constitutes a prerequisite for RNA-packaging (32–40) and dimerization (41–43) as well as for proper multimerization of Gag (44–50) in concert with the CA domain.

Deletion of the NC domain of Gag or mutation of all NC basic residues by neutral residues was reported to reduce the binding as well as the multimerization of Gag at the PM (47, 51). This phenotype was observed both when the mutated Gag was expressed alone and when the mutated Gag was expressed with wild-type Gag in the same cell. Though these data could be

a consequence of the binding of the NC domain to genomic RNA, which acts a scaffold to promote Gag-Gag interactions, a non-exclusive hypothesis is that NC may contribute at least transiently to the binding of the Gag protein to the PM. In support of this hypothesis, in their non membrane-bound forms, Gag proteins bound to gRNA were suggested to adopt a bent conformation (52–54) with both MA and NC interacting with gRNA (55–59). Moreover, in the absence of gRNA, recombinant Gag proteins were shown to bind in their bent form to negatively charged model membranes, suggesting that in addition to the MA domain, the NC domain may bind to membranes through electrostatic interactions. Interestingly, gRNA has been shown to decrease the affinity of MA for lipid membranes (60, 61). Thus, gRNA may act as a negative regulator of nonspecific membrane binding, likely by reducing the electrostatic interactions of the HBR with acidic lipids and preventing myristate exposure. Only phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂), a phosphatidylinositol phosphate which is abundant on the cytoplasmic leaflet of the PM can outcompete gRNA and thus, favor the anchoring of the myristate onto the membrane (62) and the strong electrostatic interaction of the HBR with negatively charged phospholipids (60, 63). Moreover, dissociation of the MA domain from gRNA driven by the interaction with PI(4,5)P₂ is thought to promote the trimerization of Gag, as well as its switch from its bent to its rod-shaped conformation, observed in immature and mature viruses (64–66).

In this context, as gRNA decreases the affinity of MA for the membrane, it can be reasonably hypothesized that the NC domain participates at least transiently, together with MA, to the binding of the Gag/gRNA complex to the PM. In order to further evidence and characterize the possible interaction of the NC domain with lipid membranes, we comparatively reinvestigated by microscopy techniques the assembly of wild-type and NC-deleted Gag proteins in cells. Furthermore, this interaction was also monitored by using eGFP-labeled NC proteins overexpressed in cells. Finally, to more directly and quantitatively address the

interaction of the NC domain with membranes, we monitored the interaction of the NC protein in its free form and in complex with nucleic acids, with model membranes, using a combination of fluorescence spectroscopy techniques. Taken together, our data confirmed that deletion of NC in the Gag polyprotein dramatically reduced the binding of Gag at the PM. Moreover, a significant binding of eGFP-labeled NC presumably at the PM was also observed. Furthermore, NC in its free form as well as in its complexes with nucleic acids was found to bind with high affinity ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) to negatively charged large unilamellar vesicles (LUVs), taken as lipid membrane models. Moreover, by changing the ratio of neutral to negatively charged lipids in LUVs, the number of binding sites but not the binding affinity for NC was decreased, suggesting that NC can recruit negatively charged lipids to optimize its binding. However, in contrast to MA, no preferential binding was observed for NC to (PI(4,5)P₂). Based on our data, we derived a new HIV-1 assembly model, in which the NC domain participates in the initial binding events of Gag to the inner leaflet of the PM.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All chemicals and solvents for spectroscopic measurements were from Sigma-Aldrich. Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), dioleoylphosphatidylserine (DOPS), dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) were from Sigma-Aldrich and Rhodamine-DOPE (Rh-DOPE) was purchased at Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). The concentration of phospholipid stock solutions in chloroform was determined by dry weight. The HIV-1 non-labeled dTAR sequence and dTAR labeled with a fluorescein at its 3'-end were synthesized and HPLC-purified by IBA GmbH (Germany). The concentrations of dTAR were calculated from their absorbance measured with a Cary 400 spectrophotometer (Varian), using a molar extinction coefficient at 260 nm of 515,070 L·mol⁻¹·cm⁻¹ and at 488 nm of 80,000 L·mol⁻¹·cm⁻¹ for dTAR and dTAR-FAM, respectively.

Preparation of peptides and plasmids

NC peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis on a 433A synthesizer (ABI, Foster City, CA), HPLC purified and characterized by ion spray mass spectrometry, as previously described (67, 68). The MFL probe, a functionalized derivative of 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone was prepared and coupled to the N-terminus of NC peptides, as previously described (69). The lissamine rhodamine dye (LRh) was synthesized as described (70) and coupled to the N-terminus of the NC peptides the same way as MFL probe. To get the zinc-bound form of the peptides, 2.2 molar equivalents of ZnSO₄ were added to the peptide and pH was raised to 7.4. Noticeably, in case of MFL-labeled peptides, a

large excess of Zn^{2+} ions should be avoided since this ion could affect its fluorescence. Peptide concentration was determined using an extinction coefficient of $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280 nm for non-labeled peptides, $33000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 400 nm for the MFL-labeled peptides, and $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 555 nm for LRh-labeled NC. Noticeably, the nucleic acid chaperone properties (68, 71, 72) of the labelled NC peptide were found to be close to those of the native NC, indicating that the MFL label marginally perturbs the peptide structure and activity (Fig. A1 and A2).

The human-codon-optimized Gag-TC encoding plasmid and pNL4-3^{EGFP} were kindly provided by David E. Ott (National Cancer Institute at Frederick, Maryland) and B Muller (Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Germany. (73, 74). The pNL4-3^{EGFP} plasmid was used to PCR amplify the sequence encoding for Gag-eGFP as previously described (75, 76). The DNA product was inserted in pcDNA under the control of the CMV promoter. Both Gag Δ NC and Gag Δ NC-eGFP mutants, where the full NC domain was deleted, were constructed by PCR based site-directed mutagenesis following the supplier's protocol using Gag-eGFP or Gag-TC as substrate (Stratagene). The mature NC protein was amplified from the human-codon-optimized Gag-TC encoding plasmid kindly provided by David E. Ott. Primers used are available on request. To allow NC-eGFP expression in mammalian cells, the DNA product was inserted in pcDNA3-eGFP from Addgene (ref 13031). Plasmid was amplified after transformation of DH5alpha and purified following supplier recommendations (NucleoBond Xtra Midi Plus, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). The cDNA sequence was controlled by DNA sequencing and correct expression of NC protein was verified by western blot using anti-eGFP (ab184601) and anti-NC antibodies (from R Gorelick (77)).

Preparation of large unilamellar vesicles

Large unilamellar vesicles (LUVs) as well as LUVs labeled with 1% of Rh-DOPE (LUVs-Rh), were obtained by extruding a suspension of multilamellar vesicles with a Lipex Biomembranes extruder (Vancouver, Canada) (78). The size of the filters was first 0.2 μm (7 passages) and thereafter 0.1 μm (10 passages). This protocol leads to monodisperse LUVs with a mean diameter of 0.11 μm , as measured by dynamic light scattering (DLS), with a Malvern Zetamaster 300 (Malvern, UK).

Cell cultures

HeLa cells were cultured on 18 mm diameter coverslips inserted in tissue culture testplates (Orange Scientific, Belgium). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France) and a 1% antibiotic mixture (penicillin-streptomycin; Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France) at 37°C and a 5% CO₂ atmosphere. HeLa cells (10⁵) were transfected either by 1 μg of plasmid expressing NC-eGFP or by a mixture of 0.1 μg of plasmid expressing Gag-eGFP, and 0.3 μg of plasmid expressing Gag, in the presence of JetPEI (PolyPlus; Illkirch, France) according to the supplier recommendations. Before observation by microscopy, cells were fixed for 15 min with paraformaldehyde 4%.

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra were recorded at 20°C on a FluoroMax or Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer equipped with a thermostated cuvette holder. All spectra were corrected for the emission of the corresponding blank solution (neat solvent, lipid vesicles).

Quantum yields were calculated, using 4'-(dialkylamino)-3-hydroxyflavone in ethanol (QY = 0.52 (79)), as a reference. To calculate the insertion depth of the MFL label in the lipid bilayer when the MFL-labeled NC peptides are bound to LUVs, the parallax quenching method was used, as described (80–82). To determine the NC/LUV binding parameters, 0.1 μ M of MFL-NC was titrated with increasing concentrations of LUVs at 20°C. To determine the binding parameters of the MFL-NC/dTAR (3:1) complexes to LUVs, the complexes were prepared first by mixing 0.1 μ M of MFL-NC with 33 nM of dTAR, and then titrated with increasing concentrations of LUVs at 20°C. To further demonstrate the interaction between the binding partners in the ternary complexes NC/dTAR/LUVs, FRET experiments were performed in solution. The interactions between the partners were monitored two at time, so that three combinations were used, namely MFL-NC with LUVs-Rh, dTAR-FAM with LRh-NC and dTAR-FAM with LUVs-Rh. The NC/dTAR (3:1) complexes (0.3 μ M of NC added to 0.1 μ M of dTAR) were prepared first and then added to an equivalent volume of a LUVs solution (100 μ M in lipid concentration). Excitation wavelengths were 400 nm and 480 nm for MFL-NC and dTAR-FAM, respectively. To calculate the vesicle concentration, the extended radius of the vesicles (R) was considered to be 535 Å, as determined by DLS measurements. The thickness of the lipid bilayer (t) and the average lipid density (d) were assumed to be 40 Å and 70 Å²/lipid, respectively (83). The number of lipids per vesicle was determined as $N = 4\pi(R^2 + (R-t)^2)/d = 9.54 \times 10^4$ lipids/vesicle, so that the vesicle concentration corresponds to: $C(\text{vesicles}) = C(\text{lipids})/N$.

Confocal fluorescence microscop

Fluorescence confocal images of eGFP-labeled Gag or NC proteins in fixed cells were taken using a confocal microscope (TSC-SPE, Leica) equipped with a HXCPL APO 63×/1.40 oil

immersion objective and a 488 nm laser diode. Emission was recorded at 500-555 nm using a diffracting prism. The images were analyzed by imageJ.

RESULTS

Involvement of the Gag NC domain in the association of Gag to the plasma membrane

To address the question whether NC might contribute to the binding of Gag polyprotein to the PM, we first reinvestigated the intracellular localization of Gag with and without the NC domain. To that end, a mixture (0.4 μ g/0.1 μ g) of plasmids coding for wild-type Gag and Gag with eGFP downstream to the MA domain was used to transfect cells in conditions shown to generate infectious viral particles (47, 75, 84–86). Representative images are given in Figure 1. In agreement with published data (84), Gag-eGFP was found to mainly stain the PM together with a faint diffuse localization in the cytoplasm (Fig. 1A). Deletion of the NC domain in both Gag and Gag-eGFP resulted in a markedly different staining pattern with an increase of fluorescence in the cytoplasm and only a limited accumulation of the mutant Gag at the PM (Fig. 1B). Moreover, this PM accumulation of Gag was mainly in the form of patches rather than the thin PM delineation observed with the wild-type Gag, further indicating that NC deletion not only reduces Gag accumulation at the PM, but also changes the Gag assembly process (51, 87). Thus, these data suggest a possible role of the NC domain in the binding of Gag to the PM, but they do not allow discriminating whether the NC domain may directly be involved through a transient binding to the PM or indirectly through its ability to bind the gRNA and scaffold the Gag-Gag interactions.

To directly check a possible binding of NC to the PM avoiding the contribution of the other Gag domains, NC was expressed in the form of a NC-eGFP fusion protein and its localization

in HeLa cells was studied in parallel with that of eGFP. This approach is thought to be straightforward since the structure and properties of the NC domain of Gag are likely similar to those of the isolated NC protein (88–90). While eGFP appears homogeneously distributed in all cell compartments (Fig. 1E), a more heterogeneous distribution was observed for NC-eGFP with a preferential localization in the nucleoli and the cytoplasm (Fig. 1C). Interestingly, in cells showing a moderate expression of NC-eGFP, so that the full cytoplasm was not homogeneously stained and allowed a possible contrast with the PM, a clear delineation of the PM due to an accumulation of NC-eGFP was observed as with Gag-eGFP (Fig. 1D). Such a clear localization of NC at the PM was found to be independent of the position of the fluorescent protein at the N- or C- terminus, and the nature of the fluorescent protein (mCherry or eGFP) as well as on the fixation protocol (data not shown). Thus, the NC-eGFP data suggest a direct binding of NC to the PM, giving further credit to the hypothesis of a possible role for the binding of the Gag NC domain to the PM during assembly.

Binding of NC to model membranes and the involvement of negatively charged lipids

To further evidence and characterize the binding of NC to membranes, we investigated the binding of a synthetic NC protein covalently labeled at its N-terminus by MFL (69, 91), an environment sensitive probe of the 3-hydroxyflavone family (Fig. 2A), to large unilamellar vesicles (LUVs) of 100 nm in diameter, used as a stable membrane model. Due to an excited-state intra-molecular proton transfer reaction, the MFL probe is characterized by two excited state species, namely the normal and tautomeric forms (N^* and T^*), showing two well separated emission bands, differently sensitive to the polarity and hydration of the probe environment (69, 79, 92).

While the labelled NC showed a single emission band similar to that of the free MFL label in water (69) (Fig. 2B), negatively charged LUVs, composed of either DOPS or DOPG phospholipids added at a molar ratio of 400 lipids per MFL-NC peptide, induced a dual emission (Fig. 2B) with a strongly increased quantum yield (Table A1). These large changes in the MFL emission can be ascribed to the transfer of the MFL-probe from the polar environment of the buffer to the aprotic environment of the hydrophobic membrane. These results clearly show that the MFL-NC peptide binds to negatively charged LUVs, irrespective of the nature of the negatively charged phospholipid. In sharp contrast, neutral DOPC LUVs did not significantly affect the MFL-NC fluorescence spectrum (Fig. 2B), suggesting that NC does not bind to neutral lipid vesicles. To further analyze the dependence of NC binding to LUVs on the presence of negatively charged lipids, we systematically increased the molar fraction of DOPS into DOPC LUVs and monitored the binding of these LUVs to MFL-NC through the changes in the probe fluorescence intensity (Fig. 2C). While no change in MFL intensity was observed with a molar fraction of 10%, a sharp increase was observed when the molar ratio was increased from 20 to 60 mol%, where a plateau was reached. This unambiguously indicated that the binding of the positively charged NC protein to these LUVs is driven by likely electrostatic interactions with the negatively charged lipids. This conclusion is further substantiated by the strong analogy of MFL-NC with MFL-labeled poly-L-lysine that was reported to bind through electrostatic interactions to negatively charged LUVs and induce similar changes in MFL fluorescence parameters (69). Interestingly, LUVs having a lipid composition DOPC:DOPE:DOPS:SM:PI(4,5)P₂ in a ratio of 16:46:25:8:5 (mole % of lipids) that mimics the composition of the inner leaflet of the plasma membrane (ILPM) (93) led to changes in the MFL-NC spectrum, close to those observed upon addition of negatively charged LUVs (Fig. 2B). The only difference with pure DOPS LUVs is the somewhat lower quantum yield observed with the ILPM LUVs, likely due to their lower

content (30%) in negatively charged lipids. Thus, in line with the microscopy images (Fig. 1D), the present data indicate that NC can bind to the inner leaflet of the PM mainly by interacting with negatively charged lipids.

Determination of NC binding parameters to lipid membranes

To further characterize the interaction of NC with lipid membranes, we titrated MLF-NC by increasing concentrations of LUVs with different lipid compositions, in order to determine its binding parameters (Fig. 3A). To fit the binding curves, we first used an equation that considers the binding of NC to lipid bilayers to be governed by a molar partition coefficient K_m :

$$\frac{[P_m]}{[P_t]} = \frac{(I - I_0)}{(I_f - I_0)} = \frac{K_m[L]}{1 + K_m[L]} \quad (1)$$

where P_m and P_t are the concentrations of protein bound to the membrane and total protein, respectively, I_0 , I and I_f are the fluorescence intensities in the absence and in the presence of a given and a saturating lipid concentration. Assuming that only the lipids at the external surface of the vesicles are accessible to NC and that the concentration of bound NC is negligible as compared to the concentration of accessible lipids, it can be approximated that the concentration of free lipids $[L] = L_t/2$, where L_t is the total concentration of lipids. Using this approximation, eq. 1 was used to fit the binding curves of MA to lipid bilayers (94, 95). Using the same equation, we found that the K_m value of NC for DOPS LUVs was $4.5(\pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Table A2) and was thus, close to the affinity ($3.5(\pm 1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) reported for the binding of MA to POPS LUVs (96). Importantly, due to this rather high affinity, it is likely that the concentration of bound peptide may not be negligible in comparison to L_t , especially for the first points of the titration, so that the approximation $[L] = L_t/2$ is not fully

valid. Moreover, eq. 1 is formally equivalent to a classical Scatchard equation for a protein/ligand interaction with a one to one stoichiometry (97, 98). Due to its multiple charges and its large area as compared to that of lipid head groups, it is unlikely that NC binds to only one lipid in a LUV. As a consequence, since the vesicles are the real entities that bind NC with a limited number n of binding sites and a K_{app} binding constant, we used a modified Scatchard equation for independent and equivalent binding sites where we made no approximation on the concentration of the free species and where we directly fitted the fluorescence intensities of the labeled proteins:

$$I = I_0 - \frac{(I_0 - I_f)}{P_t} \times \frac{(1 + (P_t + nL_t)K_{app}) - \sqrt{(1 + (P_t + nL_t)K_{app})^2 - 4P_t nL_t K_{app}^2}}{2K_{app}} \quad (2)$$

where L_t is the total concentration of LUVs, calculated as indicated in Materials and Methods. The number of binding sites n was determined from the intercept of the tangent to the initial points of the curve with the tangent to the plateau value (Fig. 3A, inset). For DOPS LUVs, we obtained a binding stoichiometry of 1500 (± 150) protein molecules per LUV, which corresponds to about 29 (± 3) lipids per NC molecule. By taking $70 \text{ \AA}^2$ as the surface of a lipid, each peptide occupies thus about 20 nm^2 on the vesicle surface, in reasonable agreement with the about 4 nm^2 area calculated from the largest section ($3.2 \times 1.5 \text{ nm}$) of the 3D structure of NC (PDB 1ESK). Using the stoichiometry value obtained from Figure 3A, we then determined by fitting the binding curves with eq. 2, a K_{app} value of $3.9 (\pm 0.9) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 3B, Table A2) for each NC binding site on the DOPS vesicles. As this K_{app} value was obtained through the same formalism as that applied for the binding of NC to nucleic acids (99, 100), a direct comparison is thus possible and shows that the affinity of NC for negatively charged lipids is of the same order than the affinity of NC to its preferential binding sites on nucleic acids (Darlix et al, 2011).

Interestingly, addition of increasing proportions of DOPC to DOPS LUVs was found to sharply decrease the number of NC binding sites per LUV to 920 (± 50) and 470 (± 95) for DOPC:DOPS (40:60) and DOPC:DOPS (60:40), respectively (Fig. 3B). In contrast, the binding affinities were only slightly affected, since we observed only a two-fold decrease between pure DOPS LUVs and DOPC:DOPS (60:40) LUVs, which corresponds to a negligible change of the binding energy ($< 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Using ILPM LUVs, we found an affinity and a number of NC binding sites close to that of DOPC:DOPS (60:40) LUVs, though the ILPM contain only 30% of negatively charged lipids. As ILPM LUVs contain 5% of PI(4,5)P₂, which are characterized by 3 negative charges vs only one for DOPS, one PI(4,5)P₂ molecule may be equivalent to 3 DOPS molecules in the binding process. Therefore, the real percentage of negative charges would be 40%, which would explain the similarities with the DOPC:DOPS (60:40) composition. To confirm this hypothesis, we substituted the 5% of PI(4,5)P₂ in the ILPM composition by 5% of DOPS, so that the total percentage of DOPS becomes 30%. The number of binding sites decreased to 380 (± 50) NC/LUV with no significant change in the binding affinity, confirming that each PI(4,5)P₂ molecule can substitute 3 DOPS molecules for the binding of NC. Moreover, from the negligible changes in the K_{app} values accompanying the replacement of PI(4,5)P₂ by DOPS, it may be further concluded that in contrast to the MA (94), NC does not show a preferential binding for PI(4,5)P₂. Importantly, together with the limited changes in the K_{app} values, a linear correlation was observed between the number of binding sites and the percentage of negatively charged lipids in the LUVs (Fig. 3B, inset), strongly suggesting that NC is able to recruit negatively charged lipids to ensure its strong binding to the LUVs.

Taken together, our binding data clearly indicate that NC binds with high affinity to the lipid membrane, giving further credit to the hypothesis of the binding of the NC domain of Gag to the PM.

Determinants of NC binding to lipid membranes

In order to determine which regions of NC are instrumental for its binding to membranes, we used three NC mutants (Fig. 4A). The role of the poorly folded and basic N-terminal (1-10) domain was evaluated with the NC(11-55) derivative. The role of the folded zinc finger domain which is critical for a number of NC functions (5, 99, 101–103) was evaluated with the NC_{SSHs} mutant, where all cysteine residues were replaced by serines to prevent the coordination of zinc ions and thus, the folding of the fingers (10). Finally, to check the contribution of the hydrophobic plateau at the top of the folded finger motifs, we used the NC_{H23C} mutant where the His23 residue is replaced by a Cys residue. This substitution induces a misfolding of the proximal finger motif that prevents the formation of the hydrophobic plateau (104).

To monitor their interaction with LUVs, all mutated peptides were N-terminally labeled with the MFL-probe. As for the labeled native NC, addition of negatively charged LUVs to all labeled mutants induced a two band emission and strongly increased their quantum yield, indicating that all peptides are able to bind to these LUVs (Fig. 4B and Table A3). Interestingly, the N*/T* ratio values were significantly lower with the NC_{H23C} (red spectrum) and NC_{SSHs} (blue spectrum) mutants as compared to the native protein, indicating that the MFL probe linked to the amino acid at position 1 experienced a less polar environment in the mutated peptides than in the native NC, when they are bound to LUVs. This suggests that the position of the (1-10) domain of NC on LUVs depends on the proper folding of the fingers. In contrast, the fluorescence parameters of the labeled NC(11-55) peptide were indistinguishable from those of MFL-NC, indicating that the amino acid at position 11 in NC(11-55) and the amino acid at position 1 in NC experience similar environment at the membrane.

To further determine the localization of the probe for the labeled peptides bound to the membrane, parallax measurements were performed to determine the depth of the label in the bilayer (69). Using DOPC:DOPS (40:60) vesicles, we obtained average depths of 16.2-17.7 Å from the center of bilayer for the MFL-NC peptide and its three labeled mutants (Table A4). These depths pointed to a shallow location of the probe close to the lipid head groups for all four peptides. However, the accuracy of this technique was not good enough to evidence binding depth differences that could explain the differences in the N*/T* ratio values observed for the NC_{H23C} and NC_{SSHs} mutants as compared to the native protein.

Next, we compared the binding of the four labeled peptides to LUVs containing increasing molar fractions of negatively charged lipids (Fig. 4C). The binding of all tested NC mutants to LUVs was found to be strongly dependent on the percentage of negatively charged lipids. Interestingly, as for the native NC, an optimal binding for the NC_{H23C} and NC_{SSHs} peptides was reached with LUVs containing 60% of negatively charged lipids. In contrast, NC₁₁₋₅₅ needs higher percentages of negatively charged lipids, suggesting that it likely binds to LUVs with a lower affinity. By investigating the binding parameters of the mutant peptides to DOPC:DOPS (40:60) LUVs, we found that the MFL-labeled NC, NC_{H23C} and NC_{SSHs} showed nearly indistinguishable binding parameters. This indicates that the proper folding of the zinc fingers, as well as the hydrophobic plateau at the top of the folded fingers is not critical for the interaction of NC with the lipids. Nevertheless, the differences in polarity of the MFL probe observed in Figure 4B suggest that the properly folded fingers may control the position of the N-terminal domain of NC on the membrane. Moreover, as the binding is thought to be mainly electrostatic, it can be speculated from our data that the numerous positively charged aminoacids distributed along the NC sequence indifferently intervene in the binding to the lipids, so that their number is more important than their localization in the sequence. In

agreement with this conclusion, NC(11-55) that contains three basic residues less than NC shows a more than 10-fold decrease in its binding constant (Fig. 4D and E).

Binding properties of NC/DNA complexes to lipid membranes

Since NC either in its mature form or as Gag domain is probably associated to nucleic acids throughout the viral life cycle (105), we further investigated the possible binding of NC/nucleic acid complexes to lipid membranes. As a model of nucleic acid sequence, we used the dTAR 55 nt sequence corresponding to the DNA version of the transactivation response element of the HIV-1 genome. To evidence the binding of the NC/dTAR (3:1) complexes to lipid membranes, we first performed FRET experiments, by monitoring the interactions between the partners two at time. As we have three partners, the FRET efficiencies of the three combinations of two labeled partners were determined in the presence or the absence of the third non-labeled partner. As both the interactions of NC with LUVs (this work) and with nucleic acids (99, 106, 107) are dependent on electrostatic interactions, we systematically investigated the FRET efficiencies at two salt concentrations (30 mM and 150 mM NaCl) (Table 1). For the interaction between MFL-NC and DOPS LUVs labeled by 1% of Rh-DOPE (LUV-Rh), we observed a strong FRET efficiency (83-90%) that was only marginally affected by the addition of non-labeled dTAR or by the salt concentration. These data clearly indicate that NC is largely bound to LUVs both in the absence or presence of dTAR, being close enough to the Rh-DOPE molecules to give a high FRET efficiency. Thus, dTAR does not significantly outcompete NC from the LUVs to form binary dTAR/NC complexes. Next, we monitored the FRET efficiency of dTAR labeled with fluorescein at its 3'-end (dTAR-FAM) to LUV-Rh in the absence and the presence of non-labeled NC. As expected, due to the inability of negatively charged oligonucleotides to bind to negatively

charged lipid vesicles (108), we do not observe any FRET in the absence of NC. In contrast, a significant FRET efficiency (9% at 150 mM NaCl and 27% at 30 mM NaCl) was observed when NC was added, indicating the formation of ternary NC/dTAR/LUV complexes. Finally, we observed a strong FRET efficiency (> 70%) between dTAR-FAM and NC labeled at its N-terminus by Rhodamine (LRh-NC) in the binary NC/dTAR complex. Addition of non-labeled LUVs to the Rh-NC/dTAR-FAM was found to preserve a good FRET efficiency (37% at 150 mM NaCl and 62% at 30 mM NaCl). Taken together with the high FRET efficiency between MFL-NC and LUV-Rh in the presence of dTAR, the high FRET efficiency between dTAR-FAM and LRh-NC in the presence of LUV unambiguously confirmed the formation of NC/dTAR/LUV ternary complexes. Noticeably, the lower FRET efficiencies observed for dTAR-FAM/LUV-Rh and dTAR-FAM/LRh-NC in the ternary mixtures at 150 mM NaCl as compared to 30 mM NaCl, suggest that less dTAR molecules may be bound to LUVs probably as a consequence of a lower coating of dTAR by NC molecules at the highest salt concentration. Alternatively, it cannot be excluded that the two salt concentrations induce different conformations of the NC/dTAR complexes bound to LUVs.

Next, we determined the binding parameters of the MFL-NC/dTAR complexes to LUVs of various compositions (DOPS, DOPC:DOPS (40:60) and ILPM) by titrating the complexes with increasing concentrations of LUVs in 20 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4 (Fig. 5A). For all three compositions of LUVs, the binding constants of the NC/dTAR complexes were found to be similar to those of NC, but with a lower number of binding sites as expected from the increased size of the NC/dTAR complexes in respect to free NC proteins (Fig. 5B). The reduction in the number of binding sites was the lowest for DOPS (20%) and the highest for ILPM (45%). Since, by analogy with free NC, only the number of binding sites, but not the value of the binding constant of the NC/dTAR complexes for the LUVs was

found to vary with the percentage of negatively charged lipids, it may be concluded that the complexes can also recruit negatively charged lipids in LUVs to optimize their binding.

Taken together, our data clearly indicate that the complexes of NC with nucleic acids can bind with high affinity to negatively charged lipid membranes, strengthening the hypothesis that the NC domain of Gag may interact with the inner leaflet of the PM and thus participate to the binding of Gag proteins to the PM.

DISCUSSION

The aim of the present work was to validate lipid membranes as a new binding platform for the nucleocapsid protein NC of HIV-1. Though the hypothesis of the binding of NC as a domain of Gag to membranes has already been evoked (57, 58, 87), a clear demonstration and characterization of this binding was still missing. We first confirmed by confocal microscopy that deletion of the NC domain of Gag markedly reduced the binding of Gag to the PM (51, 87). However, since NC also binds to the genomic or host RNAs that act to scaffold the Gag-Gag interactions needed for Gag assembly, no clear conclusion could be drawn on the possible binding of NC to the PM. Therefore, to more directly evidence the possible binding of NC to the PM and avoid any interference from the other Gag domains, we used the mature NC in the remaining part of the study. Interestingly, eGFP-labeled NC was found to decorate the PM of HeLa cells (Fig. 1D), but due to the limited resolution of optical microscopes, it was not possible to unambiguously demonstrate a direct binding of NC to the PM.

A more direct evidence was obtained by monitoring the binding of fluorescently labeled synthetic NC to LUVs of different lipid compositions, taken as model membranes. Our data clearly show that free NC or in a complex with an oligonucleotide binds with strong affinity to negatively charged LUVs, but not to neutral ones. This ability of NC to bind negatively

charged membranes is typical of proteins with domains rich in basic amino-acids that bind to the internal leaflet of the PM (109). The NC/membrane interaction is thought to be mostly electrostatic, which was confirmed by the analysis of the binding of NC mutants to LUVs. Importantly, while the number of binding sites was found to decrease with the percentage of negatively charged lipids in the LUV composition, the binding constant value was nearly independent on this percentage, suggesting that NC and NC-oligonucleotide complexes can recruit negatively charged lipids to ensure optimal binding. This possible recruitment of negatively charged lipids by NC is in line with the recent hypothesis that Gag multimerization at the PM could induce the formation of acidic lipid-enriched microdomains (ALEM) (110).

Importantly, the binding constant of NC to negatively charged lipids is close to the binding constants of unmyristylated retroviral MA and Gag to DOPS-containing LUVs (94, 96), which are mainly governed by electrostatic interactions, involving notably the HBR domain of MA (58, 59, 95, 110). However, in sharp contrast to the myristylated MA domain of Gag (62, 94, 111) which binds avidly and specifically to PI(4,5)P₂ through a hydrophobic interaction with the myristyl chain after its switch from the MA core to the PM, no specific binding was found for NC which binds PI(4,5)P₂, mainly through its three negative charges. Therefore, it is highly likely that the affinity of NC for negatively charged lipids is substantially lower than the final affinity of the myristylated MA domain for PI(4,5)P₂, after the myristyl switch. This conclusion is substantiated by the fact that mutation of the N-terminal glycine of the MA domain of Gag, to which the myristate is attached, prevents Gag-membrane association (27, 28, 112).

Another major difference between the MA and NC domains is related to the competition of gRNA and lipids for their binding. Indeed, the binding of PI(4,5)P₂ to MA was shown to decrease the affinity of MA for nucleic acids, so that gRNA is dissociated from the

myristylated MA specifically bound to the PM (60, 63). In contrast, our binding data (compare ILPM and DOPC:DOPS in Figure 5B) clearly confirm that PI(4,5)P₂ did not compete effectively for nucleic acid binding to the NC domain of Gag (57), so that Gag may remain bound to gRNA through its NC domain. These thermodynamic differences between the stability of the different complexes together with the ability of NC and NC/nucleic acid complexes to bind to negatively charged lipid membranes, lead us to propose a new HIV-1 assembly model where the NC domain of Gag participates in the binding of Gag to the PM (Fig. 6). This model is an extension of a previous one proposed by Chukkapalli et al. (60) (for reviews (58, 59)). As a starting point, the NC and MA domains of Gag are thought to recruit the gRNA (Fig. 6, step a), inducing a conformational change of Gag that leads to a bent conformation (36, 54, 58, 60, 61, 65, 66, 113). In this step, the binding of gRNA is thought to be mediated by the HBR domain of Gag (60, 114), while the myristyl group is still buried within the MA protein core. Then, based on our demonstration that NC bound to a nucleic acid can interact with negatively charged membranes (Fig. 5), the Gag-gRNA complex in its bent conformation possibly binds through both its MA and NC domains to the cytoplasmic leaflet of the PM (Fig. 6, step b). Interestingly, a compact bent Gag was also observed in the presence of membranes only (65), strengthening our hypothesis that NC in the context of Gag can bind to lipid membranes. Next, to optimize its interaction with the PM, the gRNA-bound NC domain is thought to recruit negatively charged phospholipids, and notably PI(4,5)P₂, in order to form an ALEM (Fig. 6, step c). This NC-induced recruitment of ALEM is fully consistent with the previously reported ability of the NC domain of Gag to accelerate and stabilize the binding of Gag to cellular membranes (115). The recruited PI(4,5)P₂ may then dissociate the MA domain from the gRNA and promote the exposure of the myristyl group that is needed to further anchor the MA domain to the PM (Fig. 6, step d). Following the dissociation of the gRNA from the MA domain, the binding energy of the NC-gRNA complex

to the PM is probably not sufficient to maintain the bent conformation of Gag, so that the NC-gRNA complex dissociates from the membrane, allowing Gag to adopt the extended rod-shape conformation (Fig.6, step e) found in immature viral particles (116, 117). This model suggests that the initial steps of HIV-1 assembly likely result from a succession of binding events involving the MA and NC domains of Gag, the genomic RNA and the PM. These binding events and their resulting conformational changes control both, kinetically and thermodynamically, the specificity of the assembly steps. The proposed role of the NC domain in the binding of Gag to the PM may well explain the large decrease in the accumulation of Gag at the PM, when the NC domain was deleted (Fig. 1B and (51)). Furthermore, the proposed generation only at the PM of the extended rod-shape conformation prone to HIV-1 assembly may also well explain why HIV-1 assembly essentially occurs at the PM (118–121).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work and V.P. were supported by ANR Fluoquant. This work was also supported by the ANR Femtostack and the European Project THINPAD “Targeting the HIV-1 Nucleocapsid Protein to fight Antiretroviral Drug Resistance” (FP7 – Grant Agreement 601969). N.K. was supported by a fellowship from the French Ministère de la Recherche. We thank Andrey Klymchenko for providing the MFL probe and useful discussion. We are also indebted to Jean-Luc Darlix for critical reading of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

BIBLIOGRAPHY

1. **Mély Y, De Rocquigny H, Morellet N, Roques BP, Gérard D.** 1996. Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* **35**:5175–5182.
2. **Thomas JA, Gorelick RJ.** 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* **134**:39–63.
3. **Adamson CS, Freed EO.** 2007. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly, Release, and Maturation, p. 347–387. In *HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis Viral Mechanisms*, Second Edition. Academic Press.
4. **Levin JG, Mitra M, Mascarenhas A, Musier-Forsyth K.** 2010. Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol* **7**:754–774.
5. **Muriaux D, Darlix J-L.** 2010. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* **7**:744–753.
6. **Barraud P, Gaudin C, Dardel F, Tisné C.** 2007. New insights into the formation of HIV-1 reverse transcription initiation complex. *Biochimie* **89**:1204–1210.
7. **Hargittai MRS, Gorelick RJ, Rouzina I, Musier-Forsyth K.** 2004. Mechanistic Insights into the Kinetics of HIV-1 Nucleocapsid Protein-facilitated tRNA Annealing to the Primer Binding Site. *J. Mol. Biol.* **337**:951–968.
8. **Li X, Quan Y, Arts EJ, Li Z, Preston BD, De Rocquigny H, Roques BP, Darlix JL, Kleiman L, Parniak MA, Wainberg MA.** 1996. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein (NCp7) Directs Specific Initiation of Minus-Strand DNA Synthesis Primed by Human tRNA(Lys3) *in vitro*: Studies of Viral RNA Molecules Mutated in Regions That Flank the Primer Binding Site. *J. Virol.* **70**:4996–5004.
9. **Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA.** 2008. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res.* **134**:19–38.
10. **Guo J, Wu T, Anderson J, Kane BF, Johnson DG, Gorelick RJ, Henderson LE, Levin JG.** 2000. Zinc finger structures in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein facilitate efficient minus- and plus-strand transfer. *J. Virol.* **74**:8980–8988.
11. **Liang C, Rong L, Götte M, Li X, Quan Y, Kleiman L, Wainberg MA.** 1998. Mechanistic studies of early pausing events during initiation of HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* **273**:21309–21315.
12. **Bampi C, Jacquenet S, Lener D, Décimo D, Darlix J-L.** 2004. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1668–1686.
13. **Rong L, Liang C, Hsu M, Guo X, Roques BP, Wainberg MA.** 2001. HIV-1 nucleocapsid protein and the secondary structure of the binary complex formed between tRNA(Lys.3) and viral RNA template play different roles during initiation of (-) strand DNA reverse transcription. *J. Biol. Chem.* **276**:47725–47732.
14. **Bampi C, Bibillo A, Wendeler M, Divita G, Gorelick RJ, Le Grice SFJ, Darlix J-L.** 2006. Nucleotide excision repair and template-independent addition by HIV-1 reverse transcriptase in the presence of nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* **281**:11736–11743.

15. **Grohmann D, Godet J, Mély Y, Darlix J-L, Restle T.** 2008. HIV-1 nucleocapsid traps reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Biochemistry (Mosc.)* **47**:12230–12240.
16. **Wu T, Guo J, Bess J, Henderson LE, Levin JG.** 1999. Molecular requirements for human immunodeficiency virus type 1 plus-strand transfer: analysis in reconstituted and endogenous reverse transcription systems. *J. Virol.* **73**:4794–4805.
17. **Ji X, Klarmann GJ, Preston BD.** 1996. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity *in vitro*. *Biochemistry (Mosc.)* **35**:132–143.
18. **Drummond JE, Mounts P, Gorelick RJ, Casas-Finet JR, Bosche WJ, Henderson LE, Waters DJ, Arthur LO.** 1997. Wild-type and mutant HIV type 1 nucleocapsid proteins increase the proportion of long cDNA transcripts by viral reverse transcriptase. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**:533–543.
19. **Klasens BI, Huthoff HT, Das AT, Jeeninga RE, Berkhout B.** 1999. The effect of template RNA structure on elongation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**:355–370.
20. **Roda RH, Balakrishnan M, Hanson MN, Wöhrle BM, Grice SFJL, Roques BP, Gorelick RJ, Bambara RA.** 2003. Role of the Reverse Transcriptase, Nucleocapsid Protein, and Template Structure in the Two-step Transfer Mechanism in Retroviral Recombination. *J. Biol. Chem.* **278**:31536–31546.
21. **Krishnamoorthy G, Roques B, Darlix J-L, Mély Y.** 2003. DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acids Res.* **31**:5425–5432.
22. **Buckman JS, Bosche WJ, Gorelick RJ.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zn(2+) fingers are required for efficient reverse transcription, initial integration processes, and protection of newly synthesized viral DNA. *J Virol* **77**:1469–80.
23. **Carteau S, Gorelick RJ, Bushman FD.** 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**:6670–9.
24. **Gao K, Gorelick RJ, Johnson DG, Bushman F.** 2003. Cofactors for human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration *in vitro*. *J Virol* **77**:1598–603.
25. **Thomas JA, Gagliardi TD, Alvord WG, Lubomirski M, Bosche WJ, Gorelick RJ.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* **353**:41–51.
26. **Massiah MA, Starich MR, Paschall C, Summers MF, Christensen AM, Sundquist WI.** 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* **244**:198–223.
27. **Bryant M, Ratner L.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:523–527.
28. **Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:5781–5785.

29. **Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556–2569.
30. **Yuan X, Yu X, Lee TH, Essex M.** 1993. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J. Virol.* **67**:6387–6394.
31. **Ono A, Orenstein JM, Freed EO.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* **74**:2855–2866.
32. **Aldovini A, Young RA.** 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.
33. **Cimarelli A, Sandin S, Höglund S, Luban J.** 2000. Basic Residues in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Promote Virion Assembly Via Interaction with RNA. *J. Virol.* **74**:3046–3057.
34. **De Guzman RN, Wu ZR, Stalling CC, Pappalardo L, Borer PN, Summers MF.** 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**:384–388.
35. **Mizuno A, Ido E, Goto T, Kuwata T, Nakai M, Hayami M.** 1996. Mutational analysis of two zinc finger motifs in HIV type 1 nucleocapsid proteins: effects on proteolytic processing of Gag precursors and particle formation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:793–800.
36. **Ott DE, Coren LV, Gagliardi TD.** 2005. Redundant Roles for Nucleocapsid and Matrix RNA-Binding Sequences in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J Virol* **79**:13839–13847.
37. **Ott DE, Coren LV, 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.
38. **Poon DTK, Chertova EN, Ott DE.** 2002. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preferentially Encapsidates Genomic RNAs That Encode Pr55Gag: Functional Linkage between Translation and RNA Packaging. *Virology* **293**:368–378.
39. **Zhang Y, Barklis E.** 1997. Effects of Nucleocapsid Mutations on Human Immunodeficiency Virus Assembly and RNA Encapsidation. *J. Virol.* **71**:6765–6776.
40. **Zhang Y, Barklis E.** 1995. Nucleocapsid Protein Effects on the Specificity of Retrovirus RNA Encapsidation. *J. Virol.* **69**:5716–5722.
41. **Feng Y-X, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A.** 1999. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Has Nucleic Acid Chaperone Activity: Possible Role in Dimerization of Genomic RNA and Placement of tRNA on the Primer Binding Site. *J. Virol.* **73**:4251–4256.
42. **Jalalirad M, Laughrea M.** 2010. Formation of immature and mature genomic RNA dimers in wild-type and protease-inactive HIV-1: Differential roles of the Gag polyprotein, nucleocapsid proteins NCp15, NCp9, NCp7, and the dimerization initiation site. *Virology* **407**:225–236.

43. **Kafaie J, Song R, Abrahamyan L, Mouland AJ, Laughrea M.** 2008. Mapping of nucleocapsid residues important for HIV-1 genomic RNA dimerization and packaging. *Virology* **375**:592–610.
44. **Alfadhli A, Dhenub TC, Still A, Barklis E.** 2005. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Dimerization-Induced Assembly. *J. Virol.* **79**:14498–14506.
45. **Bowzard JB, Bennett RP, Krishna NK, Ernst SM, Rein A, Wills JW.** 1998. Importance of Basic Residues in the Nucleocapsid Sequence for Retrovirus Gag Assembly and Complementation Rescue. *J. Virol.* **72**:9034–9044.
46. **Burniston MT, Cimorelli A, Colgan J, Curtis SP, Luban J.** 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Multimerization Requires the Nucleocapsid Domain and RNA and Is Promoted by the Capsid-Dimer Interface and the Basic Region of Matrix Protein. *J. Virol.* **73**:8527–8540.
47. **Hogue IB, Hoppe A, Ono A.** 2009. Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Gag Interaction: Relative Contributions of the CA and NC Domains and Membrane Binding. *J Virol* **83**:7322–7336.
48. **Lee E-G, Linial ML.** 2004. Basic residues of the retroviral nucleocapsid play different roles in gag-gag and Gag-Psi RNA interactions. *J. Virol.* **78**:8486–8495.
49. **Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P.** 2000. Mapping and Characterization of the N-Terminal I Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pr55Gag. *J. Virol.* **74**:7238–7249.
50. **Zhang Y, Qian H, Love Z, Barklis E.** 1998. Analysis of the Assembly Function of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Nucleocapsid Domain. *J. Virol.* **72**:1782–1789.
51. **Grigorov B, Decimo D, Smagulova F, Pechoux C, Mougél M, Muriaux D, Darlix JL.** 2007. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* **4**:54.
52. **Shkriabai N, Datta SAK, Zhao Z, Hess S, Rein A, Kvaratskhelia M.** 2006. Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. *Biochemistry (Mosc.)* **45**:4077–4083.
53. **Datta SAK, Zhao Z, Clark PK, Tarasov S, Alexandratos JN, Campbell SJ, Kvaratskhelia M, Lebowitz J, Rein A.** 2007. Interactions between HIV-1 Gag Molecules in Solution: An Inositol Phosphate-mediated Switch. *J. Mol. Biol.* **365**:799–811.
54. **Datta SAK, Curtis JE, Ratcliff W, Clark PK, Crist RM, Lebowitz J, Krueger S, Rein A.** 2007. Conformation of the HIV-1 Gag Protein in Solution. *J. Mol. Biol.* **365**:812–824.
55. **Alfadhli A, McNett H, Tsagli S, Bächinger HP, Peyton DH, Barklis E.** 2011. HIV-1 matrix protein binding to RNA. *J. Mol. Biol.* **410**:653–666.
56. **Lochrie MA, Waugh S, Pratt DG Jr, Clever J, Parslow TG, Polisky B.** 1997. *In vitro* selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res.* **25**:2902–2910.

57. **Jones CP, Datta SAK, Rein A, Rouzina I, Musier-Forsyth K.** 2011. Matrix domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity via inositol phosphate binding. *J. Virol.* **85**:1594–1603.
58. **Rein A, Datta SAK, Jones CP, Musier-Forsyth K.** 2011. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem. Sci.* **36**:373–380.
59. **Hamard-Peron E, Muriaux D.** 2011. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology* **8**:15–15.
60. **Chukkapalli V, Oh SJ, Ono A.** 2010. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:1600–1605.
61. **Chukkapalli V, Ono A.** 2011. Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *J. Mol. Biol.* **410**:512–524.
62. **Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF.** 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:11364–11369.
63. **Alfadhli A, Still A, Barklis E.** 2009. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *J. Virol.* **83**:12196–12203.
64. **Fuller SD, Wilk T, Gowen BE, Kräusslich HG, Vogt VM.** 1997. Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr. Biol. CB* **7**:729–738.
65. **Datta SAK, Heinrich F, Raghunandan S, Krueger S, Curtis JE, Rein A, Nanda H.** 2011. HIV-1 Gag extension: conformational changes require simultaneous interaction with membrane and nucleic acid. *J. Mol. Biol.* **406**:205–214.
66. **Munro JB, Nath A, Färber M, Datta SAK, Rein A, Rhoades E, Mothes W.** 2014. A Conformational Transition Observed in Single HIV-1 Gag Molecules during *In vitro* Assembly of Virus-Like Particles. *J. Virol.* **88**:3577–3585.
67. **De Rocquigny H, Ficheux D, Gabus C, Fournié-Zaluski MC, Darlix JL, Roques BP.** 1991. First large scale chemical synthesis of the 72 amino acid HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 in an active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**:1010–1018.
68. **Shvadchak VV, Klymchenko AS, de Rocquigny H, Mély Y.** 2009. Sensing peptide-oligonucleotide interactions by a two-color fluorescence label: application to the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res.* **37**:e25.
69. **Postupalenko VY, Shvadchak VV, Duportail G, Pivovarenko VG, Klymchenko AS, Mély Y.** 2011. Monitoring membrane binding and insertion of peptides by two-color fluorescent label. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**:424–432.
70. **Bonnet D, Ilien B, Galzi J-L, Riché S, Antheaune C, Hibert M.** 2006. A rapid and versatile method to label receptor ligands using “click” chemistry: Validation with the muscarinic M1 antagonist pirenzepine. *Bioconjug. Chem.* **17**:1618–1623.
71. **Bernacchi S, Stoylov S, Piémont E, Ficheux D, Roques BP, Darlix JL, Mély 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.

72. **Godet J, de Rocquigny H, Raja C, Glasser N, Ficheux D, Darlix J-L, Mély 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.
73. **Fritz JV, Didier P, Clamme J-P, Schaub E, Muriaux D, Cabanne C, Morellet N, Bouaziz S, Darlix J-L, Mély Y, de Rocquigny H.** 2008. Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* **5**:87.
74. **Fritz JV, Dujardin D, Godet J, Didier P, De Mey J, Darlix J-L, Mély Y, 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.
75. **Muller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Krausslich HG.** 2004. Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol* **78**:10803–13.
76. **Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE.** 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* **79**:4055–65.
77. **Thomas JA, Bosche WJ, Shatzer TL, Johnson DG, Gorelick RJ.** 2008. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein zinc fingers cause premature reverse transcription. *J Virol* **82**:9318–28.
78. **Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR.** 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **812**:55–65.
79. **Chou PT, Martinez ML, Clements JH.** 1993. Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds. *J Phys Chem* **97**:2618–2622.
80. **Chattopadhyay A, London E.** 1987. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry (Mosc.)* **26**:39–45.
81. **Abrams FS, London E.** 1993. Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: Use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup. *Biochemistry (Mosc.)* **32**:10826–10831.
82. **Kaiser RD, London E.** 1998. Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth†. *Biochemistry (Mosc.)* **37**:8180–8190.
83. **Lewis BA, Engelman DM.** 1983. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166**:211–217.
84. **Hübner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK.** 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.

85. **Larson DR, Ma YM, Vogt VM, Webb WW.** 2003. Direct measurement of Gag-Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J. Cell Biol.* **162**:1233–1244.
86. **Derdowski A, Ding L, 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.
87. **Sandefur S, Varthakavi V, Spearman P.** 1998. The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J. Virol.* **72**:2723–2732.
88. **Turner BG, Summers MF.** 1999. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**:1–32.
89. **Bell NM, Lever AML.** 2013. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* **21**:136–144.
90. **Cruceanu M, Urbaneja MA, Hixson CV, Johnson DG, Datta SA, Fivash MJ, Stephen AG, Fisher RJ, Gorelick RJ, Casas-Finet JR, Rein A, Rouzina I, Williams MC.** 2006. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**:593–605.
91. **Pivovarenko VG, Zamotaiev OM, Shvadchak VV, Postupalenko VY, Klymchenko AS, Mély Y.** 2012. Quantification of local hydration at the surface of biomolecules using dual-fluorescence labels. *J. Phys. Chem. A* **116**:3103–3109.
92. **Klymchenko AS, Demchenko AP.** 2003. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**:461–468.
93. **Op den Kamp JAF.** 1979. Lipid Asymmetry in Membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**:47–71.
94. **Hamard-Peron E, Juillard F, Saad JS, Roy C, Roingeard P, Summers MF, Darlix J-L, Picart C, Muriaux D.** 2010. Targeting of Murine Leukemia Virus Gag to the Plasma Membrane Is Mediated by PI(4,5)P2/PS and a Polybasic Region in the Matrix. *J. Virol.* **84**:503–515.
95. **Dalton AK, Ako-Adjei D, Murray PS, Murray D, Vogt VM.** 2007. Electrostatic interactions drive membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Gag MA domain. *J. Virol.* **81**:6434–6445.
96. **Ehrlich LS, Fong S, Scarlata S, Zybarth G, Carter C.** 1996. Partitioning of HIV-1 Gag and Gag-related proteins to membranes. *Biochemistry (Mosc.)* **35**:3933–3943.
97. **Ben-Tal N, Honig B, Miller C, McLaughlin S.** 1997. Electrostatic binding of proteins to membranes. Theoretical predictions and experimental results with charybdotoxin and phospholipid vesicles. *Biophys. J.* **73**:1717–1727.
98. **Didier P, Sharma KK, Mély Y.** 2011. Chapter 5. Fluorescence Techniques to Characterise Ligand Binding to Proteins, p. 156–199. In Podjarny, A, Dejaegere, AP, Kieffer, B (eds.), *RSC Biomolecular Sciences*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
99. **Beltz H, Clauss C, Piémont E, Ficheux D, Gorelick RJ, Roques B, Gabus C, Darlix J-L, de Rocquigny H, Mély 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.

100. **Egelé C, Schaub E, Ramalanjaona N, Piémont E, Ficheux D, Roques B, Darlix J-L, Mély Y.** 2004. HIV-1 nucleocapsid protein binds to the viral DNA initiation sequences and chaperones their kissing interactions. *J. Mol. Biol.* **342**:453–466.
101. **Godet J, Ramalanjaona N, Sharma KK, Richert L, de Rocquigny H, Darlix J-L, Duportail G, Mély 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.* **39**:6633–6645.
102. **Levin JG, Guo J, Rouzina, Musier[hyphen (true graphic)]Forsyth K.** 2005. Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV[hyphen (true graphic)]1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism, p. 217–286. In Academic Press.
103. **Post K, Kankia B, Gopalakrishnan S, Yang V, Cramer E, Saladores P, Gorelick RJ, Guo J, Musier-Forsyth K, Levin JG.** 2009. Fidelity of plus-strand priming requires the nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res.* **37**:1755–1766.
104. **Déméné H, Dong CZ, Ottmann M, Rouyez MC, Jullian N, Morellet N, Mely Y, Darlix JL, Fournié-Zaluski MC, Saragosti S.** 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 (Mosc.)* **33**:11707–11716.
105. **Darlix J-L, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fossé P, Mauffret O, Mély Y.** 2011. Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J. Mol. Biol.* **410**:565–581.
106. **Mély Y, de Rocquigny H, Sorinas-Jimeno M, Keith G, Roques BP, Marquet R, Gérard D.** 1995. Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), *in vitro*, is essentially not specific. *J. Biol. Chem.* **270**:1650–1656.
107. **Vuilleumier C, Bombarda E, Morellet N, Gérard D, Roques BP, Mély Y.** 1999. Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry (Mosc.)* **38**:16816–16825.
108. **Clamme JP, Bernacchi S, Vuilleumier C, Duportail G, Mély Y.** 2000. Gene transfer by cationic surfactants is essentially limited by the trapping of the surfactant/DNA complexes onto the cell membrane: a fluorescence investigation. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**:347–361.
109. **Lemmon MA.** 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:99–111.
110. **Kerviel A, Thomas A, Chaloin L, Favard C, Muriaux D.** 2013. Virus assembly and plasma membrane domains: which came first? *Virus Res.* **171**:332–340.
111. **Bouamr F, Scarlata S, Carter C.** 2003. Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry (Mosc.)* **42**:6408–6417.
112. **Pal R, Reitz MS Jr, Tschachler E, Gallo RC, Sarngadharan MG, Veronese FD.** 1990. Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:721–730.

113. **Chukkapalli V, Inlora J, Todd GC, Ono A.** 2013. Evidence in support of RNA-mediated inhibition of phosphatidylserine-dependent HIV-1 Gag membrane binding in cells. *J. Virol.* **87**:7155–7159.
114. **Chukkapalli V, Hogue IB, Boyko V, Hu W-S, Ono A.** 2008. Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding. *J. Virol.* **82**:2405–2417.
115. **Ono A, Freed EO.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:13925–13930.
116. **Briggs JAG, Simon MN, Gross I, Kräusslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC.** 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:672–675.
117. **Wright ER, Schooler JB, Ding HJ, Kieffer C, Fillmore C, Sundquist WI, Jensen GJ.** 2007. Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J.* **26**:2218–2226.
118. **Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD.** 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* **4**:e435.
119. **Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD.** 2011. Visualizing HIV-1 assembly. *J. Mol. Biol.* **410**:501–511.
120. **Briggs JAG, Kräusslich H-G.** 2011. The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* **410**:491–500.
121. **Joshi A, Garg H, Ablan SD, Freed EO.** 2011. Evidence of a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) machinery in HIV-1 assembly and release. *J. Biol. Chem.* **286**:29861–29871.
122. **Beltz H, Azoulay J, Bernacchi S, Clamme J-P, Ficheux D, Roques B, Darlix J-L, Mély 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.
123. **Kuciak M, Gabus C, Ivanyi-Nagy R, Semrad K, Storchak R, Chaloin O, Muller S, Mély Y, Darlix J-L.** 2008. The HIV-1 transcriptional activator Tat has potent nucleic acid chaperoning activities *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **36**:3389–3400.
124. **Boudier C, Storchak R, Sharma KK, Didier P, Follenius-Wund A, Muller S, Darlix J-L, Mély Y.** 2010. The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *J. Mol. Biol.* **400**:487–501.
125. **Bernacchi S, Mély Y.** 2001. Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res.* **29**:E62–62.

FIGURES

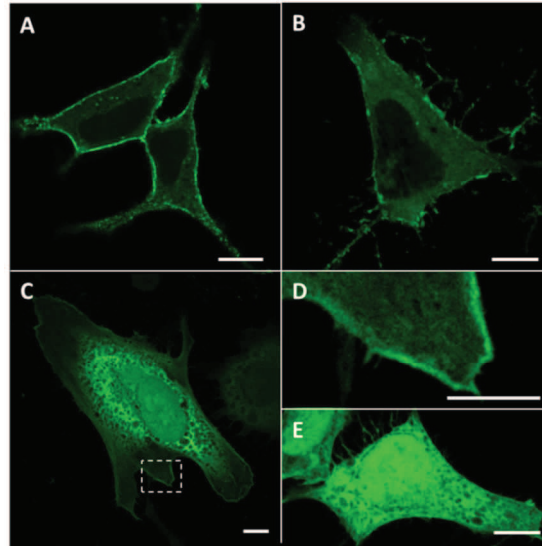


Figure 1: Cellular localization of Gag and NC observed by confocal microscopy.

(A-B) A mixture of plasmids expressing Gag/Gag-eGFP (0.4 μ g/0.1 μ g) (A) or Gag Δ NC/Gag Δ NC-eGFP (0.4 μ g/0.1 μ g) (B) was transiently transfected in HeLa cells and observed 24h later, after 4% PFA fixation. While Gag strongly accumulates at the PM (A), only a residual accumulation of Gag at the PM is observed when the NC domain is removed (B). (C) HeLa cells expressing transiently transfected NC-eGFP. (D) Zoom image of (C) showing accumulation of NC-eGFP at the PM. (E) Control: HeLa cells expressing eGFP. Scale bars: 10 μ m.

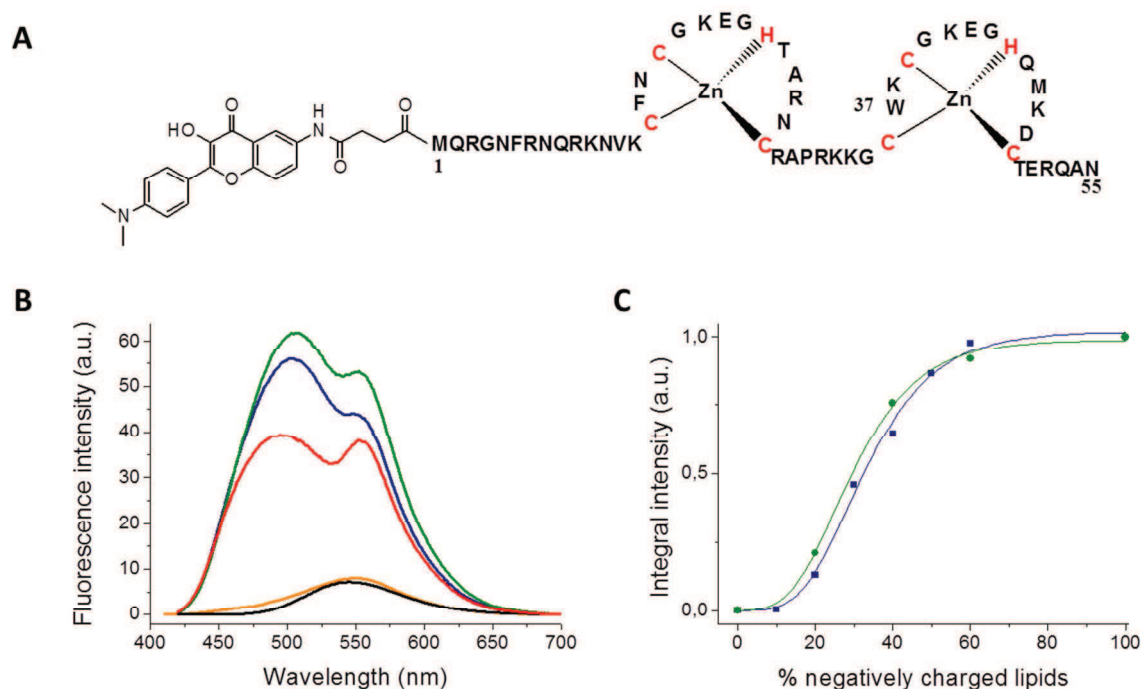


Figure 2: Binding of NC-MFL to LUVs, taken as a membrane model.

(A) Structure of the NC peptide N-terminally labeled with the MFL probe. (B) Fluorescence spectra of MFL-NC in the absence (black) and in the presence of LUVs composed of either neutral DOPC (orange), negatively charged DOPS (blue) and DOPG (green), or a lipid mixture mimicking the composition of the inner leaflet of the plasma membrane ILPM (DOPC:DOPE:DOPS:SM:PI(4,5)P₂ in a ratio of 16:46:25:8:5 (mole % of lipids) (red). Concentration of NC and lipids were 0.25 μ M and 100 μ M, respectively. (C) Dependence of MFL-NC/LUV binding on the percentage of negatively charged lipids (DOPS in blue or DOPG in green), as monitored through the integral fluorescence intensity of the label. The data points were fitted by a sigmoidal function (solid lines) to guide the eye. The concentrations of peptide, DOPS, and DOPG were 0.3, 200 and 100 μ M, respectively. Experiments were performed in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 in the presence of 150 mM NaCl to limit non-specific electrostatic interactions. Excitation wavelength was 400 nm.

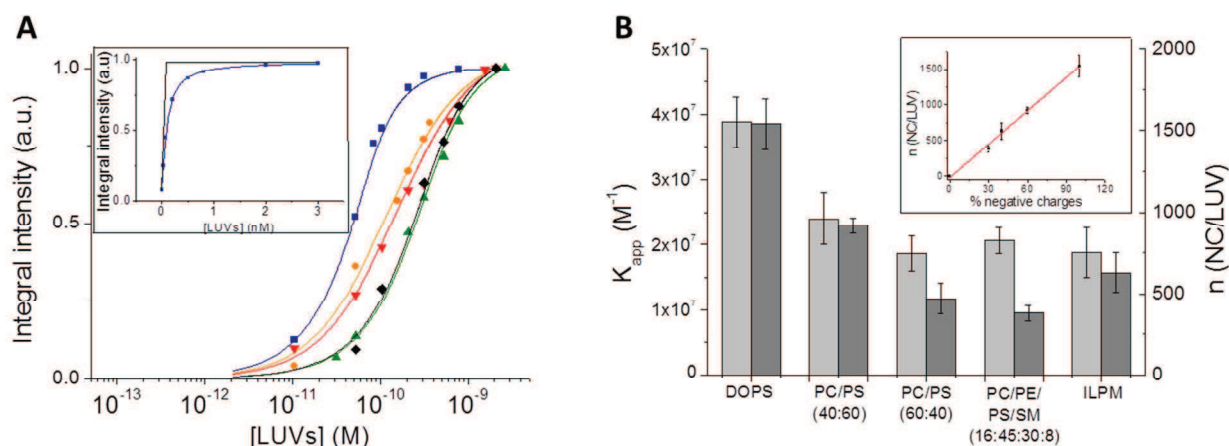


Figure 3: Determination of the binding parameters of NC to model lipid membranes.

(A) Titration of MFL-NC (0.1 μ M) with LUVs of different lipid compositions: DOPS (blue), DOPC/DOPS (40:60) (orange), DOPC/DOPS (60:40) (green), DOPC/DOPE/DOPS/SM (16:46:30:8) (black), ILPM (red). Solid lines correspond to the fit of the data points with eq. 2, using the binding constant and the number of binding sites per LUVs indicated in panel B. Inset: Determination of the number of binding sites from the intercept of the tangent to the first points of the titration with the tangent to the fluorescence plateau. (B) Binding affinity (light grey) and number of binding sites per LUV (dark grey) as a function of the LUV composition. The values of K_{app} and n were determined from the binding curves in panel A. While only moderate changes in the K_{app} values were observed as a function of the lipid composition, a sharp decrease of n in comparison to pure DOPS was observed for the DOPC:DOPS(40:60), DOPC:DOPS(60:40), DOPC:DOPE:DOPS:SM (16:46:30:8) and the ILPM composition. Inset: Linear dependence of the number of binding sites as a function of the percentage of negatively charged lipids in the LUV composition. All experiments were in 20 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4. Excitation wavelength was 400 nm.

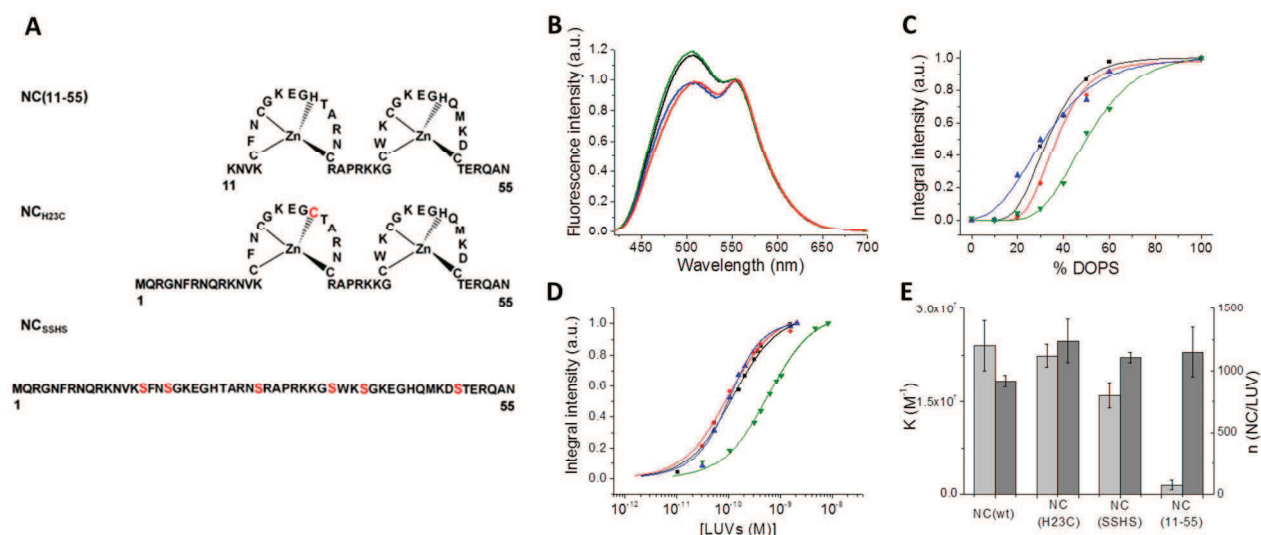


Figure 4: Interaction of NC mutants with LUVs.

A) Sequences of NC mutants. Mutations are shown in color. (B) Fluorescence spectra of MFL-labeled NC (black), NC_{H23C} (red), NC_{SSHs} (blue) and NC(11-55) (green) peptides in the presence of DOPS LUVs. Concentration of peptides and lipids was 0.25 and 200 μ M, respectively. (C) Dependence of the binding of MFL-labeled NC, NC_{H23C}, NC_{SSHs} and NC(11-55) peptides on the percentage of negatively charged DOPS lipids in DOPC:DOPS LUVs. The color code is as in panel B. The data points were fitted by a sigmoidal function (solid lines) to guide the eye. Concentration of peptides and LUVs was 0.25 and 200 μ M, respectively. (D) Titrations of MFL-labeled NC, NC_{H23C}, NC_{SSHs} and NC(11-55) peptides (0.1 μ M) with DOPC:DOPS (40:60) LUVs. The color code is as in panel B. The number of binding sites per LUV and the binding affinities were obtained, as described in Figure 3A. The data points were fitted with eq. 2, using the parameters given in panel E. (E) Binding parameters of NC mutants to DOPC:DOPS (40:60) LUVs (K_{app} in light grey, n in dark grey). Buffer and excitation wavelength are as in Fig. 3.

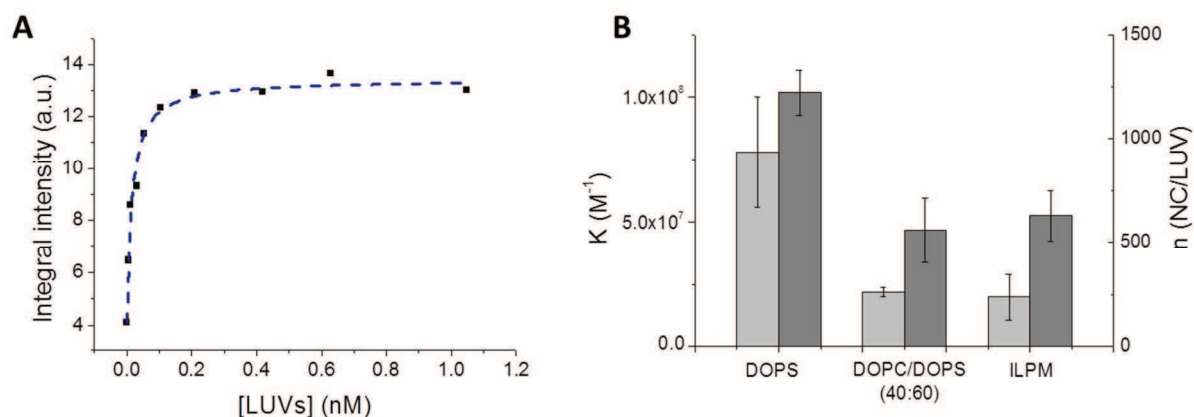


Figure 5: Determination of the binding parameters of NC/dTAR complexes to model lipid membranes.

(A) Titration curve of MFL- NC/dTAR (3:1) complexes with DOPS LUVs. The number of binding sites per LUV and the binding affinities were obtained, as in Figure 3A. The data points were fitted with eq. 2. Concentration of NC and dTAR was 100 nM and 33 nM, respectively. (B) Binding parameters of NC/dTAR complexes to DOPS, DOPC:DOPS (40:60) and ILPM LUVs (K_{app} in light grey, n in dark grey). Buffer and excitation wavelength are as in Fig. 3.

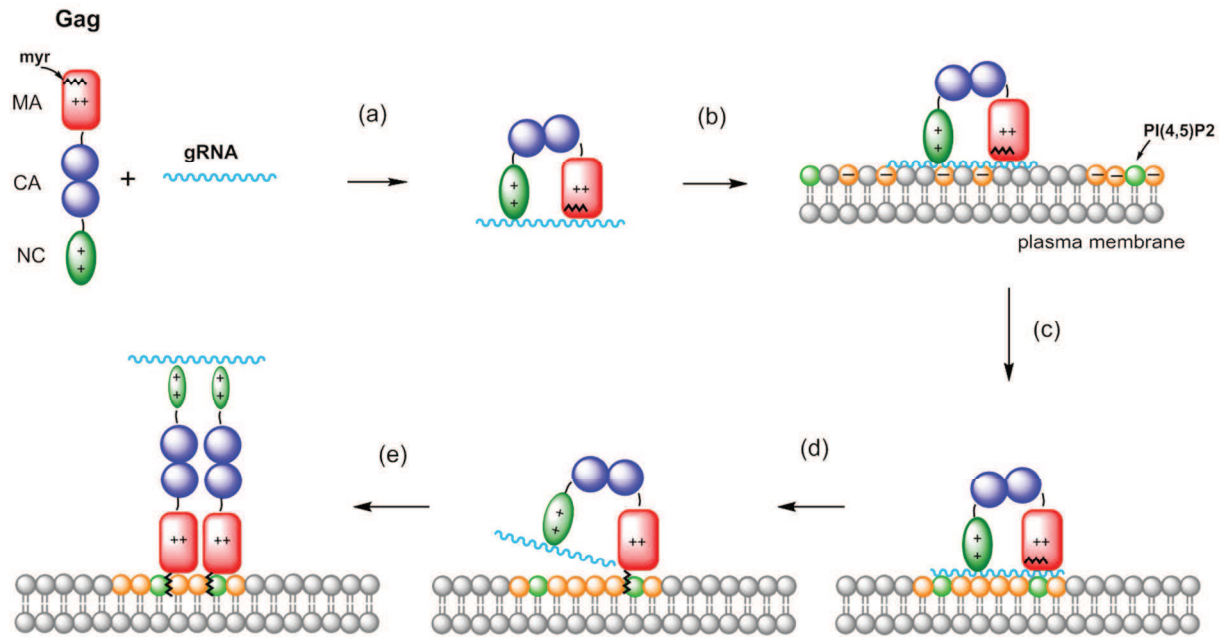


Figure 6: Proposed mechanism for NC-promoted binding of Gag to the plasma membrane.

(a) Newly made Gag polyprotein binds to the gRNA via its NC and MA domains, so that it adopts a bent conformation. (b) The Gag-gRNA complex also interacts with the plasma membrane via its MA and NC domains. (c) The NC domain recruits negatively charged lipids, including PI(4,5)P₂, that form an acidic lipid-enriched microdomain. (d) The MA domain recognizes PI(4,5)P₂, which results in the exposure of the previously sequestered myristyl group that inserts into the cytoplasmic leaflet of the PM. As a consequence of this anchoring of MA into the PM, MA dissociates from the gRNA. (e) Without the support of MA, the bent conformation is released and the Gag molecule adopts a rod-shaped conformation.

Table 1: FRET efficiencies of binary and ternary complexes between NC, dTAR and LUVs

monitored interaction ^a	non-labeled partner	FRET efficiencies	
		[NaCl] 150 mM	[NaCl] 30 mM
MFL-NC/LUV-Rh	-	0.84	0.90
	dTAR	0.83	0.85
dTAR-FAM/LUV-Rh	-	0	0
	NC	0.09	0.27
dTAR-FAM/LRh-NC	-	0.72	0.80
	LUVs	0.37	0.62

^aFRET experiments were performed between two labeled partners in the absence and in the presence of the third non-labeled partner in 20 mM phosphate buffer with 150 mM or 30 mM of NaCl (pH 7.4).

Supplementary information

To calculate the insertion depth of the MFL label in the lipid membrane when the MFL-labeled NC is bound to LUVs, the parallax quenching method (80–82), using nitroxide lipids was used as previously described (69).

To check the influence of the MFL label on the NC chaperone properties, the ability of the labeled peptides to destabilize the secondary structure of cTAR (71, 122) and to promote the annealing of cTAR with its complementary dTAR sequence (72, 123, 124) was compared to that of the unlabeled peptide. The nucleic acid destabilizing properties of NC were monitored using a cTAR sequence labeled at its 3' and 5' ends by 4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic Acid (Dabcyl) and 5(6) carboxytetramethylrhodamine (TMR), respectively. In the absence of NC, cTAR is mainly in a non-fluorescent closed form where the Dabcyl and TMR labels are close together, giving excitonic coupling (125). NC led to a concentration dependent melting of the bottom of cTAR stem, which increases the distance between the two fluorophores and thus, restores the TMR fluorescence. Annealing kinetics were performed under pseudo-first-order conditions by using unlabeled dTAR at a concentration at least 10-fold higher than the concentration of cTAR labeled with TMR at the 5' end and with Dabcyl at the 3' end (72). Excitation wavelength was 520 nm. All reported concentrations correspond to those after mixing. To avoid high local concentrations during mixing, both reactants were prepared at the same volume. Peptides were added to each reactant separately, and then the reaction was initiated by mixing the peptide-coated ODNs together. Experiments were performed in 25 mM Tris (pH 7.5) containing 30 mM NaCl and 0.2 mM MgCl₂ at 20°C.

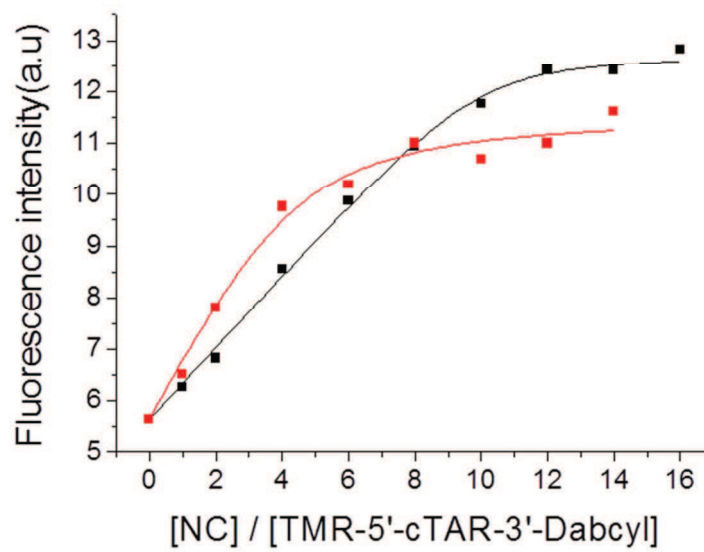


Figure A1: Destabilization of doubly-labeled cTAR DNA by NC (black) and MFL-NC (red).

Titration of 100 nM TMR-5'-cTAR-3'-Dabcyl by NC peptides was performed in 25 mM TRIS (pH 7.5), 30 mM NaCl and 10 mM MgCl₂. To monitor TMR fluorescence, excitation and emission wavelengths were 520 and 550 nm, respectively.

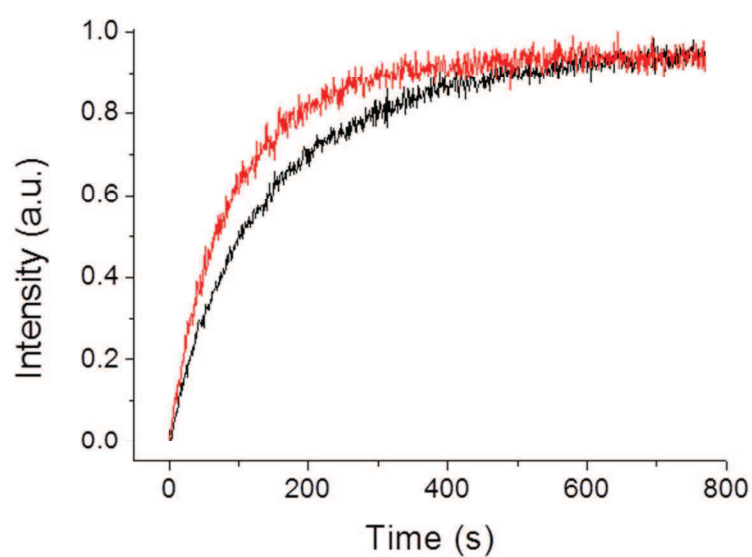


Figure A2: Nucleic acid annealing activity of NC and MFL-NC peptides.

The annealing kinetics of 10 nM TMR-5'-cTAR-3'-Dabcyl with 300 nM dTAR in the presence of the unlabeled (black) and labeled (red) NC peptides added at a protein:cTAR ratio of 1 :1 were monitored in 25 mM Tris (pH 7.5), 30 mM NaCl and 10 mM MgCl₂. Excitation and emission wavelengths were 520 and 550 nm, respectively.

Table A1: Spectroscopic properties of MFL in buffer and MFL-NC in the presence of LUVs of various compositions^a

Peptide	Media	λ_{Abs} (nm)	λ_{N^*} (nm)	λ_{T^*} (nm)	$I_{\text{N}^*}:I_{\text{T}^*}$	QY
MFL	Buffer	394	550	-	-	0.04
MFL-NC	Buffer	419	545	-	-	0.07
	DOPC	420	547	-	-	0.08
	DOPS	410	504	552	1.27	0.56
	DOPG	408	506	553	1.16	0.62

^aExperimental conditions were as in Figure 2B.

Table A2: Comparison of K_m and K_{app} values obtained for the binding of NC derivatives to LUVs of different compositions^a

Peptide	LUV composition	$K_m (\times 10^{-5} \text{ M}^{-1})$	$K_{app} (\times 10^{-5} \text{ M}^{-1})$
NC	DOPS	4.5 (± 0.7)	390 (± 20)
	DOPC/DOPS (40:60)	2.0 (± 0.1)	220 (± 70)
	DOPC/DOPS (60:40)	0.9 (± 0.1)	180 (± 10)
	ILPM	1.4 (± 0.2)	170 (± 30)
	DOPC/DOPE/DOPS/SM	0.7 (± 0.1)	201 (± 20)
	(16:45:30:8)		
NC _{H23C}	DOPC/DOPS (40:60)	2.2 (± 0.2)	220 (± 20)
NC _{SSHs}	DOPC/DOPS (40:60)	2.6 (± 0.3)	160 (± 20)
NC(11-55)	DOPC/DOPS (40:60)	0.3 (± 0.02)	20 (± 1)

^a K_m and K_{app} values were obtained by fitting the titration curves of MFL-labeled NC derivatives by LUVs of indicated compositions, using eq. 1 and 2, respectively.

Table A3: Spectroscopic properties of MFL-labeled NC derivatives upon binding to LUVs of different compositions

Peptide	Media	$\lambda_{\text{Abs}}^{\text{a}}$ (nm)	$\lambda_{\text{N}^*}^{\text{a}}$ (nm)	$\lambda_{\text{T}^*}^{\text{a}}$ (nm)	$\text{I}_{\text{N}^*}:\text{I}_{\text{T}^*}^{\text{b}}$	QY ^c
MFL-NC	Buffer	419	545	-	-	0.07
	DOPS	410	504	552	1.27	0.56
	DOPG	408	506	553	1.16	0.62
MFL-NC _{H23C}	Buffer	421	549	-	-	0.09
	DOPS	410	508	552	1.07	0.55
	DOPG	409	510	555	0.98	0.58
MFL-NC _{SSHs}	Buffer	421	551	-	-	0.04
	DOPS	408	506	552	1.14	0.54
	DOPG	410	505	555	0.98	0.60
MFL-NC(11-55)	Buffer	420	545	-	-	0.09
	DOPS	410	505	552	1.24	0.43
	DOPG	408	505	553	1.17	0.49

^a λ_{Abs} , λ_{N^*} and λ_{T^*} are the maxima of absorption, N* and T* emission bands, respectively.

^b $\text{I}_{\text{N}^*}:\text{I}_{\text{T}^*}$ is the intensity ratio of the two emission bands measured at the peak maxima.

^cQY is the fluorescence quantum yield. Estimated errors: $\lambda_{\text{Abs}} \pm 2$ nm; λ_{N^*} , $\lambda_{\text{T}^*} \pm 1$ nm; $\text{I}_{\text{N}^*}:\text{I}_{\text{T}^*} \pm 3\%$; QY $\pm 10\%$.

Table A4: Parallax quenching data of MFL-labeled NC, NC_{H23C}, NC_{SSHs} and NC(11-55) peptides bound to DOPC:DOPS (40:60) vesicles

Peptide	$F_{TC}:F_0^a$	$F_5:F_0^a$	$F_{12}:F_0^a$	$Z_{cf} (\text{\AA})^b$
MFL-NC	0.83	0.86	0.86	16.2
MFL-NC _{H23C}	0.77	0.83	0.84	16.6
MFL-NC _{SSHs}	0.78	0.94	0.95	17.7
MFL-NC(11-55)	0.80	0.84	0.85	16.3

^a $F_{TC}:F_0$, $F_5:F_0$, and $F_{12}:F_0$ are the ratios of the fluorescence intensities of the labeled peptides bound to DOPC:DOPS (40:60 mol%) vesicles containing 15 mol % TempoPC, 5-SLPC, or 12-SLPC, respectively, to the corresponding fluorescence intensities in the absence of the nitroxide-labeled lipids. The integral intensities of emission spectra were used to calculate the quenching values.

^b Z_{cf} is the distance between the middle of the bilayer and the chromophore center calculated from the parallax equation. The estimated error for Z_{cf} is $\pm 1 \text{ \AA}$.

PARTIE 2 :

***Caractérisation de l'interaction de
NCp7 avec des membranes lipidiques
modèles par microscopie biphotonique
et microscopie combinée AFM/TIRF***

Nos résultats précédents en solution nous ont permis de mettre en évidence une forte interaction de nature électrostatique entre NC, sous sa forme libre ou complexée à des acides nucléiques, et des membranes lipidiques chargées négativement.

L'objectif de la seconde partie de ce travail est d'approfondir la caractérisation de cette interaction en imageant le comportement de membranes lipidiques modèles neutres ou négativement chargées en présence de NC ou de complexes NC/ADN. Ces interactions ont été observées par microscopie combinée AFM/TIRF sur des bicouches lipidiques supportées marquées par du NR12S, une sonde fluorescente membranaire dérivée du Rouge Nil, et en microscopie biphotonique d'autre part à l'aide de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) marquées par une seconde sonde membranaire (F2N12SM, verte).

En microscopie AFM/TIRF, les bicouches composées de DOPC apparaissent planes avec une rugosité faible et une hauteur typique de 4 à 5 nm (mesurée en AFM). Ces paramètres sont stables dans le temps. On observe également des zones dépourvues de bicouche, où le substrat (mica) apparaît directement. Ces régions se distinguent aussi sur l'image TIRF puisqu'elles n'émettent pas de fluorescence, contrairement aux régions recouvertes par la bicouche lipidique qui fluorescent de manière homogène. Suite à l'ajout de concentrations croissantes de NC (entre 50 et 1000 nM) aucun effet significatif n'est observé sur ces membranes lipidiques neutres, confirmant l'absence d'interaction entre la protéine NC et les bicouches composées de lipides neutres.

En revanche, les bicouches lipidiques composées d'un mélange DOPC/DOPS (4:6), sont très affectées par la présence de NC. En AFM on observe une déstabilisation progressive de la bicouche, lorsqu'on augmente la concentration de NC. De plus, l'image TIRF effectuée après déstabilisation de la bicouche lipidique, présente une diminution importante de l'intensité de fluorescence ainsi que l'apparition de particules protéolipidiques. Ces images indiquent qu'en plus de se lier aux membranes lipidiques, NC possède également la propriété de les déstabiliser.

Ces résultats ont été confirmés par l'observation de GUVs de composition lipidique identique à celle des bicouches précédemment observées. A basse concentration de NC (marquée par une rhodamine en son extrémité N-terminale), on observe des GUVs dont la fluorescence indique que la Rh-NC y est liée. Cependant, aucune modification de leur morphologie n'est observée. Au contraire, lorsque la concentration de Rh-NC est plus importante ($\times 5$), on observe l'apparition de particules protéolipidiques sur la surface des GUVs. Celles-ci

conduisent finalement à la destruction totale des vésicules après 30 minutes d'incubation. La déstabilisation des membranes lipidiques par NC est donc un phénomène qui dépend à la fois de la concentration de peptide et du temps d'incubation.

Par ailleurs, pour comparer l'interaction de NC avec celle des complexes NC/ADN avec des membranes lipidiques modèles nous avons répété ces expériences en utilisant la séquence dTAR, équivalent ADN de la séquence de transactivation du génome du VIH-1. Par analogie avec nos premières expériences, nous avons commencé par observer ces complexes sur des membranes modèles composées uniquement de DOPC.

Les mesures effectuées en AFM/TIRF ainsi qu'en microscopie biphotonique indiquent que contrairement à la NC libre, les complexes NC/ADN se lient aux membranes neutres. Les complexes directement visualisés par AFM, ont une hauteur de 5 à 6 nm et sont stables. Ils sont localisés à la fois sur la bicouche lipidique et les zones de mica nu. Ces données suggèrent que la liaison de NC aux membranes neutres est rendue possible par la présence d'une séquence ADN. Toutefois aucune activité déstabilisatrice n'a pu être observée dans ces conditions. En revanche, les complexes NC/ADN qui se lient sur les bicouches lipidiques chargées négativement, induisent quant à eux la formation de particules protéolipidiques qui conduisent à la déstabilisation des membranes modèles. Toutefois, il est à noter que la cinétique de ce mécanisme de déstabilisation est plus lente que celle observée avec la NC libre. De plus, contrairement aux observations sur DOPC, les complexes sur des bicouches lipidiques composées d'un mélange DOPC/DOPS (4:6) ne sont pas directement visibles en AFM/TIRF, suggérant que ces complexes se détachent de la membrane après interaction. Les cinétiques avec lesquelles la NC libre ou complexée déstabilise les bicouches, suggèrent par ailleurs qu'une partie de la NC puisse se dissocier de ses complexes avec l'ADN pour interagir avec la membrane modèle.

Cette nouvelle propriété déstabilisatrice de la NC peut être comparée à celle de la protéine Vpr dont une activité déstabilisatrice similaire a pu être observée sur des bicouches lipidiques supportées ou encore en milieu cellulaire où Vpr serait capable de former des canaux dans les membranes lipidiques telles que la membrane nucléaire.

Ainsi la faculté de NC à déstabiliser les membranes lipidiques pourrait s'inscrire dans le cadre de l'import nucléaire du complexe de préintégration. Bien que les recherches actuelles semblent privilégier l'hypothèse d'un import actif par le biais des pores nucléaires, celle de sa

diffusion passive à travers la membrane nucléaire rendue possible par la déstabilisation de cette dernière par les protéines Vpr et NC ne peut pas être exclue.

MANUSCRIT 2

Lipid membrane destabilization activity of the HIV-1 nucleocapsid protein: an AFM/TIRF and two photon microscopy investigation.

Kempf Noémie, Postupalenko Viktoriia, Arntz Youri and Mély Yves

1. INTRODUCTION

The nucleocapsid protein (NC) of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is a 55 amino-acids basic protein characterized by two highly conserved CCHC motifs that bind zinc ions with high affinity (Mély et al., 1996). The mature NC results from the cleavage of the Gag polyprotein. NC is a nucleic acid binding and chaperone protein that plays multiple roles in HIV-1 replication (review in Darlix et al., 2011; Thomas and Gorelick, 2008). During the early phase of the cycle, NC assists the reverse transcription as a cofactor of the reverse transcriptase enzyme and likely promotes the integration of the viral DNA into the host genome. During the late phase, NC as a domain of Gag plays a key role in the viral assembly by recruiting the HIV-1 genomic RNA and promoting its dimerization. Though nucleic acids are likely the major ligand of NC, there is an increasing number of evidences that NC also interacts with viral and host proteins. For instance, the NC domain of Gag has been found to interact with Alix that is implicated in the budding of viral particles (Dussupt et al., 2009) or with ABCE1 which is suspected to assist Gag during the early stage of the assembly (Lingappa et al., 2006).

Recently, we evidenced that NC can also bind to negatively charged lipid membranes (Kempf et al., submitted) with high affinity. Moreover, by using lipid membrane models composed of both neutral and negatively charged lipids, we further showed that NC and NC/DNA complexes can recruit negatively charged lipids, to ensure optimal binding. These findings lead us to propose a role of the NC domain of Gag in HIV-1 assembly at the inner leaflet of the PM.

To further characterize the interaction of the NC protein, free or in complex with DNA, with lipid membranes, we used two complementary approaches. First, we used two-photon

microscopy to directly evidence the binding of fluorescently labelled NC on giant unilamellar vesicles (GUVs). Second, we monitored the morphological and roughness changes induced in supported lipid bilayers (SLBs) on binding NC or NC/DNA complexes, by using a microscope that combines atomic force microscopy (AFM) with total internal reflexion fluorescence (TIRF). These two complementary approaches further evidenced the interaction of NC with negatively charged lipid membranes. In addition, they also revealed that NC can destabilize negatively charged SLBs and GUVs, similarly but somewhat less efficiently than the HIV-1 Vpr protein (Greiner et al., 2011; Piller et al., 1999, 1998, 1996). NC/DNA complexes are also able to destabilize negatively charged lipid membranes, but at higher concentrations and with slower kinetics. Finally in contrast to free NC, these complexes were found to be able to bind to neutral lipid membranes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

All chemicals and solvents were from Sigma-Aldrich. Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and dioleoylphosphatidylserine (DOPS) were also from Sigma-Aldrich. The concentration of phospholipid stock solutions in chloroform was determined by dry weight. The dTAR oligonucleotide was synthesized and HPLC-purified by IBA GmbH (Germany). Concentration of dTAR was calculated from its absorbance measured with a Cary 400 spectrophotometer (Varian) and using the molar extinction coefficient at 260 nm given by the supplier.

2.2 Preparation of peptides and proteins

NC peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis on a 433A synthesizer (ABI, Foster City, CA), HPLC purified and characterized by ion spray mass spectrometry, as previously described (Shvadchak et al., 2009). The MFL probe, a functionalized derivative of 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone and the lissamine rhodamine (Rh) dye were prepared and coupled to the N-terminus of NC peptides, as previously described (Bonnet et al., 2006; Postupalenko et al., 2011). To get the zinc-bound form of the peptides, 2.2 molar equivalents of ZnSO₄ were added to the peptide and pH was raised to 7.4. Noticeably, in case of MFL-

labeled peptides, a large excess of Zn^{2+} ions should be avoided since this ion could affect their fluorescence. Peptide concentrations were determined using an extinction coefficient of $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 280 nm for non-labeled peptides, $33000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 400 nm for the MFL-labeled peptides, and $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 555 nm for Rh-labeled NC. Noticeably, the nucleic acid chaperone properties (Bernacchi et al., 2002; Godet et al., 2006; Shvadchak et al., 2009) of the labelled NC peptides were found to be close to those of the native NC, indicating that the MFL and rhodamine labels marginally perturb the peptide structure and activity (Kempf et al, submitted).

2.3 Preparation of giant unilamellar vesicles (GUVs)

GUVs were generated by electroformation in a home-built liquid cell (University of Odense, Denmark), as previously described (Angelova and Dimitrov, 1986; Fidorra et al., 2006). 1 mM solution of lipids in chloroform was deposited on the platinum wires of the chamber, and the solvent was evaporated under vacuum for 30 min. The chamber was filled with a 300 mM sucrose solution, and a 2-V, 10-Hz alternating electric current was applied to this capacitor-like configuration for ca. 1.5 h. Then, a 50 μL aliquot of the obtained stock solution of GUVs in sucrose (cooled down to room temperature) was added to 200 μL of 300 mM glucose solution to give the final suspension of GUVs used in microscopy experiments. The staining of GUVs was performed by 0.4 μM of F2N12SM, an analogue of the F2N12S fluorescent membrane probe (Shynkar et al., 2007), where the 3-hydroxy group was methylated, as described in (Kucherak et al., 2010). This methylation prevents the excited state intramolecular proton transfer observed with F2N12S, and thus, gives a single emission band at 480 nm in LUVs.

2.4 Preparation of supported lipid bilayer (SLBs)

SLBs were prepared by depositing the LUVs suspensions onto freshly cleaved mica for 45–60 min at room temperature (Horn, 1984; Richter et al., 2005). Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained by extruding a suspension of multilamellar vesicles with a Lipex Biomembranes extruder (Vancouver, Canada) (Hope et al., 1985). The size of the filters was first 0.2 μm (7 passages) and thereafter 0.1 μm (10 passages). This protocol leads to LUVs with a mean diameter of 0.11 μm , as measured by dynamic light scattering (DLS), with a

Malvern Zetamaster 300 (Malvern, UK). For AFM measurements, freshly cleaved mica was immersed in an eppendorf containing 300 μL of 200 μM LUV solution and 300 μL of 20 mM Hepes buffer, 150 mM NaCl at pH 7.4 with 4 mM CaCl_2 . The Ca^{2+} was added to induce adsorption and rupture of the vesicles on the mica. For AFM/TIRF measurements, freshly cleaved mica was glued on a glass coverslip and 50 μL of the LUVs solution together with 50 μL of 20 mM Hepes buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4 with 4 mM CaCl_2 were added on the mica. After incubation, samples were rinsed abundantly with the buffer without CaCl_2 to remove unfused vesicles.

Staining of SLBs for TIRF measurements was performed by addition of 0.3 μM of NR12S (Kucharak et al., 2010).

2.5 AFM/TIRF imaging

The AFM/TIRF microscope is a combination of an AFM composed of a SNEMA head driven by Integra electronics (NTMDT company Moscow, Ru) implemented on a homemade wide field TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) microscope. The TIRF microscope is based on an Olympus IX-71 inverted microscope with an oil immersion objective (NA = 1.49, 100 $\times$). Excitation at 532 nm is provided by a DPPS (Cobolt) cw laser. Fluorescence images were recorded by an EMCCD camera IXON 897 (ANDOR inc., UK). Exposure time was typically 100 ms. AFM images were performed in the tapping mode, using a CSG01 cantilever tip with a typical spring constant of 0.06 N/m, in liquid environment. Typical acquisition time was 10 min with a resolution of 512x512.

2.6 Two-photon imaging

Fluorescence microscopy experiments were performed using a homemade two-photon laser scanning set-up based on an Olympus IX70 inverted microscope with an Olympus 60 $\times$ 1.2NA water immersion objective. Two-photon excitation was provided by a titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics), and photons were detected by two avalanche photodiodes (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin-Elmer) interfaced with a counter/timer PCI board (PCI6602, National Instrument). Both blue and red channel images were recorded simultaneously using a dichroic mirror (Beamsplitter 585nm DCXR).

3. RESULTS

3.1 Interaction of NC with DOPC and DOPC/DOPS SBLs and GUVs

As a first step, we used SLBs labeled by the NR12S fluorescence probe (Kucherak et al., 2010) to image them simultaneously by AFM and TIRF microscopy, used in combination. The SLBs appeared by AFM (Fig 1A) as planar bilayers with a typical height of 4.3 ± 0.3 nm (Attwood et al., 2013) and a low roughness ($R_{\text{ms}} = 0.56$ nm). Several defects in the bilayer where mica was not coated by lipids are perceived as dark areas on the AFM image (Fig 1A, white arrows). Interestingly, the TIRF image of the same region of interest shows a homogeneous fluorescence staining of the bilayer, with the exception of the uncoated mica areas (dashed white ellipses). Interestingly, the DOPC bilayer was not affected by the addition of NC in the range 50 to 1000 nM, in line with previous data showing that NC only marginally interacts with neutral phospholipids (Kempf et al., submitted).

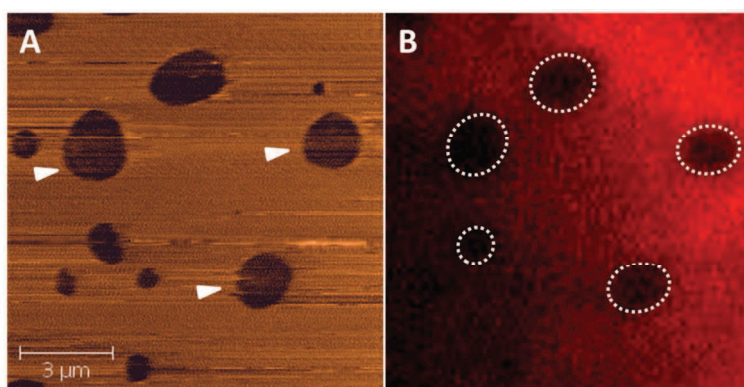


Figure 1: AFM/TIRF images of DOPC SLB. A) Morphological AFM image of the DOPC SLB. The colours indicate the height of the bilayer. The dark areas (white arrows) correspond to uncoated mica. B) TIRF image of the same region of interest. The dashed ellipses highlight the uncoated area. The SLB was labelled by NR12S. Excitation was at 532 nm. Addition of NC in the range 50-1000 nM does not substantially change both images. Experiments performed in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

In a second step, we used SLBs composed of neutral and anionic phospholipids DOPC/DOPS (4:6), a mixture that ensures strong binding of NC (Kempf et al., submitted). The AFM morphological images showed that SLBs appear as large planar areas of 4.4 ± 0.3 nm height and low roughness ($R_{\text{ms}} = 0.98$ nm) on the mica surface (Fig. 2A). These structures remain

stable over time, for more than one hour. TIRF images (Fig. 2B) further revealed that these planar SLB regions were homogenously labeled by NR12S, confirming the lipidic nature of these regions. Addition of 50 nM NC induced limited changes in the bilayer morphology, but significantly increased its roughness ($R_{ms}=1.1\text{nm}$) (Fig. 2B). In contrast, for higher NC concentrations (300 nM), we observed a marked increase of the areas of bare mica (Fig. 2C), suggesting a NC-induced destabilization of the DOPC/DOPS SBLs. The corresponding TIRF images indicated a decrease in the fluorescence of the remaining SLB regions, together with the appearance of fluorescent smears outside of the SLB regions (Fig. 2D, dashed ellipse). These smears likely correspond to nucleoprotein complexes that were displaced by the scanning AFM tip. At higher NC concentrations ($\geq 1\text{ }\mu\text{M}$), the destabilization of the membranes by NC was to found to be much faster and more extended, rapidly leading to an efficient removal of the lipids from the mica (data not shown).

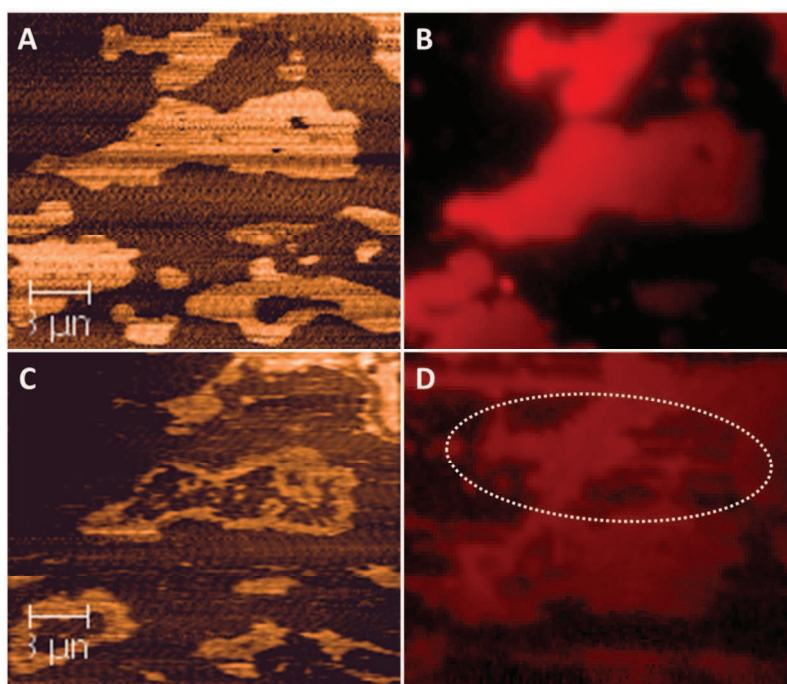


Figure 2: AFM/TIRF images of DOPC/DOPS (4:6) SLBs. (A) Morphological AFM image and (B) TIRF image of DOPC/DOPS SLB in the absence of NC. In AFM the colours indicate the height of the bilayer. (C) Morphological AFM image and (D) TIRF image 30 min after interaction with 300 nM of NC. The dashed ellipse highlighted the formation of proteolipidic particles. The SLB was labelled by NR12S. Excitation was at 532 nm. Experiments were performed in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

To get further insight into the interaction of NC with lipid membranes, and notably to directly visualize the NC-induced changes on the lipid membrane, two-photon microscopy was performed on giant unilamellar vesicles (GUVs) composed of DOPC:DOPS (4:6). To visualize simultaneously both interacting partners, the GUVs were labeled by F2N12SM, a membrane probe emitting in the green, while NC was labeled at its N-terminus by lissamine rhodamine (Rh), emitting in the red. In the absence of NC, the GUVs appear as regularly shaped spheres, uniformly colored in green (Fig. 3A). Addition of 0.4 μ M Rh-NC provided yellow-colored GUVs (Fig. 3B), indicating a superposition of the red emission of Rh-NC with the green emission of the labeled GUVs, that confirmed the binding of NC to lipid membranes of this composition. Interestingly, no detectable alteration of the GUVs could be observed over time at this NC concentration. In sharp contrast, addition of 2 μ M Rh-NC induced dramatic time-dependent changes in the morphology of the GUVs. At short incubation times (2 min), yellow-colored spherical structures likely corresponding to proteolipidic particles were observed at the GUV surface (Fig. 3C). Then, at later times (> 30 min), a complete destruction of the GUVs was observed (data not shown). Thus, our data suggest that by analogy to the Vpr protein (Basañez and Zimmerberg, 2001; Piller et al., 1999, 1998, 1996), NC can destabilize lipid membranes at high concentrations.

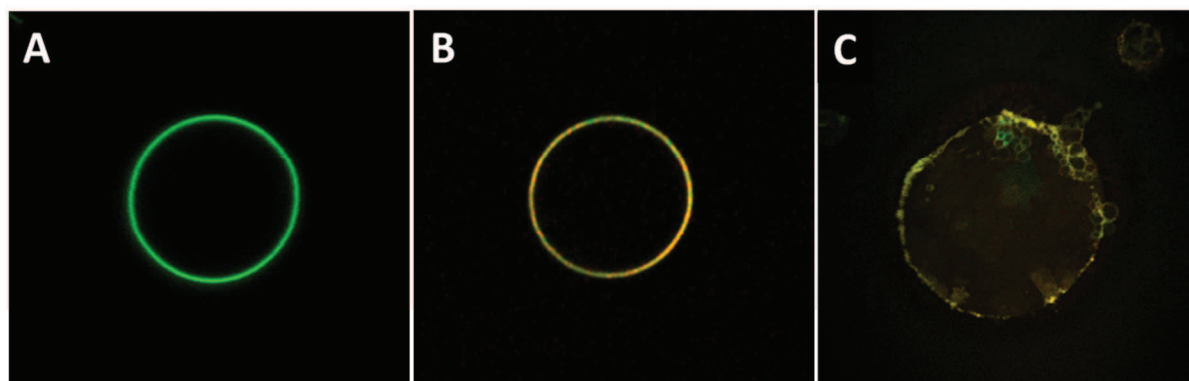


Figure 3: Two-photon fluorescence microscopy images of Rh-labeled NC in interaction with DOPC/DOPS (4:6) GUVs labeled with 400 nM F2N12SM. Images were recorded simultaneously in the green and red channels, to visualize the F2N12SM and Rh labels, respectively. Images of GUVs were recorded in the absence (A) and in the presence of Rh-NC added at a concentration of 400 nM (B) or 2 μ M (C). NC was incubated with GUVs for 2 min. At high concentration of NC, a partial disruption of LUV is observed. Two-photon excitation wavelength was at 830 nm. Sizes of the images were 70 μ m x 70 μ m. Experiments performed in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

3.2 Interaction of NC/dTAR complexes with DOPC and DOPC/DOPS SBLs and GUVs

The same strategy was used to characterize the interaction of 100 nM NC/DNA complexes with neutral and negatively charged SBLs. The complexes were prepared at a molar ratio of 3 NC per dTAR, to ensure a full complexation of NC molecules (Beltz et al., 2005).

On addition to the DOPC SBLs (Fig. 4A), the NC/dTAR complexes were observed as particles of about 5 to 6 nm of height, both on the top of the SLBs and on the bare mica (Fig. 4B). The presence of these complexes on the SLBs indicated that in contrast to free NC, the complexes could bind to neutral phospholipids. However, this binding may be of not very strong affinity, because much more complexes were observed on the mica as compared to the SLBs. Interestingly, no significant change of the morphology (Fig. 4B) and the emission (Fig. 4C) of the SLBs was observed with time, suggesting that the complexes marginally destabilize the bilayers.

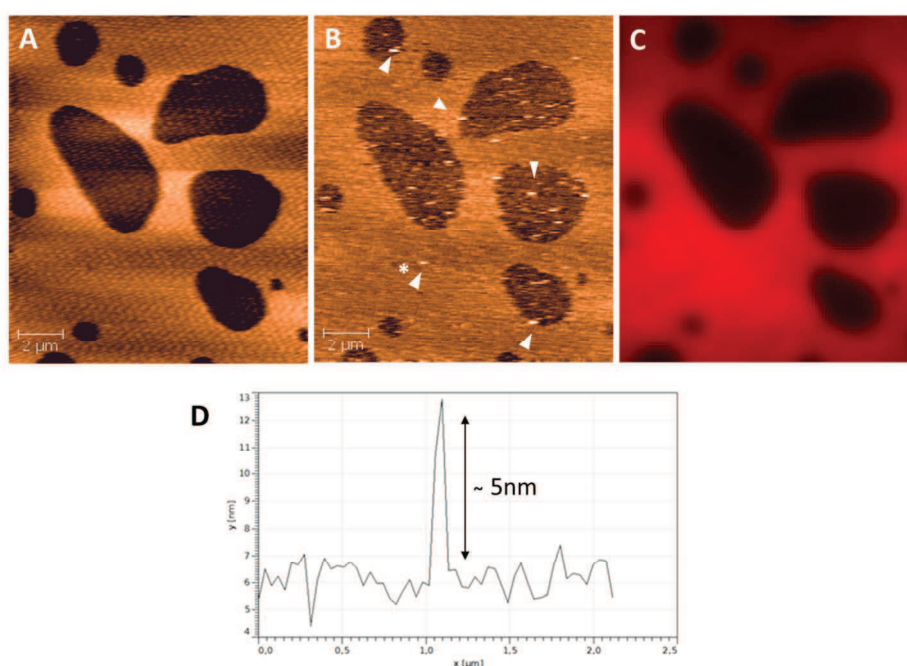


Figure 4: AFM/TIRF images of the interaction of DOPC SLB with NC/dTAR complexes. Morphological AFM images of the same DOPC SLB region of interest in the absence (A) or in the presence (B) of NC/dTAR complexes. NC/dTAR complexes are visible on the mica surface and on the DOPC SLB. C) TIRF image of the same region of interest. The SLB was labelled by NR12S (1 μM). Excitation was at 532 nm. D) Profile section of the NC/dTAR complex identified by an asterisk in B. Concentration of NC and dTAR were 300 nM and 100 nM respectively, in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

To further show that the complexes could bind to DOPC SLBs, we used fluorescently labeled MFL-NC/dTAR complexes. The strong spatial correlation between the AFM (Fig. 5A) and TIRF (Fig. 5B) images confirmed that the NC/dTAR complexes bind to the SLB, without destabilizing it.

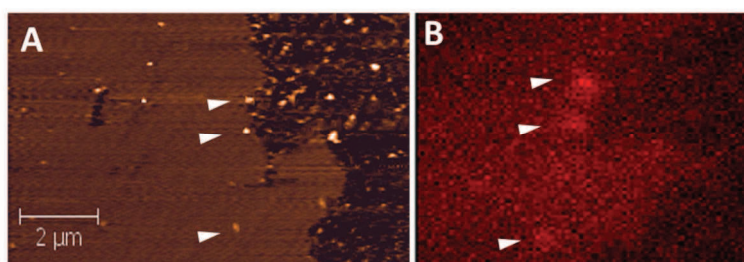


Figure 5: AFM/TIRF images of the interaction of DOPC SLB with MFL-NC/dTAR complexes. The correlation of the localization of the MFL-NC/dTAR complexes in AFM (A) and TIRF (B) is highlighted by the white arrows. Concentration of MFL-NC and dTAR was 300 nM and 100 nM respectively, in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4).

As in Fig. 2A, the DOPC/DOPS (4:6) SBLs in the absence of NC/dTAR complexes were perceived as planar bilayer regions interrupted by defects of rather large area corresponding to lipid-free mica (Fig. 6A). After addition of 100 nM of NC/dTAR complexes, we observed numerous particles of 5 to 6 nm height on the mica surface, but not on the DOPC/DOPS bilayer (Fig. 6B). Though no significant changes in the bilayer morphology was observed during the scanning time (10 min), an increase of its roughness was perceived (Rms = 1.1 nm vs Rms = 0.6 nm in the absence of complexes). Much more significant changes were observed after 15 min, with a clear destabilization of the bilayer (Fig. 6C). During the scanning process, a progressively increasing number of smears appeared during the acquisition of the AFM image (Fig. 6C), indicating a progressive destabilization of the bilayer with time. This was confirmed by the dramatic decrease in the intensity of the TIRF image, showing that the lipids have been removed from the mica (data not shown). Taken together, our data suggest that by analogy to NC, the NC/dTAR complexes can interact with negatively charged SLBs and destabilize them. Since no complexes could be observed on the SLB surface, one possible explanation is that the complexes bind transiently to the bilayer in order to form lipid/NC/dTAR complexes that are rapidly released from the mica. Alternatively, the NC/dTAR complexes may partly or fully dissociate on binding to the bilayer, so that NC can

form lipoprotein complexes similar to those formed when the SLBs are challenged with free NC.

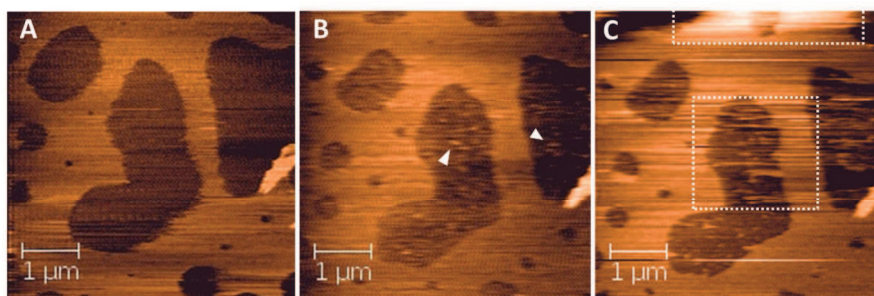


Figure 6: AFM images of the interaction of DOPC/DOPS (4:6) SLB with NC/dTAR complexes. The same region of interest was imaged before (A) and after (B) addition of NC/dTAR complexes. In (B), complexes are only visible on the mica surface (white arrows), but not on the SLB. (C) Evolution of the region of interest after 30 minutes of incubation with the NC/dTAR complexes. Smears appear during scanning time (indicated with white dashed boxes). Concentration of NC and dTAR was 300 nM and 100 nM respectively, in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

In full line with AFM images, the observation by two photon microscopy of yellow-colored DOPC GUVs with regular shape and stable in time (Fig. 7A) confirmed that Rh-NC/dTAR complexes can bind to DOPC bilayer, without destabilization. A shift from green to yellow of the GUVs was also observed when Rh-NC/DNA complexes were added to NR12SM-labeled DOPC/DOPS GUVs (Fig. 7B). However, in contrast to DOPC GUVs, small spherical structures likely corresponding to proteolipidic particles rapidly form at the surface of DOPC/DOPS GUVs (Fig. 7C), leading at a later step, to the disruption of the GUVs (data not shown). Comparison of the two-photon images obtained with the complexes (Fig. 7C) to those obtained with free NC at the same concentration (Fig. 2C) but at different incubation times (40 min vs 2 min) further revealed that the effect of NC/dTAR complexes on bilayer stability was slower and less pronounced than that of free NC. Therefore, it may be deduced that NC/dTAR complexes form less efficiently proteolipidic complexes than free NC and/or that only a partial dissociation of the NC/dTAR complexes occurs on interaction with the bilayer.

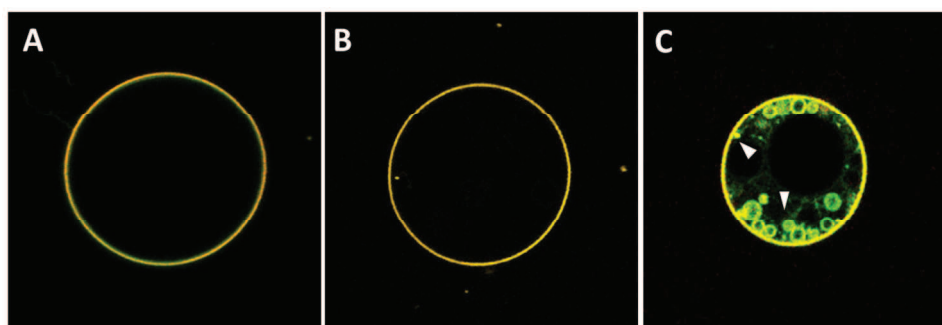


Figure 7: Two-photon fluorescence microscopy images of Rh-NC/dTAR complexes bound to DOPC (A) and DOPC/DOPS (4:6) GUVs (B and C). The GUVs were labeled with 0.4 μM F2N12SM. Images were recorded simultaneously in the green and red channels, to visualize the F2N12SM probe and Rh, respectively. The Rh-NC/dTAR complexes were prepared either with 2 μM Rh-NC and 670 nM dTAR (A) or with 1 μM Rh-NC and 330 nM dTAR (B and C). Incubation time of Rh-NC/dTAR complexes was 30 min (A), 25 min (B) and 40 min (C). The yellow color demonstrates that the red emitting Rh-NC is bound on the surface of the green emitting F2N12SM-labelled GUVs. In C, the arrows designate proteolipidic complexes. Two-photon excitation wavelength was at 830 nm. Sizes of the images were 70 μm x 70 μm . Experiments performed in 20 mM Hepes Buffer, NaCl 150 mM, pH 7.4.

4. DISCUSSION

In this work, we investigated the interaction of NC and NC/DNA complexes with model membranes, using two complementary microscopy techniques, namely AFM/TIRF combination and two-photon microscopy that allow visualizing the binding of the partners as well as the subsequent changes in the membrane structure. In line with our previous results (Kempf et al., submitted), free NC was found to marginally bind to neutral membranes, being thus unable to affect the stability or the morphology of the SLBs or GUVs, even over long incubation times ($> 1\text{h}$). In addition, both AFM/TIRF and two-photon imaging unambiguously confirmed that free NC interacts with negatively charged lipid membranes and evidenced for the first time that NC can destabilize these membranes, by forming proteolipid particles that are released in the medium. This effect was clearly dependent on the concentration of NC, as well as on the incubation time. While at low concentrations of NC (e.g. 50 nM), only marginal change in the membranes accompanies the binding of NC to these membranes, a full destruction of the membranes was observed at higher NC concentrations ($\geq 1\text{-}2\ \mu\text{M}$).

Interestingly, while no NC binding could be evidenced with neutral lipid membranes, a clear binding of NC/DNA complexes to these membranes was observed. However, this binding may be rather low, as we found more complexes bound to the mica than to the neutral SLBs (Fig 4, 5, 7). This may also explain why this binding was not evidenced in our previous spectroscopy studies (Kempf et al., submitted), though it could not be excluded that this binding could have been hidden by insufficient changes in the monitored signal. Importantly, both AFM and two photon images indicated that the complexes bound to the neutral lipid membranes were stable with time, leading to no or marginal destabilization of the membranes. This indicates that NC/DNA complexes are unable to form lipoprotein complexes with neutral lipids. In contrast, lipoprotein complexes were clearly observed when NC/DNA complexes were incubated with negatively charged lipids (Fig. 7C), though their formation was less efficient than with free NC, being slower in time and requiring higher NC concentrations. Taken together, our data suggest that the lipid membrane destabilization activity results from the interaction of NC or NC/DNA complexes with negatively charged lipids. As a result of this interaction, lipoproteins or liponucleoprotein complexes form and then dissociate from the membranes, leading to their destabilization and finally, their disruption.

This lipid membrane destabilizing property of NC is reminiscent of that reported for Vpr (Piller et al., 1999, 1998, 1996) that was even found to be more potent in similar AFM experiments (Greiner et al., 2011, and data not shown). Vpr was reported to induce ion channels in plasma membranes (Piller et al 1996, 1998, 1999), as well as local discontinuities in the mitochondrial membranes (Basañez and Zimmerberg, 2001) and local herniations in the nuclear envelope (de Noronha et al., 2001). In turn, these Vpr-induced alterations in the membranes were suggested to play a crucial role in AIDS pathology (Garry, 1989), and notably in Vpr-induced apoptosis (Basañez and Zimmerberg, 2001) and cell-cycle arrest (de Noronha et al., 2001), as well as in neuron death (Piller et al., 1999, 1998). In these conditions, what could be the role of the lipid membrane destabilization properties of NC? Due to the much lower affinity of NC to double-stranded DNA as compared to single stranded RNA (Darlix et al., 2011; Mirambeau et al., 2007, 2006), together with the probable disassembly of the capsid in close proximity to the nuclear envelop (Arhel, 2010; Arhel et al., 2007), a massive release of NC molecules close to the nuclear envelop is expected at the end of the reverse transcription. It could thus be speculated that NC could destabilize the nuclear membrane to assist by a still ill-defined mechanism the translocation of the HIV-1 preintegration complex (PIC) into the nucleus.

5. REFERENCES

- Angelova, M.I., Dimitrov, D.S., 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81, 303–311. doi:10.1039/DC9868100303
- Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96. doi:10.1186/1742-4690-7-96
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M.C., Allen, T.D., Charneau, P., 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26, 3025–37.
- Attwood, S.J., Choi, Y., Leonenko, Z., 2013. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3514–3539. doi:10.3390/ijms14023514
- Basañez, G., Zimmerberg, J., 2001. HIV and Apoptosis. *J. Exp. Med.* 193, f11–f14.
- Beltz, H., Clauss, C., Piémont, E., Ficheux, D., Gorelick, R.J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J.-L., de Rocquigny, H., Mély, 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. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.042
- Bernacchi, S., Stoylov, S., Piémont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L., Mély, 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. doi:10.1006/jmbi.2002.5429
- Bonnet, D., Ilien, B., Galzi, J.-L., Riché, S., Antheaune, C., Hibert, M., 2006. A rapid and versatile method to label receptor ligands using “click” chemistry: Validation with the muscarinic M1 antagonist pirenzepine. *Bioconjug. Chem.* 17, 1618–1623. doi:10.1021/bc060140j
- Darlix, J.-L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fossé, P., Mauffret, O., Mély, Y., 2011. Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J. Mol. Biol.* 410, 565–581. doi:10.1016/j.jmb.2011.03.037
- De Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D., Greene, W.C., 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294, 1105–8.
- Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoudé, G., Jadwin, J.A., de La Cruz, J., Nagashima, K., 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. doi:10.1371/journal.ppat.1000339
- Fidorra, M., Duelund, L., Leidy, C., Simonsen, A.C., Bagatolli, L.A., 2006. Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophys. J.* 90, 4437–4451. doi:10.1529/biophysj.105.077107
- Garry, R.F., 1989. Potential mechanisms for the cytopathic properties of HIV.: AIDS [WWW Document]. URL http://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/1989/11000/Potential_mechanisms_for_the_cytopathic_properties.1.aspx (accessed 5.28.14).
- Godet, J., de Rocquigny, H., Raja, C., Glasser, N., Ficheux, D., Darlix, J.-L., Mély, 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. doi:10.1016/j.jmb.2005.12.038
- Greiner, V.J., Shvadchak, V., Fritz, J., Arntz, Y., Didier, P., Frisch, B., Boudier, C., Mély, Y., de Rocquigny, H., 2011. Characterization of the mechanisms of HIV-1 Vpr(52-96) internalization in cells. *Biochimie* 93, 1647–1658. doi:10.1016/j.biochi.2011.05.033

- Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G., Cullis, P.R., 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55–65.
- Horn, R.G., 1984. Direct measurement of the force between two lipid bilayers and observation of their fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 778, 224–228. doi:10.1016/0005-2736(84)90466-8
- Kucherak, O.A., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D.A., Arntz, Y., Didier, P., Mély, Y., Klymchenko, A.S., 2010. Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4907–4916. doi:10.1021/ja100351w
- Lingappa, J.R., Doohar, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K., 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. doi:10.1074/jbc.M507255200
- Mély, Y., De Rocquigny, H., Morellet, N., Roques, B.P., Gérard, D., 1996. Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 5175–5182. doi:10.1021/bi952587d
- Mirambeau, G., Lyonais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J., Borde, I., Reboud-Ravaux, M., Restle, T., Gorelick, R.J., Le Cam, E., 2007. HIV-1 protease and reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. *PLoS One* 2, e669.
- Mirambeau, G., Lyonais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J., Justome, A., Delain, E., Gorelick, R.J., Le Cam, E., 2006. Transmission electron microscopy reveals an optimal HIV-1 nucleocapsid aggregation with single-stranded nucleic acids and the mature HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* 364, 496–511.
- Piller, S.C., Ewart, G.D., Jans, D.A., Gage, P.W., Cox, G.B., 1999. The Amino-Terminal Region of Vpr from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Forms Ion Channels and Kills Neurons. *J. Virol.* 73, 4230–4238.
- Piller, S.C., Ewart, G.D., Premkumar, A., Cox, G.B., Gage, P.W., 1996. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 111–115.
- Piller, S.C., Jans, P., Gage, P.W., Jans, D.A., 1998. Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: Implications for AIDS pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4595–4600.
- Postupalenko, V.Y., Shvadchak, V.V., Duportail, G., Pivovarenko, V.G., Klymchenko, A.S., Mély, Y., 2011. Monitoring membrane binding and insertion of peptides by two-color fluorescent label. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 424–432. doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.013
- Richter, R.P., Maury, N., Brisson, A.R., 2005. On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* 21, 299–304.
- Shvadchak, V., Sanglier, S., Rocle, S., Villa, P., Haiech, J., Hibert, M., Van Dorsselaer, A., Mély, Y., de Rocquigny, H., 2009. Identification by high throughput screening of small compounds inhibiting the nucleic acid destabilization activity of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biochimie* 91, 916–923. doi:10.1016/j.biochi.2009.04.014
- Shynkar, V.V., Klymchenko, A.S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C.D., Demchenko, A.P., Freyssinet, J.-M., Mely, Y., 2007. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2187–2193. doi:10.1021/ja068008h
- Thomas, J.A., Gorelick, R.J., 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* 134, 39–63. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.006

PARTIE 3 :

***Mise en œuvre d'un protocole
expérimental permettant l'observation
d'évènements membranaires en
microscopie super-résolutive***

Notre objectif, suite à l'analyse des interactions NCp7/membrane consiste à caractériser le rôle du domaine NC de Gag dans sa liaison à la membrane plasmique au cours de l'assemblage en milieu cellulaire. De par la petite taille des particules virales et donc des domaines membranaires sur lesquels s'assemblent les protéines Gag, des techniques super-résolutives de type PALM ou STORM sont nécessaires pour leur observation. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire d'exprimer la protéine Gag sous forme de protéine de fusion avec une protéine photoactivable. Cependant, la très haute concentration des protéines Gag au niveau de la membrane plasmique et la difficulté de contrôler l'expression des protéines de fusion rend l'utilisation de ces dernières, assez complexe pour mettre au point les conditions d'utilisation de la microscopie PALM/STORM récemment implantée au laboratoire. Par conséquent, nous avons choisi un système plus simple et plus facilement contrôlable pour mettre au point les conditions de travail et les outils qui permettront par la suite de suivre l'assemblage du VIH-1, de manière qualitative et quantitative.

Le modèle choisi a été l'internalisation dirigée par la clathrine du neuropeptide Y (NPY) associé à son récepteur Y_1 . Il y a quelques années, le laboratoire a proposé un modèle d'endocytose et de recyclage du couple NPY/ Y_1 , sur la base de résultats acquis par des techniques indirectes telle que la spectroscopie de fluorescence. Les endosomes étant des objets de taille inférieure à la limite de la diffraction imposée par la microscopie optique conventionnelle, leur observation nécessite l'utilisation de techniques pouvant surpasser cette limite, telle que la microscopie électronique ou la microscopie de fluorescence super-résolutive.

Ainsi, grâce à la microscopie haute résolution dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) nous avons pu mettre en évidence la liaison du peptide à son récepteur et son internalisation par endocytose à puits de clathrine, ainsi que la spécificité de l'interaction NPY/ Y_1 . Nous avons également pu confirmer le modèle d'endocytose/recyclage préalablement proposé en suivant l'évolution des tailles des vésicules internalisées en fonction du temps.

L'objet biologique étudié étant différent du contexte du VIH-1, cette dernière partie commence par une brève introduction concernant le neuropeptide Y et l'internalisation par puits de clathrine, et est suivie des résultats obtenus.

I. Le neuropeptide Y et son récepteur Y₁

La famille des peptides Y est un système multi-récepteur/multi-ligand qui comprend quatre récepteurs exprimés chez l'humain (hY₁, hY₂, hY₄ et hY₅) et un cinquième récepteur y₆ exprimé chez le lapin et la souris (495), et trois peptides (le neuropeptide Y (NPY), le peptide YY (PYY) et le peptide pancréatique (PP)) qui les activent en s'y liant. L'affinité de chacun des peptides pour chaque récepteur diffère et de plus, chaque récepteur joue des rôles bien spécifiques dans différents processus physiologiques et pathologiques.

Le neuropeptide Y (NPY), découvert en 1982 (496) est un petit peptide, composé de 36 acides aminés. NPY est structuré en deux domaines : le domaine C-terminal qui se présente sous forme d'hélice α et le domaine N-terminal qui est flexible. Faisant partie de la famille hormonale des peptides Y, il présente 70% d'homologie avec PYY et 50% avec PP (Fig. 1A). Ces trois peptides sont étroitement liés. Cependant, PYY et PP sont localisés dans le système digestif alors que le NPY est abondamment trouvé dans le cerveau (497, 498). De ce fait, NPY est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de l'alimentation (499), la neurogenèse (500), la dépendance à l'alcool (501, 502), la dépression (503), la mémoire à court terme (504), la vasoconstriction (498), la douleur (505), l'agressivité (506), ou encore la réponse immunitaire (507). NPY se lie avec une forte affinité à hY₁, hY₂ et hY₅.

Les récepteurs des peptides Y (RPY) font partie de la grande famille des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) qui, avec plus de 800 membres constitue la plus grande famille de récepteurs membranaires permettant la transduction du signal à travers la membrane plasmique (MP) (508). Les RPYs appartiennent plus particulièrement à la classe A (c'est-à-dire qu'ils sont de type rhodopsine). Ces récepteurs ne possèdent que peu d'homologies les uns avec les autres, d'où leurs affinités et types d'interactions variables avec les trois peptides Y (509). Les RPYs sont donc couplés aux protéines G_i et G_o, dont l'activation conduit à l'inhibition de l'adényl-cyclase et donc à la réduction du taux d'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) (510). Ce sont des protéines membranaires qui comprennent sept hélices α hydrophobes transmembranaires, trois boucles intra- et trois boucles extracellulaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique. Le site de liaison se situe au centre de l'heptagone (Fig. 1B).

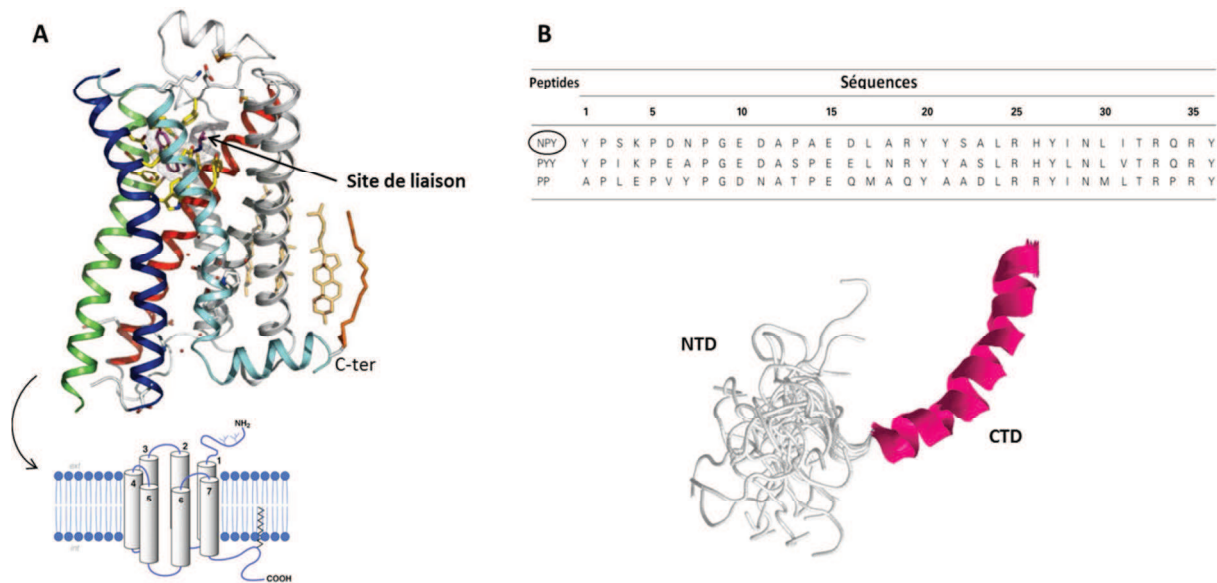


Figure 1 : Structure du NPY et d'un RCPG de type A. (A) Structure tridimensionnelle d'un RCPG lié à son agoniste. Le schéma permet de mieux visualiser la conformation des sept domaines transmembranaires, des trois boucles intra- et extracellulaires et des extrémités N- et C-terminales, respectivement extracellulaire et cytoplasmique (508). **(B)** Tableau présentant les séquences des acides aminés des trois peptides Y (511). Structure tridimensionnelle de NPY : le domaine C-terminal structuré en hélice α est représenté en rose, les conformations possibles du domaine N-terminal flexible sont représentées en blanc (PDB : 1RON).

Le récepteur hY_1 est composé de 384 acides aminés organisés comme précédemment décrit. Il est majoritairement situé dans la région hypothalamique du cerveau (512), bien qu'il ait également été localisé dans les tissus adipeux (513), dans les vaisseaux sanguins, ou encore dans le colon, les reins, le cœur ... (514, 515). Parmi ses nombreux rôles physiopathologiques, il a récemment été montré qu'il pourrait être lié à certains cancers (516–518). hY_1 est essentiellement activé par PYY et NPY, qui s'y lient à haute affinité. Il interagit également avec PP, avec toutefois une activité réduite. L'interaction NPY/ Y_1 est essentiellement dirigée par le domaine C-terminal de NPY qui interagit avec plusieurs résidus des boucles extracellulaires. Tout d'abord, les résidus chargés négativement Asn2.68 et Asn6.59, interagissent avec NPY de manière électrostatique (Fig. 2, violet) (519–521). De plus, le résidu Asn6.59 de Y_1 interagit avec le résidu Arg35 de NPY (522). Ces études ont également révélé l'importance des résidus Tyr2.64, Phe6.58 et His7.31 (Fig. 2, bleu), qui formeraient une poche hydrophobe dans laquelle s'insèreraient NPY. Finalement, les résidus Asn 6.55, Trp6.60 et Asn7.32 semblent également participer à cette interaction (Fig. 2, bleu), cependant leur rôle reste à encore à définir (523).

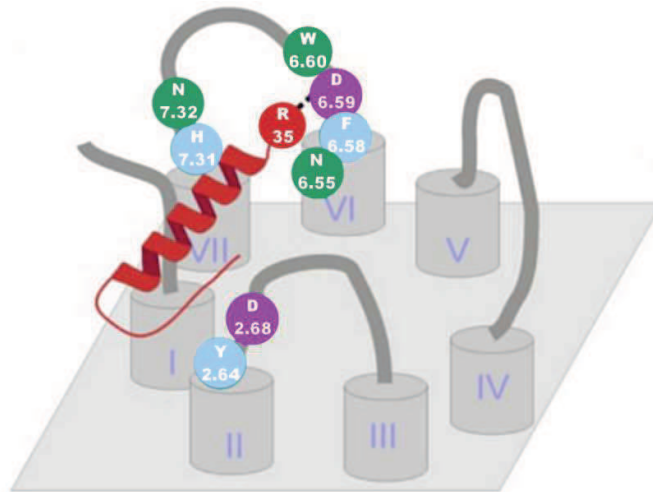


Figure 2 : Interaction du récepteur Y_1 avec NPY (adapté de (511)). Schématisation des différentes interactions entre NPY et son récepteur Y_1 . Les résidus Asp2.68 et Asp6.59 (violet) sont impliqués dans des interactions électrostatiques et plus particulièrement Asp6.59 qui interagit avec l'Arg35 de NPY. Les résidus Tyr2.64, Phe6.58 et His7.31 (bleu) sont impliqués dans des interactions hydrophobes. Les résidus Asn6.55, Trp6.60 et Asn7.32 sont également importants, mais leur interaction est encore indéfinie.

Par ailleurs, hY_1 est le seul des récepteurs des peptides Y, dont l'internalisation rapide a pu être confirmée (524–527). Ainsi, après son activation par NPY, hY_1 est internalisé via une endocytose par puits de clathrine.

II. L'endocytose par puits de clathrine

L'endocytose est le mécanisme par lequel des molécules extérieures ou membranaires peuvent transiter du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (528). L'endocytose joue un rôle essentiel aussi bien dans l'internalisation d'éléments nutritifs, que dans la régulation de l'expression des récepteurs membranaires. Le feuillet externe de la MP constitue la surface avec laquelle une cellule peut communiquer avec l'environnement extérieur. Sa composition protéo-lipidique est donc très importante pour maintenir l'homéostasie cellulaire ainsi que les différentes interactions entre la cellule et son environnement. Il existe de nombreux mécanismes d'endocytose, ayant tous comme point commun la liaison de protéines « cargo » à la membrane cellulaire, suivie de la déformation de celle-ci et de l'internalisation du matériel dans des vésicules lipidiques qui bourgeonnent au niveau de la face interne de la MP (Fig. 3A). Les vésicules internalisées sont toutes adressées vers les endosomes précoces où

elles seront ensuite soit directement recyclées soit dirigées vers le compartiment ciblé (l'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmic, le noyau) puis finalement dégradées (lysosome) ou recyclées (endosome de recyclage) (Fig. 3B).

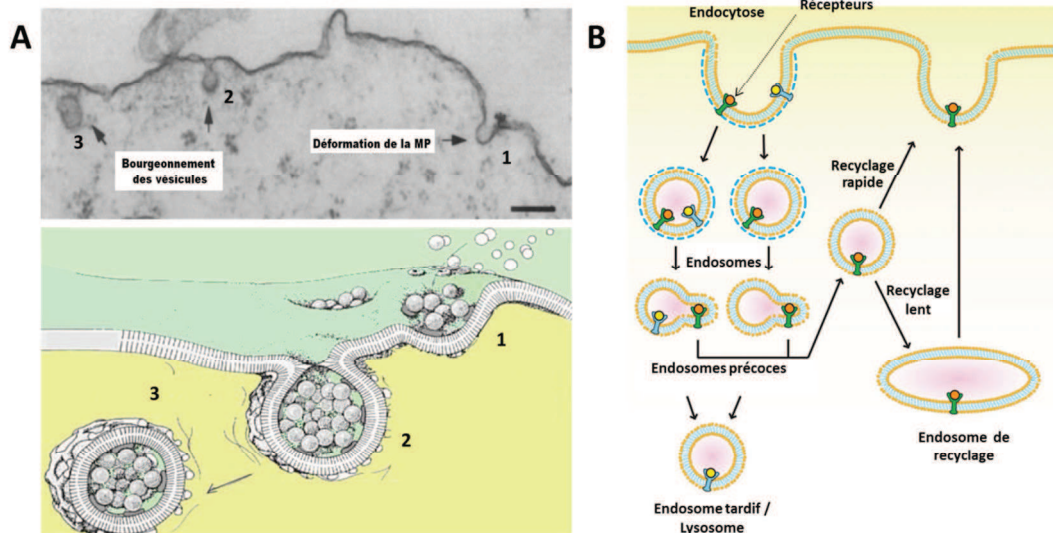


Figure 3 : Endocytose et trafic cellulaire. (A) Gros plan sur l'endocytose : image de microscopie électronique (529) et schéma illustrant l'internalisation par endocytose de matériel extra-cellulaire. **(B)** Schéma illustrant le trafic intracellulaire. (530).

Parmi les nombreux modes d'endocytose (531), le mécanisme le mieux caractérisé aujourd'hui est celui de l'endocytose dirigée par la clathrine (CME pour clathrin-mediated endocytosis).

L'endocytose par puits de clathrine constitue le processus principal de l'internalisation des récepteurs membranaires tels que les récepteurs de la transferrine, des protéines EGF (epithelial growth factor), LDL (low density lipoproteins), des cytokines ou encore du récepteur hY_1 . Ce mécanisme requiert un assemblage coordonné et dynamique de nombreuses protéines membranaires (532, 533), dont la composition et la cinétique dépendent du type de cellule et du matériel à internaliser. Les principales protéines impliquées dans cet évènement sont les adaptines, la clathrine et la dynamine (534–536). L'endocytose dirigée par la clathrine s'initierait par la liaison du cargo à son récepteur (Fig. 4A (a)), qui conduirait à la liaison des adaptines sur le site membranaire destiné à être internalisé (le mécanisme d'initiation de la CME est toutefois encore discutée, (537)). Les adaptines font le lien entre la membrane et la clathrine en recrutant cette dernière qui se trouve sous forme de trimère, appelés triskelions,

dans le cytoplasme (Fig. 4B) (538). Ceux-ci s'assemblent tout d'abord en épousant la forme de la déformation de la MP précédemment induite suite à la liaison du cargo à son récepteur (Fig. 4A (b) et 4B).

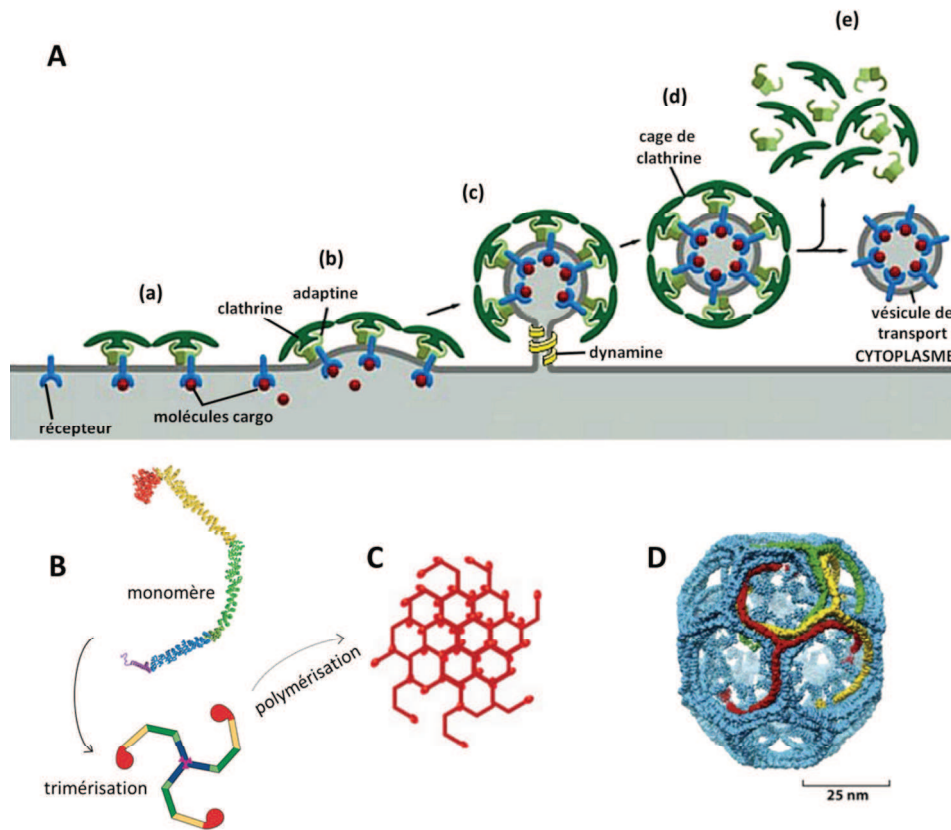


Figure 4 : Mécanisme de l'endocytose par puits de clathrine (adapté de Molecular Biology of the Cell 4th édition – Chapitre 13, (539, 540)). **(A)** Schéma illustrant les différentes étapes du processus d'endocytose par puits de clathrine. **(B)** Structure d'un monomère de clathrine qui trimérise sous forme de triskélion. Les différents domaines fonctionnels sont représentés en couleur : le domaine de trimérisation en violet, le domaine proximal en bleu, le « genou » en vert clair, le domaine distal en vert foncé, la cheville en jaune, le domaine terminal en rouge. **(C)** Maillage issu de la polymérisation des triskélions de clathrine. **(D)** Reconstruction d'une cage de clathrine (résolution : 8Å).

Par la suite, la polymérisation de la clathrine en un maillage hexagonal incurvé (Fig. 4C) conduit à l'invagination de la MP due à l'« aspiration » de celle-ci dans la cage polygonale formée par l'association des triskélions de clathrine (Fig. 4A (c) et 4D) (540, 541). La vésicule est alors juste maintenue à la membrane par un collet, autour duquel la dynamine va polymériser en hélice. Cette hélice, en se resserrant, permet la scission de la membrane et la libération de la vésicule dans le cytoplasme (Fig. 4A (d)) (542). Finalement, la clathrine se

désassemble et la vésicule peut alors se diriger vers le compartiment cellulaire auquel elle est adressée.

Par ailleurs, de récentes études ont également souligné le rôle important joué par la composition lipidique de la MP au cours de l'endocytose. Tout d'abord, les phospholipides, et plus particulièrement le $PI(4,5)P_2$ est essentiel pour la déformation de la MP car il permet le recrutement des adaptines par le biais d'une interaction spécifique (543–545). De plus, le rôle potentiel des sphingolipides et du cholestérol a également été étudié, donnant cependant des résultats contradictoires résumés dans la revue de Doherty et McMahon (2009) (546)

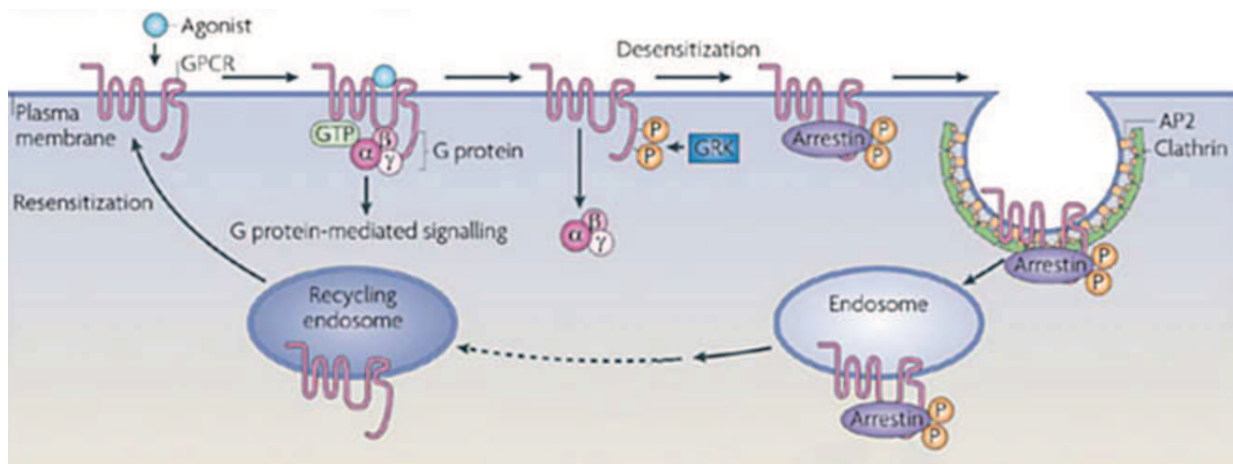


Figure 5 : Mécanisme de l'endocytose par puits de clathrine des RCPGs (adapté de (547)). Schéma illustrant l'internalisation par puits de clathrine des RCPGs.

Dans le cas des RCPGs, lorsque la molécule cargo est liée au récepteur, elle active ce-dernier, ce qui conduit à l'interaction du RCPG avec un hétérotrimère de protéine G. Le RCPG catalyse l'échange de GDP en GTP sur la sous-unité $G\alpha$ induisant la libération dans le cytoplasme de l'hétérotrimère et la dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Le RCPG est ensuite phosphorylé par une kinase (GRK pour GPCR kinase), conduisant à l'interaction avec une arrestine (de la famille des adaptines), qui elle-même va recruter la clathrine et permettre la formation de la vésicule d'endocytose. A noter que la sous-unité α activée par la GTP est responsable, entre autre, de la régulation de l'activité de l'adényl cyclase alors que la libération de la sous-unité $\beta\gamma$ va pouvoir réguler le flux d'ions et l'activité de la phospholipase $C\beta$.

L'internalisation des RCPGs permet donc de réguler le processus fonctionnel de la désensibilisation des membranes. Suite à leur internalisation, ceux-ci peuvent être redirigés vers les lysosomes, dans le but d'être dégradé, ou comme pour le récepteur Y_1 d'être recyclés et de resensibiliser la MP.

MANUSCRIT 3 :

***Etude de l'internalisation du neuropeptide Y
(NPY) par microscopie super-résolutive***

Investigation by high resolution microscopy of the internalization of the neuropeptide Y bound to its Y₁ receptor.

Kempf Noémie, Didier Pascal, Postupalenko Viktoriia, Bucher Bernard and Mély Yves[#]

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie,
Université de Strasbourg, Cedex, Fr., 67401 Illkirch, France

[#]Corresponding author: Yves Mély, yves.mely@unistra.fr, tel: 33368854263

ABSTRACT

The neuropeptide Y (NPY) plays numerous biological roles that are mediated by a family of G-protein-coupled receptors. Among the latter, the NPY Y₁ subtype receptor undergoes a rapid desensitization following agonist exposure. This desensitization was recently suggested to result from a rapid clathrin-dependent internalization of Y₁ and its recycling to the plasma membrane via early/sorting endosomes (EE/SE) and recycling endosomes (RE). Herein, to confirm this internalization/recycling model, we investigated the NPY-induced internalization of the Y₁ receptor by applying direct optical reconstruction microscopy (dSTORM), a super-resolution microscopy technique that enables imaging with a lateral resolution of 30 nm, and thus allows resolving the EE and SE which are below the resolution limit of conventional optical microscopes. Using Cy5-labeled NPY, we could visualize and monitor with time the internalization and recycling of the NPY peptide on HEK293 cells stably expressing eGFP-labeled Y₁ receptors. Internalization was found to be highly dependent on the Y₁ receptor, since it was suppressed by the specific Y₁ antagonist BIBP3226 and was not observed in cells expressing the Y₂ receptor, instead of the Y₁ receptor. By discriminating the EE/SE from the larger RE by their sizes and monitoring these two populations as a function of the time, we could unambiguously confirm the previously proposed model describing the rapid internalization of the human Y₁ receptor following agonist activation.

INTRODUCTION

Neuropeptide Y (NPY) is a member of the pancreatic-polypeptide-fold family of peptides, firstly isolated from porcine brain. NPY is a 36 amino-acid residue peptide that is one of the most abundant and widely distributed neuropeptide in the central and peripheral nervous system (Berglund et al., 2003; Tatemoto et al., 1982). The actions of NPY are mediated by a family of G-protein-coupled receptors (NPY Y₁, Y₂, Y₄ and Y₅). The most common action of these receptor subtypes is the negative coupling to adenylyl cyclase activity through a pertussis toxin sensitive GTP-binding protein (G_{i/o}). Like with other G protein coupled receptors (GPCRs), we have previously reported for the NPY Y₁ subtype receptor a rapid desensitization following agonist exposure which results from a rapid clathrin-dependent internalization into endosomal recycling compartments (Gicquiaux et al., 2002; Ouedraogo et al., 2008). Moreover, using the pH-dependence of the fluorescence intensity of an eGFP tag at the N-terminal end of the Y₁ receptor, we derived by fluorescence spectroscopy and confocal microscopy, a model describing Y₁ receptor internalization and recycling upon interaction with NPY. In this model, the NPY-bound Y₁ receptor is thought to be rapidly internalized, before being recycled either from early endosomes (EE) and/or from recycling endosomes (RE) (Gicquiaux et al., 2002) (Fig. 1). The values of the kinetic rate constants governing the different steps were obtained, so that a full kinetic description of the internalization/recycling process was provided. This model was further substantiated and validated by using different mutated and truncated NPY Y₁ receptors (Lecat et al., 2011; Ouedraogo et al., 2008). Interestingly, similar results have also been obtained for vasopressin receptor trafficking (Innamorati et al., 2001).

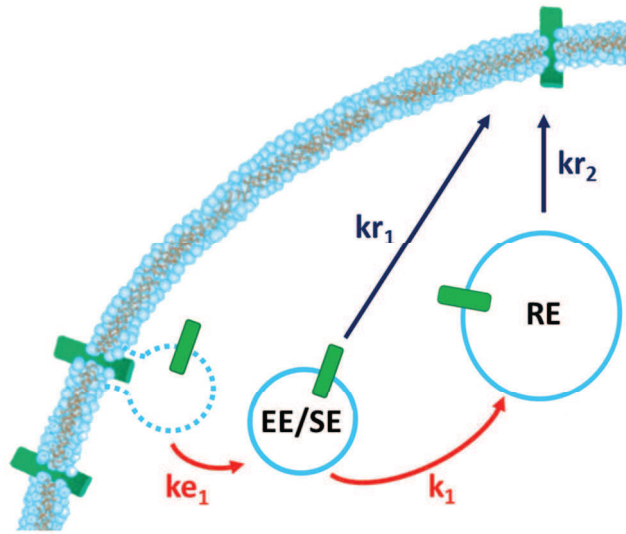


Figure 1: Model of NPY-induced internalization and recycling of hNPY Y_1 receptors in HEK293 cells. Proposed scheme for the internalization (red arrows) and recycling (blue arrows) of hNPY- Y_1 receptors (Gicquiaux et al, 2002). Receptors are in green. The NPY-bound Y_1 receptors internalized via the clathrin-coated pits pathway are directed to the EE/SE compartment (early endosomes/sorting endosomes) with rate constant ke_1 ($0.15 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$) and then, to the RE (recycling endosomes) compartment with a rate constant k_1 ($0.056 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$). Recycling from these two compartments toward the cell plasma membrane is characterized by rate constants kr_1 ($0.57 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$) and kr_2 ($0.083 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$), respectively.

In the present study, to strengthen and confirm the Y_1 receptor internalization/recycling model, we reinvestigated the internalization of NPY bound to its Y_1 receptor by applying direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM), a super-resolution microscopy technique that enables cell imaging with a lateral resolution of 30 nm. This technique is of particular interest in this case, since endosomes and notably early (EE) and sorting (SE) endosomes are below 200 nm in diameter (Brodin et al., 2000; Mukherjee et al., 1997; Parton et al., 1992) and thus, below the resolution limit of conventional optical microscopes. Using Cy5-labeled NPY, we could directly visualize the internalization and recycling of the NPY peptide on HEK293 cells expressing eGFP-labeled Y_1 receptors. Internalization was found to be highly dependent on the Y_1 receptor, since it was suppressed by the specific Y_1 antagonist BIBP3226 and was not observed in cells expressing the Y_2 receptor, instead of the Y_1 receptor. Due to the high resolution of the dSTORM technique, we were able to discriminate the EE/SE from the larger recycling endosomes (RE). By quantitatively monitoring these two populations as a function of the time, we could unambiguously confirm the previously

proposed model describing the rapid internalization of the human Y₁ receptor following agonist activation (Gicquiaux et al., 2002).

MATERIALS AND METHODS

Peptides and Chemicals

The cyanine 5 succinimidyl ester was purchased from Lumiprobe. All other chemicals were from Sigma Aldrich. BIBP3226 and BIIE0246 were kindly supplied by Dr. H. Hoods (Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany). Transferrin labeled at its C-terminus end by Alexa Fluor 555 (Trf-A555) was purchased at Invitrogen.

NPY peptide was synthesized by solid phase peptide synthesis on a 433A synthesizer (ABI, Foster City, CA). The synthesis was performed at a 0.1 mmol scale using standard side-chain protected fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-amino acids and HBTU/HOBt coupling protocol. LL-HMP resin (ABI, 0.44 mmol/g reactive group concentrations) was used as solid support. At the end of the synthesis, peptidylresin was isolated, washed twice by NMP and split into two parts. To label the peptide, two equivalents (0.02 mmol) of the cyanine 5 succinimidyl ester were dissolved in 0.2 mL of NMP, mixed with two eq. of HBTU/HOBt coupling solution (in DMF) and added to Fmoc-deprotected peptidylresin (0.01 mmol) swelled in 0.2 mL of NMP. After a few minutes of shaking, five eq. of DIEA solution was added. Then, the reaction mixture was stirred overnight at 40°C. Resin was filtrated and washed by NMP, methanol and DCM. Cleavage and deprotection of the peptidylresin were performed for 2 h using a 10 mL trifluoroacetic acid (TFA) solution containing water (5%, v/v), TIS (iPr₃SiH, 2.5%, v/v), phenol (1%, w/v), thioanisole (5%, v/v) and ethanedithiol (2.5%, v/v). The solution was concentrated in vacuo and the peptide was precipitated by using ice-cold diethyl ether and then pelleted by centrifugation. The pellet was washed with diethyl ether and dried. The peptides were solubilized with aqueous TFA (0.05 %, v/v). HPLC purification was carried out on a C8 column (uptisphere 300A, 5µm; 250X10, Interchim, France) in water/acetonitrile mixture containing 0.05% TFA. The biological activity of the NPY and Cy5-NPY was assessed by measuring the dose-dependent inhibitory effect of NPY on forskolin-stimulated cAMP accumulation, as previously described (Gicquiaux et al., 2002).

Cell culture and transfection

Control and transfected HEK293 cells were cultured to ~80% confluence in T-75 flasks in MEM with Earle's salt supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). cDNA of human NPY Y₁ and Y₂ receptors were kindly provided by Prof. H. Herzog (Garvan Institut, Sydney, Australia). The pCEP4-SP-eGFP-NPY Y₁ vector and pIRES-SP-eGFP -NPY Y₂ vectors where eGFP was fused to the NH₂-terminal of the full-length human NPY Y₁ receptor and NPY Y₂ receptor were constructed as previously described (Gicquiaux et al., 2002; Lecat et al., 2011; Ouedraogo et al., 2008). HEK293 cells were transfected and selected with 4000 µg/ml hygromycin B, as previously described (Gicquiaux et al., 2002). eGFP-NPY Y₁ and eGFP-NPY Y₂ receptors were expressed stably for about 2 months (10 cell passages).

For microscopy experiments, transfected cells were grown at low density on µ-Dish^{35mm} glass bottom (Ibidi, Biovalley). Cells were washed twice with Krebs-Ringer buffer (in mM: 136 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 5 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 0.21 EGTA, 5.5 glucose, 20 HEPES, 1mg/mL BSA, pH 7.4). Cells were then incubated in the same medium at 37°C for periods ranging from 0 to 60 minutes with NPY (100 nM) or Cy5-NPY (100 nM), in the absence or the presence of Trf-A555 (20 µg/ml), BIBP3226 (10 µM) or BIEE0246 (10 µM) used. The internalization process was stopped by washing the cells with the Krebs Ringer buffer (without BSA). To remove the excess of peptide on the cells and at the bottom of the boxes, a 30 seconds incubation with a PBS buffer containing 0.01% trypsin was performed at 37°C. After removal of the medium, cells were then fixed in 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde/Krebs Ringer buffer (without glucose and BSA) for 15 min at room temperature and then incubated for 15 min in NH₄Cl 50mM to quench any remaining paraformaldehyde or glutaraldehyde. Finally, cells were stored in PBS at 4°C for less than one week.

To increase the photostability of the Cy5 dye during imaging, cells were in a PBS buffer supplemented with 0.2% glucose, 0.02 mg/mL catalase and 0.1 mg/mL glucose oxidase. Stock-solutions of catalase and glucose oxidase were prepared separately in 0.2% glucose PBS buffer and mixed with the PBS buffer at the last moment.

Microscopy experiments and image processing

Highly inclined and laminated optical sheet (HILO) microscopy (Tokunaga et al., 2008) and direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) (Klein et al., 2014; van de Linde et al., 2009) were performed on an Olympus IX-71 inverted microscope with a high-numerical aperture (NA) HILO objective (Apo HILO 100 $\times$, oil, NA 1.49, Olympus). Samples were illuminated with laser diodes at 488 nm (15 W/cm², Spectra Physics) and 532 nm (20 W/cm², Cobolt) and with a Helium/Neon laser at 632.8 nm (65 W/cm², ThorLabs). The signal was recorded on an EM-CCD camera (ImagEM, Hamamatsu) (0.106 μ m pixel size) with a typical integration time of 50 ms. The following bandpass filters were used to image respectively eGFP, Alexa 555 and Cy5: 525 $\pm$ 17 nm (Semrock FF01-525/35-25), 579 $\pm$ 34 nm (Semrock FF01-579/34-25) and 675 $\pm$ 67 nm (Semrock FF01-675/67-25). were used to image the fluorophores (eGFP, Alexa 555 and Cy5). The brightness and contrast were adjusted independently for each of the three channels. Drift correction was performed by using 100 nm Tetraspeck fluorescent beads (Life Technologies) as fiducial markers. HILO images were proceed with ImageJ while dSTORM images were reconstructed from a series of 5000 frames (HILO images) and were processed with the rapidSTORM 3.2 software (Wolter et al., 2012). Individual fluorophores in the dSTORM frames were localized using rapidSTORM 3, generally specifying an intensity threshold of 700 and an image plane pixel size of 106 nm according to the optical configuration of the microscope. Spots were found by smoothing the dSTORM frames with a Gaussian kernel and then, were fitted with the Levenberg-Marquardt method. Asymmetry and photon thresholds were also applied to exclude spots appearing too wide or too elliptical. The pixel size of reconstructed super-resolution images was 30 nm.

The image processing package ImageJ was used to analyze the size of the vesicles in the reconstructed images as follow. First, the size of the HILO image was adjusted to fit with the dSTORM reconstructed image. On the resized HILO image, the cell outline was drawn with the polygon selection tool in order to obtain the cell area. After transforming the 16-bit gray scale dSTORM image into a binary image by threshold adjustment, the particle analyzer plug-in was used to determine the area of the vesicles by fitting them to ellipses with a minimum size threshold of 3 pixels and a minimum circularity of 0.5. Finally, the area of the vesicles were used to plot histograms of the density of vesicles (total number of vesicles present in cells divided by the area of the cells) as a function of the diameter of the vesicles.

RESULTS

Internalization of NPY and its NPY Y₁ receptors

To investigate the internalization of the NPY/NPY Y₁ complex by dSTORM, we designed a synthetic NPY peptide covalently labeled at its N-terminus by cyanine 5 (Cy5-NPY), a highly bright dye that exhibits the required photoswitching properties for dSTORM (Dempsey et al., 2009). To monitor in parallel the NPY Y₁ receptor, the latter was stably expressed as a chimeric protein with eGFP coupled at its N-terminus in HEK293 cells that do not constitutively express NPY receptors. As a first step, we checked the functionality of the Cy5-labeled NPY molecules, by monitoring the NPY-stimulated G-protein-dependent inhibition of adenylyl cyclase (Figure S1 in supplementary materials). Following receptor activation, the native NPY inhibited the forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in a concentration-dependent manner. Interestingly, Cy5-NPY shows the same concentration-dependent inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation than the non-labeled peptide, but its maximal effect was somewhat decreased. As the functional properties were preserved, we used the labeled peptide for our imaging experiments.

To monitor the internalization of the Cy5-NPY peptide, HILO microscopy was selected to image with high signal to noise ratio a thin layer of the cell, but not limited to the cell basal membrane in comparison to TIRF (Total internal reflection fluorescence) (Tokunaga et al., 2008). Control observations of eGFP-NPY Y₁ in HEK293 cells in the absence of peptide revealed an homogeneous distribution of the receptors at the plasma membrane (PM), with a weak uniform signal coming from the cytoplasm, in agreement with previous confocal observations (Fig. 2A) (Gicquiaux et al., 2002). Then, cells were incubated with non-labeled or labeled NPY during 5 minutes. This incubation time was chosen as it was previously shown that internalization reached a maximum 5 minutes after addition of the peptide to the cells (Gicquiaux et al., 2002). On addition of non-labeled NPY, numerous vesicles containing eGFP-NPY Y₁ were observed into the cytoplasm, while only a weak signal persisted at the PM, confirming the efficient internalization of the eGFP-NPY Y₁ receptors after binding of NPY (Fig. 2B). After incubation with Cy5-NPY, a similar localization pattern was observed, with the labeled peptides accumulating in cytoplasmic vesicles (Fig. 2C). As the cells were briefly treated with trypsin (see Materials and Methods) to remove all non-internalized peptides, this excludes that the observed dots correspond to peptides bound to the PM and

thus clearly suggests that Cy5-NPY is efficiently internalized after interaction with the eGFP-NPY Y₁ receptor.

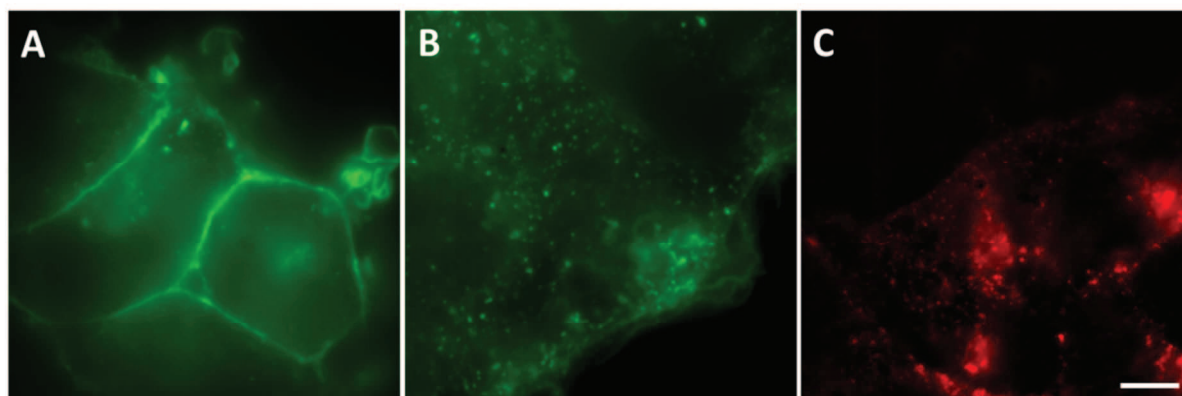


Figure 2: HILO images of eGFP-NPY Y₁ receptors and Cy5-NPY in fixed HEK293 cells. **(A)** In the absence of NPY, eGFP-NPY Y₁ receptors stay mainly at the plasma membrane. **(B)** After 5 minutes of incubation with non-labeled NPY, the eGFP-NPY Y₁ receptors are mainly localized in cytoplasmic vesicles. **(C)** After 5 minutes of incubation with Cy5-NPY, the labeled peptide is also mainly localized in cytoplasmic vesicles. (Scale bar: 10 μm).

From the dSTORM reconstruction (Fig 3A) of the Cy5-NPY HILO image (Fig. 2C) a sharp increase of the resolution was obtained that enables to resolve the vesicles containing Cy5-NPY in the cytoplasm, with a significant decrease of the background noise. The improved resolution of dSTORM as compared to HILO is illustrated by the comparison of the profile sections of one of vesicle by the two imaging modalities (Fig. 3B-D). For the selected vesicle, the FWHM decreased from 320 nm for HILO to 75 nm for dSTORM, indicating that in contrast to the HILO images, vesicles could be observed individually at high resolution by dSTORM.

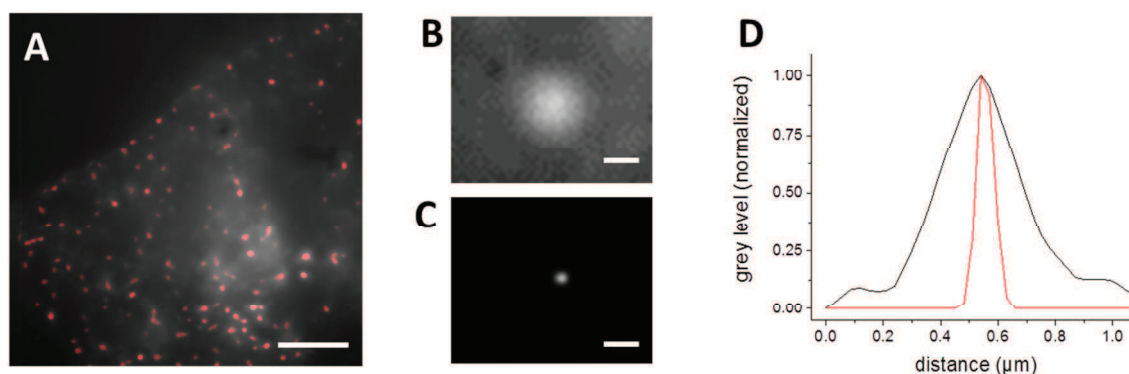


Figure 3: Comparison of HILO and dSTORM images of Cy5-NPY after 5 minutes of incubation with eGFP-NPY Y₁-expressing HEK293 cells. (A) Overlay of the HILO image with the dSTORM reconstruction image of the internalized Cy5-NPY molecules in fixed HEK293 cells. **(B)** Zoom of an isolated endosome of the HILO image in panel A. **(C)** Zoom of an isolated endosome of the dSTORM image in panel A. **(D)** Profile sections of the HILO and dSTORM images of an endosome. (Scale bars: Panel A, 5µm; Panel B and C, 0.5µm) Panel A represents a zoom of the image in Fig. 1C.

In a next step, our aim was to confirm the possible internalization of activated Y₁ receptors through clathrin-mediated endocytosis (Gicquiaux et al., 2002; Ouedraogo et al., 2008). To reach this aim, we first compared the cellular localization of eGFP-NPY Y₁ and transferrin tagged with Alexa 555 at its C-terminal end (Trf-A555) after 5 minutes of incubation in the absence and in the presence of non-labeled NPY (Fig. 4A). Transferrin was selected because its receptor at the plasma membrane is the archetypical cargo for internalization through clathrin-mediated endocytosis (Mayle et al., 2012). In the absence of NPY (Fig. 4A, upper panel), we observe a strong internalization of Trf-A555 in the form of small dots, likely corresponding to endosomes. In contrast, eGFP-NPY Y₁ receptors remain largely at the PM, indicating that Trf-A555 marginally interacts with the eGFP-NPY Y₁ receptors and marginally triggers its internalization. In the presence of NPY (Fig. 4A, lower panel), both Trf-A555 molecules and eGFP-NPY Y₁ receptors were internalized in the cytoplasm in dot-like structures. While some dots contain either only Trf-A555 (red arrow) or eGFP-NPY Y₁ (green arrow), some others contain both labeled molecules (white arrow), indicating that at least part of the activated eGFP-NPY Y₁ receptors are internalized through clathrin-mediated endocytosis.

To further confirm the clathrin-mediated endocytosis of activated eGFP-NPY-Y₁ receptors, we repeated the experiment in the presence of labeled Cy5-NPY molecules to have simultaneously all the three partners being labeled (Fig. 4B). The Trf-A555 molecules and eGFP-NPY Y₁ receptors were imaged by HILO, while Cy5-NPY was imaged by dSTORM simultaneously on the same cell. The insets show again the much better resolution of the dSTORM image as compared to the HILO images. Interestingly, the overlay image clearly shows the presence of vesicles containing simultaneously all three types of labeled molecules (white arrow and inset), unambiguously confirming that activated eGFP-NPY Y₁ receptors can be internalized through clathrin-mediated endocytosis, as was suggested by Gicquiaux et al (Gicquiaux et al., 2002).

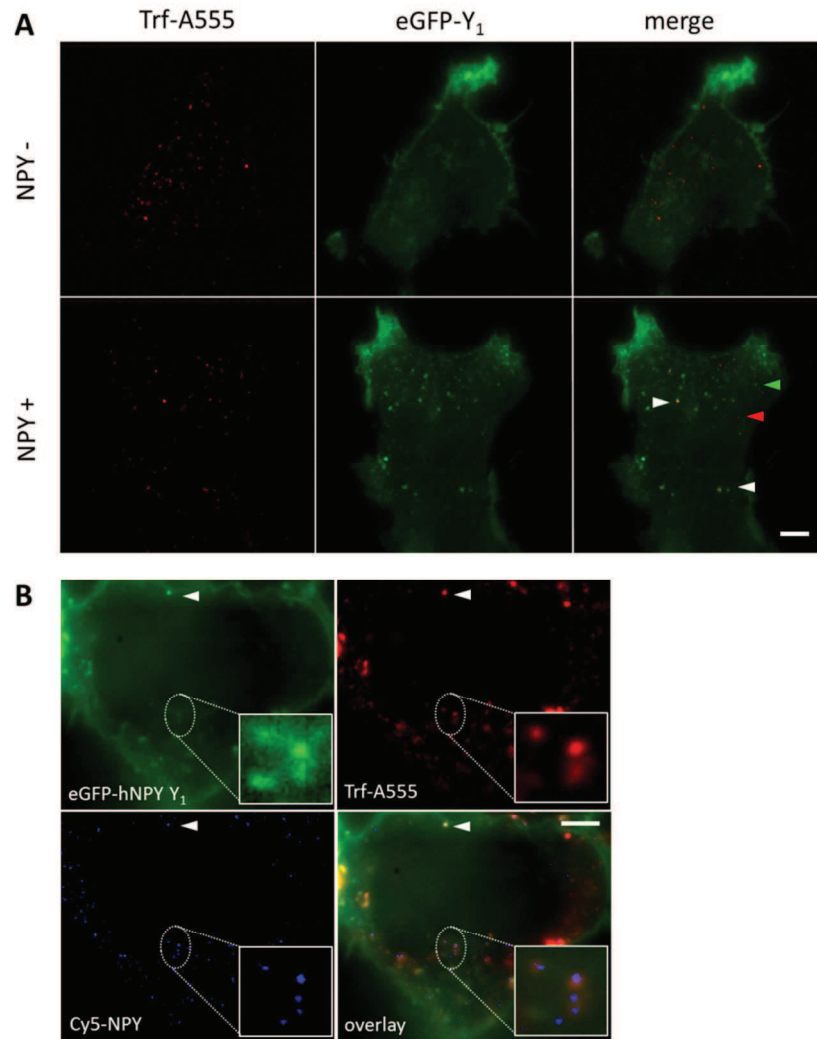


Figure 4: Internalization through clathrin-mediated endocytosis of activated eGFP-NPY Y₁ receptors in HEK293 cells **(A)** HILO images of Trf-A555 (left panels), eGFP-NPY Y₁ (middle panels) and their overlay (right panels). The images were performed in the absence (upper panels) and in the presence (lower panels) of non-labeled NPY. In the overlay images, vesicles containing either eGFP-NPY Y₁ (green arrow), Trf-A555 (red arrow) or both (white arrow) were observed. **(B)** Combined HILO/dSTORM images of an eGFP-NPY Y₁-expressing cell in the presence of Cy5-NPY and Trf-A555. The eGFP-NPY Y₁ receptors and Trf-A555 were imaged by HILO, while Cy5-NPY was imaged by dSTORM. The white arrows and the insets highlight vesicles containing simultaneously the three labeled species: Cy5-NPY, Trf-A555 and eGFP-NPY Y₁. (Scale bars: 5μm)

Specificity of the NPY/Y₁ interaction

To unambiguously demonstrate that Cy5-NPY is internalized through its interaction with the eGFP-labeled Y₁ receptor, the internalization of Cy5-NPY in eGFP-NPY Y₁-expressing cells

was then monitored in the presence of the Y_1 competitive antagonist, BIBP3226. This antagonist is able to compete with NPY for the binding to the Y_1 receptor and consequently to inhibit the internalization of the NPY/ Y_1 complex (Gicquiaux et al., 2002; Lecat et al., 2011; Ouedraogo et al., 2008). Moreover, its binding to the Y_1 receptor does not elicit the internalization of the receptor, which thus stays at the cell surface (Entzeroth et al., 1995). As a control, we also monitored the internalization of Cy5-NPY in the presence of BIIE0246, a specific antagonist of the Y_2 receptor which shows no antagonistic activity for Y_1 (Dumont et al., 2000).

The eGFP-NPY Y_1 -expressing cells were incubated for 5 minutes with Cy5-NPY in the absence or the presence of one of the two antagonists, before being fixed and imaged with combined HILO/dSTORM microscopy (Fig. 5A-C). In the absence of BIBP3226, the Cy5-NPY molecules were found to be internalized in numerous cytoplasmic vesicles in 95% of the observed cells (Fig. 5A). In sharp contrast, in the presence of BIBP3226, less than 50% of the cells showed internalization of Cy5-NPY molecules (Fig. 5B). In addition, the number of Cy5-NPY-containing vesicles in these cells was found to be highly reduced as compared to cells incubated in the absence of the antagonist (Compare Fig. 5B with Fig. 5A). Furthermore, we also observed that Cy5-NPY internalization was only moderately affected by the presence of the Y_2 antagonist BIIE0246, as still an abundant number of cytoplasmic vesicles are visible in this case (Fig 5C). Thus, our data clearly indicate that internalization of the activated Y_1 receptors is selectively inhibited by the Y_1 antagonist, unambiguously confirming previous conclusions obtained from more indirect techniques (Gicquiaux et al., 2002).

To further illustrate the specificity of the NPY internalization through its interaction with the Y_1 receptor, we monitored the cellular internalization of Cy5-NPY in HEK 293 cells stably expressing eGFP-NPY Y_2 receptors (Fig. 4D-F). NPY is known to bind to Y_2 receptors with a similar affinity than to the Y_1 receptors, but without inducing their internalization, at least at the concentrations used in this study (Lundell et al., 2011; Parker et al., 2001; Walther et al., 2011). As expected, after 5 minutes of incubation of Cy5-NPY with eGFP-NPY Y_2 expressing cells in the absence as well as in the presence of BIBP3226 or BIIE0246 antagonists, only a negligible number of Cy5-NPY-containing spots were observed in the cytoplasm, while a few spots were observed at the PM (Fig. 5D-F, white arrows). These spots likely correspond to Cy5-NPY molecules bound to Y_2 receptors, but are limited in number, probably as a consequence of the trypsin treatment which was applied to reduce the

extracellular fluorescence background. Thus, our data confirm that NPY is only marginally internalized by Y_2 receptors or other receptors constitutively expressed by HEK 293 cells.

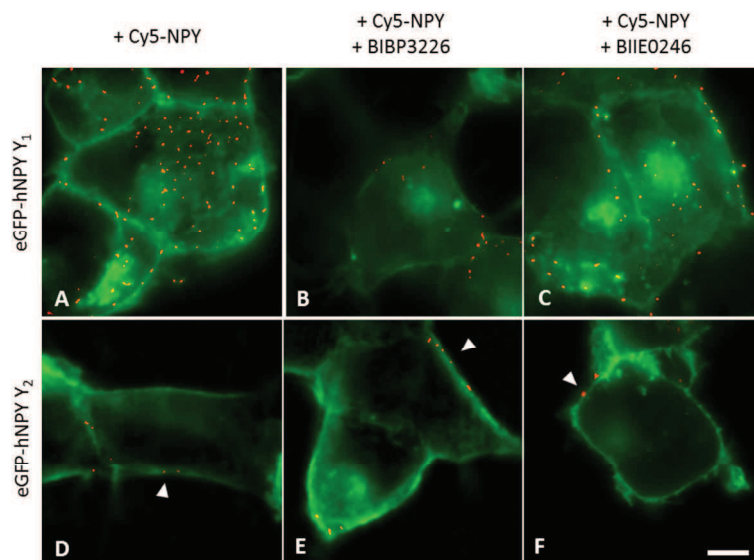


Figure 5: HILO/dSTORM images of the internalization of Cy5-NPY in eGFP NPY Y_1 - (A-C) and eGFP-NPY Y_2 - (D-F) expressing cells. Overlay of HILO (green) and dSTORM (red) images of eGFP-NPY Y_1 (A to C) and eGFP-NPY Y_2 (D to F) expressing cells after 5 minutes of incubation with Cy5-NPY in the absence (A, D) or in the presence of 10 μ M of the Y_1 antagonist BIBP3226 (B, E) or 10 μ M of the Y_2 antagonist BIIE0246 (C, F). (Scalebar: 5 μ m).

To more quantitatively assess the Cy5-NPY internalization in the various conditions, we used the dSTORM images to quantify the populations of vesicles. Taking into account that our lateral resolution is 30 nm and that the minimal size of endosomes is ≥ 50 nm, we included in our calculations only vesicles with a diameter above 50 nm. This also allows us to avoid contributions from single fluorophores free in the cytoplasm. In order to reliably compare the various images, we normalized the number of vesicles by the surface occupied by the analyzed cells, resulting in densities of vesicles expressed in vesicles per μm^2 (vscl/ μm^2). For each condition, the density of vesicles was calculated from the analysis of 30 to 40 cells.

For the internalization of Cy5-NPY in eGFP-NPY Y_1 expressing cells in the absence of antagonists, we found an average density of 0.35 vscl/ μm^2 (Fig. 6) Addition of the Y_1 specific antagonist BIBP3226 to the same system induced a strong decrease of 70% of the Cy5-NPY vesicles density, while the Y_2 antagonist BIIE0246 induced only a 20% decrease (Fig. 6 dark

grey columns). These data are in line with the dSTORM/HILO images (Fig. 5), confirming that only BIBP3226 can outcompete the Cy5-NPY/eGFP-NPY Y_1 interaction and inhibit the NPY/ Y_1 complex internalization. The same analysis was also performed on eGFP-NPY Y_2 expressing cells incubated for 5 minutes with Cy5-NPY and with the BIBP3226 or BIIE0246 antagonists (Fig 6, light grey columns). In line with the microscopy images (Fig. 5), only a low vesicle density (~ 0.03 vscl/ μm^2) that was not affected by the added antagonists was observed. This confirms that the peptide is not internalized in eGFP-NPY Y_2 expressing cells. Taken together, our data confirm that NPY ligands are selectively internalized as the consequence of their binding to Y_1 receptors.

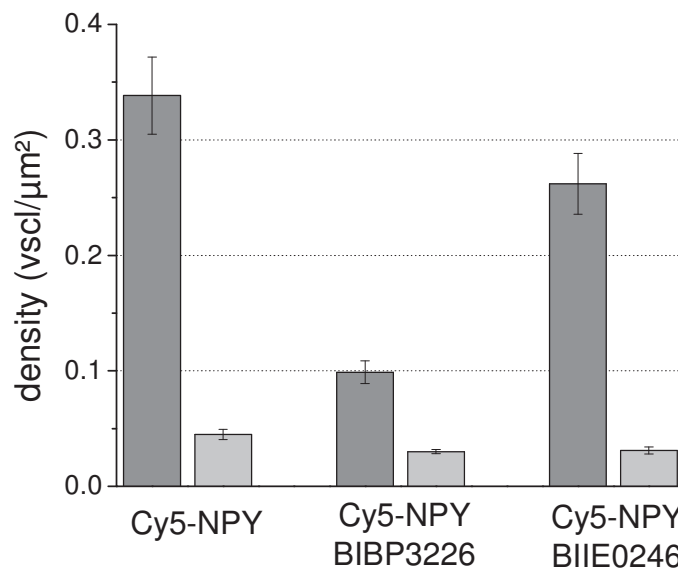


Figure 6: Density of Cy5-NPY-containing vesicles in eGFP-NPY Y_1 (dark grey) or eGFP-NPY Y_2 (light grey) expressing cells. Cells were incubated for 5 minutes with 100 nM Cy5-NPY in the absence or in the presence 10 μM of BIBP3226 or BIIE0246. The density of vesicles expressed in number of vesicles/ μm^2 was calculated from an analysis on 30 to 40 cells for each condition. The error bars on the densities are about 10%.

Distribution of vesicle sizes and its dependence with time

Since endosomal compartments could be discriminated based on their sizes (Brodin et al., 2000; Mukherjee et al., 1997; Parton et al., 1992), we next measured the diameters of Cy5-NPY-containing vesicles in ~ 40 eGFP-NPY Y_1 -expressing cells. Considering only vesicles of diameter ≥ 50 nm, we plotted the density of vesicles as a function of their diameter (Fig. 6A). Each point represents the density of vesicle exhibiting diameters found in an interval of 50

nm. As an example, the first point represents the density of the vesicles with diameters ranging between 50 and 100 nm.

For vesicles measured after 5 min incubation of Cy5-NPY with eGFP-NPY Y₁-expressing cells, the highest density was observed for vesicles with a diameter below 100 nm, which thus represented by far the major population. For larger diameters, a progressive decrease of the density of vesicles as a function of the vesicle diameter was observed, so that the density dropped to zero for diameters above 500 nm.

According to the well-established dimensions of early endosomes (EE), sorting endosomes (SE) and recycling endosomes (RE), we chose 200 nm as a threshold diameter to discriminate EE and SE, from the larger RE vesicles (Brodin et al., 2000; Gicquiaux et al., 2002; Mukherjee et al., 1997; Parton et al., 1992) (Fig. 7A). Based on this, relative amounts of 75% and 25% could be estimated for the EE/SE and RE populations, respectively.

In a next step, the evolution of these two populations was monitored with time by analyzing the reconstructed dSTORM images of eGFP-NPY Y₁ expressing cells incubated with Cy5-NPY for different times: 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes (Fig. 7B). The total density of vesicles (Fig. 7B, black line) was observed to rapidly increase between 1 and 5 minutes to reach a maximum of 0.4 vesicles per μm^2 after 5 minutes of incubation. Then, the vesicles density slightly decreased and reached a plateau value between 10 and 30 min. Finally, a slight density increase was observed at 60 minutes. Interestingly, the density of both EE/SE (Fig. 7B blue points) and RE (Fig. 7B, red points) vesicle populations was also observed to increase rapidly with incubation time, giving a peak at 5 min. This confirms that NPY is efficiently and rapidly internalized when bound to the NPY Y₁ receptors (Gicquiaux et al., 2002). At longer times (10-60 min), the EE/SE population reached a plateau, while the RE continuously increased. These data are in line with a conversion of the EE/SE population into the RE population, as well as a dynamic equilibrium between the formation of the NPY-containing EE/SE vesicles and their recycling. Comparison of the relative populations of EE/SE and RE vesicles (Fig. 7C) further indicated that the EE/SE vesicles were largely dominant (80%) at short times and then decreased slowly with time, reaching ~ 65% at 60 min.

In a last step, we confronted the time-dependence of the relative populations of EE/SE and RE with that predicted from the model of Gicquiaux et al. (Gicquiaux et al., 2002). Indeed, by

using the values of the kinetic rate constants for the various steps of the NPY/Y₁ internalization model, the relative concentrations of EE/SE and RE could be easily calculated. Comparison of the experimental data (Fig 7C, blue and red points) with the calculated values (Fig. 7C) shows a good agreement, further strengthening the validity of the proposed model.

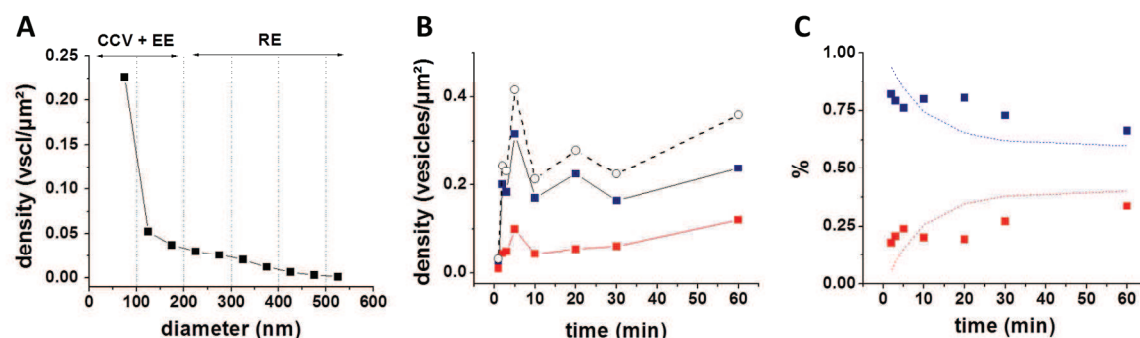


Figure 7: Distribution of vesicle sizes and its dependence with time. (A) Representation of the density of NPY-containing vesicles (expressed in number of vesicles / μm^2) as a function of the vesicle diameter. Cy5-NPY was incubated for 5 min with eGFP-NPY Y₁ – expressing HEK 293 cells. The vesicle density and diameter were measured from the reconstructed dSTORM images of ~ 40 cells. Each point represents the density of vesicles, for diameters in an interval of 50 nm. SE/EE vesicles are below 200 nm, while RE vesicles are above 200 nm. **(B)** Variation of the density of EE/SE (blue) and RE (red) as a function of the incubation time. The black dashed line represents the summed density of both populations. For each incubation time, the data points were obtained as described in panel A. **(C)** Relative populations of EE/SE (blue) and RE (red) vesicles as a function of the incubation time. The data points were calculated from panel B. The dashed lines correspond to the theoretical proportions calculated from the model and the parameter values given in Fig. 1.

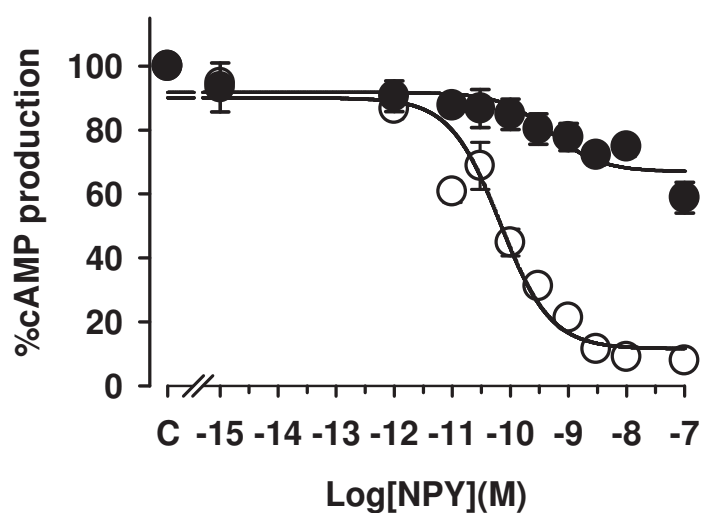
CONCLUSION

In this study, high resolution dSTORM was used to monitor the internalization pathway of the activated Y₁/NPY complex. Through its lateral resolution of 30 nm, this technique enabled us to discriminate sorting and early endosomes from recycling endosomes by their sizes. By monitoring the distribution of the different populations with time, we confirmed that NPY/Y₁ complexes are rapidly and efficiently endocytosed mainly through a clathrin-mediated endocytosis, in full line with the rapid desensitization of Y₁ receptors following agonist exposure. Moreover, our data confirmed a previously proposed model suggesting that the NPY/Y₁ complexes are recycled at the PM via early or recycling endosomes. Thus, our work shows the potency of high-resolution microscopy techniques, such as dSTORM to address both qualitatively and quantitatively the endocytosis pathway of a neuropeptide. We believe

that a similar approach can be used for investigating the internalization pathways of other NPY receptors (Babilon et al., 2013; Walther et al., 2011) as well as the peptide-induced endocytosis of other RCPGs.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Figure S1: Functionality test of the Cy5-NPY peptide. NPY-induced inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in eGFP-NPY Y_1 expressing cells for native NPY (○) and Cy5-tagged NPY (●). Data represent the mean $\pm$ sem of 6 independent experiments, each performed in duplicate.



BIBLIOGRAPHY

- Babilon, S., Mörl, K., Beck-Sickinger, A.G., 2013. Towards improved receptor targeting: anterograde transport, internalization and postendocytic trafficking of neuropeptide Y receptors. *Biol. Chem.* 394, 921–936. doi:10.1515/hsz-2013-0123
- Berglund, M.M., Hipskind, P.A., Gehlert, D.R., 2003. Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 228, 217–244.
- Brodin, L., Löw, P., Shupliakov, O., 2000. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 312–320. doi:10.1016/S0959-4388(00)00097-0
- Dempsey, G.T., Bates, M., Kowtoniuk, W.E., Liu, D.R., Tsien, R.Y., Zhuang, X., 2009. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 18192–18193. doi:10.1021/ja904588g
- Dumont, Y., Cadieux, A., Doods, H., Pheng, L.H., Abounader, R., Hamel, E., Jacques, D., Regoli, D., Quirion, R., 2000. BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1075–1088. doi:10.1038/sj.bjp.0703162
- Entzeroth, M., Braunger, H., Eberlein, W., Engel, W., Rudolf, K., Wienen, W., Wieland, H.A., Willim, K.D., Doods, H.N., 1995. Labeling of neuropeptide Y receptors in SK-N-MC cells using the novel, nonpeptide Y1 receptor-selective antagonist [3H]BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.* 278, 239–242.
- Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mely, Y., Takeda, K., Bucher, B., Galzi, J.L., 2002. Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. *J Biol Chem* 277, 6645–55.
- Innamorati, G., Le Gouill, C., Balamotis, M., Birnbaumer, M., 2001. The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 13096–13103. doi:10.1074/jbc.M009780200
- Klein, T., Proppert, S., Sauer, M., 2014. Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem. Cell Biol.* doi:10.1007/s00418-014-1184-3
- Lecat, S., Ouedraogo, M., Cherrier, T., Noulet, F., Ronde, P., Glasser, N., Galzi, J.L., Mely, Y., Takeda, K., Bucher, B., 2011. Contribution of a tyrosine-based motif to cellular trafficking of wild-type and truncated NPY Y(1) receptors. *Cell Signal* 23, 228–38.
- Lundell, I., Rabe Bernhardt, N., Johnsson, A.-K., Larhammar, D., 2011. Internalization studies of chimeric neuropeptide Y receptors Y1 and Y2 suggest complex interactions between cytoplasmic domains. *Regul. Pept.* 168, 50–58. doi:10.1016/j.regpep.2011.03.004
- Mayle, K.M., Le, A.M., Kamei, D.T., 2012. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 264–281. doi:10.1016/j.bbagen.2011.09.009
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R., 1997. Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77, 759–803.
- Ouedraogo, M., Lecat, S., Rochdi, M.D., Hachet-Haas, M., Matthes, H., Gicquiaux, H., Verrier, S., Gaire, M., Glasser, N., Mely, Y., Takeda, K., Bouvier, M., Galzi, J.L., Bucher, B., 2008. Distinct motifs of neuropeptide Y receptors differentially regulate trafficking and desensitization. *Traffic* 9, 305–24.

- Parker, S.L., Kane, J.K., Parker, M.S., Berglund, M.M., Lundell, I.A., Li, M.D., 2001. Cloned neuropeptide Y (NPY) Y1 and pancreatic polypeptide Y4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells show considerable agonist-driven internalization, in contrast to the NPY Y2 receptor. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 877–886.
- Parton, R.G., Simons, K., Dotti, C.G., 1992. Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J. Cell Biol.* 119, 123–137. doi:10.1083/jcb.119.1.123
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V., 1982. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659–660.
- Tokunaga, M., Imamoto, N., Sakata-Sogawa, K., 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods* 5, 159–161. doi:10.1038/nmeth1171
- Van de Linde, S., Endesfelder, U., Mukherjee, A., Schüttelz, M., Wiebusch, G., Wolter, S., Heilemann, M., Sauer, M., 2009. Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 465. doi:10.1039/b822533h
- Walther, C., Mörl, K., Beck-Sickinger, A.G., 2011. Neuropeptide Y receptors: ligand binding and trafficking suggest novel approaches in drug development. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 17, 233–246. doi:10.1002/psc.1357
- Wolter, S., Löschberger, A., Holm, T., Aufmkolk, S., Dabauvalle, M.-C., van de Linde, S., Sauer, M., 2012. rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* 9, 1040–1041. doi:10.1038/nmeth.2224

Conclusions et Perspectives

La grande variabilité génétique du VIH-1 lui permet d'échapper au système immunitaire et aux traitements. Depuis la découverte du VIH-1 en 1983 et la commercialisation de la première molécule antirétrovirale, l'AZT, en 1987, de nombreux efforts ont été effectués pour développer des médicaments ainsi que des traitements anti-VIH de plus en plus efficaces. Aujourd'hui, les multi-thérapies proposées permettent aux patients de retrouver une espérance de vie normale, ainsi qu'un quotidien de moins en moins affecté par les effets secondaires des médicaments ingérés. Les différentes molécules antirétrovirales actuellement commercialisées ciblent principalement les enzymes virales (la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase), ainsi que l'étape d'entrée du virus dans la cellule hôte. Malheureusement le virus s'adapte génétiquement à ces différents traitements, conduisant à la génération de souches virales multi-résistantes. Pour pouvoir développer des médicaments générant peu ou pas de résistances, la recherche doit se concentrer sur d'autres cibles thérapeutiques. La protéine NCp7 est une candidate très intéressante car en plus d'être présente à de nombreuses étapes du cycle rétroviral, c'est une protéine très conservée. Le laboratoire, où les mécanismes moléculaires des interactions NCp7/acides nucléiques ont été largement étudiés, s'est récemment concentré sur l'étude de l'interaction de NCp7 avec les membranes lipidiques. Cette étude prend tout son sens lorsque l'on sait qu'au cours de son cycle réplcatif le VIH-1 doit interagir avec les membranes cellulaires à plusieurs reprises, et notamment lors de l'assemblage des virions. Selon un récent modèle d'assemblage, Gag adopterait transitoirement une conformation repliée, permettant au domaine MA de Gag de se lier de manière non-spécifique à l'ARNg. Cette conformation serait favorable pour une liaison du domaine NC de Gag avec la membrane plasmique. Le but de ce travail consista donc à mettre en évidence l'existence d'une interaction entre la protéine NCp7 et les membranes lipidiques et à la caractériser par le biais de différentes techniques de spectroscopie de fluorescence et de microscopies.

Par spectroscopie de fluorescence, nous avons montré que la NCp7 se lie avec une forte affinité avec les membranes lipidiques modèles chargées négativement. De manière intéressante, en faisant varier les proportions de lipides négatifs de nos membranes modèles, nous avons observé que la constante de liaison de NCp7 envers les membranes lipidiques ne varie que marginalement, alors que le nombre de sites de liaison diminue proportionnellement avec la quantité de lipides négatifs. Ces données indiquent que la protéine NCp7 est capable de recruter les lipides négatifs de manière à optimiser sa liaison aux membranes lipidiques. Des résultats similaires ont été également obtenus en présence d'acides nucléiques. Le

domaine NC de Gag étant généralement lié à l'ARNg, ces données accréditent l'hypothèse selon laquelle ce domaine puisse interagir avec le feuillet interne de la membrane plasmique lors de l'assemblage des virions.

Par la suite, l'interaction de la NCp7 (libre ou en complexe avec des acides nucléiques) avec des membranes lipidiques modèles chargées négativement a été confirmée par deux techniques d'imagerie complémentaires, à savoir la microscopie combinée AFM/TIRF sur des bicouches lipidiques supportées, et la microscopie biphotonique sur des GUVs. Ces techniques nous ont également permis de mettre en évidence la propriété déstabilisatrice de NCp7 vis-à-vis de ces membranes modèles. De manière spéculative, cette nouvelle propriété de NCp7 pourrait intervenir par un mécanisme qui reste à élucider dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration. Par ailleurs, ces techniques ont également permis de montrer qu'au contraire de la NCp7 libre, la NCp7 complexée à une séquence ADN est également capable de se lier aux membranes lipidiques neutres. En spectroscopie de fluorescence, nous avons noté une faible diminution du signal de notre sonde lors de l'interaction des complexes avec des membranes neutres, pouvant indiquer un possible quenching de la sonde par les membranes modèles non-chargées. Cependant la faiblesse de cette variation ne nous avait pas permis de conclure. Au contraire, les images de GUVs montrent clairement la présence de NCp7 sur les membranes neutres en présence d'acides nucléiques, et les mesures de microscopie combinée AFM/TIRF nous ont permis de d'observer directement ces complexes sur ces membranes.

Avec ces résultats nous avons clairement démontré la capacité de NCp7 à se lier aux membranes lipidiques. L'avantage d'étudier la protéine NCp7 mature au lieu de la protéine Gag entière est que nous avons pu nous affranchir de la contribution des autres domaines de Gag et notamment de la matrice. Il n'en reste pas moins que la transposition de nos résultats au domaine NC de Gag reste à réaliser. Une des possibilités sera de réaliser cette étude en solution avec la protéine Gag native et des mutants de celle-ci où les domaines de liaison de la matrice à la membrane auront été mutés. Ces études seront probablement complexes à réaliser car les protéines Gag natives sont difficiles à préparer et présentent des solubilités limitées. Cependant, le groupe de Johnson Mak semble avoir très récemment mis au point un protocole permettant d'obtenir des quantités importantes de cette protéine dans *E. Coli* (548), permettant ainsi d'envisager de réaliser des études biophysiques dans de bonnes conditions. Avec ces protéines, il devrait être de possible de confirmer la liaison du domaine NC de Gag

aux membranes. Une autre voie de recherche consistera à démontrer l'existence de la forme repliée de Gag en milieu cellulaire, afin de valider la possibilité d'une interaction du domaine NC de Gag avec le feuillet interne de la membrane plasmique dans le contexte de l'assemblage des virions. Pour atteindre cet objectif, deux approches pourront être envisagées.

La première approche consistera à utiliser un Gag marqué à ses deux extrémités par des sondes compatibles avec la technique de FLIM/FRET, de sorte à ce que le repliement de Gag se manifeste par une diminution du temps de vie du donneur qui pourra être visualisée par la technique FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Toutefois, le repliement de Gag étant un état transitoire, probablement de courte durée (sachant que la durée de l'assemblage est inférieure à 30 minutes) il n'est pas certain qu'une diminution du temps de vie significative soit réellement mesurable. Une alternative consisterait à remplacer ce couple donneur/accepteur par une protéine fluorescente scindée en deux parties. Lorsque Gag se trouve sous sa forme droite, la sonde n'est pas fluorescente, puisqu'elle n'est pas complète. En revanche lorsque Gag se trouve sous sa forme repliée, les propriétés fluorescentes sont restaurées suite à la réunion de ses deux sous-unités. De plus, cette interaction entre les deux sous-unités de la protéine fluorescente, présente l'avantage d'être irréversible, ce qui conduira à une augmentation de signal fluorescent avec le temps, qui confirmera clairement l'existence de cet état transitoire en milieu cellulaire.

La dernière partie de ce travail montre par l'étude d'un système modèle, que la technique de microscopie PALM/STORM récemment implantée au laboratoire est un outil parfaitement adapté à l'étude quantitative d'évènements membranaires. Suite à nos travaux *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le domaine NC de Gag interagirait avec la membrane plasmique dans le but de promouvoir la liaison Gag/membrane, lorsque le domaine MA de Gag est non-spécifiquement lié aux acides nucléiques. Nous pourrions utiliser cette microscopie super résolutive pour confirmer la participation du domaine NC de Gag dans sa liaison à la membrane plasmique en milieu cellulaire, en comparant les cinétiques d'assemblage de la polyprotéine Gag sauvage avec celle de polyprotéines Gag chimériques, mutées au niveau du domaine NC. Par sa résolution (20-30 nm), la microscopie PALM/STORM permettra d'observer ce qui se passe au niveau de particules individuelles en formation à la membrane plasmique et ainsi de voir directement l'impact des mutations du domaine NC sur la formation de ces particules individuelles.

Un témoin intéressant de cette étude sera la protéine appelée « Gag Leucine Zipper » (GagLeuZ) dont le domaine NC est substitué par un motif leucine zipper. Ce motif permet de restaurer la localisation membranaire de Gag lorsqu'elle ne possède pas de domaine NC, en forçant son oligomérisation. Bien que GagLeuZ s'assemble et se retrouve à la membrane plasmique, il est possible que le chemin emprunté soit différent de celui de la protéine Gag sauvage. La comparaison par microscopie PALM/STORM des assemblages des différentes formes mutées de Gag devrait permettre de répondre à cette question.

L'interaction entre la NCp7 et les lipides chargés négativement mais pas les lipides neutres suggère que l'interaction ait lieu à la surface des membranes lipidiques en impliquant la tête polaire chargée négativement des lipides. Une caractérisation du rôle des différents résidus impliqués dans l'interaction pourrait être réalisée grâce à des mesures de résonance magnétique nucléaire, en utilisant des micelles de lipides. Cette technique nous permettra d'obtenir des informations sur la structure des complexes NCp7/membranes et donner des informations sur le mécanisme de déstabilisation de NCp7 vis-à-vis des membranes.

Finalement, un projet à long terme consisterait à valider l'hypothèse que NCp7 puisse participer à l'import nucléaire du complexe de pré-intégration par le biais de ses propriétés déstabilisatrices vis-à-vis des membranes lipidiques. La première partie de ce travail consistera à étudier l'interaction de NCp7 (libre ou en complexe avec des acides nucléiques), avec des fragments de membranes nucléaires ainsi que des noyaux complets (549) en microscopie combinée AFM/TIRF. Ces observations nous permettront de valider les observations faites avec les bicouches lipidiques dans un contexte plus proche des conditions cellulaires. La seconde partie de ce travail consistera à valider la possible interaction de NCp7 avec la membrane nucléaire. Pour ce faire, nous infecterons des cellules avec des pseudoparticules virales qui expriment une protéine NCp7 marquée et suivrons son devenir lors des phases précoces du cycle rétroviral à l'aide de la microscopie super-résolutive PALM/STORM. De manière complémentaire, nous examinerons par FRET/FLIM l'interaction des protéines NCp7 avec des protéines de l'enveloppe nucléaire (par exemple des nucléoporines). Enfin, dans un troisième temps, sachant que le complexe de préintégration comprend l'intégrase, nous suivrons celui-ci en utilisant des particules pseudovirales exprimant une intégrase fluorescente. Nous pourrions ainsi suivre par tracking le complexe de préintégration par le biais de l'intégrase. En comparant l'import nucléaire des complexes de préintégration issus de pseudoparticules exprimant la NCp7 native avec celui de

pseudoparticules exprimant la NCp7 mutée, nous devrions pouvoir évaluer le rôle de cette dernière dans l'import nucléaire.

Ainsi ce travail où nous avons mis en évidence l'interaction de la protéine NCp7 avec les membranes lipidiques pourrait constituer le point de départ de plusieurs projets de recherche qui permettront de compléter les connaissances des mécanismes d'assemblage et d'import nucléaire du VIH-1, actuellement encore débattus.

Références

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868–871.
2. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324:691–695.
3. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436–441.
4. Sharpe S, Beer B, Hall G, Dennis M, Norley S, Cranage M. 2001. Analysis of SIV-specific CTL in the rhesus macaque model of AIDS: the use of simian fibroblasts as an alternative source of target cells for chromium release assays. *J. Immunol. Methods* 258:137–140.
5. Wainberg MA. 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS Lond. Engl.* 18 Suppl 3:S63–68.
6. Maucière P, Loussert-Ajaka I, Damond F, Fagot P, Souquière S, Monny Lobe M, Mbopi Keou FX, Barré-Sinoussi F, Saragosti S, Brun-Vézinet F, Simon F. 1997. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS Lond. Engl.* 11:445–453.
7. Bodelle P, Vallari A, Coffey R, McArthur CP, Beyeme M, Devare SG, Schochetman G, Brennan CA. 2004. Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:902–908.
8. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15:871–872.
9. Ariën KK, Vanham G, Arts EJ. 2007. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat. Rev. Microbiol.* 5:141–151.
10. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, Kappes JC, Hahn BH, Shaw GM. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324:954–960.
11. Ho Y-C, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, Lai J, Blankson JN, Siliciano JD, Siliciano RF. 2013. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155:540–551.
12. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156:171–176.
13. Briggs JAG, Kräusslich H-G. 2011. The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 410:491–500.
14. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW Jr, Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460:711–716.
15. Marcello A, Zoppé M, Giacca M. 2001. Multiple Modes of Transcriptional Regulation by the HIV-1 Tat Transactivator. *IUBMB Life* 51:175–181.

16. Darlix JL, Cristofari G, Rau M, P  choux C, Berthoux L, Roques B. 2000. Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 48:345–372.
17. Helga-Maria C, Hammarskj  ld M-L, Rekosh D. 1999. An Intact TAR Element and Cytoplasmic Localization Are Necessary for Efficient Packaging of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA. *J. Virol.* 73:4127–4135.
18. Kleiman L. 2002. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* 53:107–114.
19. Paillart J-C, Shehu-Xhilaga M, Marquet R, Mak J. 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:461–472.
20. O'Reilly MM, McNally MT, Beemon KL. 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.
21. Ashe MP, Pearson LH, Proudfoot NJ. 1997. The HIV-1 5' LTR poly(A) site is inactivated by U1 snRNP interaction with the downstream major splice donor site. *EMBO J.* 16:5752–5763.
22. Lever A, Gottlinger H, Haseltine W, Sodroski J. 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* 63:4085–4087.
23. Russell RS, Liang C, Wainberg MA. 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* 1:23.
24. Malim MH, B  hnlein S, Fenrick R, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. 1989. Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:8222–8226.
25. DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Rader C, Wingfield PT, Stuart DI, Steven AC, Grimes JM. 2010. Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2    resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:5810–5814.
26. Reicin AS, Kalpana G, Paik S, Marmon S, Goff S. 1995. Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *J. Virol.* 69:5904–5907.
27. Aloia RC, Tian H, Jensen FC. 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:5181–5185.
28. Br  gger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kr  usslich H-G. 2006. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2641–2646.
29. Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W, Wenk MR. 2008. Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J. Virol.* 82:11228–11238.
30. Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A. 2011. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J. Virol.* 85:9749–9766.

31. Kerviel A, Thomas A, Chaloin L, Favard C, Muriaux D. 2013. Virus assembly and plasma membrane domains: which came first? *Virus Res.* 171:332–340.
32. Grigorov B, Arcanger F, Roingeard P, Darlix J-L, Muriaux D. 2006. Assembly of Infectious HIV-1 in Human Epithelial and T-Lymphoblastic Cell Lines. *J. Mol. Biol.* 359:848–862.
33. Kremontsov DN, Rassam P, Margeat E, Roy NH, Schneider-Schaulies J, Milhiet P-E, Thali M. 2010. HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic Cph. Den.* 11:1401–1414.
34. Nydegger S, Khurana S, Kremontsov DN, Foti M, Thali M. 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biol.* 173:795–807.
35. Muranyi W, Malkusch S, Müller B, Heilemann M, Kräusslich H-G. 2013. Super-resolution microscopy reveals specific recruitment of HIV-1 envelope proteins to viral assembly sites dependent on the envelope C-terminal tail. *PLoS Pathog.* 9:e1003198.
36. Abbas W, Herbein G. 2014. Plasma membrane signaling in HIV-1 infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1838:1132–1142.
37. Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB. 2000. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry (Mosc.)* 39:11194–11204.
38. Araújo LAL, Almeida SEM. 2013. HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition. *Viruses* 5:595–604.
39. Dong XN, Xiao Y, Dierich MP, Chen YH. 2001. N- and C-domains of HIV-1 gp41: mutation, structure and functions. *Immunol. Lett.* 75:215–220.
40. Caffrey M. 2011. HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors. *Trends Microbiol.* 19:191–197.
41. Guttman M, Kahn M, Garcia NK, Hu S-L, Lee KK. 2012. Solution Structure, Conformational Dynamics, and CD4-Induced Activation in Full-Length, Glycosylated, Monomeric HIV gp120. *J. Virol.* 86:8750–8764.
42. Massiah MA, Starich MR, Paschall C, Summers MF, Christensen AM, Sundquist WI. 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* 244:198–223.
43. Fiorentini S, Marini E, Caracciolo S, Caruso A. 2006. Functions of the HIV-1 matrix protein p17. *New Microbiol.* 29:1–10.
44. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF. 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:11364–11369.
45. Dubrovsky L, Ulrich P, Nuovo GJ, Manogue KR, Cerami A, Bukrinsky M. 1995. Nuclear localization signal of HIV-1 as a novel target for therapeutic intervention. *Mol. Med. Camb. Mass* 1:217–230.
46. Göttinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:5781–5785.

47. Alfadhli A, Huseby D, Kapit E, Colman D, Barklis E. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 matrix protein assembles on membranes as a hexamer. *J. Virol.* 81:1472–1478.
48. Galloway P, Swinger S, Aiken C, Trono D. 1995. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80:379–88.
49. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. 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. Hamard-Peron E, Muriaux D. 2011. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology* 8:15.
51. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:14889–14894.
52. Ott DE, Coren LV, Gagliardi TD. 2005. Redundant Roles for Nucleocapsid and Matrix RNA-Binding Sequences in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J Virol* 79:13839–13847.
53. Rulli SJ Jr, Hibbert CS, Mirro J, Pederson T, Biswal S, Rein A. 2007. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J. Virol.* 81:6623–6631.
54. Lopez-Vergès S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, Berlioz-Torrent C. 2006. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14947–14952.
55. Spearman P, Horton R, Ratner L, Kuli-Zade I. 1997. Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. *J. Virol.* 71:6582–6592.
56. Freed EO, Englund G, Martin MA. 1995. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* 69:3949–3954.
57. Fassati A, Goff SP. 2001. Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 75:3626–3635.
58. Byeon I-JL, Meng X, Jung J, Zhao G, Yang R, Ahn J, Shi J, Concel J, Aiken C, Zhang P, Gronenborn AM. 2009. Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* 139:780–790.
59. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:203–217.
60. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M. 2007. Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131:70–79.
61. Sundquist WI, Krausslich H-G. 2012. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
62. Sundquist WI, Hill CP. 2007. How to Assemble a Capsid. *Cell* 131:17–19.

63. Mascarenhas AP, 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.
64. Grättinger M, Hohenberg H, Thomas D, Wilk T, Müller B, Kräusslich HG. 1999. In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* 257:247–260.
65. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114:689–699.
66. Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, G Göttlinger H. 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37:181–184.
67. Bachand F, Yao X-J, Hrimech M, Rougeau N, Cohen ÉA. 1999. Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires a Direct Interaction with the p6 Domain of the p55 Gag Precursor. *J. Biol. Chem.* 274:9083–9091.
68. Fritz JV, Dujardin D, Godet J, Didier P, De Mey J, Darlix J-L, Mély Y, 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.
69. Fritz JV, Didier P, Clamme J-P, Schaub E, Muriaux D, Cabanne C, Morellet N, Bouaziz S, Darlix J-L, Mély Y, de Rocquigny H. 2008. Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* 5:87.
70. Crist RM, Datta SAK, Stephen AG, Soheilian F, Mirro J, Fisher RJ, Nagashima K, Rein A. 2009. Assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag-leucine zipper chimeras: implications for retrovirus assembly. *J. Virol.* 83:2216–2225.
71. Morellet N, Druillennec S, Lenoir C, Bouaziz S, Roques BP. 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. Publ. Protein Soc.* 14:375–386.
72. Marco A de, Heuser A-M, Glass B, Kräusslich H-G, Müller B, Briggs JAG. 2012. Role of the SP2 Domain and Its Proteolytic Cleavage in HIV-1 Structural Maturation and Infectivity. *J. Virol.* 86:13708–13716.
73. Krishnan L, Engelman A. 2012. Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *J. Biol. Chem.* 287:40858–40866.
74. Lee S-K, Potempa M, Swanstrom R. 2012. The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *J. Biol. Chem.* 287:40867–40874.
75. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E. 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* 385:693–713.
76. Pettit SC, Simsic J, Loeb DD, Everitt L, Hutchison CA, Swanstrom R. 1991. Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. *J. Biol. Chem.* 266:14539–14547.
77. Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the

- release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J. Virol.* 68:6782–6786.
78. Navia MA, Fitzgerald PM, McKeever BM, Leu CT, Heimbach JC, Herber WK, Sigal IS, Darke PL, Springer JP. 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337:615–620.
 79. Rose RB, Craik CS, Douglas NL, Stroud RM. 1996. Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry (Mosc.)* 35:12933–12944.
 80. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika E, Schiffer CA. 2002. Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Struct. Lond. Engl.* 1993 10:369–381.
 81. Telesnitsky A, Goff SP. 1993. Two defective forms of reverse transcriptase can complement to restore retroviral infectivity. *EMBO J.* 12:4433–4438.
 82. Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, Woolf DJ, Debouck C, Harrison SC. 1995. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:1222–1226.
 83. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783–1790.
 84. Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD Jr, Ding J, Whitcomb JM, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. 2001. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J.* 20:1449–1461.
 85. Hostomsky Z, Hostomska Z, Hudson GO, Moomaw EW, Nides BR. 1991. Reconstitution in vitro of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:1148–1152.
 86. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* 169:415–429.
 87. Katz RA, Skalka AM. 1994. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63:133–173.
 88. Chen JC, Krucinski J, Miercke LJ, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, Stroud RM. 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8233–8238.
 89. Hare S, Maertens GN, Cherepanov P. 2012. 3'-Processing and strand transfer catalysed by retroviral integrase in crystallo. *EMBO J.* 31:3020–3028.
 90. Jenkins TM, Hickman AB, Dyda F, Ghirlando R, Davies DR, Craigie R. 1995. Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:6057–6061.
 91. Maillot B, Lévy N, Eiler S, Crucifix C, Granger F, Richert L, Didier P, Godet J, Pradeau-Auberton K, Emiliani S, Nazabal A, Lesbats P, Parissi V, Mely Y, Moras D, Schultz P, Ruff M. 2013. Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PloS One* 8:e60734.

92. Lee SP, Xiao J, Knutson JR, Lewis MS, Han MK. 1997. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 36:173–180.
93. Engelman A, Craigie R. 1992. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J. Virol.* 66:6361–6369.
94. Drelich M, Wilhelm R, Mous J. 1992. Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro. *Virology* 188:459–468.
95. Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R. 1993. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:3428–3432.
96. Bouyac-Bertoia M, Dvorin J, Fouchier R, Jenkins Y, Meyer B, Wu L, Emerman M, Malim M. 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *MOL CELL* 7:1025–1035.
97. Malim MH, Emerman M. 2008. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3:388–398.
98. Jeang KT, Xiao H, Rich EA. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J. Biol. Chem.* 274:28837–28840.
99. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92:451–462.
100. Benkirane M, Chun RF, Xiao H, Ogryzko VV, Howard BH, Nakatani Y, Jeang KT. 1998. Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* 273:24898–24905.
101. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA, Valerio R. 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:6925–6929.
102. Roy S, Delling U, Chen CH, Rosen CA, Sonenberg N. 1990. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4:1365–1373.
103. Hauber J, Malim MH, Cullen BR. 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63:1181–1187.
104. Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA. 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63:1–8.
105. Jones KA, Peterlin BM. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63:717–743.
106. Rana TM, Jeang K-T. 1999. Biochemical and Functional Interactions between HIV-1 Tat Protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:175–185.

107. Gu J, Babayeva ND, Suwa Y, Baranovskiy AG, Price DH, Tahirov TH. 2014. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb and AFF4. *Cell Cycle Georget. Tex* 13.
108. Apolloni A, Meredith LW, Suhrbier A, Kiernan R, Harrich D. 2007. The HIV-1 Tat protein stimulates reverse transcription in vitro. *Curr. HIV Res.* 5:473–483.
109. Harrich D, Ulich C, García-Martínez LF, Gaynor RB. 1997. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* 16:1224–1235.
110. Kameoka M, Morgan M, Binette M, Russell RS, Rong L, Guo X, Mouland A, Kleiman L, Liang C, Wainberg MA. 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.
111. Boudier C, Humbert N, Chaminade F, Chen Y, de Rocquigny H, Godet J, Mauffret O, Fossé P, Mély Y. 2014. Dynamic interactions of the HIV-1 Tat with nucleic acids are critical for Tat activity in reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 42:1065–1078.
112. Boudier C, Storchak R, Sharma KK, Didier P, Follenius-Wund A, Muller S, Darlix J-L, Mély Y. 2010. The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *J. Mol. Biol.* 400:487–501.
113. Godet J, Boudier C, Humbert N, Ivanyi-Nagy R, Darlix J-L, Mély Y. 2012. Comparative nucleic acid chaperone properties of the nucleocapsid protein NCp7 and Tat protein of HIV-1. *Virus Res.* 169:349–360.
114. Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH. 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465:747–751.
115. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. 2012. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13:355–363.
116. Wodrich H, Kräusslich HG. 2001. Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl. Cell Differ.* 34:197–217.
117. Pollard VW, Malim MH. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:491–532.
118. Daugherty MD, Liu B, Frankel AD. 2010. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:1337–1342.
119. Henklein P, Bruns K, Sherman MP, Tessmer U, Licha K, Kopp J, Noronha CMC de, Greene WC, Wray V, 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.
120. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66:7193–7200.
121. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425–430.
122. Bour S, Strebel K. 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5:1029–1039.
123. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. 2003. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J. Mol. Biol.* 327:215–227.

124. Planelles V, Benichou S. 2009. Vpr and its interactions with cellular proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 339:177–200.
125. Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Kräusslich HG. 2000. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 74:1168–1177.
126. Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC. 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* 143:875–85.
127. Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, Benichou S. 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J. Biol. Chem.* 277:45091–45098.
128. Lyonnais S, Gorelick RJ, Heniche-Boukhalfa F, Bouaziz S, Parissi V, Mouscadet J-F, Restle T, Gatell JM, Le Cam E, Mirambeau G. 2013. A protein ballet around the viral genome orchestrated by HIV-1 reverse transcriptase leads to an architectural switch: from nucleocapsid-condensed RNA to Vpr-bridged DNA. *Virus Res.* 171:287–303.
129. De Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavrois MV, Moir RD, Goldman RD, Greene WC. 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294:1105–8.
130. Piller SC, Ewart GD, Jans DA, Gage PW, Cox GB. 1999. The Amino-Terminal Region of Vpr from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Forms Ion Channels and Kills Neurons. *J. Virol.* 73:4230–4238.
131. Basañez G, Zimmerberg J. 2001. HIV and Apoptosis. *J. Exp. Med.* 193:f11–f14.
132. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, Weiner DB. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:962–970.
133. Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HL, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand JP, Irinopoulou T, Daugas E, Susin SA, Cointe D, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G. 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* 191:33–46.
134. Le Rouzic E, Benichou S. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2:11.
135. Barraud P, Paillart J-C, Marquet R, Tisné C. 2008. Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr. HIV Res.* 6:91–99.
136. Huvent I, Hong SS, Fournier C, Gay B, Tournier J, Carrière C, Courcoul M, Vigne R, Spire B, Boulanger P. 1998. Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5):1069–1081.
137. Henriët S, Richer D, Bernacchi S, Decroly E, Vigne R, Ehresmann B, Ehresmann C, Paillart J-C, Marquet R. 2005. Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* 354:55–72.
138. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646–650.

139. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112.
140. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu X-F. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056–1060.
141. Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H, Landau NR. 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114:21–31.
142. Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix J-L, Marquet R, Tisné C, Paillart J-C. 2012. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res.* 169:361–376.
143. Henriët S, Sinck L, Bec G, Gorelick RJ, Marquet R, Paillart J-C. 2007. Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 35:5141–5153.
144. Foster JL, Denial SJ, Temple BRS, Garcia JV. 2011. Mechanisms of HIV-1 Nef Function and Intracellular Signaling. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 6:230–246.
145. Kondo M, Shima T, Nishizawa M, Sudo K, Iwamuro S, Okabe T, Takebe Y, Imai M. 2005. Identification of attenuated variants of HIV-1 circulating recombinant form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef/long terminal repeat sequences. *J. Infect. Dis.* 192:56–61.
146. Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR. 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* 177:1561–1566.
147. Ren X, Park SY, Bonifacino JS, Hurley JH. 2014. How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *eLife* 3:e01754.
148. Yang OO, Nguyen PT, Kalams SA, Dorfman T, Göttlinger HG, Stewart S, Chen ISY, Threlkeld S, Walker BD. 2002. Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 76:1626–1631.
149. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. 1999. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* 283:80–83.
150. Shehu-Xhilaga M, Kraeusslich HG, Pettit S, Swanstrom R, Lee JY, Marshall JA, Crowe SM, Mak J. 2001. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J. Virol.* 75:9156–9164.
151. Thomas JA, Gorelick RJ. 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* 134:39–63.
152. De Marco A, Müller B, Glass B, Riches JD, Kräusslich H-G, Briggs JAG. 2010. Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS Pathog.* 6:e1001215.
153. Sheng N, Pettit SC, Tritch RJ, Ozturk DH, Rayner MM, Swanstrom R, Erickson-Viitanen S. 1997. Determinants of the human immunodeficiency virus type 1 p15NC-RNA interaction that affect enhanced cleavage by the viral protease. *J. Virol.* 71:5723–5732.

154. Coren LV, Thomas JA, Chertova E, Sowder RC, Gagliardi TD, Gorelick RJ, Ott DE. 2007. Mutational Analysis of the C-Terminal Gag Cleavage Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 81:10047–10054.
155. Cruceanu M, Urbaneja MA, Hixson CV, Johnson DG, Datta SA, Fivash MJ, Stephen AG, Fisher RJ, Gorelick RJ, Casas-Finet JR, Rein A, Rouzina I, Williams MC. 2006. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* 34:593–605.
156. Briggs JAG, Simon MN, Gross I, Kräusslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC. 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:672–675.
157. Chen Y, Wu B, Musier-Forsyth K, Mansky LM, Mueller JD. 2009. Fluorescence fluctuation spectroscopy on viral-like particles reveals variable gag stoichiometry. *Biophys. J.* 96:1961–1969.
158. Darlix J-L, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fossé P, Mauffret O, Mély Y. 2011. Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J. Mol. Biol.* 410:565–581.
159. Morellet N, de Rocquigny H, Mély Y, Jullian N, Déméné H, Ottmann M, Gérard D, Darlix JL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. 1994. Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by ¹H NMR. *J. Mol. Biol.* 235:287–301.
160. Morellet N, Jullian N, De Rocquigny H, Maigret B, Darlix JL, Roques BP. 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.
161. Summers MF, Henderson LE, Chance MR, Bess JW Jr, South TL, Blake PR, Sagi I, Perez-Alvarado G, Sowder RC 3rd, Hare DR. 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. Publ. Protein Soc.* 1:563–574.
162. Bombarda E, Grell E, Roques BP, Mély Y. 2007. Molecular mechanism of the Zn²⁺-induced folding of the distal CCHC finger motif of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biophys. J.* 93:208–217.
163. Bombarda E, Morellet N, Cherradi H, Spiess B, Bouaziz S, Grell E, Roques BP, Mély Y. 2001. Determination of the pK(a) of the four Zn²⁺-coordinating residues of the distal finger motif of the HIV-1 nucleocapsid protein: consequences on the binding of Zn²⁺. *J. Mol. Biol.* 310:659–672.
164. Mély Y, De Rocquigny H, Morellet N, Roques BP, Gérard D. 1996. Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* 35:5175–5182.
165. Mély Y, Jullian N, Morellet N, De Rocquigny H, Dong CZ, Piémont E, Roques BP, Gérard D. 1994. Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry (Mosc.)* 33:12085–12091.
166. Morellet N, Déméné H, Teilleux V, Huynh-Dinh T, de Rocquigny H, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. 1998. Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J. Mol. Biol.* 283:419–434.

167. Godet J, Ramalanjaona N, Sharma KK, Richert L, de Rocquigny H, Darlix J-L, Duportail G, Mély 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.* 39:6633–6645.
168. Déméné H, Dong CZ, Ottmann M, Rouyez MC, Jullian N, Morellet N, Mely Y, Darlix JL, Fournié-Zaluski MC, Saragosti S. 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 (Mosc.)* 33:11707–11716.
169. Dorfman T, Luban J, Goff SP, Haseltine WA, Göttlinger HG. 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.
170. Gorelick RJ, Gagliardi TD, Bosche WJ, Wilttrout TA, Coren LV, Chabot DJ, Lifson JD, Henderson LE, Arthur LO. 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.
171. Beltz H, Clauss C, Piémont E, Ficheux D, Gorelick RJ, Roques B, Gabus C, Darlix J-L, de Rocquigny H, Mély 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.
172. Bourbigot S, Ramalanjaona N, Boudier C, Salgado GFJ, Roques BP, Mély Y, Bouaziz S, Morellet N. 2008. How the HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds and Destabilises the (-)Primer Binding Site During Reverse Transcription. *J. Mol. Biol.* 383:1112–1128.
173. Egelé C, Schaub E, Ramalanjaona N, Piémont E, Ficheux D, Roques B, Darlix J-L, Mély Y. 2004. HIV-1 nucleocapsid protein binds to the viral DNA initiation sequences and chaperones their kissing interactions. *J. Mol. Biol.* 342:453–466.
174. Godet J, Mély Y. 2010. Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA Biol.* 7:687–699.
175. Fisher RJ, Rein A, Fivash M, Urbaneja MA, Casas-Finet JR, Medaglia M, Henderson LE. 1998. Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *J. Virol.* 72:1902–1909.
176. Mély Y, de Rocquigny H, Sorinas-Jimeno M, Keith G, Roques BP, Marquet R, Gérard D. 1995. Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific. *J. Biol. Chem.* 270:1650–1656.
177. Urbaneja MA, Kane BP, Johnson DG, Gorelick RJ, Henderson LE, Casas-Finet JR. 1999. Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J. Mol. Biol.* 287:59–75.
178. Bombarda E, Ababou A, Vuilleumier C, Gérard D, Roques BP, Piémont E, Mély Y. 1999. Time-resolved fluorescence investigation of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein: influence of the binding of nucleic acids. *Biophys. J.* 76:1561–1570.
179. Lam WC, Maki AH, Casas-Finet JR, Erickson JW, Kane BP, Sowder RC 2nd, Henderson LE. 1994. Phosphorescence and optically detected magnetic resonance

- investigation of the binding of the nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus type 1 and related peptides to RNA. *Biochemistry (Mosc.)* 33:10693–10700.
180. Mély Y, Piémont E, Sorinas-Jimeno M, de Rocquigny H, Jullian N, Morellet N, Roques BP, Gérard D. 1993. Structural and dynamic characterization of the aromatic amino acids of the human immunodeficiency virus type I nucleocapsid protein zinc fingers and their involvement in heterologous tRNA(Phe) binding: a steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biophys. J.* 65:1513–1522.
 181. Avilov SV, Godet J, Piémont E, Mély Y. 2009. Site-specific characterization of HIV-1 nucleocapsid protein binding to oligonucleotides with two binding sites. *Biochemistry (Mosc.)* 48:2422–2430.
 182. Avilov SV, Piemont E, Shvadchak V, Rocquigny H de, Mély Y. 2008. Probing dynamics of HIV-1 nucleocapsid protein/target hexanucleotide complexes by 2-aminopurine. *Nucleic Acids Res.* 36:885–896.
 183. Vuilleumier C, Bombarda E, Morellet N, Gérard D, Roques BP, Mély Y. 1999. Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry (Mosc.)* 38:16816–16825.
 184. Amarasinghe GK, De Guzman RN, Turner RB, Chancellor KJ, Wu ZR, Summers MF. 2000. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J. Mol. Biol.* 301:491–511.
 185. De Guzman RN, Wu ZR, Stalling CC, Pappalardo L, Borer PN, Summers MF. 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279:384–388.
 186. Spriggs S, Garyu L, Connor R, Summers MF. 2008. Potential intra- and intermolecular interactions involving the unique-5' region of the HIV-1 5'-UTR. *Biochemistry (Mosc.)* 47:13064–13073.
 187. Bazzi A, Zargarian L, Chaminade F, Boudier C, De Rocquigny H, René B, Mély Y, Fossé P, Mauffret O. 2011. Structural insights into the cTAR DNA recognition by the HIV-1 nucleocapsid protein: role of sugar deoxyribose in the binding polarity of NC. *Nucleic Acids Res.* 39:3903–3916.
 188. Bazzi A, Zargarian L, Chaminade F, De Rocquigny H, René B, Mély Y, Fossé P, Mauffret O. 2012. Intrinsic Nucleic Acid Dynamics Modulates HIV-1 Nucleocapsid Protein Binding to Its Targets. *PLoS ONE* 7:e38905.
 189. Zargarian L, Kanevsky I, Bazzi A, Boynard J, Chaminade F, Fossé P, Mauffret O. 2009. Structural and dynamic characterization of the upper part of the HIV-1 cTAR DNA hairpin. *Nucleic Acids Res.* 37:4043–4054.
 190. Wilkinson KA, Gorelick RJ, Vasa SM, Guex N, Rein A, Mathews DH, Giddings MC, Weeks KM. 2008. High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol.* 6:e96.
 191. Draper DE. 1992. The RNA-folding problem. *Acc. Chem. Res.* 25:201–207.
 192. Treiber DK, Williamson JR. 2001. Beyond kinetic traps in RNA folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:309–314.

193. Herschlag D. 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J. Biol. Chem.* 270:20871–20874.
194. Cristofari G, Darlix J-L. 2002. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72:223–268.
195. Schroeder R, Barta A, Semrad K. 2004. Strategies for RNA folding and assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:908–919.
196. Zúñiga S, Sola I, Cruz JLG, Enjuanes L. 2009. Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res.* 139:253–266.
197. Prats AC, Sarih L, Gabus C, Litvak S, Keith G, Darlix JL. 1988. Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. *EMBO J.* 7:1777–1783.
198. Barat C, Schatz O, Le Grice S, Darlix JL. 1993. Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* 231:185–190.
199. Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, Barré-Sinoussi F. 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* 216:689–699.
200. De Rocquigny H, Gabus C, Vincent A, Fournié-Zaluski MC, Roques B, Darlix JL. 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.
201. Dib-Hajj F, Khan R, Giedroc DP. 1993. Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2:231–243.
202. Azoulay J, Clamme JP, Darlix JL, Roques BP, Mély 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.
203. Beltz H, Azoulay J, Bernacchi S, Clamme J-P, Ficheux D, Roques B, Darlix J-L, Mély 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.
204. Le Cam E, Coulaud D, Delain E, Petitjean P, Roques BP, Gérard D, Stoylova E, Vuilleumier C, Stoylov SP, Mély Y. 1998. Properties and growth mechanism of the ordered aggregation of a model RNA by the HIV-1 nucleocapsid protein: an electron microscopy investigation. *Biopolymers* 45:217–229.
205. Mirambeau G, Lyonnais S, Coulaud D, Hameau L, Lafosse S, Jeusset J, Justome A, Delain E, Gorelick RJ, Le Cam E. 2006. Transmission electron microscopy reveals an optimal HIV-1 nucleocapsid aggregation with single-stranded nucleic acids and the mature HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* 364:496–511.
206. Williams MC, Rouzina I, Wenner JR, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K, Bloomfield VA. 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.
207. Bernacchi S, Stoylov S, Piémont E, Ficheux D, Roques BP, Darlix JL, Mély 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.

208. Godet J, Kenfack C, Przybilla F, Richert L, Duportail G, Mély Y. 2013. Site-selective probing of cTAR destabilization highlights the necessary plasticity of the HIV-1 nucleocapsid protein to chaperone the first strand transfer. *Nucleic Acids Res.* 41:5036–5048.
209. Williams MC, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K. 2002. Specific zinc-finger architecture required for HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:8614–8619.
210. Urbaneja MA, Wu M, Casas-Finet JR, Karpel RL. 2002. HIV-1 nucleocapsid protein as a nucleic acid chaperone: spectroscopic study of its helix-destabilizing properties, structural binding specificity, and annealing activity. *J. Mol. Biol.* 318:749–764.
211. Heilman-Miller SL, Wu T, Levin JG. 2004. Alteration of nucleic acid structure and stability modulates the efficiency of minus-strand transfer mediated by the HIV-1 nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* 279:44154–44165.
212. Beltz H, Piémont E, Schaub E, Ficheux D, Roques B, Darlix J-L, Mély Y. 2004. Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *J. Mol. Biol.* 338:711–723.
213. Ramalanjaona N, de Rocquigny H, Millet A, Ficheux D, Darlix J-L, Mély 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.
214. Stoylov SP, Vuilleumier C, Stoylova E, De Rocquigny H, Roques BP, Gérard D, Mély Y. 1997. Ordered aggregation of ribonucleic acids by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Biopolymers* 41:301–312.
215. Levin JG, Guo J, Rouzina, Musier-Forsyth K. 2005. Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism, p. 217–286. *In* Academic Press.
216. Vo M-N, Barany G, Rouzina I, Musier-Forsyth K. 2009. Effect of Mg(2+) and Na(+) on the nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: implications for reverse transcription. *J. Mol. Biol.* 386:773–788.
217. Cruceanu M, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K, Rouzina I, Williams MC. 2006. Rapid kinetics of protein-nucleic acid interaction is a major component of HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function. *J. Mol. Biol.* 363:867–877.
218. Tompa P, Csermely P. 2004. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18:1169–1175.
219. Rein A. 2010. Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA Biol.* 7:700–705.
220. Wu T, Datta SAK, Mitra M, Gorelick RJ, Rein A, Levin JG. 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.
221. Feng Y-X, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A. 1999. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Has Nucleic Acid Chaperone Activity: Possible Role in Dimerization of Genomic RNA and Placement of tRNA on the Primer Binding Site. *J. Virol.* 73:4251–4256.

222. Mirambeau G, Lyonnais S, Gorelick RJ. 2010. Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA Biol* 7:85–95.
223. Mirambeau G, Lyonnais S, Coulaud D, Hameau L, Lafosse S, Jeusset J, Borde I, Reboud-Ravaux M, Restle T, Gorelick RJ, Le Cam E. 2007. HIV-1 protease and reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. *PLoS One* 2:e669.
224. Auxilien S, Keith G, Le Grice SF, Darlix JL. 1999. Role of post-transcriptional modifications of primer tRNA^{Lys,3} in the fidelity and efficacy of plus strand DNA transfer during HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* 274:4412–4420.
225. Ivanyi-Nagy R, Lavergne J-P, Gabus C, Ficheux D, Darlix J-L. 2008. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res.* 36:712–725.
226. Friedrich BM, Dziuba N, Li G, Endsley MA, Murray JL, Ferguson MR. 2011. Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus Res.* 161:101–114.
227. Muriaux D, Darlix J-L. 2010. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* 7:744–753.
228. Ott DE. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev. Med. Virol.* 12:359–374.
229. Bacharach E, Gonsky J, Alin K, Orlova M, Goff SP. 2000. The carboxy-terminal fragment of nucleolin interacts with the nucleocapsid domain of retroviral gag proteins and inhibits virion assembly. *J. Virol.* 74:11027–11039.
230. Lingappa JR, Dooher JE, Newman MA, Kiser PK, Klein KC. 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.
231. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, 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.
232. Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin JA, de La Cruz J, Nagashima K, 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.
233. Wilk T, Gowen B, Fuller SD. 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J. Virol.* 73:1931–1940.
234. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H. 2004. Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* 48:111–118.
235. Cochrane AW, McNally MT, Mouland AJ. 2006. The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology* 3:18.
236. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR. 2002. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415:88–92.

237. Dooher JE, Schneider BL, Reed JC, Lingappa JR. 2007. Host ABCE1 is at plasma membrane HIV assembly sites and its dissociation from Gag is linked to subsequent events of virus production. *Traffic Cph. Den.* 8:195–211.
238. Chatel-Chaix L, Clément J-F, Martel C, Bériault V, Gatignol A, DesGroseillers L, Mouland AJ. 2004. Identification of Staufén in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol. Cell. Biol.* 24:2637–2648.
239. Mouland AJ, Mercier J, Luo M, Bernier L, DesGroseillers L, Cohen EA. 2000. The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufén Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation. *J. Virol.* 74:5441–5451.
240. Popov S, Popova E, Inoue M, Göttinger HG. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* 82:1389–1398.
241. Krogstad P, Geng Y-Z, Rey O, Canon J, Ibarrondo FJ, Ackerson B, Patel J, Aldovini A. 2002. Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein polymorphisms modulate the infectivity of RNA packaging mutants. *Virology* 294:282–288.
242. Gladnikoff M, Shimon E, Gov NS, Rouso I. 2009. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys. J.* 97:2419–2428.
243. Gabus C, Derrington E, Leblanc P, Chnaiderman J, Dormont D, Swietnicki W, Morillas M, Surewicz WK, Marc D, Nandi P, Darlix JL. 2001. The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 276:19301–19309.
244. Leblanc P, Baas D, Darlix J-L. 2004. Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line. *J. Mol. Biol.* 337:1035–1051.
245. Perugi F, Muriaux D, Ramirez BC, Chabani S, Decroly E, Darlix J-L, Blot V, Pique C. 2009. Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Mol. Biol. Cell* 20:498–508.
246. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319:921–6.
247. Jäger S, Gulbahce N, Cimermanic P, Kane J, He N, Chou S, D’Orso I, Fernandes J, Jang G, Frankel AD, Alber T, Zhou Q, Krogan NJ. 2011. Purification and characterization of HIV–human protein complexes. *Methods San Diego Calif* 53:13–19.
248. König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK. 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135:49–60.
249. Goldschmidt V, Miller Jenkins LM, de Rocquigny H, Darlix J-L, Mély Y. 2010. The nucleocapsid protein of HIV-1 as a promising therapeutic target for antiviral drugs. *HIV Ther.* 4:179–198.

250. Rice WG, Schaeffer CA, Graham L, Bu M, McDougal JS, Orloff SL, Villinger F, Young M, Oroszlan S, Fesen MR. 1993. The site of antiviral action of 3-nitrosobenzamide on the infectivity process of human immunodeficiency virus in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:9721–9724.
251. De Rocquigny H, Shvadchak V, Avilov S, Dong CZ, Dietrich U, Darlix J-L, Mély Y. 2008. Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-HIV-1 therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* 8:24–35.
252. Musah RA. 2004. The HIV-1 nucleocapsid zinc finger protein as a target of antiretroviral therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:1605–1622.
253. Turpin JA, Schito ML, Jenkins LMM, Inman JK, Appella E. 2008. Topical microbicides: a promising approach for controlling the AIDS pandemic via retroviral zinc finger inhibitors. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 56:229–256.
254. Pannecouque C, Szafarowicz B, Volkova N, Bakulev V, Dehaen W, Mély Y, Daelemans D. 2010. Inhibition of HIV-1 replication by a bis-thiadiazolbenzene-1,2-diamine that chelates zinc ions from retroviral nucleocapsid zinc fingers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1461–1468.
255. Anzellotti AI, Liu Q, Bloemink MJ, Scarsdale JN, Farrell N. 2006. Targeting retroviral Zn finger-DNA interactions: a small-molecule approach using the electrophilic nature of trans-platinum-nucleobase compounds. *Chem. Biol.* 13:539–548.
256. Quintal SM, dePaula QA, Farrell NP. 2011. Zinc finger proteins as templates for metal ion exchange and ligand reactivity. Chemical and biological consequences. *Met. Integr. Biometal Sci.* 3:121–139.
257. Morcock DR, Thomas JA, Gagliardi TD, Gorelick RJ, Roser JD, Chertova EN, Bess JW Jr, Ott DE, Sattentau QJ, Frank I, Pope M, Lifson JD, Henderson LE, Crise BJ. 2005. Elimination of retroviral infectivity by N-ethylmaleimide with preservation of functional envelope glycoproteins. *J. Virol.* 79:1533–1542.
258. Rice WG, Turpin JA, Schaeffer CA, Graham L, Clanton D, Buckheit RW Jr, Zaharevitz D, Summers MF, Wallqvist A, Covell DG. 1996. Evaluation of selected chemotypes in coupled cellular and molecular target-based screens identifies novel HIV-1 zinc finger inhibitors. *J. Med. Chem.* 39:3606–3616.
259. Rice WG, Supko JG, Malspeis L, Buckheit RW Jr, Clanton D, Bu M, Graham L, Schaeffer CA, Turpin JA, Domagala J, Gogliotti R, Bader JP, Halliday SM, Coren L, Sowder RC 2nd, Arthur LO, Henderson LE. 1995. Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science* 270:1194–1197.
260. Sharmeen L, McQuade T, Heldsinger A, Gogliotti R, Domagala J, Gracheck S. 2001. Inhibition of the early phase of HIV replication by an isothiazolone, PD 161374. *Antiviral Res.* 49:101–114.
261. Mahmood N, Jhaumeer-Lauloo S, Sampson J, Houghton PJ. 1998. Anti-HIV activity and mechanism of action of macrocyclic diamide SRR-SB3. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:1339–1342.
262. Miller Jenkins LM, Ott DE, Hayashi R, Coren LV, Wang D, Xu Q, Schito ML, Inman JK, Appella DH, Appella E. 2010. Small-molecule inactivation of HIV-1 NCp7 by repetitive intracellular acyl transfer. *Nat. Chem. Biol.* 6:887–889.

263. Turpin JA, Song Y, Inman JK, Huang M, Wallqvist A, Maynard A, Covell DG, Rice WG, Appella E. 1999. Synthesis and biological properties of novel pyridinioalkanoyl thioesters (PATE) as anti-HIV-1 agents that target the viral nucleocapsid protein zinc fingers. *J. Med. Chem.* 42:67–86.
264. Turpin JA, Terpening SJ, Schaeffer CA, Yu G, Glover CJ, Felsted RL, Sausville EA, Rice WG. 1996. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 zinc fingers prevent normal processing of gag precursors and result in the release of noninfectious virus particles. *J. Virol.* 70:6180–6189.
265. Rice WG, Schaeffer CA, Harten B, Villinger F, South TL, Summers MF, Henderson LE, Bess JW Jr, Arthur LO, McDougal JS. 1993. Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds. *Nature* 361:473–475.
266. Witvrouw M, Balzarini J, Pannecouque C, Jhaumeer-Laulloo S, Esté JA, Schols D, Cherepanov P, Schmit JC, Debyser Z, Vandamme AM, Desmyter J, Ramadas SR, de Clercq E. 1997. SRR-SB3, a disulfide-containing macrolide that inhibits a late stage of the replicative cycle of human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:262–268.
267. Loo JA, Holler TP, Sanchez J, Gogliotti R, Maloney L, Reily MD. 1996. Biophysical characterization of zinc ejection from HIV nucleocapsid protein by anti-HIV 2,2'-dithiobis[benzamides] and benzisothiazolones. *J. Med. Chem.* 39:4313–4320.
268. Rice WG, Turpin JA, Huang M, Clanton D, Buckheit RW Jr, Covell DG, Wallqvist A, McDonnell NB, DeGuzman RN, Summers MF, Zalkow L, Bader JP, Haugwitz RD, Sausville EA. 1997. Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nat. Med.* 3:341–345.
269. Jenkins LMM, Byrd JC, Hara T, Srivastava P, Mazur SJ, Stahl SJ, Inman JK, Appella E, Omichinski JG, Legault P. 2005. Studies on the mechanism of inactivation of the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 with 2-mercaptobenzamide thioesters. *J. Med. Chem.* 48:2847–2858.
270. Vandeveld M, Witvrouw M, Schmit JC, Sprecher S, De Clercq E, Tassignon JP. 1996. ADA, a potential anti-HIV drug. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12:567–568.
271. Vercruysse T, Basta B, Dehaen W, Humbert N, Balzarini J, Debaene F, Sanglier-Cianféran S, Pannecouque C, Mély Y, Daelemans D. 2012. A phenylthiadiazolylidene-amine derivative ejects zinc from retroviral nucleocapsid zinc fingers and inactivates HIV virions. *Retrovirology* 9:95.
272. Goebel FD, Hemmer R, Schmit JC, Bogner JR, de Clercq E, Witvrouw M, Pannecouque C, Valeyev R, Vandeveld M, Margery H, Tassignon JP. 2001. Phase I/II dose escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamide in patients failing on current antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 15:33–45.
273. Turpin JA. 2003. The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental antiHIV drugs and targets. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 1:97–128.
274. Srivastava P, Schito M, Fattah RJ, Hara T, Hartman T, Buckheit RW Jr, Turpin JA, Inman JK, Appella E. 2004. Optimization of unique, uncharged thioesters as inhibitors of HIV replication. *Bioorg. Med. Chem.* 12:6437–6450.
275. Wallace GS, Cheng-Mayer C, Schito ML, Fletcher P, Miller Jenkins LM, Hayashi R, Neurath AR, Appella E, Shattock RJ. 2009. Human immunodeficiency virus type 1

- nucleocapsid inhibitors impede trans infection in cellular and explant models and protect nonhuman primates from infection. *J. Virol.* 83:9175–9182.
276. Breuer S, Chang MW, Yuan J, Torbett BE. 2012. Identification of HIV-1 inhibitors targeting the nucleocapsid protein. *J. Med. Chem.* 55:4968–4977.
 277. Stephen AG, Worthy KM, Towler E, Mikovits JA, Sei S, Roberts P, Yang Q, Akee RK, Klausmeyer P, McCloud TG, Henderson L, Rein A, Covell DG, Currens M, Shoemaker RH, Fisher RJ. 2002. Identification of HIV-1 nucleocapsid protein: nucleic acid antagonists with cellular anti-HIV activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:1228–1237.
 278. Shvadchak VV, Klymchenko AS, de Rocquigny H, Mély Y. 2009. Sensing peptide-oligonucleotide interactions by a two-color fluorescence label: application to the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res.* 37:e25.
 279. Goudreau N, Huckle O, Faucher A-M, Grand-Maître C, Lepage O, Bonneau PR, Mason SW, Titolo S. 2013. Discovery and structural characterization of a new inhibitor series of HIV-1 nucleocapsid function: NMR solution structure determination of a ternary complex involving a 2:1 inhibitor/NC stoichiometry. *J. Mol. Biol.* 425:1982–1998.
 280. Mori M, Manetti F, Botta M. 2011. Predicting the binding mode of known NCp7 inhibitors to facilitate the design of novel modulators. *J. Chem. Inf. Model.* 51:446–454.
 281. Mori M, Dietrich U, Manetti F, Botta M. 2010. Molecular dynamics and DFT study on HIV-1 nucleocapsid protein-7 in complex with viral genome. *J. Chem. Inf. Model.* 50:638–650.
 282. Mori M, Schult-Dietrich P, Szafarowicz B, Humbert N, Debaene F, Sanglier-Cianferani S, Dietrich U, Mély Y, Botta M. 2012. Use of virtual screening for discovering antiretroviral compounds interacting with the HIV-1 nucleocapsid protein. *Virus Res.* 169:377–387.
 283. Avilov SV, Boudier C, Gottikh M, Darlix J-L, Mély Y. 2012. Characterization of the inhibition mechanism of HIV-1 nucleocapsid protein chaperone activities by methylated oligoribonucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1010–1018.
 284. Grigorov B, Bocquin A, Gabus C, Avilov S, Mély Y, Agopian A, Divita G, Gottikh M, Witvrouw M, Darlix J-L. 2011. Identification of a methylated oligoribonucleotide as a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcription complex. *Nucleic Acids Res.* 39:5586–5596.
 285. Chung J, Mujeeb A, Jiang Y, Guilbert C, Pendke M, Wu Y, James TL. 2008. A small molecule, Lys-Ala-7-amido-4-methylcoumarin, facilitates RNA dimer maturation of a stem-loop 1 transcript in vitro: structure-activity relationship of the activator. *Biochemistry (Mosc.)* 47:8148–8156.
 286. Turner KB, Kohlway AS, Hagan NA, Fabris D. 2009. Noncovalent probes for the investigation of structure and dynamics of protein-nucleic acid assemblies: the case of NC-mediated dimerization of genomic RNA in HIV-1. *Biopolymers* 91:283–296.
 287. Warui DM, Baranger AM. 2009. Identification of specific small molecule ligands for stem loop 3 ribonucleic acid of the packaging signal Psi of human immunodeficiency virus-1. *J. Med. Chem.* 52:5462–5473.

288. Godet J, de Rocquigny H, Raja C, Glasser N, Ficheux D, Darlix J-L, Mély 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.
289. Sosic A, Frecentese F, Perissutti E, Sinigaglia L, Santagada V, Caliendo G, Magli E, Ciano A, Zagotto G, Parolin C, Gatto B. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of TAR and cTAR binders as HIV-1 nucleocapsid inhibitors. *MedChemComm* 4:1388–1393.
290. Dietz J, Koch J, Kaur A, Raja C, Stein S, Grez M, Pustowka A, Mensch S, Ferner J, Möller L, Bannert N, Tampé R, Divita G, Mély Y, Schwalbe H, Dietrich U. 2008. Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal Psi. *ChemMedChem* 3:749–755.
291. Ennifar E, Paillart J-C, Bodlenner A, Walter P, Weibel J-M, Aubertin A-M, Pale P, Dumas P, Marquet R. 2006. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. *Nucleic Acids Res.* 34:2328–2339.
292. Raja C, Ferner J, Dietrich U, Avilov S, Ficheux D, Darlix J-L, de Rocquigny H, Schwalbe H, Mély Y. 2006. A tryptophan-rich hexapeptide inhibits nucleic acid destabilization chaperoned by the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biochemistry (Mosc.)* 45:9254–9265.
293. Krishnamoorthy G, Roques B, Darlix J-L, Mély Y. 2003. DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acids Res.* 31:5425–5432.
294. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
295. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648–659.
296. Huang C, Tang M, Zhang M-Y, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310:1025–1028.
297. White JM. 1992. Membrane fusion. *Science* 258:917–924.
298. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263–273.
299. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* 71:3588–3596.
300. Henrich TJ, Kuritzkes DR. 2013. HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. *Curr. Opin. Virol.* 3:51–57.
301. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JSG, Piliero PJ, Trottier B, Walmsley S, Cohen C, Kuritzkes DR, Eron JJ Jr, Chung J, DeMasi R, Donatacci L, Drobnes C, Delehanty J, Salgo M, TORO 1 Study Group. 2003. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N. Engl. J. Med.* 348:2175–2185.

302. Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AIM, Lampiris H, Hirschel B, Tebas P, Raffi F, Trottier B, Bellos N, Saag M, Cooper DA, Westby M, Tawadrous M, Sullivan JF, Ridgway C, Dunne MW, Felstead S, Mayer H, van der Ryst E, MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2 Study Teams. 2008. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 359:1442–1455.
303. Hulme AE, Perez O, Hope TJ. 2011. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:9975–9980.
304. Hilditch L, Towers GJ. 2014. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr. Opin. Virol.* 4:32–36.
305. Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J. 2004. Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* 78:12800–12808.
306. Arhel N. 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7:96.
307. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prevost MC, Allen TD, Charneau P. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26:3025–37.
308. Mak J, Khorchid A, Cao Q, Huang Y, Lowy I, Parniak MA, Prasad VR, Wainberg MA, Kleiman L. 1997. Effects of mutations in Pr160gag-pol upon tRNA(Lys3) and Pr160gag-plo incorporation into HIV-1. *J. Mol. Biol.* 265:419–431.
309. Sleiman D, Goldschmidt V, Barraud P, Marquet R, Paillart J-C, Tisné C. 2012. Initiation of HIV-1 reverse transcription and functional role of nucleocapsid-mediated tRNA/viral genome interactions. *Virus Res.* 169:324–339.
310. Tisné C, Roques BP, Dardel F. 2004. The Annealing Mechanism of HIV-1 Reverse Transcription Primer onto the Viral Genome. *J. Biol. Chem.* 279:3588–3595.
311. Cen S, Huang Y, Khorchid A, Darlix JL, Wainberg MA, Kleiman L. 1999. The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA³Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J. Virol.* 73:4485–4488.
312. Chan B, Weidemaier K, Yip WT, Barbara PF, Musier-Forsyth K. 1999. Intra-tRNA distance measurements for nucleocapsid protein-independent tRNA unwinding during priming of HIV reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:459–464.
313. Hargittai MR., Mangla AT, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K. 2001. HIV-1 nucleocapsid protein zinc finger structures induce tRNA^{Lys,3} structural changes but are not critical for primer/template annealing. *J. Mol. Biol.* 312:985–997.
314. Hargittai MRS, Gorelick RJ, Rouzina I, Musier-Forsyth K. 2004. Mechanistic insights into the kinetics of HIV-1 nucleocapsid protein-facilitated tRNA annealing to the primer binding site. *J. Mol. Biol.* 337:951–968.
315. Lapadat-Tapolsky M, De Rocquigny H, Van Gent D, Roques B, Plasterk R, Darlix JL. 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.
316. Tisné C, Roques BP, Dardel F. 2001. Heteronuclear NMR studies of the interaction of tRNA(Lys)³ with HIV-1 nucleocapsid protein. *J. Mol. Biol.* 306:443–454.

317. Baudin F, Marquet R, Isel C, Darlix JL, Ehresmann B, Ehresmann C. 1993. Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J. Mol. Biol.* 229:382–397.
318. Goldschmidt V, Rigourd M, Ehresmann C, Le Grice SFJ, Ehresmann B, Marquet R. 2002. Direct and indirect contributions of RNA secondary structure elements to the initiation of HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* 277:43233–43242.
319. Isel C, Marquet R, Keith G, Ehresmann C, Ehresmann B. 1993. Modified nucleotides of tRNA(3Lys) modulate primer/template loop-loop interaction in the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* 268:25269–25272.
320. Lanchy JM, Ehresmann C, Le Grice SF, Ehresmann B, Marquet R. 1996. Binding and kinetic properties of HIV-1 reverse transcriptase markedly differ during initiation and elongation of reverse transcription. *EMBO J.* 15:7178–7187.
321. Beerens N, Berkhout B. 2002. Switching the in vitro tRNA usage of HIV-1 by simultaneous adaptation of the PBS and PAS. *RNA N. Y.* 8:357–369.
322. Beerens N, Berkhout B. 2002. The tRNA primer activation signal in the human immunodeficiency virus type 1 genome is important for initiation and processive elongation of reverse transcription. *J. Virol.* 76:2329–2339.
323. Beerens N, Groot F, Berkhout B. 2001. Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J. Biol. Chem.* 276:31247–31256.
324. Huthoff H, Bugala K, Barciszewski J, Berkhout B. 2003. On the importance of the primer activation signal for initiation of tRNA(lys3)-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 31:5186–5194.
325. Berkhout B. 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 54:1–34.
326. Darlix JL, Vincent A, Gabus C, de Rocquigny H, Roques B. 1993. Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* 316:763–771.
327. Wu T, Heilman-Miller SL, Levin JG. 2007. Effects of nucleic acid local structure and magnesium ions on minus-strand transfer mediated by the nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res.* 35:3974–3987.
328. You JC, McHenry CS. 1994. Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription. *J. Biol. Chem.* 269:31491–31495.
329. Vo M-N, Barany G, Rouzina I, Musier-Forsyth K. 2006. Mechanistic studies of mini-TAR RNA/DNA annealing in the absence and presence of HIV-1 nucleocapsid protein. *J. Mol. Biol.* 363:244–261.
330. Cosa G, Zeng Y, Liu H-W, Landes CF, Makarov DE, Musier-Forsyth K, Barbara PF. 2006. Evidence for non-two-state kinetics in the nucleocapsid protein chaperoned opening of DNA hairpins. *J. Phys. Chem. B* 110:2419–2426.
331. Cosa G, Harbron EJ, Zeng Y, Liu H-W, O'Connor DB, Eta-Hosokawa C, Musier-Forsyth K, Barbara PF. 2004. Secondary structure and secondary structure dynamics of DNA hairpins complexed with HIV-1 NC protein. *Biophys. J.* 87:2759–2767.

332. Charneau P, Alizon M, Clavel F. 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 66:2814–2820.
333. Smith CM, Smith JS, Roth MJ. 1999. RNase H requirements for the second strand transfer reaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.* 73:6573–6581.
334. Charneau P, Mirambeau G, Roux P, Paulous S, Buc H, Clavel F. 1994. HIV-1 Reverse Transcription A Termination Step at the Center of the Genome. *J. Mol. Biol.* 241:651–662.
335. Hameau L, Jeusset J, Lafosse S, Coulaud D, Delain E, Unger T, Restle T, Le Cam E, Mirambeau G. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: Dynamic terminal product of plus-strand displacement DNA synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein. *J VIROL J VIROL* 75:3301–3313.
336. Ji X, Klarmann GJ, Preston BD. 1996. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 35:132–143.
337. Bampi C, Bibillo A, Wendeler M, Divita G, Gorelick RJ, Le Grice SFJ, Darlix J-L. 2006. Nucleotide excision repair and template-independent addition by HIV-1 reverse transcriptase in the presence of nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* 281:11736–11743.
338. Bampi C, Jacquenet S, Lener D, Décimo D, Darlix J-L. 2004. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:1668–1686.
339. Klumpp K, Mirzadegan T. 2006. Recent progress in the design of small molecule inhibitors of HIV RNase H. *Curr. Pharm. Des.* 12:1909–1922.
340. Chen H, Engelman A. 1998. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:15270–15274.
341. Ciuffi A, Llano M, Poeschla E, Hoffmann C, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman F. 2005. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat. Med.* 11:1287–1289.
342. Farnet CM, Bushman FD. 1997. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88:483–492.
343. Wang H, Musier-Forsyth K, Falk C, Barbara PF. 2013. Single-molecule spectroscopic study of dynamic nanoscale DNA bending behavior of HIV-1 nucleocapsid protein. *J. Phys. Chem. B* 117:4183–4196.
344. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159:441–452.
345. Gaudin R, Alencar BC de, Arhel N, Benaroch P. 2013. HIV trafficking in host cells: motors wanted! *Trends Cell Biol.* 23:652–662.
346. Riviere L, Darlix JL, Cimarelli A. 2009. Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *J Virol* 84:729–39.

347. Kukolj G, Skalka AM. 1995. Enhanced and coordinated processing of synapsed viral DNA ends by retroviral integrases in vitro. *Genes Dev.* 9:2556–2567.
348. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. 1991. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67:1211–1221.
349. Yoder KE, Bushman FD. 2000. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J. Virol.* 74:11191–11200.
350. Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521–529.
351. Hindmarsh P, Ridky T, Reeves R, Andrade M, Skalka AM, Leis J. 1999. HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J. Virol.* 73:2994–3003.
352. Carteau S, Gorelick RJ, Bushman FD. 1999. Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *J Virol* 73:6670–9.
353. Gao K, Gorelick RJ, Johnson DG, Bushman F. 2003. Cofactors for human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration in vitro. *J Virol* 77:1598–603.
354. Poljak L, Batson SM, Ficheux D, Roques BP, Darlix JL, Kas E. 2003. Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *J Mol Biol* 329:411–21.
355. Thomas JA, Gagliardi TD, Alvord WG, Lubomirski M, Bosche WJ, Gorelick RJ. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* 353:41–51.
356. Savarino A. 2007. In-Silico docking of HIV-1 integrase inhibitors reveals a novel drug type acting on an enzyme/DNA reaction intermediate. *Retrovirology* 4:21.
357. Malet I, Calvez V, Marcelin A-G. 2012. The future of integrase inhibitors of HIV-1. *Curr. Opin. Virol.* 2:580–587.
358. Blanco J-L, Varghese V, Rhee S-Y, Gatell JM, Shafer RW. 2011. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J. Infect. Dis.* 203:1204–1214.
359. Carayon K, Leh H, Henry E, Simon F, Mouscadet J-F, Deprez E. 2010. A cooperative and specific DNA-binding mode of HIV-1 integrase depends on the nature of the metallic cofactor and involves the zinc-containing N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 38:3692–3708.
360. Christ F, Voet A, Marchand A, Nicolet S, Desimmie BA, Marchand D, Bardiot D, Van der Veken NJ, Van Remoortel B, Strelkov SV, De Maeyer M, Chaltin P, Debyser Z. 2010. Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat. Chem. Biol.* 6:442–448.
361. Yamaguchi Y, Wada T, Handa H. 1998. Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 3:9–15.
362. Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330:489–493.

363. Sloan RD, Wainberg MA. 2011. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 8:52.
364. Ruelas DS, Greene WC. 2013. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell* 155:519–529.
365. Kim YK, Bourgeois CF, Isel C, Churcher MJ, Karn J. 2002. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol. Cell. Biol.* 22:4622–4637.
366. Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM. 2004. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol. Cell. Biol.* 24:787–795.
367. Ott M, Dorr A, Hetzer-Egger C, Kaehlcke K, Schnolzer M, Henklein P, Cole P, Zhou M-M, Verdin E. 2004. Tat acetylation: a regulatory switch between early and late phases in HIV transcription elongation. *Novartis Found. Symp.* 259:182–193; discussion 193–196, 223–225.
368. Mujtaba S, He Y, Zeng L, Farooq A, Carlson JE, Ott M, Verdin E, Zhou M-M. 2002. Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol. Cell* 9:575–586.
369. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyö EM, Pavlakis GN. 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64:2519–2529.
370. Ott M, Geyer M, Zhou Q. 2011. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* 10:426–435.
371. Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rusche JR, Hauber J, Cullen BR. 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* 60:675–683.
372. Görlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 377:246–248.
373. Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M. 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr. Biol. CB* 7:767–775.
374. Kuzembayeva M, Dilley K, Sardo L, Hu W-S. 2014. Life of psi: How full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology* 454-455C:362–370.
375. Morita E, Sundquist WI. 2004. Retrovirus Budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:395–425.
376. Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW. 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331:1616–1620.
377. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszkowski DG, Sundquist WI. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55–65.

378. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. 2011. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9:235–242.
379. Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, Moriscot C, Popov S, Hinz A, Jamin M, Boyer V, Sadoul R, Forest E, Svergun DI, Göttinger HG, Weissenhorn W. 2009. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Struct. Lond. Engl.* 17:843–856.
380. Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180:389–402.
381. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD, Williams RL. 2007. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449:735–739.
382. Sadiq SK, Noé F, Fabritiis GD. 2012. Kinetic characterization of the critical step in HIV-1 protease maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201210983.
383. Freed EO. 2002. Viral late domains. *J. Virol.* 76:4679–4687.
384. Fun A, Wensing AMJ, Verheyen J, Nijhuis M. 2012. Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology* 9:63.
385. O’Carroll IP, Crist RM, Mirro J, Harvin D, Soheilian F, Kamata A, Nagashima K, Rein A. 2012. Functional redundancy in HIV-1 viral particle assembly. *J. Virol.* 86:12991–12996.
386. Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Kräusslich H-G, Eils R, Rohr K, Bräuchle C, Müller B, Lamb DC. 2009. Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* 5:e1000652.
387. Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM. 2008. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454:236–240.
388. Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD. 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4:e435.
389. Kutluay SB, Bieniasz PD. 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog.* 6:e1001200.
390. Robinson BA, Reed JC, Geary CD, Swain JV, Lingappa JR. 2014. A Temporospatial Map That Defines Specific Steps at Which Critical Surfaces in the Gag MA and CA Domains Act during Immature HIV-1 Capsid Assembly in Cells. *J. Virol.* 88:5718–5741.
391. Clever J, Sasseti C, Parslow TG. 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.
392. Zhang Y, Barklis E. 1995. Nucleocapsid Protein Effects on the Specificity of Retrovirus RNA Encapsidation. *J. Virol.* 69:5716–5722.
393. Bell NM, Kenyon JC, Balasubramanian S, Lever AML. 2012. Comparative Structural Effects of HIV-1 Gag and Nucleocapsid Proteins in Binding to and Unwinding of the Viral RNA Packaging Signal. *Biochemistry (Mosc.)* 51:3162–3169.

394. Webb JA, Jones CP, Parent LJ, Rouzina I, Musier-Forsyth K. 2013. Distinct binding interactions of HIV-1 Gag to Psi and non-Psi RNAs: implications for viral genomic RNA packaging. *RNA N. Y. N* 19:1078–1088.
395. Aldovini A, Young RA. 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.
396. Mizuno A, Ido E, Goto T, Kuwata T, Nakai M, Hayami M. 1996. Mutational analysis of two zinc finger motifs in HIV type 1 nucleocapsid proteins: effects on proteolytic processing of Gag precursors and particle formation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12:793–800.
397. Ottmann M, Gabus C, Darlix JL. 1995. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. *J. Virol.* 69:1778–1784.
398. Pappalardo L, Kerwood DJ, Pelczer I, Borer PN. 1998. Three-dimensional folding of an RNA hairpin required for packaging HIV-1. *J. Mol. Biol.* 282:801–818.
399. Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A. 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:5246–5251.
400. Hogue IB, Hoppe A, Ono A. 2009. Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Gag Interaction: Relative Contributions of the CA and NC Domains and Membrane Binding. *J Virol* 83:7322–7336.
401. Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP. 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278:849–853.
402. Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI. 1996. Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273:231–235.
403. Wills JW, Craven RC. 1991. Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS Lond. Engl.* 5:639–654.
404. Doménech R, Bocanegra R, Velázquez-Campoy A, Neira JL. 2011. The isolated major homology region of the HIV capsid protein is mainly unfolded in solution and binds to the intact protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1814:1269–1278.
405. Mammano F, Ohagen A, Höglund S, Göttlinger HG. 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* 68:4927–4936.
406. Bharat TAM, Davey NE, Ulbrich P, Riches JD, de Marco A, Rumlova M, Sachse C, Ruml T, Briggs JAG. 2012. Structure of the immature retroviral capsid at 8 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature* 487:385–389.
407. Worthylake DK, Wang H, Yoo S, Sundquist WI, Hill CP. 1999. Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55:85–92.
408. Von Schwedler UK, Stray KM, Garrus JE, Sundquist WI. 2003. Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J. Virol.* 77:5439–5450.

409. Verli H, Calazans A, Brindeiro R, Tanuri A, Guimarães JA. 2007. Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Model.* 26:62–68.
410. Bryant M, Ratner L. 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:523–527.
411. Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF. 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:517–522.
412. Chukkapalli V, Hogue IB, Boyko V, Hu W-S, Ono A. 2008. Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding. *J. Virol.* 82:2405–2417.
413. Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, Martin MA. 1994. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* 68:5311–5320.
414. Ono A, Freed EO. 1999. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J. Virol.* 73:4136–4144.
415. Paillart JC, Göttlinger HG. 1999. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J. Virol.* 73:2604–2612.
416. Saad JS, Loeliger E, Luncsford P, Liriano M, Tai J, Kim A, Miller J, Joshi A, Freed EO, Summers MF. 2007. Point mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. *J. Mol. Biol.* 366:574–585.
417. McLaughlin S, Aderem A. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20:272–276.
418. Murray PS, Li Z, Wang J, Tang CL, Honig B, Murray D. 2005. Retroviral Matrix Domains Share Electrostatic Homology: Models for Membrane Binding Function throughout the Viral Life Cycle. *Structure* 13:1521–1531.
419. Quinn PJ. 2002. Plasma membrane phospholipid asymmetry. *Subcell. Biochem.* 36:39–60.
420. Alfadhli A, Still A, Barklis E. 2009. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *J. Virol.* 83:12196–12203.
421. Gomez CY, Hope TJ. 2006. Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J. Virol.* 80:8796–8806.
422. Molle D, Segura-Morales C, Camus G, Berlioz-Torrent C, Kjems J, Basyuk E, Bertrand E. 2009. Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *J. Biol. Chem.* 284:19727–19743.
423. Chukkapalli V, Oh SJ, Ono A. 2010. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:1600–1605.
424. Lochrie MA, Waugh S, Pratt DG Jr, Clever J, Parslow TG, Polisky B. 1997. In vitro selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res.* 25:2902–2910.

425. Purohit P, Dupont S, Stevenson M, Green MR. 2001. Sequence-specific interaction between HIV-1 matrix protein and viral genomic RNA revealed by in vitro genetic selection. *RNA N. Y. N* 7:576–584.
426. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112–124.
427. Chukkapalli V, Inlora J, Todd GC, Ono A. 2013. Evidence in support of RNA-mediated inhibition of phosphatidylserine-dependent HIV-1 Gag membrane binding in cells. *J. Virol.* 87:7155–7159.
428. Datta SAK, Zhao Z, Clark PK, Tarasov S, Alexandratos JN, Campbell SJ, Kvaratskhelia M, Lebowitz J, Rein A. 2007. Interactions between HIV-1 Gag Molecules in Solution: An Inositol Phosphate-mediated Switch. *J. Mol. Biol.* 365:799–811.
429. Campbell S, Rein A. 1999. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J. Virol.* 73:2270–2279.
430. Datta SAK, Curtis JE, Ratcliff W, Clark PK, Crist RM, Lebowitz J, Krueger S, Rein A. 2007. Conformation of the HIV-1 Gag Protein in Solution. *J. Mol. Biol.* 365:812–824.
431. Munro JB, Nath A, Färber M, Datta SAK, Rein A, Rhoades E, Mothes W. 2014. A Conformational Transition Observed in Single HIV-1 Gag Molecules during In Vitro Assembly of Virus-Like Particles. *J. Virol.* 88:3577–3585.
432. Jones CP, Datta SAK, Rein A, Rouzina I, Musier-Forsyth K. 2011. Matrix domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity via inositol phosphate binding. *J. Virol.* 85:1594–1603.
433. Rein A, Datta SAK, Jones CP, Musier-Forsyth K. 2011. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem. Sci.* 36:373–380.
434. Bouamr F, Scarlata S, Carter C. 2003. Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry (Mosc.)* 42:6408–6417.
435. Datta SAK, Heinrich F, Raghunandan S, Krueger S, Curtis JE, Rein A, Nanda H. 2011. HIV-1 Gag extension: conformational changes require simultaneous interaction with membrane and nucleic acid. *J. Mol. Biol.* 406:205–214.
436. Gorter E, Grendel F. 1925. ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* 41:439–443.
437. Mouritsen OG. 2011. Lipidology and lipidomics--quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* 13:19195–19205.
438. Feigenson GW. 2007. Phase boundaries and biological membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:63–77.
439. Van Meer G. 1989. Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:247–275.
440. King G, Sharom FJ. 2012. Proteins that bind and move lipids: MsbA and NPC1. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47:75–95.
441. Hanshaw RG, Smith BD. 2005. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg. Med. Chem.* 13:5035–5042.
442. Campbell SM, Crowe SM, Mak J. 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 22:217–227.

443. Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
444. Brown DA. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiol. Bethesda Md* 21:430–439.
445. Brown DA, London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275:17221–17224.
446. Giocondi M-C, Besson F, Dosset P, Milhiet P-E, Le Grimmellec C. 2007. Temperature-dependent localization of GPI-anchored intestinal alkaline phosphatase in model rafts. *J. Mol. Recognit.* 20:531–537.
447. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW. 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457:1159–1162.
448. Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hörber JK. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148:997–1008.
449. Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K. 2002. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys. J.* 82:274–284.
450. Munro S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377–388.
451. Cai M, Zhao W, Shang X, Jiang J, Ji H, Tang Z, Wang H. 2012. Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 8:1243–1250.
452. Pike LJ. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47:1597–1598.
453. Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet P-E, Boucheix C, Rubinstein E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem. J.* 420:133–154.
454. Espenel C, Margeat E, Dosset P, Arduise C, Le Grimmellec C, Royer CA, Boucheix C, Rubinstein E, Milhiet P-E. 2008. Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J. Cell Biol.* 182:765–776.
455. Hemler ME. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:801–811.
456. Haller C, Fackler OT. 2008. HIV-1 at the immunological and T-lymphocytic virological synapse. *Biol. Chem.* 389:1253–1260.
457. Jolly C, Sattentau QJ. 2004. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic Cph. Den.* 5:643–650.
458. Levy S, Shoham T. 2005. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiol. Bethesda Md* 20:218–224.
459. Holm K, Weclawicz K, Hewson R, Suomalainen M. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J. Virol.* 77:4805–4817.

460. Nguyen DH, Hildreth JE. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* 74:3264–3272.
461. Ono A, Freed EO. 2005. Role of lipid rafts in virus replication. *Adv. Virus Res.* 64:311–358.
462. Ott. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev. Med. Virol.* 7:167–180.
463. Lindwasser OW, Resh MD. 2002. Myristoylation as a target for inhibiting HIV assembly: unsaturated fatty acids block viral budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:13037–13042.
464. Ono A, Freed EO. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:13925–13930.
465. Pickl WF, Pimentel-Muñoz FX, Seed B. 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol.* 75:7175–7183.
466. Ono A, Waheed AA, Freed EO. 2007. Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology* 360:27–35.
467. Freed EO. 2006. HIV-1 Gag: Flipped out for PI(4,5)P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:11101–11102.
468. Ono A. 2010. HIV-1 assembly at the plasma membrane. *Vaccine* 28 Suppl 2:B55–59.
469. Grigorov B, Attuil-Audenis V, Perugi F, Nedelec M, Watson S, Pique C, Darlix J-L, Conjeaud H, Muriaux D. 2009. A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* 6:28.
470. Jolly C, Sattentau QJ. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J. Virol.* 81:7873–7884.
471. Mazurov D, Heidecker G, Derse D. 2006. HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* 346:194–204.
472. Lewis BA, Engelman DM. 1983. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* 166:211–217.
473. Richter RP, Maury N, Brisson AR. 2005. On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* 21:299–304.
474. Chiantia S, Kahya N, Schwille P. 2005. Dehydration Damage of Domain-Exhibiting Supported Bilayers: An AFM Study on the Protective Effects of Disaccharides and Other Stabilizing Substances. *Langmuir* 21:6317–6323.
475. Angelova MI, Dimitrov DS. 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.
476. De Rocquigny H, Ficheux D, Gabus C, Fournié-Zaluski MC, Darlix JL, Roques BP. 1991. First large scale chemical synthesis of the 72 amino acid HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 in an active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:1010–1018.
477. Muller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Krausslich HG. 2004. Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol* 78:10803–13.

478. Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE. 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* 79:4055–65.
479. Postupalenko VY, Shvadchak VV, Duportail G, Pivovarenko VG, Klymchenko AS, Mély Y. 2011. Monitoring membrane binding and insertion of peptides by two-color fluorescent label. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:424–432.
480. Didier P, Sharma KK, Mély Y. 2011. Chapter 5. Fluorescence Techniques to Characterise Ligand Binding to Proteins, p. 156–199. *In* Podjarny, A, Dejaegere, AP, Kieffer, B (eds.), RSC Biomolecular Sciences. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
481. Minsky M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10:128–138.
482. Axelrod D, Burghardt TP, Thompson NL. 1984. Total internal reflection fluorescence. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13:247–268.
483. Hohlbein J, Gryte K, Heilemann M, Kapanidis AN. 2010. Surfing on a new wave of single-molecule fluorescence methods. *Phys. Biol.* 7:031001.
484. Hell SW, Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19:780–2.
485. Dyba M, Hell SW. 2002. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys. Rev. Lett.* 88:163901.
486. Gustafsson MG. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* 198:82–87.
487. Gustafsson MGL. 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:13081–13086.
488. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313:1642–1645.
489. Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 91:4258–4272.
490. Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. 2007. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 317:1749–53.
491. Heilemann M, van de Linde S, Schüttelpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M. 2008. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47:6172–6176.
492. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. 2006. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nat. Methods* 3:793–795.
493. Dempsey GT, Bates M, Kowtoniuk WE, Liu DR, Tsien RY, Zhuang X. 2009. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 131:18192–18193.
494. Binnig, Quate, Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930–933.
495. Starbäck P, Wraith A, Eriksson H, Larhammar D. 2000. Neuropeptide Y receptor gene y6: multiple deaths or resurrections? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277:264–269.

496. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. 1982. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296:659–660.
497. Dumont Y, Jacques D, Bouchard P, Quirion R. 1998. Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains. *J. Comp. Neurol.* 402:372–384.
498. Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R. 1992. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog. Neurobiol.* 38:125–167.
499. Chee MJS, Colmers WF. 2008. Y eat? *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 24:869–877.
500. Hökfelt T, Stanic D, Sanford SD, Gatlin JC, Nilsson I, Paratcha G, Ledda F, Fetissov S, Lindfors C, Herzog H, Johansen JE, Ubink R, Pfenninger KH. 2008. NPY and its involvement in axon guidance, neurogenesis, and feeding. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 24:860–868.
501. Thiele TE, Sparta DR, Hayes DM, Fee JR. 2004. A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. *Neuropeptides* 38:235–243.
502. Thorsell A. 2007. Neuropeptide Y (NPY) in alcohol intake and dependence. *Peptides* 28:480–483.
503. Heilig M. 2004. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 38:213–224.
504. Cleary J, Semotuk M, Levine AS. 1994. Effects of neuropeptide Y on short-term memory. *Brain Res.* 653:210–214.
505. Hökfelt T, Brumovsky P, Shi T, Pedrazzini T, Villar M. 2007. NPY and pain as seen from the histochemical side. *Peptides* 28:365–372.
506. Karl T, Herzog H. 2007. Behavioral profiling of NPY in aggression and neuropsychiatric diseases. *Peptides* 28:326–333.
507. Wheway J, Herzog H, Mackay F. 2007. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 7:1743–1752.
508. Millar RP, Newton CL. 2010. The Year In G Protein-Coupled Receptor Research. *Mol. Endocrinol.* 24:261–274.
509. Merten N, Beck-Sickinger AG. 2006. Molecular ligand-receptor interaction of the NPY/PP peptide family. *EXS* 35–62.
510. Cabrele C, Langer M, Bader R, Wieland HA, Doods HN, Zerbe O, Beck-Sickinger AG. 2000. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J. Biol. Chem.* 275:36043–36048.
511. Pedragosa-Badia X, Stichel J, Beck-Sickinger AG. 2013. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Front. Endocrinol.* 4:5.
512. Caberlotto L, Fuxe K, Sedvall G, Hurd YL. 1997. Localization of neuropeptide Y Y1 mRNA in the human brain: abundant expression in cerebral cortex and striatum. *Eur. J. Neurosci.* 9:1212–1225.
513. Hausman GJ, Barb CR, Dean RG. 2008. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: insulin-like growth factor system proteins, neuropeptide Y (NPY), NPY

- receptors, neurotrophic factors and other secreted factors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35:24–34.
514. Cabrele C, Beck-Sickinger AG. 2000. Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 6:97–122.
 515. Wharton J, Gordon L, Byrne J, Herzog H, Selbie LA, Moore K, Sullivan MH, Elder MG, Moscoso G, Taylor KM. 1993. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:687–691.
 516. Körner M, Reubi JC. 2008. Neuropeptide Y receptors in primary human brain tumors: overexpression in high-grade tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67:741–749.
 517. Körner M, Reubi JC. 2007. NPY receptors in human cancer: a review of current knowledge. *Peptides* 28:419–425.
 518. Körner M, Waser B, Reubi JC. 2008. High expression of neuropeptide Y1 receptors in ewing sarcoma tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14:5043–5049.
 519. Sautel M, Rudolf K, Wittneben H, Herzog H, Martinez R, Munoz M, Eberlein W, Engel W, Walker P, Beck-Sickinger AG. 1996. Neuropeptide Y and the nonpeptide antagonist BIBP 3226 share an overlapping binding site at the human Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 50:285–292.
 520. Sautel M, Martinez R, Munoz M, Peitsch MC, Beck-Sickinger AG, Walker P. 1995. Role of a hydrophobic pocket of the human Y1 neuropeptide Y receptor in ligand binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* 112:215–222.
 521. Sjödin P, Holmberg SKS, Akerberg H, Berglund MM, Mohell N, Larhammar D. 2006. Re-evaluation of receptor-ligand interactions of the human neuropeptide Y receptor Y1: a site-directed mutagenesis study. *Biochem. J.* 393:161–169.
 522. Merten N, Lindner D, Rabe N, Römpler H, Mörl K, Schöneberg T, Beck-Sickinger AG. 2007. Receptor subtype-specific docking of Asp6.59 with C-terminal arginine residues in Y receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 282:7543–7551.
 523. Kanno T, Kanatani A, Keen SL, Arai-Otsuki S, Haga Y, Iwama T, Ishihara A, Sakuraba A, Iwaasa H, Hirose M, Morishima H, Fukami T, Ihara M. 2001. Different binding sites for the neuropeptide Y Y1 antagonists 1229U91 and J-104870 on human Y1 receptors. *Peptides* 22:405–413.
 524. Babilon S, Mörl K, Beck-Sickinger AG. 2013. Towards improved receptor targeting: anterograde transport, internalization and postendocytic trafficking of neuropeptide Y receptors. *Biol. Chem.* 394:921–936.
 525. Gicquiaux H, Lecat S, Gaire M, Dieterlen A, Mely Y, Takeda K, Bucher B, Galzi JL. 2002. Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. *J Biol Chem* 277:6645–55.
 526. Lecat S, Ouedraogo M, Cherrier T, Noulet F, Ronde P, Glasser N, Galzi JL, Mely Y, Takeda K, Bucher B. 2011. Contribution of a tyrosine-based motif to cellular trafficking of wild-type and truncated NPY Y(1) receptors. *Cell Signal* 23:228–38.
 527. Ouedraogo M, Lecat S, Rochdi MD, Hachet-Haas M, Matthes H, Gicquiaux H, Verrier S, Gaire M, Glasser N, Mely Y, Takeda K, Bouvier M, Galzi JL, Bucher B. 2008.

- Distinct motifs of neuropeptide Y receptors differentially regulate trafficking and desensitization. *Traffic* 9:305–24.
528. Willingham MC, Pastan I. 1984. Endocytosis and membrane traffic in cultured cells. *Recent Prog. Horm. Res.* 40:569–587.
 529. Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E, Larkin JM, Miller LJ. 1995. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell Biol.* 128:1029–1041.
 530. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. 2012. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1820:264–281.
 531. Kirkham M, Parton RG. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1746:349–363.
 532. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 123:305–320.
 533. Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. 2011. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biol.* 9.
 534. Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
 535. Marsh M, McMahon HT. 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285:215–220.
 536. Robinson MS. 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:538–544.
 537. Godlee C, Kaksonen M. 2013. Review series: From uncertain beginnings: initiation mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 203:717–725.
 538. Schmid EM, Ford MGJ, Burtey A, Praefcke GJK, Peak-Chew S-Y, Mills IG, Benmerah A, McMahon HT. 2006. Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol.* 4:e262.
 539. Edeling MA, Smith C, Owen D. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:32–44.
 540. Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T. 2004. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* 432:649–653.
 541. Schein S. 2009. Architecture of Clathrin Fullerene Cages Reflects a Geometric Constraint—the Head-to-Tail Exclusion Rule—and a Preference for Asymmetry. *J. Mol. Biol.* 387:363–375.
 542. Praefcke GJK, McMahon HT. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:133–147.
 543. Abe N, Inoue T, Galvez T, Klein L, Meyer T. 2008. Dissecting the role of PtdIns(4,5)P₂ in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 121:1488–1494.
 544. Haucke V. 2005. Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1285–1289.

- 545. Rohde G, Wenzel D, Haucke V. 2002. A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 158:209–214.
- 546. Doherty GJ, McMahon HT. 2009. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78:857–902.
- 547. Ritter SL, Hall RA. 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:819–830.
- 548. McKinstry WJ, Hijnen M, Tanwar HS, Sparrow LG, Nagarajan S, Pham ST, Mak J. 2014. Expression and purification of soluble recombinant full length HIV-1 Pr55(Gag) protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 100C:10–18.
- 549. Oberleithner H, Brinckmann E, Schwab A, Krohne G. 1994. Imaging nuclear pores of aldosterone-sensitive kidney cells by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9784–9788.

Résumé : Le VIH-1 a la capacité de développer des résistances aux traitements antirétroviraux actuels. Il est donc indispensable de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques dont le ciblage n'entraînera peu ou pas de développement de résistances. La protéine de la nucléocapside NCp7 est une cible intéressante car c'est une protéine très conservée qui intervient lors de nombreuses étapes du cycle réplcatif du VIH-1, notamment en interagissant avec les acides nucléiques grâce à ses propriétés chaperonnes. Plus récemment, les recherches se sont concentrées sur de nouvelles fonctions possibles de NCp7 par le biais de ses interactions avec des protéines cellulaires. Par contre, très peu de données existent à l'heure actuelle concernant une interaction potentielle de NCp7 avec les membranes lipidiques. Il a récemment été montré que, lors de l'assemblage des virions, le précurseur Gag adopterait une conformation repliée qui permettrait à son domaine NC d'interagir avec la membrane plasmique. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'une interaction du domaine NC avec les membranes lipidiques. Pour s'affranchir des contributions des autres domaines de Gag, nous avons utilisé la protéine NCp7 sous sa forme mature, marquée en son extrémité N-terminale par une sonde fluorescente sensible à la polarité et à l'hydratation de son environnement. Nos résultats indiquent que NCp7 se lie aux membranes lipidiques chargées négativement avec une forte affinité. Nous avons également observé que la NCp7 possède la capacité de recruter les lipides chargés négativement de manière à optimiser sa liaison sur la membrane. NCp7 étant lié à l'ARN génomique durant l'assemblage, nous avons répété ces expériences avec des complexes NCp7/oligonucléotide et trouvé des résultats similaires, confirmant une possible contribution du domaine NC dans la liaison de Gag à la membrane plasmique. Par ailleurs, nous avons montré par des techniques avancées d'imagerie que NCp7, libre ou en complexe avec des acides nucléiques, peut également déstabiliser les membranes lipidiques. Finalement, en utilisant un système modèle basé sur l'internalisation d'un système récepteur/ligand, nous avons mis au point les conditions de travail pour la poursuite de cette étude en microscopie super-résolutive. Notre étude ouvre la voie à des recherches qui permettront de compléter les connaissances des étapes du cycle réplcatif du VIH-1 impliquant les membranes cellulaires.

Abstract: HIV-1 is able to develop variants that are resistant to all current antiviral therapeutics. Therefore, there is a strong request to find new therapeutic targets that would raise less resistance. The nucleocapsid protein NCp7 is undoubtedly an interesting target since it is highly conserved and plays a key role in numerous steps of the HIV-1 replication cycle, notably through its nucleic acid chaperone properties. Recent efforts have been focused to elucidate new functions of NCp7 that rely on its interactions with various host proteins. In contrast, only few data are currently available on the possible interaction of NCp7 with lipid membranes. Interestingly, it has been recently shown that during assembly, the Gag precursor can adopt a bent conformation where the NC domain may interact with the plasma membrane. In order to check this hypothesis, our objective was to characterize the possible interaction of the NC domain with lipid membranes. To avoid the interference of the other domains of Gag in the binding process, we used the mature NCp7 N-terminally labelled with a fluorescent dye highly sensitive to the polarity and hydration of its environment. Our data indicated that the NCp7 protein binds to negatively charged lipid membrane with high affinity. Interestingly, we also observed that NCp7 can recruit negatively charged lipids to optimize its binding to lipid membranes. Since the NC domain of Gag is mainly bound to genomic RNA, we repeated these experiments with NCp7/oligonucleotides complexes and found similar results giving more credit to the possible contribution of the NC domain in the binding of Gag to the plasma membrane. Moreover, we further characterized by advanced imaging techniques, the interaction of NCp7, in its free form or in complex with nucleic acids, with lipid membranes, and highlighted the ability of this protein to destabilize negatively charged lipid membranes at high concentrations. Finally, by using a receptor/ligand model system we established the working conditions to investigate Gag/membrane interactions by high resolution microscopy. Thus, our study constitutes a starting point for further research projects that will allow completing our knowledge on HIV-1 replication steps involving cellular membranes.